PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 4
G01N 33/577, 33/573, A61K 39/395
C12P 21/00, C07K 15/04

A1

(11) 国際公開番号 WO 87/03377

(43) 国際公開日 1987年6月4日 (04.06.87)

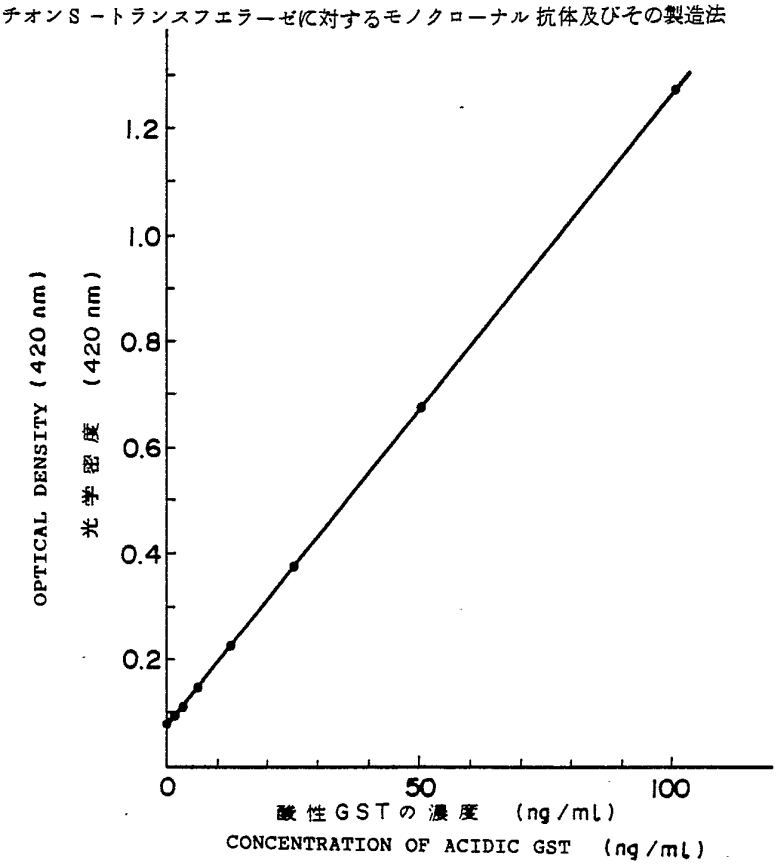
(21) 国際出願番号 PCT/JP86/00592
(22) 国際出願日 1986年11月19日 (19. 11. 86)
(31) 優先権主張番号 特願昭60-259858
(32) 優先日 1985年11月21日 (21. 11. 85)
(33) 優先権主張国 JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)
帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED)〔JP/JP〕
〒541 大阪府大阪市東区南本町1丁目11番地 Osaka, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人 (米国についてのみ)
漆崎一朗 (URUSHIZAKI, Ichiro)〔JP/JP〕
〒064 北海道札幌市中央区双子山2丁目4番3号 Hokkaido, (JP)
新津洋司郎 (NIITSU, Yoshiro)〔JP/JP〕
〒064 北海道札幌市中央区大通西15丁目大通ハイム601号
Hokkaido, (JP)
丸山 裕 (MARUYAMA, Hiroshi)〔JP/JP〕
〒042 北海道函館市深堀町2丁目18番503号 Hokkaido, (JP)
鈴木英明 (SUZUKI, Hideaki)〔JP/JP〕
〒184 東京都小金井市桜町2丁目7番18号 Tokyo, (JP)
細田健治 (HOSODA, Kenji)〔JP/JP〕
〒350 埼玉県川越市旭町3丁目3番12号 Saitama, (JP)
本田仁美 (HONDA, Hitomi)〔JP/JP〕
〒191 東京都日野市多摩平3丁目18番4号 Tokyo, (JP)
増保安彦 (MASUHO, Yasuhiko)〔JP/JP〕
〒191 東京都日野市多摩平5丁目20番2号 Tokyo, (JP)
(74) 代理人
弁理士 前田純博 (MAYEDA, Sumihiro)
〒100 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号
帝人株式会社 特許部内 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許),
GB (欧州特許), JP, NL (欧州特許), US.
添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND PROCESS FOR ITS PREPARATION

(54) 発明の名称 グルタチオンS－トランスフエラーゼに対するモノクローナル抗体及びその製造法



(57) Abstract

A monoclonal antibody against acidic human glutathione S-transferase. It can be utilized as a diagnostic agent for liver, stomach, or blood cancer.

(57)要約

ヒトの酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼに対するモノクローナル抗体。このモノクローナル抗体は、肝癌，胃癌あるいは血液癌の診断薬として利用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CM カメルーン
DE 西ドイツ
DK デンマーク
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
HU ハンガリー
IT イタリー
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリー
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウエー
RO ルーマニア
SD スーダン
SE スウエーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャード
TG トーゴ
US 米国

明　　細　　書

発明の名称

グルタチオンＳ－トランスフェラーゼに対する
モノクローナル抗体及びその製造法

技術分野

本発明は、例えば、肝癌や胃癌等の診断試薬として使用できる、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（以下ＧＳＴと略記する）を認識するモノクローナル抗体とその製造法に関する。

背景技術

ＧＳＴは、生体に侵入する各種物質あるいは生体内で生じる類縁物質（以下基質という）と、還元型グルタチオンとの抱合（反応）を触媒する解毒酵素として知られている。基質の多くは、生体内の蛋白質や核酸などと反応して種々の病変（例えば発癌）の原因になるものであるが、これらの基質の反応性はこの抱合により中和され、より水溶性の生成物となり肝臓などで代謝され、最終的には体外に排泄される。

ＧＳＴは哺乳動物を含む多くの生物種に存在しており、特に肝臓，脾臓，腎臓，肺臓，脳，骨格筋，胎盤，小腸等に多く含まれており、その他皮膚，赤血球，白血球等にも微量存在している。一般にＧＳＴは多種の酵素からなっており、種特異性があるだけでなく、臓器又は組織

特異性も有している。

ヒトの場合は塩基性ＧＳＴと酸性ＧＳＴが知られている（例えばThe Journal of Biological Chemistry Vol. 259, No.20, pp 12444－ 12448及びpp 12449－ 12455（1984））。塩基性ＧＳＴは等電点（ｐＩ）が７～９で２つのサブユニットから成り、各サブユニットの分子量は約23,000である。酸性ＧＳＴは等電点（ｐＩ）が４～５で、２つのサブユニットから成り、各サブユニットの分子量は約22,000である。塩基性ＧＳＴは健常な成人の肝臓に主として存在し、その他腎臓，睾丸，小腸，脳，肺臓等にも存在する。一方、酸性ＧＳＴは、健常な成人の肝臓にはほとんど存在せず、新生児の肝臓，胎盤，肝癌細胞，胃癌細胞等の増殖性細胞や赤血球，白血球等に存在する。そして、増殖性細胞が産生する酸性ＧＳＴは血中に遊離してくるので、これは肝癌，胃癌，大腸癌食道癌，膵癌等の消化器癌あるいは血液癌，リンパ種等の血液癌に特異性の高い腫瘍マーカーとして利用できる可能性がある。

発明の開示

本発明者らは、前述の如き腫瘍マーカーを精確に検出し得るモノクローナル抗体を得るべく鋭意研究を行ない、本発明に到達した。

本発明は、ヒトの酸性ＧＳＴに対するモノクローナル抗体である。ヒトの酸性ＧＳＴでも、それが産生される

臓器又は組織によって若干の構造の違いがあることが予想されるが、癌の診断のマーカーとして有用なものは、新生児の肝臓，胎盤，赤血球，肝癌細胞，胃癌細胞等の増殖性細胞が産生する酸性ＧＳＴである。従って、本発明においては、かかる酸性ＧＳＴを共通的に認識する（例えば共通のサブユニットを認識する）モノクローナル抗体が望ましい。しかもＩｇＧ型のマウス抗体が好ましい。また、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトの塩基性ＧＳＴとの交差反応を示されないという特徴も有する。

本発明は、また、かかるモノクローナル抗体を用いる酸性ＧＳＴの測定方法，及びそれに使用する試薬キットも含むものである。

図面の簡単な説明

第１図は、酸性ＧＳＴ濃度と光学密度（420nm）の関係を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のモノクローナル抗体は、好ましくはヒトの酸性ＧＳＴで免疫された動物の抗体産生細胞と、ミエローマ細胞とを融合させることによって、酸性ＧＳＴを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得、次いで、このハイブリドーマ及び／又はそれに由来する細胞株を培養し、培養物からヒトの酸性ＧＳＴに対するモノクローナル抗体を採取することによって得られる。

本発明におけるヒトの酸性ＧＳＴは、分子量が共に約22,000の２つのサブユニットから構成され、ソジウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）で単一のバンドを示し、等電点（ｐＩ）が４～５のものである。これらの条件を満足する限り、種々のアイソザイムが本発明におけるヒトの酸性ＧＳＴに含まれる。

ヒトの酸性ＧＳＴを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、手法それ自体は公知である細胞融合法によって製造することができる。まず、ヒトの酸性ＧＳＴでサル，ウマ，ウシ，ヤギ，ヒツジ，ウサギ，ラット，マウス等の動物を免疫し、次いでこれらの動物の脾臓やリンパ節等から抗体産生細胞（リンパ球）を採取し、そして、この細胞をヒト又は動物のミエローマ細胞と融合させる。ミエローマ細胞としてはマウスのミエローマ細胞を用いるのが便利であり、これらの例としては、ＢＡＬＢ／ＣマウスのＰ３－Ｘ63－Ａg8，Ｐ３－Ｘ63－Ａg8－Ｕ１，Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａg4－１，Ｐ３－Ｘ63－Ａg8－６.５.３，ＳＰ２／０－Ａg14，ＦＯ，ＭＰＣ11－45.6ＴＧ１.7などがある。

細胞融合の条件は、例えば次の通りである。抗体産生細胞とミエローマ細胞を10：１～１～10，好ましくは１：１～１：３の比率で混合し、適当な細胞融合用溶液、例えば約35％ポリエレチングリコール（分子量 1,000～

6,000程度）および約 7.5%ジメチルスルホキシドを含むＲＰＭＩ1640を加えて、室温～37℃で１～数分間撹拌し、その後10%牛胎児血清加ＲＰＭＩ1640で徐々に希釈し、洗浄の後ＨＡＴ（ヒポキサンチンーアミノプテリンーチミジン）選択培養液にて細胞濃度が１～５×10^5 個／mlとなるように調整する。これを 0.2mlずつ、例えば96穴プレートに分注し、５％CO_2 を含む空気中35～38℃で２～３週間培養する。ＨＡＴ培養液中ではハイブリドーマのみが生存し、８－アザグアニン耐性のミエローマ細胞及びミエローマ同士の融合細胞は生存し得ない（未融合の抗体産生細胞は数日で死滅する）。次に、このハイブリドーマ集落から、ヒトの酸性ＧＳＴに対し特異的なモノクローナル抗体を分泌するものだけ選別する。この選別工程（スクリーニング）は、それぞれのハイブリドーマより産生されたモノクローナル抗体が、目的とする酸性ＧＳＴと抗原抗体反応をするか否かを酵素抗体法（ＥＬＩＳＡ）で調べることによって行なう事ができる。目的とするモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、次にクローニングによりクローン化細胞にしなくてはならない。この工程は、具体的には限界希釈法を用いて行う事ができる。約２～３週間後、96穴のプレート中で生育したコロニーを拾い、再びＥＬＩＳＡでヒトの酸性ＧＳＴに対する抗体活性を調べ、選別したハイブリドーマを培養して、所望の酸性ＧＳＴに特異的なモ

ノクローナル抗体を生成せる。

モノクローナル抗体を得るためのもう一つの方法は、抗体産生細胞にエプスタイン・バー・ウイルス（Epstein-Barr Virus，以下E-Bウイルスと略称する）を感染させて形質転換細胞を作成し、該形質転換細胞及び／又はそれに由来する細胞株を培養し、培養物からヒトの酸性GSTに結合する性質を有するモノクローナル抗体を採取する方法である。

E-Bウイルスは、バーキットリンパ腫や鼻咽頭ガンの原因ウイルスとされている、ヘルペスウイルス群に属するウイルスである。抗体産生細胞をE-Bウイルスに感染させ、約2～3週間，5％CO_2インキュベータで培養し、多くの異質集落から成る形質転換細胞（トランスフォームドセル）を形成させる。次に、この形質転換細胞から、酸性GSTに対し特異的なモノクローナル抗体を分泌するものだけを、前記と同様な方法で選別する。そして、前記と同様にして、クローン化された形質転換細胞を得ることができる。

次に、本発明においては、選択したハイブリドーマ又は形質転換細胞を培養して、所望の特異的モノクローナル抗体を生成させる。クローニングによって選択された、ヒトの酸性GSTを認識する抗体を産生するハイブリドーマ又は形質転換細胞は凍結して保存することができ、これを適当な方法で大量に培養することもできる。そし

て、培養上清から酸性ＧＳＴに特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。また、かかる細胞を動物に移植して腫瘍化し、その腹水や血清から目的とする抗体を得ることもできる。本発明のモノクローナル抗体の精製は、プロテインＡ等を用いるアフィニテイクロマトグラフィー等の方法によって行なわれる。

本発明で得られたヒトの酸性ＧＳＴに対するモノクローナル抗体は、消化器癌等の腫瘍マーカーとしての性質を有する酸性ＧＳＴの測定に利用できるのを初めとし、癌細胞組織の組織染色，放射性標識によりイメージングによる癌の体内診断，更には制癌剤等と結合することにより癌の治療等に利用することが可能である。

本発明によるヒトの酸性ＧＳＴに対するモノクローナル抗体を用いヒトの酸性ＧＳＴを測定する方法としては、不溶性担体に結合した抗体（以下これを“固定化抗体”という）と標識抗体とによってヒト酸性ＧＳＴを反応させて、生成したサンドイッチ錯体を標識物によって検出するサンドイッチ法（Ｓandwich Ｍethod ）また、標識ヒト酸性ＧＳＴと検体中のヒト酸性ＧＳＴとを、抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト酸性ＧＳＴを測定する競合法（Ｃompetitive Ｍethod ）等で、検体中のヒト酸性ＧＳＴを測定することができる。

また、サンドイッチ法によるヒト酸性ＧＳＴの測定に

おいては、先ず、固定化抗体とヒト酸性ＧＳＴとを反応させた後、未反応物を洗浄によって安全に除去してから、標識抗体を添加して固定化抗体－ヒト酸性ＧＳＴ－標識抗体の三者からなるサンドイッチ錯体を形成させる方法（２ステップ法），或いは固定化抗体，標識抗体及びヒト酸性ＧＳＴを同時に混合して反応させることにより一度にサンドイッチ錯体を形成させる方法（１ステップ法、又はＳimultaneons Ａssay Ｍethod ）等を用いることができる。

本発明の測定方法に使用される不溶性担体としては、例えばポリスチレン，ポリエチレン，ポリプロピレン，ポリ塩化ビニル，ポリエステル，ポリアクリル酸エステル，ナイロン，ポリアセタール，弗素樹脂等の合成樹脂，セルロース，アガロース等の多糖類，ガラス，金属等が挙げられる。

不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状，球状，繊維状，棒状，盤状，容器状，セル，試験管などの種々の形状を用いることができる。

標識物質としては、酵素，螢光物質，発光物質及び放射性物質等を使用するのが有利である。酵素としては、ペルオキシダーゼ，アルカリフォスファターゼ，β－Ｄ－ガラクトシダーゼ，螢光物質としてはフルオレッセインイソチオシアネート，フイコビリプロティン等，発光物質としてはイソルシノール，ルシゲニン等，そして放

射性物質としは ^{125}I，^{131}I，^{14}C，^{3}H 等を用いることができるが、これらは例示したものに限らず、免疫学的測定法に使用し得るものであれば、他のものでも使用できる。

標識剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。

酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として H_2O_2 を用い、発色剤として 2,2′－アジノジ－［3－エチルベンズチアゾリンスルホン酸］アンモニウム塩（ＡＢＴＳ），5－アミノサリチル酸，Ｏ－フェニレンジアミン，4－アミノアンチピリン，3,3′，5,5′－テトラメチルベンジン等，酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてＯ－ニトロフェニルフォスフェート等，酵素にβ－Ｄ－ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセインージー（β－Ｄ－ガラクトピラノシド），4－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド等を用いることができる。

本発明は、また、前述したような抗体及び試薬類のキット化したものも、その範囲に含むものである。この好ましい例は、(1)ヒト酸性ＧＳＴを認識する固定化抗体と、(2)ヒト酸性ＧＳＴを認識するが固定化抗体とは異なる抗原部位と結合する標識抗体と、(3)必要により、該標識化抗体の検出試薬を主要構成成分とし、更に測定に必要で

あれば、これらの試薬以外にも溶解剤，洗浄剤，反応停止剤等の公知の試薬を構成成分とする、免疫学的方法により血清等の体液中に存在するヒト酸性ＧＳＴを測定するための試薬キットである。

以下、実施例により本発明を詳述する。

実施例１

(1) 酸性ＧＳＴの分離精製

ヒト胎盤を 0.25 Ｍシュークロース、10 mMリン酸緩衝液（ pH 7.4）中で細切りした後、ホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネートを、10,000 xg で４℃において30分間遠心分離し、上清を採取した。次いで、この上清を、更に100,000 xg で４℃において１時間遠心分離を行なって、上清を採取した。この上清を10 mMリン酸緩衝液（ pH 6.8）を用いて透析した後、透析内液をこの緩衝液で平衡化したＣＭセルロース充填カラムに通じて、非吸着分画を採取した。次に、この分画を還元型グルタチオン固定セファロースを充填したカラムに通じて、酸性ＧＳＴを吸着させた後、10 mMリン酸緩衝液（ pH 7.4）でカラムを洗浄し、流出液の紫外吸収スペクトルにおける280nm の吸収強度が 0.02 以下になった時点で、還元型グルタチオン含有トリス緩衝液（ pH 8.0）をカラムに通液して、吸着物を溶出させた。この溶出液を

限外濾過した後、10 mMリン酸緩衝生理的食塩水（ＰＢＳ）（ pH 7.4）を用いて、セファデックスＧ－100（ファルマシア社）カラムによりゲル濾過することによって、酸性ＧＳＴを含有する画分を得た。この画分を、再度限外濾過により濃縮した後、等電点電気泳動カラム（ＬＫＢ社製）を用い、濃度勾配作成にシュークロースを、 pH勾配作成にアンフォライン（ファルマシア社製： pH 3.5～10）を使用してカラム等電点電気泳動（ pH 3.5～10）を行ない、精製した酸性ＧＳＴを含有する画分を得た。

(2) 抗体の作製

前記の如くしてヒト胎盤から抽出，採取した酸性ＧＳＴを、フロイント完全アジュバンドに乳化し、７週齢のＢＡＬＢ／Ｃマウスの腹腔に 100㎎／匹の量を投与した。そして、15日後に、マウスに追加免疫を初回と同様の方法で行なった。次に、１０日後に血中に抗体量が増大したことを確認して、更に７日後に抗原を100㎎／匹の量で静注により投与した。

一方、15％の牛胎児血清を添加したＲＰＭＩ1640（ギブコ社製）で、ミエローマ細胞Ｐ３－Ｘ63－Ａg8－Ｕ１を維持培養しておいた。最終免疫の３日後、マウスから採取した脾臓細胞とＰ３Ｕ１を、Ｏｉ等の方法（Ｓelective methods in cellular immunology 1980, 351～ 372，参照）によりポリエチレングリコ

ール4000を用い細胞融合させ、96穴マイクロプレートにまいた。細胞融合後、培地を 100μMヒポキサンチン，0.4μMアミノプテリン，16μMチミジンを添加したＲＰＭＩ培地（ＨＡＴ培地）に置き換えた。ＨＡＴ培地で培養中２～３週間で脾臓細胞とミエローマ細胞のハイブリドーマのみが生育した。ハイブリドーマの培養液中の抗体活性を、以下に述べるＥＬＩＳＡで調べた。

(3) 抗体のスクリーニング

酸性ＧＳＴをＥＬＩＳＡ用のプレートに付着させ、10 mMリン酸生理食塩液（ pH 7.4）に３％（Ｗ／Ｖ）の牛血清アルブミン（ＢＳＡ）を添加した液でブロッキングを行なった。ブロッキング後、ハイブリドーマ培養液50㎖をＥＬＩＳＡプレートに添加し、室温で２時間放置した。その後、ハイブリドーマ培養液を除去して洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識山羊抗マウスＩｇＧ－Ｆｃ特異抗体（２㎎／㎖） 100㎖を添加し、3℃で 1.5時間反応させた。更に、この酵素標識抗体溶液を除去した後、洗浄し、 0.05 % 2,2′－アジノジー［３－エチルベンツチアゾリンスルフォネート(6)］（ＡＢＴＳ），0.0034 %H_2O_2，0.1Mクエン酸緩衝液（ pH 4.6）を 200㎖添加して発色させることにより検出した。

(4) クローニング及びモノクローナル抗体の作製

酸性ＧＳＴに対する抗体を産生するハイブリドーマ培養液を選別し、更に限界希釈法によるクローニングを行ない、最終的に単一クローンのハイブリドーマ４種を得た。このハイブリドーマを、夫々、プリスタン投与ＢＡＬＢ／Ｃマウスの腹腔に投与して増殖させ、モノクローナル抗体を含む腹水を得た。得られた腹水に50％飽和硫安を加え、抗体を沈澱させ、この沈澱物を 0.1Mリン酸生理食塩液（ pH 8.0）に溶解させた。そして透析後、プロテインＡ－セファロースＣＬ４Ｂカラム（ファルマシア社製）にかけ、抗体を 0.2Mグリシン－塩酸緩衝液（ pH 3.0）で溶出し、中和して精製した。

４種類のハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体を、夫々２Ｆ，５Ｆ，２Ｈ，６Ａと命名した。

(5) モノクローナル抗体の性質

後述の如きウエスタンブロッティング（Western - blotting）法で４種のモノクローナル抗体は、ヒト胎児由来ＧＳＴを認識した。また、ＥＬＩＳＡ用プレート固定した酸性ＧＳＴに対して、ビオチン化した第一の抗体と非標識の第二の抗体を共存させて反応させるインヒビション・アッセイ（Ｉnhibition assay ）法により、いずれの２つの組み合せにおいてもビオチン化抗体の反応量に変化がないことより、４種のモノクローナル抗体はいずれも互に異なるエピトープ（抗原

部位）を認識することが示された。

これらの抗体は、ヒトの塩基性ＧＳＴとは反応せず、また健常人の血清とも反応しなかった。

(6) ウエスタンブロッティング法

モノクローナル抗体に特異的な抗原を、Towbing等の方法（Pro. N. A. S. 76 4350～4354）によるウエスタンブロッティング法を用いて固定した。

最初にヒト胎児由来酸性ＧＳＴを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後電解液バッファーを25 mMグリシン，20%（Ｖ／Ｖ）メタノールを用い、電圧傾斜が７Ｖ／㎝，２時間の条件でスラブ（Ｓlab）ゲルからニトロセルロースシートへ蛋白を移した。ニトロセルロースシートの各レーンを切り離し、片一方のシートをアミドブラックで蛋白染色を行ない、他方は次の様な酵素免疫アッセイを行なった。

３%（Ｗ／Ｖ）ＢＳＡ／ＰＢＳでブロッキング後、１次抗体としてモノクローナル抗体（２Ｆまたは５Ｆ）を加えた。２次抗体としてペルオキシダーゼ標識山羊抗マウスＩｇＧ－Ｆc 特異抗体を加えた後、洗浄、0.04 % 3,3′－ジアミノベンジジン，0.0034 % H_2O_2，0.01 ＭＰＢＳからなる基質溶液を加えて発色させることにより検出し固定した。

実施例２　酸性ＧＳＴの測定法

(1) モノクローナル抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ（直径６㎜）をよく洗浄してから、モノクローナル抗体２Ｈの20μｇ／㎖の濃度を有するＰＢＳ（ｐＨ 7.4）溶液中に４℃の温度で１昼夜放置した後、ＰＢＳで洗浄し、0.5％ＢＳＡ水溶液中に４℃の温度で１昼夜放置してポストコーティング処理を実施して、モノクローナル抗体固定化ビーズを得た。

(2) ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体６Ａの 1.0㎎／㎖のＰＢＳ溶液に、Ｎ－（ｍ－マレイミド安息香酸）－Ｎ－サクシンイミドエステル（ＭＢＳ）の10㎎／㎖の濃度のジメチルホルムアミド溶液50㎖を添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いでセファデックスＧ－25を充填したカラムを用い、0.1Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ 6.0）でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応ＭＢＳとを分離した。

一方、ホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）の 1.0㎎／㎖のＰＢＳ溶液に、Ｎ－サクシンイミジル－３－（２－ピリジルチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）の10㎎／㎖の濃度のエタノール溶液を添加し、25℃で30分間反応させた。次いで、セファデックスＧ－25を充填したカラムを用い、0.01Ｍ酢酸緩衝液

（ pH 4.5）でゲル濾過して精製し、ピリジルジスルフィド化ＨＲＰを含有する画分を採集し、これをコロジオンバック中において氷冷下に約10倍に濃縮した。次に、これに 0.85 %ＮａＣℓと 0.1Mジチオスレイトールとを含有する 0.1M酢酸緩衝液（ pH 4.5）1 mℓを添加して、25℃で30分間撹拌してＨＲＰ分子中に導入したピリジルジスフィド基を還元した後、セファデックスＧ－25カラムにかけてゲル濾過し、チオール化ＨＲＰを含有する画分を得た。

次に、マレイミド化モノクローナル抗体とチオール化ＨＲＰとを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に４mg／mℓの蛋白質濃度まで濃縮し、４℃で１昼夜放置した。その後、ウルトロゲルＡｃ Ａ44（ＬＫＢ社）を充填したカラムでゲル濾過し、ＨＲＰ標識モノクローナル抗体を得た。

(3) 同時サンドイッチ酵素免疫測定法による酸性ＧＳＴの測定法

モノクローナル抗体２Ｈを固定化したビーズ各１個と、精製した酸性ＧＳＴ（標準物質）を 1.0mg／mℓ～100mg／mℓの範囲で含有する 0.5%ＢＳＡ含有ＰＢＳ溶液（ pH 7.4） 200μℓとＨＲＰ標識モノクローナル抗体６Ａを含有する 0.5%ＢＳＡ含有ＰＢＳ溶液（ pH 7.4）20μℓとを、それぞれ試験管に添加して37℃の温度で４時間インキュベートした。次に、試験

管内の溶液を吸引除去した後、ＰＢＳで洗浄してから、2,2′－アジノジ－［３－エチルベンズチアゾリンスルホン酸］アンモニウム塩（ＡＢＴＳ）0.05％，過酸化水素 0.003％を含有する 0.1Mリン酸－クエン酸緩衝液（ pH 4.5）を 0.5㎖ずつ各試験管内に加え、37℃の温度で30分間インキュベートした後、反応停止剤として 0.2Mシュウ酸水溶液を１㎖ずつ加えて酵素反応を停止させた。

次いで、この溶液を分光光度計を用いて420nm の波長の吸収強度を測定し、これを標準物質濃度に対してプロットすることにより濃度依存性の良い検量線を得た。結果は第１図に示した。

(4) 臨床検体中の酸性ＧＳＴの測定

健常人及び大腸癌患者の血清を採取し、この血清各50μℓを試験管に添加し、 0.5％ＢＳＡ含有ＰＢＳ溶液（ pH 7.4） 150μℓを加えて希釈した後、これにモノクローナル抗体２Ｈを固定化したビーズ各１個と、ＨＲＰ標識モノクローナル抗体６Ａを含有する 0.5％ＢＳＡ含有ＰＢＳ溶液（ pH 7.4） 200μℓとを、それぞれ試験管に添加して37℃の温度で４時間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成するのと全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行なった後、分光光度計を用いて420nm の波長の吸収強度を測定し、検量線より濃度を求めた。その結果、健常

人血清中の酸性ＧＳＴ濃度は 0.7 ng ／㎖であり、大腸癌患者血清中の酸性ＧＳＴ濃度は35.0 ng ／㎖であった。

請　求　の　範　囲

1．ヒトの酸性グルタチオンＳ－トランスフェラーゼに対するモノクローナル抗体。

2．増殖性細胞が産生する酸性グルタチオンＳ－トランスフェラーゼに対する請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体。

3．モノクローナル抗体の種類が、ＩｇＧ型のマウスモノクローナル抗体である請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体。

4．ヒト胎盤由来酸性グルタチオンＳ－トランスフェラーゼを認識する請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体。

5．ヒトの酸性グルタチオンＳ－トランスフェラーゼで免疫された動物の抗体産生細胞と、ミエローマ細胞とを融合させることによって該酸性グルタチオンＳ－トランスフェラーゼを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得、次いで、該ハイブリドーマ及び／又はそれに由来する細胞株を培養し、培養物から該モノクローナル抗体を採取することを特徴とするグルタチオンＳ－トランスフェラーゼに対するモノクローナル抗体の製造法。

6．免疫学的方法により検体中のヒト酸性グルタチオンＳ－トランスフェラーゼを測定する方法において、ヒ

ト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼを認識するモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、検体中のヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼの測定方法。

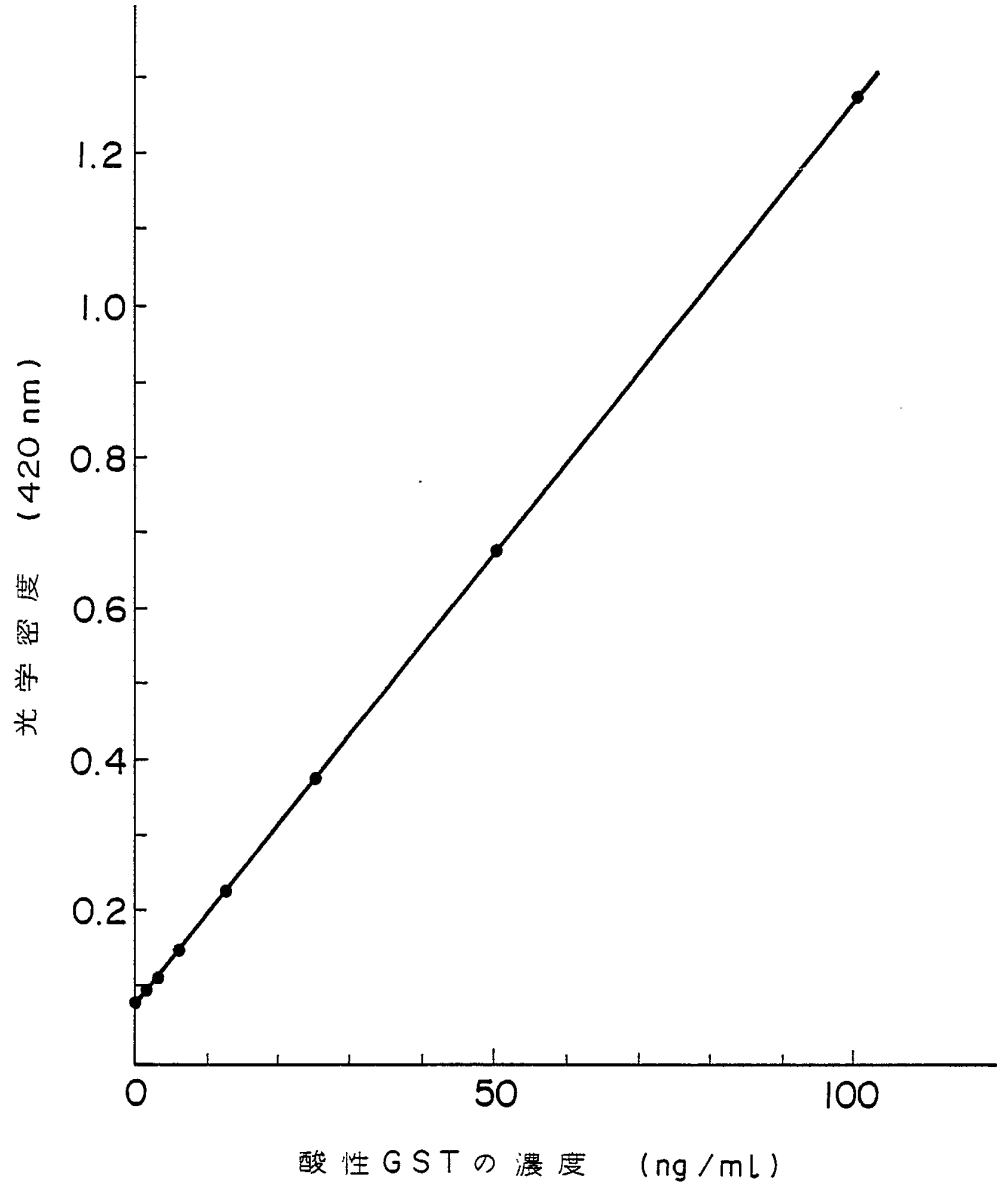
7．ヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼを認識するモノクローナル抗体を用いて検体中のヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼを測定する方法において、2個のモノクローナル抗体を使用し、第一のモノクローナル抗体が担体に固定されており、第二のモノクローナル抗体が標識化されていることを特徴とする請求の範囲第6項記載のヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼの測定方法。

8．標識化されているモノクローナル抗体の標識物が、酵素，蛍光物質，発光物質及び放射性物質のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第7項記載のヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼの測定方法。

9．免疫学的方法により検体中のヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼを測定する試薬キットであって、(1)ヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼを認識する、担体に固定された第一のモノクローナル抗体と、(2)ヒト酸性グルタチオンS－トランスフェラーゼを認識するが第一のモノクローナル抗体とは異なる抗原部位と結合する、標識化された第二のモノクローナル抗体と、(3)必要により、該標識化抗体の検出試

薬を主要構成成分とする試薬キット。

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP86/00592

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [3]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl[4] G01N33/577, G01N33/573, A61K39/395, C12P21/00, C07K15/04

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [4]

Classification System	Classification Symbols
IPC	G01N33/577, G01N33/573, C12P21/00, A61K39/395, C07K15/04

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [5]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [14]

Category*	Citation of Document, [16] with indication, where appropriate, of the relevant passages [17]	Relevant to Claim No. [18]
P	Arch. Biochem. Biophys., Vol. 245, No.2 (1986) P. 543-547, Irene Y. Wang, Multiple Ya subunits of glutatione S-transferase detected by monoclonal antibodies.	1-9
P	Cancer Res., Vol. 46, No.10 (1986) P.5259 -5263, Matsumoto Kozo, A monoclonal antibody specific far the Yc subunit of vat liver glutathione S-transferase B.	1-9
A	Mol. Cell Biochem., Vol. 48, No.2 (1982) P. 91-96, Lee C. G., Identity of microsomal glutathione-S-transferase.	1-9
A	JP, A, 57-86051 (Akzo N.V.) 28 May 1982 (28. 05. 82) & AU, A, 7307881 (04. 02. 82) & DK, A, 315081 (29. 01. 82) & EP, A, 45103 (03. 02. 82)	9

* Special categories of cited documents: [15]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document 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

"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

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search [2]	Date of Mailing of this International Search Report [2]
February 16, 1987 (16. 02. 87)	February 23, 1987 (23. 02. 87)
International Searching Authority [1]	**Signature of Authorized Officer [20]**
Japanese Patent Office	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 259, No.20 (1984) P.12444-12448, Hiroshi Maruyama, Distinctions between the Multiple Cationic Forms of Rat Liver Glutathione S-Transferase.	1-9
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 259, No.20 (1984) P.12449-12455, Hiroshi Maruyama, Preferential Binding of Steroids by Anionic Forms of Rat Glutathione S-Transferase.	1-9

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE[10]

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers_____, because they relate to subject matter [12] not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers_____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out [13], specifically:

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING[11]

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国　際　調　査　報　告

国際出願番号PCT/JP 86/00592

I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類（IPC） Int. Cl⁴
G01N33/577, G01N33/573, A61K39/395,
C12P21/00, C07K15/04

II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

分類体系	分類記号
IPC	G01N33/577, G01N33/573, C12P21/00, A61K39/395, C07K15/04

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

III. 関連する技術に関する文献

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	請求の範囲の番号
P	Arch. Biochem. Biophys., Vol. 245, No2 (1986) P. 543-547, Irene Y. Wang. Multiple Ya subunits of glutatione S-transferase detected by monoclonal antibodies.	1-9
P.	Cancer Res., Vol. 46, No10 (1986) P. 5259-5263, Matsumoto Kozo, A monoclonal antibody specific far the Yc subunit of vat liver glutathione S-transferase B.	1-9
A	Mol. Cell Biochem., Vol. 48, No2 (1982) P. 91-96, Lee C. G., Identity of microsomal glutathione-S-transferase.	1-9

※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」先行文献ではあるが、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の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の文献

IV. 認　　証

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
16. 02. 87	23.02.87

国際調査機関	権限のある職員
日本国特許庁（ISA/JP）	特許庁審査官　秋月　美紀子　2G 7906

第2ページから続く情報

	（Ⅱ欄の続き）	
A	JP, A, 57-86051（アクゾ・エヌ・ヴェー）28. 5月. 1982（28. 05. 82） &AU, A, 7307881（04. 02. 82） &DK, A, 315081（29. 01. 82） &EP, A, 45103（03. 02. 82）	9
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 259, No20（1984）P.12444-12448, Hiroshi Maruyama, Distinctions between the Multiple Cationic Forms of Rat Liver Glutathione S-Transferase,	1-9

Ⅴ. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2. ☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

Ⅵ. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
   請求の範囲＿＿＿＿＿
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
   請求の範囲＿＿＿＿＿
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。

☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

Ⅲ. 関連する技術に関する文献（第2ページからの続き）

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	請求の範囲の番号
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 259, No 20 (1984) P. 12449-12455, Hiroshi Maruyama, Preferential Binding of Steroids by Anionic Forms of Rat Glutathione S-Transferase.	1-9