

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7685340号
(P7685340)

(45)発行日 令和7年5月29日(2025.5.29)

(24)登録日 令和7年5月21日(2025.5.21)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
請求項の数 13 (全25頁)		

(21)出願番号	特願2021-26616(P2021-26616)	(73)特許権者	390014960
(22)出願日	令和3年2月22日(2021.2.22)		シスメックス株式会社
(65)公開番号	特開2022-128212(P2022-128212 A)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
(43)公開日	令和4年9月1日(2022.9.1)	(74)代理人	100103034
審査請求日	令和6年1月29日(2024.1.29)		弁理士 野河 信久
		(74)代理人	100159385
			弁理士 甲斐 伸二
		(74)代理人	100163407
			弁理士 金子 裕輔
		(74)代理人	100166936
			弁理士 稲本 潔
		(72)発明者	坂口 晃司
			兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体、サイトケラチン 1 8 フラグメントの測定試薬、試薬キットおよび測定方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】
重鎖および軽鎖を含む単離されたモノクローナル抗体であって、
前記重鎖が配列番号 1、2 および 3 に示されるアミノ酸配列からそれぞれなる C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含み、
前記軽鎖が配列番号 4、5 および 6 に示されるアミノ酸配列からそれぞれなる C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む、サイトケラチン 1 8 フラグメントに結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】
前記重鎖が配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖が配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。 10

【請求項 3】
配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を含むペプチドに結合する、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】
配列番号 9 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 7 番目のアスパラギン酸を C 末端として含むサイトケラチン 1 8 フラグメントに特異的に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】
請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む、サイトケラチン 1 8 フラ 20

グメント測定用試薬。

【請求項 6】

捕捉体を含む試薬と検出体を含む試薬とを含み、前記捕捉体または前記検出体が請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体である、サイトケラチン 18 フラグメント測定用試薬キット。

【請求項 7】

キャリブレーションをさらに含み、前記キャリブレーションがサイトケラチン 18 フラグメントを含む、請求項 6 に記載の試薬キット。

【請求項 8】

前記キャリブレーションが複数の試薬を含み、
前記複数の試薬が前記サイトケラチン 18 フラグメントをそれぞれに含み、
前記複数の試薬中の前記サイトケラチン 18 フラグメントの濃度が互いに異なる、請求項 7 に記載の試薬キット。

【請求項 9】

前記キャリブレーション中の前記サイトケラチン 18 フラグメントが、配列番号 47 に示されるアミノ酸配列のみからなる、請求項 7 または 8 に記載の試薬キット。

【請求項 10】

前記キャリブレーション中の前記サイトケラチン 18 フラグメントが、配列番号 48 に示されるアミノ酸配列のみからなる、請求項 7 または 8 に記載の試薬キット。

【請求項 11】

検体中のサイトケラチン 18 フラグメントの測定方法であって、
固相上に、捕捉体と、検体中のサイトケラチン 18 フラグメントと、検出体とを含む複合体を形成する工程、および
前記複合体に含まれる前記検出体に基づき、前記検体中のサイトケラチン 18 フラグメントを測定する工程を含み
前記捕捉体または前記検出体が、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体である、検体中のサイトケラチン 18 フラグメントの測定方法。

【請求項 12】

前記形成工程において、前記固相と、前記捕捉体と、前記検体中の前記サイトケラチン 18 フラグメントと、前記検出体とを接触する工程をさらに含む請求項 11 に記載の測定方法。

【請求項 13】

請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載のキャリブレーションを用いて、前記キャリブレーション中のサイトケラチン 18 フラグメントの濃度を測定する工程と、測定濃度に基づき前記検体中の前記サイトケラチン 18 フラグメントの濃度を取得する工程と、をさらに含む、請求項 11 または 12 に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体、サイトケラチン 18 フラグメントの測定試薬、試薬キットおよび測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトケラチン 18 (以下、「CK18」という)は、肝細胞などの上皮系細胞のアポトーシスの過程でカスパーゼにより切断されて、CK18 フラグメント (以下、「fCK18」という)となる。例えば、カスパーゼ 3 によって切断された血中の fCK18 はアポトーシスが誘導される非アルコール性脂肪肝炎 (以下「NASH」という)、癌などの疾患を反映するバイオマーカーとして知られている。fCK18 の検出方法として、特許文献 1 が知られている。特許文献 1 では fCK18 を検出するために fCK18 の C 末端の一部に結合するモノクローナル抗体が開示されている。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】米国特許第6296850号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明はfCK18に結合する新規の抗体を提供することとする。また、本発明は、当該抗体を含むfCK18測定用試薬、fCK18測定用試薬を含む試薬キットおよび、当該抗体を用いるfCK18の測定方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、重鎖および軽鎖を含む単離されたモノクローナル抗体であって、重鎖が配列番号1、2および3に示されるアミノ酸配列からそれぞれなるCDR1、CDR2およびCDR3を含み、軽鎖が配列番号4、5および6に示されるアミノ酸配列からそれぞれなるCDR1、CDR2およびCDR3を含む、fCK18に結合する新規のモノクローナル抗体を提供する。

【0006】

また、本発明は、当該抗体を含むfCK18測定用試薬、当該測定試薬を含む試薬キットおよび、当該抗体を捕捉体または検出体として用いるfCK18の測定方法を提供する。

20

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、fCK18に結合する新規のモノクローナル抗体が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1A】本実施形態の試薬キットの一例を示す概略図である。

【図1B】本実施形態の試薬キットの一例を示す概略図である。

【図2】実施例2のK18-624抗体およびM30抗体と、fCK18(239-397)とのIP-ウェスタンブロットの結果である。

【図3】実施例3のリコンビナントfCK18(241-397)の精製工程における可溶性画分と不溶性画分のウェスタンブロットの結果である。

30

【図4】実施例3のリコンビナントfCK18(261-397)の精製工程における可溶性画分と不溶性画分のウェスタンブロットの結果である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

[1. モノクローナル抗体]

本実施形態の抗体は、重鎖および軽鎖を含む単離されたモノクローナル抗体であって、重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれに、3つの相補性決定領域(以下「CDR」という)を有する。3つのCDRは、抗体鎖のアミノ末端から数えてCDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれる。本実施形態の抗体は、以下のアミノ酸配列を有するCDRを含む。

40

【0010】

本実施形態の抗体のCDRのアミノ酸配列

- ・重鎖CDR1：SFGMH(配列番号1)
- ・重鎖CDR2：YISSGSTTIYYADTVKG(配列番号2)
- ・重鎖CDR3：RGMITTGAWFAY(配列番号3)
- ・軽鎖CDR1：RASQRIGTSIH(配列番号4)
- ・軽鎖CDR2：YASESIS(配列番号5)
- ・軽鎖CDR3：QQSYIWPFT(配列番号6)

【0011】

本実施形態の抗体の重鎖は、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むことが好ましい

50

。本実施形態の抗体の軽鎖は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含むことが好ましい。一実施形態にかかる抗体は、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。

【 0 0 1 2 】

本実施形態の抗体の可変領域のアミノ酸配列

・重鎖の可変領域

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPEKGLEWVAYISSGSTTIYY
ADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARRGMITTGAWFAYWGQGTTLVT
VSA (配列番号 7)

・軽鎖の可変領域

DILLTQSPAILSVPGERVVSFSCRASQRIGTSIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS
GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSYIWPFTFGSGTKLEIK (配列番号 8)

【 0 0 1 3 】

当該技術において、重鎖および軽鎖の C D R 配列は、抗体の可変領域のアミノ酸配列に基づき、C D R 配列を決定する公共のデータベースから特定することができる。そのようなデータベースは V B A S E 2 (Reter I, Nucleic Acids Res. 2005) などが挙げられる。本実施形態の抗体の C D R 配列は、V B A S E 2 により特定された配列である。

【 0 0 1 4 】

CK18は、上皮細胞の細胞骨格を形成する中間系フィラメントの 1 つである。本明細書において、CK18はヒトのサイトケラチン 18 を示す。全長のCK18 (以下、「全長CK18」という) のアミノ酸配列は配列番号 9 のアミノ酸配列に示される。全長CK18は、酵素によって消化され、種々の長さのフラグメントとなる。酵素によって消化されたfCK18として、例えば、fCK18 (1-239)、fCK18 (239-430)、およびfCK18 (239-397) の存在が確認されている (Carlos, The Journal of cell biology 138.6 (1997): 1379-1394.)。なお、本明細書では、配列番号 9 において、X番目からY番目のアミノ酸配列のfCK18を、fCK18(X-Y)と表す。ここで、XおよびYは0を含まない430以下の任意の自然数を示し、且つXはYに比べて小さい数字を示す。例えば、配列番号 9 の239番目から397番目のアミノ酸配列のfCK18はfCK18(239-397)で表される。

【 0 0 1 5 】

後述の実施例に示されるように、本実施形態の抗体が抗原に結合するためには、抗原の C 末端アミノ酸配列が、アスパラギン酸残基であることが重要であると考えられる。そのため本実施形態の抗体は、CK18のうち、fCK18(239-397)およびfCK18(261-397)と結合性を示し、全長CK18およびfCK18(239-396)とは実質的に結合性を示さない。

【 0 0 1 6 】

ここで、「実質的に結合性を示さない」とは、全く結合しないことだけでなく、本実施形態の抗体を用いたイムノアッセイにおいて測定結果に影響を与えない程度の結合性を示すことをも含む。例えば、本実施形態の抗体と、fCK18 (381-397) との結合性の 50 分の 1 以下である。より好ましい例では、100 分の 1 以下であり、さらに好ましい例では、150 分の 1 以下である。抗体と抗原との結合性は、当業界において公知の方法によって測定することができる。そのような方法としては、例えば、イムノアッセイ、イムノブロットティング、表面プラズモン共鳴解析、等温滴定型カロリメトリ解析などが挙げられる。

【 0 0 1 7 】

本実施形態の抗体は、重鎖の可変領域に、配列番号 1、2 および 3 で示されるアミノ酸配列からそれぞれからなる重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 と、軽鎖の可変領域に、配列番号 4、5 および 6 で示されるアミノ酸配列からそれぞれなる軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2、軽鎖 C D R 3 を有するヒト化抗体であってもよい。ヒト化抗体とは、非ヒト由来の抗体の C D R の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植 (C D R グラフティング) して得られる抗体である。また、本実施形態にかかる抗体は、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するキメラ抗体であってもよい。キメラ抗体とはそれぞれ異なる種に由来する

10

20

30

40

50

抗体の可変領域と、定常領域とを連結させた抗体である。

【0018】

本実施形態の抗体のクラスは、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgEのいずれであってもよいが、好ましくはIgGである。IgGのサブクラスは特に限定されず、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4のいずれであってもよい。本明細書において、「抗体」は、免疫グロブリンの形態だけでなく、抗体フラグメントも含む。そのような抗体フラグメントとしては、例えばFab、F(ab')₂、Fab'、Fv、Fd、ドメイン抗体(dAb)、一本鎖抗体(scFv)、ダイアボディなどが挙げられる。

【0019】

本実施形態の抗体は、当該技術分野において公知の標識物質で修飾されてもよい。そのような標識物質は、検出可能なシグナルが生じる限り、特に限定されない。例えば、それ自体がシグナルを発生する物質(以下、「シグナル発生物質」ともいう)、および、他の物質の反応を触媒してシグナルを発生させる物質が挙げられる。シグナル発生物質としては、蛍光物質、放射性同位元素、発色物質などが挙げられる。他の物質の反応を触媒して検出可能なシグナルを発生させる物質としては、例えば酵素が挙げられる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、Alexa Fluor(登録商標)などの蛍光色素、GFPなどの蛍光タンパク質などが挙げられる。放射性同位元素としては、¹²⁵I、¹⁴C、³²Pなどが挙げられる。発色物質としては、金ナノコロイドなどの金属コロイドが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。

【0020】

[2. 抗体の生産方法]

本実施形態の抗体は、例えば、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法、遺伝子工学的な方法などの公知のモノクローナル抗体の作製法により得ることができる。ハイブリドーマ法により本実施形態の抗体を産生するハイブリドーマを作製する場合、免疫原として、fCK18を用いることができる。具体的には、fCK18(381-397)に示されるポリペプチドが例示される。ポリペプチドの合成法自体は公知であり、例えばFmoc固相合成法が挙げられる。合成したポリペプチドの免疫原性が低い場合、キーホール・リンベット・ヘモシアニン(KLH)、アルブミンなどのキャリアタンパク質と結合させることが好ましい。架橋によりキャリアタンパク質と合成ペプチドとを結合する場合は、ポリペプチドを合成するときに、その配列のN末端又はC末端にシステイン残基を付加することが好ましい。あるいは、免疫原は、リコンビナントタンパク質として作製することもできる。リコンビナントfCK18(X-397)(以下、「rfCK18(X-397)」ともいう)は、fCK18(X-397)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを公知の発現ベクターに組み込み、このベクターで宿主細胞を形質転換してrfCK18(X-397)を発現させた後、公知の方法で精製することにより得ることができる。

【0021】

次に、作製したポリペプチドでマウスを免疫し、免疫したマウスから脾臓細胞などの抗体産生細胞を取得する。そして、KohlerおよびMilstein, Nature, vol.256, p.495-497, 1975などに記載の公知のハイブリドーマの作製方法に従って、得られた抗体産生細胞と、適切なミエローマ細胞とを融合して、ハイブリドーマを得る。ハイブリドーマのスクリーニングには、免疫原に用いた合成ポリペプチドを用いることができる。本実施形態の抗体は、ハイブリドーマの培養上清、又は該ハイブリドーマを腹腔投与した哺乳動物の腹水から得ることができる。得られた抗体は、塩析、アフィニティクロマトグラフィー、ゲルろ過などの公知の方法により精製してもよい。

【0022】

本実施形態の抗体を産生するハイブリドーマを作製した場合、後述の実施例1の記載のようにして解析できる。具体的には、まず、該ハイブリドーマから抽出したRNAを用いて、逆転写反応およびRACE(Rapid Amplification of cDNA ends)法により、本実施形態

10

20

30

40

50

の抗体をコードするポリヌクレオチドを合成する。そして、合成したポリヌクレオチドの塩基配列をシーケンシングにより解析し、その塩基配列に基づいて抗体のアミノ酸配列を決定する。

【 0 0 2 3 】

ファージディスプレイ法により、本実施形態の抗体を作製する場合、例えば、Fabのクローンを作製することができる。まず、上記の合成ポリペプチドでマウスなどの動物を免疫し、該動物の脾臓からmRNAを取得し、cDNAを合成する。得られたcDNAを、抗体遺伝子をクローニングするための公知のプライマーを用いて増幅し、Fabのファージライブラリーを作製する。得られたライブラリーを用いて、公知のFabファージディスプレイ法およびバイオパニング(Philippa M. O'BrienおよびRobert Aitken, Antibody Phage Display, (2002) Methods in Molecular Biology Volume No. 178参照)により、本実施形態の抗体のFabのクローンを得ることができる。

10

【 0 0 2 4 】

遺伝子工学的な方法により本実施形態の抗体を作製する場合、例えば、宿主細胞の合成系を用いる方法や、人工tRNAを用いた無細胞タンパク質合成系などが挙げられる。宿主細胞の合成系を用いる場合、本実施形態の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを含むベクターおよびベクターを含む宿主細胞を用いることにより作製することができる。具体的には、本実施形態の抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを公知の発現ベクターに組み込み、このベクターで宿主細胞を形質転換して、本実施形態の抗体を発現させた後、公知の方法で精製することができる。なお、ベクターの種類は特に限定されず、発現ベクター、クローニングベクター、ウィルスベクターなど、当該技術において公知のベクターから適宜選択できる。また、宿主細胞の種類は特に限定されず、真核細胞、原核細胞、哺乳動物細胞などから適宜選択できる。

20

【 0 0 2 5 】

無細胞タンパク質合成系を用いる場合、翻訳因子を含む細胞抽出液に対して、アミノ酸、エネルギー分子(例えば、ATP、GTPなど)、本実施形態の抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドなどを添加することで合成することができる。翻訳因子を含む細胞抽出液としては、例えば、大腸菌、酵母、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽、昆虫細胞、哺乳類培養細胞などの細胞抽出液を用いることができる。

【 0 0 2 6 】

30

[3 . 試薬]

本発明の一実施形態は、fCK18測定用試薬である。この試薬は上記[1 . モノクローナル抗体]の実施形態の抗体を含む。本実施形態の試薬において、測定されるfCK18は、当該抗体において検出可能なfCK18であればよく、特に限定されない。そのようなfCK18としては、例えば、fCK18(239-397)、fCK18(241-397)、fCK18(261-397)などが挙げられる。

【 0 0 2 7 】

本実施形態の試薬の形態は特に限定されず、固体(例えば粉末、結晶、凍結乾燥品など)であってもよいし、液体(例えば溶液、懸濁液、乳濁液など)であってもよい。試薬が液体である場合、溶媒は、本実施形態の抗体を安定して保存できる限り、特に限定されない。溶媒としては、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリス緩衝生理食塩水(TBS)、グッドの緩衝液、それらの組合せなどが挙げられる。グッドの緩衝液としては、例えば、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、Bis-Tris-Propane、ACES、MOPS、MOPSO、BES、TES、HEPES、HEPPS、Tricine、Tris、Bicine、TAPSなどが挙げられる。

40

【 0 0 2 8 】

本実施形態の試薬は、公知の添加物を含んでもよい。添加物としては、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)などタンパク質安定化剤、アジ化ナトリウムなどの防腐剤、塩化ナトリウムなどの無機塩類、それらの組合せなどが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

50

[4 . 試薬キット]

本発明の一実施形態は、fCK18測定用試薬キットである。この試薬キットは、捕捉体を含む試薬と検出体を含む試薬とを含み、捕捉体または検出体のいずれかは[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体を含む。捕捉体は、fCK18において検出体が結合する部位とは異なる部位に結合することが好ましい。

【 0 0 3 0 】

ある実施形態では、捕捉体は、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体を含む。この実施形態において、検出体は、fCK18に結合することができれば、特に限定されないが、fCK18において捕捉体とは異なる部位に結合することが好ましい。検出体は、抗体、アプタマーなどを含み得る。

10

【 0 0 3 1 】

別の実施形態では、検出体は、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体を含む。この実施形態において、捕捉体は、fCK18に結合することができれば、特に限定されないが、fCK18において検出体とは異なる部位に結合することが好ましい。この実施形態において、捕捉体は、fCK18 (239-397) に結合することが好ましく、fCK18 (239-397) において、検出体とは異なる部位に結合することが好ましい。捕捉体は、抗体、アプタマーなどを含み得る。検出体は、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体が1次抗体であり、標識物質を含み、且つ1次抗体に結合する2次抗体を含んでいてもよい。

【 0 0 3 2 】

本実施形態の試薬キットは、捕捉体を固定化するための固相をさらに含んでもよい。固相は、捕捉抗体を固定可能な不溶性の担体であればよい。捕捉抗体の固相への固定の様態は、特に限定されない。例えば、捕捉抗体と固相とは、直接結合してもよいし、別の物質を介して間接的に結合してもよい。直接の結合としては、例えば、物理的吸着などが挙げられる。間接的な結合としては、例えば、ビオチン類(ビオチン、およびデスチオビオチンなどのビオチン類縁体を含む)とアビジン類(アビジン、およびストレプトアビジン、タマビジン(登録商標)などのアビジン類縁体を含む)との組み合わせを介した結合が挙げられる。この場合、捕捉抗体をあらかじめビオチン類で修飾し、固相にアビジン類をあらかじめ結合させておくことにより、ビオチン類とアビジン類との結合を介して、捕捉抗体と固相とが間接的に結合できる。

20

【 0 0 3 3 】

固相の素材は特に限定されず、例えば、有機高分子化合物、無機化合物、生体高分子などから選択できる。有機高分子化合物としては、ラテックス、ポリスチレン、ポリプロピレンなどが挙げられる。無機化合物としては、磁性体(酸化鉄、酸化クロムおよびフェライトなど)、シリカ、アルミナ、ガラスなどが挙げられる。生体高分子としては、不溶性アガロース、不溶性デキストラン、ゼラチン、セルロースなどが挙げられる。これらのうちの2種以上を組み合わせ用いてもよい。固相の形状は特に限定されず、例えば、マイクロプレート、マイクロチューブ、試験管、粒子、膜などが挙げられる。それらの中でも、マイクロプレートおよび粒子(特に磁性粒子)が好ましい。

30

【 0 0 3 4 】

fCK18において、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体とは異なる部位に結合する抗体としては、特に限定されず、例えば、市販の抗体を用いることができる。例えば、商品名：M5 Keratin 18 Mab (クローン名：M5、以下、「M5抗体」という) (Diapharma社)、商品名：M6 Keratin 18 Mab (クローン名：M6、以下、「M6抗体」という) (Diapharma社) などが挙げられる。

40

【 0 0 3 5 】

本実施形態の試薬キットは、fCK18のキャリブレータをさらに含んでもよい。キャリブレータに含まれるfCK18は、リコンビナントであってもよいし、合成ペプチドであってもよい。キャリブレータに含まれるfCK18としては、例えば、fCK18 (239-397)、fCK18 (241-397)、fCK18(261-397)などを用いることができる。当該fCK18のリコンビナントを調製する場合、発現効率の観点から、リコンビナントfCK18(261-397)が好

50

適である。

【 0 0 3 6 】

本実施形態のキャリブレーションは、fCK18をそれぞれに含む複数の試薬を含み、複数の試薬中のfCK18の濃度が互いに異なることが好ましい。このキャリブレーションは、例えば、fCK18を含まない緩衝液(ネガティブコントロール)と、既知濃度のfCK18を含む緩衝液とを備えていてもよい。一実施形態のキャリブレーションは、少なくとも第1～第3容器を含み、第1容器にはfCK18を含まない緩衝液が収容され、第2容器には第1のfCK18溶液が収容され、第3容器には第2のfCK18溶液が収容される。この実施形態の第1のfCK18溶液のfCK18濃度と第2のfCK18溶液のfCK18濃度は相違する。

【 0 0 3 7 】

本実施形態の試薬キットに含まれるキャリブレーションに含まれる試薬の数は特に限定されないが、例えば2、3、4、5および6以上から選択できる。キャリブレーションのfCK18濃度はその濃度に基づき検体中のfCK18の濃度を決定できればよく、特に限定されない。

【 0 0 3 8 】

本実施形態の試薬キットに含まれる各試薬の形態は特に限定されず、固体(例えば粉末、結晶、凍結乾燥品など)であってもよいし、液体(例えば溶液、懸濁液、乳濁液など)であってもよい。試薬が液体である場合、溶媒は、本実施形態の抗体を安定して保存できる限り、特に限定されない。そのような溶媒の詳細は、[3 . 試薬] で述べたことと同様である。

【 0 0 3 9 】

本実施形態の試薬キットに含まれる各試薬は、公知の添加物を含んでいてもよい。添加物としては、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)などタンパク質安定化剤、アジ化ナトリウムなどの防腐剤、塩化ナトリウムなどの無機塩類などが挙げられる。

【 0 0 4 0 】

本実施形態の試薬キットの一例を、図1Aに示す。図1Aにおいて、11は、試薬キットを示し、12は、捕捉体を含む第1試薬を収容した第1容器を示し、13は、検出体を含む試薬を収容した第2容器を示し、14は、梱包箱を示し、15は、添付文書を示す。添付文書には、各試薬の組成、使用方法、保存方法などが記載され得る。この例の試薬キットにはその他の試薬を含み得る。そのような試薬としては、例えば、捕捉抗体を固定化するための固相、緩衝溶液、キャリブレーションなどが挙げられる。

【 0 0 4 1 】

実施形態の試薬キットの一例を、図1Bに示す。図1Bにおいて、21は、試薬キットを示し、22は、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体を含む第1試薬を収容した第1容器を示し、23は、検出体を含む試薬を収容した第2容器を示し、24および25は、fCK18を含むキャリブレーション試薬を収容した第3容器および第4容器を示し、第3容器24および第4容器25に収容されたキャリブレーション試薬のfCK18濃度は互いに異なる。26は、添付文書を示し、27は、梱包箱を示す。この例の試薬キットは、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体を含む第1試薬と、検出体を含む試薬と、fCK18の定量的ためのキャリブレーションを含むが、その他の試薬を含みうる。そのような試薬としては、例えば、捕捉抗体を固定化するための固相、緩衝溶液、上記のキャリブレーション試薬とは異なるfCK18濃度のキャリブレーション試薬などが挙げられる。

【 0 0 4 2 】

[5 . fCK18の測定方法]

本発明の一実施形態は検体中のfCK18の測定方法である。この測定方法は、固相上に、捕捉体と、検体中のfCK18と、検出体とを含む複合体(以下「サンドイッチ複合体」ともいう)を形成する工程、および複合体に含まれる検出体に基づき、検体中のfCK18を測定する工程を含む。さらに、捕捉体または検出体に含まれる抗体が、[1 . モノクローナル抗体] で述べた抗体である、検体中のfCK18の測定方法である。

【 0 0 4 3 】

本実施形態の検体は、fCK18を含む試料、またはfCK18を含むことが疑われる試料である。検体としては、生物由来の試料、生物由来の試料に前処理を施した試料、細胞培養抽

10

20

30

40

50

出液、細胞抽出物などが用いられ得る。例えば、全血、血清、血漿、髄液、精液、組織、組織液、リンパ液などが挙げられる。検体に細胞などの不溶性の夾雑物が含まれる場合は、遠心分離、ろ過などの公知の手段により、検体から夾雑物を除去してもよい。また、検体は、必要に応じて適切な水性媒体で希釈してもよい。そのような水性媒体は、後述の測定を妨げない限り、特に限定されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液などが挙げられる。緩衝液は、中性付近のpH(例えば6以上8以下のpH)で緩衝作用を有する限り、特に限定されない。そのような緩衝液は、例えば、HEPES、MES、PIPESなどのグッドの緩衝液、TBS、PBSなどが挙げられる。

【0044】

本実施形態の測定方法は、形成工程において、固相と、捕捉体と、検体中のfCK18と、検出体とを接触する工程を含んでいてもよい。このとき、形成工程において、捕捉体をあらかじめ固定した固相と検体中のfCK18と、検出体を接触させることにより、固相上に複合体を形成してもよい。

10

【0045】

本実施形態の接触工程では、固相と捕捉体とfCK18と検出体との接触順序は特に限定されない。中でも、fCK18と捕捉体とを接触させて検体中の被検物質と捕捉体との複合体を形成し、その後該複合体と固相とを接触させて複合体を固相上に形成し、その後該複合体と検出体とを接触させてサンドイッチ複合体を固相上に形成することが好ましい。

【0046】

被検物質と捕捉体との複合体を固相上に形成した後、検出体を接触させる前に未反応の成分を除去するB/F分離を行うことが好ましい。未反応の遊離成分とは、複合体を構成しない成分をいう。例えば、fCK18と結合しなかった捕捉抗体および検出抗体などが挙げられる。B/F分離の手段は特に限定されないが、固相が粒子であれば、遠心分離により、複合体を捕捉した固相だけを回収することによりB/F分離ができる。固相がマイクロプレートやマイクロチューブなどの容器であれば、未反応の遊離成分を含む液を除去することによりB/F分離ができる。また、固相が磁性粒子の場合は、磁石で磁性粒子を磁氣的に拘束した状態でノズルによって未反応の遊離成分を含む液を吸引除去することによりB/F分離ができ、自動化の観点で好ましい。未反応の遊離成分を除去した後、複合体を捕捉した固相をPBSなどの適切な水性媒体で洗浄してもよい。

20

【0047】

固相上に形成した複合体を、当該技術において公知の方法で検出することにより、検体中のfCK18の測定値を取得できる。例えば、検出用抗体として、標識物質で標識した抗体を用いた場合は、その標識物質により生じるシグナルを検出することにより、fCK18の測定値を取得できる。あるいは、検出用抗体に対する標識二次抗体を用いた場合も、同様にfCK18の測定値を取得できる。

30

【0048】

本明細書において「シグナルを検出する」とは、シグナルの有無を定性的に検出すること、シグナル強度を定量すること、および、シグナルの強度を半定量的に検出することを含む。半定量的な検出とは、シグナルの強度を、「シグナル発生せず」、「弱」、「中」、「強」などのように段階的に示すことをいう。本実施形態では、シグナルの強度を定量的又は半定量的に検出することが好ましい。

40

【0049】

シグナルを検出する方法自体は、当該技術において公知である。本実施形態では、上記の標識物質に由来するシグナルの種類に応じた方法を適宜選択すればよい。例えば、標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質を反応させることによって発生する光、色などのシグナルを、分光光度計などの公知の装置を用いて測定することにより行うことができる。

【0050】

酵素の基質は、該酵素の種類に応じて公知の基質から適宜選択できる。例えば、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合、基質として、CDP-Star(登録商標)(4-クロロ-

50

3-(メトキシスピロ[1, 2-ジオキセタン-3, 2'-(5'-クロロ)トリクロ[3, 3, 1, 13, 7]デカン]-4-イル)フェニルリン酸 2 ナトリウム)、CSPD(登録商標)(3-(4-メトキシスピロ[1, 2-ジオキセタン-3, 2-(5'-クロロ)トリクロ[3, 3, 1, 13, 7]デカン]-4-イル)フェニルリン酸 2 ナトリウム)などの化学発光基質、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)、5-ブromo-6-クロロ-インドリルリン酸 2 ナトリウム、p-ニトロフェニルリン酸などの発色基質が挙げられる。また、酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合、基質としては、ルミノールおよびその誘導体などの化学発光基質、2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸アンモニウム)(ABTS)、1, 2-フェニレンジアミン(OPD)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)などの発色基質が挙げられる。

【0051】

標識物質が放射性同位体である場合は、シグナルとしての放射線を、シンチレーションカウンターなどの公知の装置を用いて測定できる。また、標識物質が蛍光物質である場合は、シグナルとしての蛍光を、蛍光マイクロプレートリーダーなどの公知の装置を用いて測定できる。なお、励起波長および蛍光波長は、用いた蛍光物質の種類に応じて適宜決定できる。

【0052】

シグナルの検出結果は、fCK18の測定結果として用いることができる。例えば、シグナルの強度を定量する場合は、シグナル強度の測定値自体または該測定値から取得される値を、fCK18の測定結果として用いることができる。シグナル強度の測定値から取得される値としては、例えば、該測定値から陰性対照試料の測定値又はバックグラウンドの値を差し引いた値などが挙げられる。また、シグナル強度の測定値を検量線に当てはめて、ヒトfCK18の量又は濃度の値を決定してもよい。陰性対照試料は、適宜選択できるが、例えば、健常人から得た生体試料などが挙げられる。

【0053】

本実施形態の測定方法は、上記のキャリブレーションを用いて、上記のキャリブレーション中のfCK18濃度を測定する工程と、測定された濃度に基づき検体中のfCK18の濃度を取得する工程と、をさらに含んでもよい。

【0054】

本実施形態の測定方法では、キャリブレーション中のfCK18の測定値と、検体中のfCK18の測定値とから、検体中のfCK18の濃度を取得することができる。

【0055】

キャリブレーション中のfCK18の濃度は既知であるため、キャリブレーション中のfCK18の測定値に基づいて、検体中のfCK18の測定値から検体中のfCK18の濃度を算出できる。好ましい実施形態では、キャリブレーション中のfCK18の測定値から検量線を作成し、検量線および検体中のfCK18の測定値に基づいて、検体中のfCK18の濃度を算出する。検量線は、例えば、X軸にキャリブレーション中のfCK18の濃度を取り、Y軸に測定値をとったXY平面に、複数のキャリブレーション中のfCK18の測定値をプロットし、最小二乗法などの公知の方法により、直線または曲線を得ることで作成できる。検体中のfCK18の測定値を作成した検量線に当てはめることで、検体中のfCK18の濃度を取得することができる。

【0056】

本実施形態では、検体中のfCK18を市販の全自動免疫測定装置を用いて行ってもよい。全自動免疫測定装置の例としては、HISCL(商標)シリーズ(シスメックス社)などをあげることができる。

【実施例】

【0057】

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0058】

実施例 1

抗体の取得

10

20

30

40

50

[1] ハイブリドーマの取得

マウス脾臓法により抗体群を産生するハイブリドーマを得た。具体的には、表1に記載のペプチド1（配列番号10）を合成し、これをKLHとコンジュゲートし、アジュバントと混合したエマルジョンを、Balb/Cマウスの腹腔に5回、静脈に1回注射することで免疫した。この際、アジュバントは初回にフロイントコンプリートアジュバントを用い、2回目以降の追加免疫ではフロイントインコンプリートアジュバントを用いた。また、免疫原を配列番号9に示される全長型リコンビナントCK18（以下、「全長rCK18」ともいう）とし、免疫原を注射する回数を腹腔に4回、静脈に2回として、上記と同様に注射することで免疫した。最終免疫の3日後、マウスから脾臓を摘出し、脾臓から脾臓細胞を単離した。その後、得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞（P3-X63-Ag8.653）とを細胞融合させることによりハイブリドーマを得た。

10

【 0 0 5 9 】

[2] スクリーニング

上記[1]で得たハイブリドーマから、表1に記載のペプチド1、ペプチド2および全長rCK18（PROSPEC社製）との反応性を下記スクリーニング手法（固相ELISA法）により測定した。

【 0 0 6 0 】

【表1】

ペプチド名	アミノ酸配列（N末端→C末端）	配列番号
ペプチド1	RRLLEDGEDFNLGDALD	10
ペプチド2	RRLLEDGEDFNLGDAL	11

20

【 0 0 6 1 】

< スクリーニング手法1 >

（1）ELISA用プレートにANTI penta HIS抗体を2.5 μg/mL、50 μL/well添加し、一晚4で静置して固定化した後、プレートをPBSTで3回洗浄し、Buffer I'（10 mM NaH₂PO₄・2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA・2Na, 0.10% BSA, pH7.0）を200 μL/well加えて、一晚4で保存したプレートを調製した。

30

（2）全長rCK18の終濃度が0.2 μg/mL、になるようにBuffer I'（10 mM NaH₂PO₄・2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA・2Na, 0.10% BSA, pH7.0）で希釈し、抗原希釈液を調製した。

（3）プレートをPBSTで3回洗浄し、各抗原希釈液を50 μL/wellずつ加え、45分間振とうした。

（4）プレートをPBSTで3回洗浄し、培養上清を50 μL/wellずつ加え、45分間振とうした。

（5）プレートをPBSTで3回洗浄し、15000倍希釈したPeroxidase-conjugated Affini pure F(ab)'2 Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)（Jackson社）を50 μL/wellずつ加え、45分間振とうした。

40

（6）プレートをPBSTで3回洗浄し、TMB Mix（1-step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific社）：3% H₂O₂：Phosphate-Citrate buffer (sigma社)=15：0.15：14.85）を100 μL/well加えて室温で10分間反応させた後、1M H₂SO₄を100 μL/well加えて反応を停止させた。

（7）プレートリーダーで反応液の450nm吸光度を測定した。

【 0 0 6 2 】

< スクリーニング手法2 >

（1）ペプチド1およびペプチド2のN末端にBSAを付加した。

（2）ELISA用プレートに各ペプチドを5 μg/mL、100 μL/well添加し、一晚4で静置して固定化した後、ELISA用プレートをPBSTで3回洗浄し、Buffer I'（10 mM NaH₂PO₄・2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA・2Na, 0.10% BSA, pH7.0）を200 μL/well加えて、一晚4で保存したプレートを調製した。

50

$\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA $\cdot$ 2Na, 0.10% BSA, pH7.0) を200 μL /well加えて、一晚4 で保存したプレートを調製した。

(3) プレートをPBSTで3回洗浄し、培養上清を100 μL /wellずつ加え、1時間振とうした。

(4) プレートをPBSTで3回洗浄し、15000倍希釈したPeroxidase-conjugated Affinity pure F(ab)'₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson社) を100 μL /wellずつ加え、1時間振とうした。

(5) プレートをPBSTで3回洗浄し、TMB Mix (1-step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific社): 3% H_2O_2 : Phosphate-Citrate buffer (sigma社) = 15: 0.15: 14.85) を100 μL /well加えて室温で10分間反応させた後、1M H_2SO_4 を100 μL /well加えて反応を停止させた。

10

(6) プレートリーダーで反応液の450nm吸光度を測定した。

【0063】

全長rCK18またはペプチド1に対して反応性を示す抗体を産生する4種のハイブリドーマを選定した。

【0064】

[3] 選定した抗体のエピトープ解析

スクリーニングによって選定した全長rCK18に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマの産生する3種の抗体(以下、それぞれ「K18-91抗体」、「K18-287抗体」および「K18-328抗体」という)と表2記載の合成ペプチドとの反応性を固相ELISA法によって測定した。また、ペプチド1に対して反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマの産生する抗体(以下、「K18-624抗体」という)と、ペプチド25、ペプチド26およびペプチド27との反応性を固相ELISA法によって測定した。

20

【0065】

<手法>

(1) 表2記載のペプチドを合成し、N末端側にビオチンを付加した。

(2) 合成したペプチドを80%DMSO溶液で溶解し、さらに1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にPBSTで希釈した。

(3) ELISA用プレートをPBSTで3回洗浄した後、ビオチン化ペプチドを100 μL /well添加し、室温で1時間静置してペプチドを固定化した後、プレートをPBSTで3回洗浄し、Buffer I' (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA $\cdot$ 2Na, 0.10% BSA, pH7.0) を200 μL /well加えて、一晚4 で保存したプレートを調製した。

30

(4) プレートをPBSTで3回洗浄し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した抗体を50 μL /wellずつ加え、室温で1時間振とうした。

(5) プレートをPBSTで3回洗浄し、Buffer I' (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA $\cdot$ 2Na, 0.10% BSA, pH7.0) で約5000倍希釈したAnti-Mouse IgG POD抗体を50 μL /wellずつ加え、室温で1時間振とうした。

(6) プレートをPBSTで3回洗浄し、TMB Mix (1-step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific社): 3% H_2O_2 : Phosphate-Citrate buffer (sigma社) = 15: 0.15: 14.85) を100 μL /well加えて室温で10分間反応させた後、1M H_2SO_4 を100 μL /well加えて反応を停止させた。

40

(7) プレートリーダーで反応液の450nm吸光度を測定した。

【0066】

【表 2】

ペプチド名	アミノ酸配列（N末端→C末端）	配列番号
ペプチド 3	APKSQDLAKIMADIRAQY	1 2
ペプチド 4	LAKIMADIRAQYDELARK	1 3
ペプチド 5	DIRAQYDELARKNREELD	1 4
ペプチド 6	DELARKNREELDKYWSQQ	1 5
ペプチド 7	NREELDKYWSQQIEESTT	1 6
ペプチド 8	KYWSQQIEESTTVVTTQS	1 7
ペプチド 9	IEESTTVVTTQSAEVGAA	1 8
ペプチド 10	VVTTQSAEVGAAETTLTE	1 9
ペプチド 11	AEVGAAETTLTELRRTVQ	2 0
ペプチド 12	ETTLTELRRTVQSLEIDL	2 1
ペプチド 13	LRRTVQSLEIDLDSMRNL	2 2
ペプチド 14	SLEIDLDSMRNLKASLEN	2 3
ペプチド 15	DSMRNLKASLENSLREVE	2 4
ペプチド 16	KASLENSLREVEARYALQ	2 5
ペプチド 17	SLREVEARYALQMEQLNG	2 6
ペプチド 18	ARYALQMEQLNGILLHLE	2 7
ペプチド 19	MEQLNGILLHLESELAQT	2 8
ペプチド 20	ILLHLESELAQTRAEGQR	2 9
ペプチド 21	SELAQTRAEGQRQAQYEY	3 0
ペプチド 22	RAEGQRQAQYEYALLNIK	3 1
ペプチド 23	QAQYEYALLNIKVKLEAE	3 2
ペプチド 24	ALLNIKVKLEAEIATYRR	3 3
ペプチド 25	VKLEAEIATYRRILLEDGE	3 4
ペプチド 26	IATYRRILLEDGEDFNLGD	3 5
ペプチド 27	LLEDGEDFNLGDALD	3 6

【0067】

(結果)

K18-91抗体、K18-287抗体およびK18-328抗体に関する測定結果を表3～表5に示す。K18-624抗体に関する測定結果を表6に示す。K18-91抗体はペプチド4と反応性を示した。K18-287抗体およびK18-328抗体はペプチド17と反応性を示した。また、K18-328抗体はK18-287抗体に比べてペプチド17に対する反応性が高いことが示唆された。K18-624抗体はペプチド27と反応性を示した。

【0068】

10

20

30

40

50

【表 3】

Abs450\ペプチド	3	4	5	6	7	8	9	10
K18-91 抗体	0.07	1.96	0.02	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00
K18-287 抗体	0.04	0.00	-0.01	0.02	0.00	0.00	-0.01	0.00
K18-328 抗体	0.04	0.01	-0.01	0.01	0.00	-0.01	-0.01	0.00

【 0 0 6 9 】

【表 4】

Abs450\ペプチド	11	12	13	14	15	16	17	18
K18-91 抗体	0.02	0.03	0.02	0.00	0.00	-0.01	0.02	0.02
K18-287 抗体	0.00	0.00	0.00	-0.01	-0.02	-0.04	1.05	0.01
K18-328 抗体	0.01	0.00	0.01	-0.01	0.00	-0.04	1.55	0.02

【 0 0 7 0 】

【表 5】

Abs450\ペプチド	19	20	21	22	23	24	25	26	27
K18-91 抗体	0.02	0.01	0.02	0.03	0.05	0.02	0.02	0.02	0.08
K18-287 抗体	0.01	0.00	0.01	0.00	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00
K18-328 抗体	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00

【 0 0 7 1 】

【表 6】

Abs450\ペプチド	25	26	27
K18-624 抗体	0.14	0.14	2.34

【 0 0 7 2 】

【 4 】 rCK18、rfCK18およびペプチド 1、2 を用いたエピトープの解析

K 1 8 - 3 2 8 抗体および K 1 8 - 6 2 4 抗体の全長rCK18、配列番号 9 に示される 1 2 7 番目から 4 3 0 番目のアミノ酸残基からなるリコンビナントペプチド（以下、「rfCK18(127-430)」という）（配列番号 3 7 ）（Proteintech社）、配列番号 9 に示される 2 3 9 番目から 3 9 6 番目のアミノ酸残基からなるリコンビナントペプチド（以下、「rfCK18(239-396)」という）（配列番号 3 8 ）（Cloud-Clone-Corp社）に対する反応性を固相 E L I S A 法によって測定した。

【 0 0 7 3 】

< 手法 >

（ 1 ） ELISA用プレートに 2.5 μg/mL の ANTI GST抗体またはpenta HIS抗体を 50 μL /well添加し、一晩 4 ℃ で静置して固定化した後、プレートを PBSTで 3 回洗浄し、Buffer I'（10 mM NaH₂PO₄・2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA・2Na, 0.10% BSA, pH7.0）を 200 μL/well加えて、一晩 4 ℃ で保存したプレートを調製した。

（ 2 ） 全長rCK18の終濃度が 0.2 μg/mLになり、rfCK18(127-430)およびrfCK18(239-396)の終濃度が 0.3 μg/mLになるよう Buffer I'（10 mM NaH₂PO₄・2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA・2Na, 0.10% BSA, pH7.0）で希釈し、各抗原希釈液を調製した。

（ 3 ） プレートを PBSTで 3 回洗浄し、各抗原希釈液を 50 μL ずつ加え、45 分間振とうし

た。

(4) K18-328 抗体溶液および K18-624 抗体溶液を、5~10 ng/mL に調製した。

(5) プレートを PBST で 3 回洗浄し、K18-328 抗体溶液または K18-624 抗体溶液を 50 μ L/well ずつ加え、45 分間振とうした。

(6) プレートを PBST で 3 回洗浄し、15000 倍希釈した Peroxidase-conjugated Affinipure F(ab)'₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson 社) を 50 μ L/well ずつ加え、45 分間振とうした。

(7) プレートを PBST で 3 回洗浄し、TMB Mix (1-step Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific 社) : 3% H₂O₂ : Phosphate-Citrate buffer (sigma 社) = 15 : 0.15 : 14.85) を 100 μ L/well 加えて室温で 10 分間反応させた後、1M H₂SO₄ を 100 μ L/well 加えて反応を停止させた。

(8) プレートリーダーで反応液の 450nm 吸光度を測定した。

【0074】

続いて、K18-328 抗体および K18-624 抗体のペプチド 1 およびペプチド 2 に対する反応性を固相 ELISA 法によって測定した。

【0075】

< 手法 >

(1) ペプチド 1 およびペプチド 2 の N 末端に BSA を付加した。

(2) ELISA 用プレートに各ペプチドを 5 μ g/mL、100 μ L/well 添加し、一晩 4 で静置して固定化した後、プレートを PBST で 3 回洗浄し、Buffer I' (10 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA · 2Na, 0.10% BSA, pH7.0) を 200 μ L/well 加えて、一晩 4 で保存したプレートを調製した。

(3) K18-328 抗体溶液および K18-624 抗体溶液を、5~10 ng/mL に調製した。

(4) プレートを PBST で 3 回洗浄し、K18-328 抗体溶液または K18-624 抗体溶液を 100 μ L/well ずつ加え、室温で 1 時間振とうした。

(5) プレートを PBST で 3 回洗浄し、15000 倍希釈した Peroxidase-conjugated Affinipure F(ab)'₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson 社) を 100 μ L/well ずつ加え、室温で 1 時間振とうした。

(6) プレートを PBST で 3 回洗浄し、TMB Mix (1-step Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific 社) : 3% H₂O₂ : Phosphate-Citrate buffer (sigma 社) = 15 : 0.15 : 14.85) を 100 μ L/well 加えて室温で 10 分間反応させた後、1M H₂SO₄ を 100 μ L/well 加えて反応を停止させた。

(7) プレートリーダーで反応液の 450nm 吸光度を測定した。

【0076】

最後に、K18-328 抗体および K18-624 抗体の配列番号 9 に示される 239 番目から 397 番目のアミノ酸残基からなるリコンビナントペプチド (以下、「rfCK18(239-397)」という) (配列番号 39) に対する反応性を免疫沈降法および固相 ELISA 法を組み合わせで測定した。

【0077】

< 手法 >

(1) ELISA 用プレートに K18-287 抗体を 5 μ g/mL、50 μ L/well 添加し、一晩 4 で静置して固定化した後、プレートを PBST で 3 回洗浄し、Buffer I' (10 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 149.7 mM NaCl, 2.5 mM EDTA · 2Na, 0.10% BSA, pH7.0) を 200 μ L/well 加えて、一晩 4 で保存した K18-287 抗体固相プレートを調製した。

(2) ビオチン化 K18-91 抗体を調製した。

(3) 15% 抗マウス IgG 結合セファローズ 4B (Goat, anti-Mouse IgG (H+L chain)) を結合させた CNBr-activated Sepharose 4B) を調製した。

(4) K18-328 抗体溶液および K18-624 抗体溶液を、1.25 μ g/mL に調製し

10

20

30

40

50

た。

(5) rfCK18(239-397)を50 μ g/mLに調製した。CHO細胞培養上清を準備した。

(6) 96穴V字底プレートに、15%抗マウスIgG結合セファロース4Bを30 μ L/wellずつと、rfCK18(239-397)を30 μ L/wellずつと、K 1 8 - 3 2 8 抗体溶液またはK 1 8 - 6 2 4 抗体溶液を30 μ L/wellずつ加えた。また、ポジティブコントロールとしてK 1 8 - 3 2 8 抗体溶液およびK 1 8 - 6 2 4 抗体溶液を加えないもの、ブランクとして15%抗マウスIgG結合セファロース4Bのみを加えたものを用意した。

(7) 96穴V字底プレートを室温で1時間振とうした。

(8) 96穴V字底プレートを10分静置し、抗マウスIgG結合セファロース4Bを沈殿させた後、96穴V字底プレートの上清を、K 1 8 - 2 8 7 抗体固相プレートに50 μ L/wellずつ加え、室温で1時間振とうした。

(9) ビオチン化K 1 8 - 9 1 抗体(終濃度2 μ g/mL)とStreptavidin-POD conjugate(終濃度50 mU/mL)の混合液を調製した。

(1 0) K 1 8 - 2 8 7 抗体固相プレートをPBSTで3回洗浄し、ビオチン化K 1 8 - 9 1 抗体とStreptavidin-POD conjugateの混合液を50 μ L/wellずつ加え、室温で1時間振とうした。

(1 1) K 1 8 - 抗体固相プレートをPBSTで3回洗浄し、TMB Mix(1-step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific社): 3% H_2O_2 : Phosphate-Citrate buffer (sigma社) = 15:0.15:14.85)を100 μ L/well加えて室温で10分間反応させた後、1M H_2SO_4 を100 μ L/well加えて反応を停止させた。

(1 2) プレートリーダーで反応液の450nm吸光度を測定した。

(1 3) 次の式を用いて、吸収率(%)を計算した。

吸収率(%) = (1 - (抗体サンプル液の吸光度測定値 - ブランクの吸光度測定値) $\div$ (ポジティブコントロールの吸光度測定値 - ブランクの吸光度測定値)) $\times$ 100

【 0 0 7 8 】

(結果)

測定結果を表7に示す。K 1 8 - 3 2 8 抗体は全長rCK18、rfCK18(127-430)およびrfCK18(239-396)と結合性を示した。K 1 8 - 3 2 8 抗体が結合性を示したタンパク質は、いずれもペプチド17が含まれていた。K 1 8 - 6 2 4 抗体は全長rCK18、rfCK18(127-430)、rfCK18(239-396)およびペプチド2とは結合性を示さず、ペプチド1およびrfCK18(239-397)とは結合性を示した。K 1 8 - 6 2 4 抗体が結合性を示さなかったタンパク質およびペプチドはC末端配列がアスパラギン酸残基ではなかった。一方、結合性を示したタンパク質およびペプチドのC末端残基のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基であった。この結果から、K 1 8 - 6 2 4 抗体が結合するためには、ペプチドおよびタンパク質のC末端アミノ酸残基がアスパラギン酸であることが重要であると考えられた。

【 0 0 7 9 】

【表7】

抗体	Abs450			吸収率(%)		
	全長 rCK18	rfCK18 (127-430)	rfCK18 (239-396)	ペプチド 1	ペプチド 2	rfCK18 (239-397)
K18-328 抗体	0.516	0.890	0.525	NT	NT	NT
K18-624 抗体	NT	NT	0.017	2.636	0.017	89.6

【 0 0 8 0 】

[5] アミノ酸配列の取得および、C D R 配列の特定

K 1 8 - 3 2 8 抗体およびK 1 8 - 6 2 4 抗体のアミノ酸配列の取得および、C D R 配列の特定を行った。

【 0 0 8 1 】

< 手法 >

(1) K 1 8 - 3 2 8 抗体および K 1 8 - 6 2 4 抗体を産生するハイブリドーマから、total RNAを調製した。

(2) 調製したtotal RNAを鋳型としてcDNAを合成した。

(3) RNase Hにより2本鎖化し、アダプターを連結させた。

(4) 得られたcDNAを鋳型として、H鎖の定常領域のプライマーとアダプタープライマー、L鎖の定常領域のプライマーとアダプタープライマーを用いてPCRし可変領域を増幅した。

(5) H鎖およびL鎖の増幅断片を精製し、クローニングベクターにクローニング後、大腸菌に導入して形質転換体を得た。

(6) 得られた形質転換体からプラスミドを調製し、塩基配列およびアミノ酸配列を取得した。

(7) 公共のCDR配列推定データベース (V B A S E 2) を用いて、取得した塩基配列から、CDR配列を特定した。

【 0 0 8 2 】

K 1 8 - 3 2 8 抗体の塩基配列に基づき特定したCDR配列を表 8 に示す。また、K 1 8 - 3 2 8 抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 5 および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 6 であった。K 1 8 - 6 2 4 抗体の塩基配列に基づき特定したCDR配列を表 9 に示す。また、K 1 8 - 6 2 4 抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号 7 であり、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号 8 であった。

【 0 0 8 3 】

【表 8】

K18-328	重鎖 (N末端→C末端)	軽鎖 (N末端→C末端)
CDR1	GYTFTNYT (配列番号 40)	ESVDSYGISF (配列番号 43)
CDR2	INPSSGYT (配列番号 41)	AAS
CDR3	ARQIPFAY (配列番号 42)	QQSKEVPWT (配列番号 44)

【 0 0 8 4 】

【表 9】

K18-624	重鎖 (N末端→C末端)	軽鎖 (N末端→C末端)
CDR1	SFGMH (配列番号 1)	RASQRIGTSIH (配列番号 4)
CDR2	YISSGSTTIYYADTVKG (配列番号 2)	YASESIS (配列番号 5)
CDR3	RGMITTGAWFAY (配列番号 3)	QQSYIWPFT (配列番号 6)

【 0 0 8 5 】

実施例 2

K 1 8 - 6 2 4 抗体と M 3 0 抗体の抗原に対する反応性の比較

上記で取得した K 1 8 - 6 2 4 抗体および M 3 0 抗体 (特許文献 1) の抗原に対する反応性を免疫沈降法およびウェスタンブロットにより測定した。

< 手法 >

(1) 磁性マイクロビーズに、K 1 8 - 6 2 4 抗体および M30 抗体 (Diapharma) を感作し、それぞれ K 1 8 - 6 2 4 抗体結合磁性マイクロビーズおよび M30 抗体結合磁性マイクロビーズを調製した。

(2) アポトーシス誘導した HepG2 細胞培養上清を、希釈液 (TBS, pH7.5, 2%BSA) にて 2 倍、10 倍および 20 倍希釈し、各サンプル溶液を調製した。

(3) 希釈した各サンプル溶液と各 0.5 % 抗体結合磁性マイクロビーズを混合後、インキ

キュベート (15 rpm, 4 , O/N) した。

(4) 各0.5 %抗体結合磁性マイクロビーズおよび健常者プール血清 (pool) についても同様の操作を実施した。

(5) マイクロビーズを洗浄後、溶出液 (0.05% Rapi Gest) を添加し、インキュベート (67 , 30 min) し、上清をウェスタンブロット分析に供した。

(6) ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離後、P V D F 膜に転写した。

(7) 転写した P V D F 膜をブロッキングし、実施例 1 で作成した K 1 8 - 3 2 8 抗体の Fab をアルカリホスファターゼで標識した抗体 (K18-328Fab-ALP) にてインキュベートした。

(8) 化学発光反応にて検出した。

10

【0086】

(結果)

実施例 2 の結果を図 2 に示す。特許文献 1 記載の M 3 0 抗体は 2 倍希釈細胞上清を供したレーン (図 2、M 3 0 抗体マイクロビーズ I P、sup × 2 で示されるレーン) において、18 kDa 付近のバンドがわずかに見られた。一方、K 1 8 - 6 2 4 抗体は 2 倍、10 倍および 20 倍の希釈細胞上清を供したいずれのレーン (図 2、K 1 8 - 6 2 4 抗体マイクロビーズ I P、それぞれ sup × 2、sup × 10 および sup × 20 で示されるレーン) においても、18 kDa 付近のバンドが見られた。K 1 8 - 6 2 4 抗体は M 3 0 抗体に比べて、アポトシス誘導細胞中の fCK18 に対する反応性が高いことが示唆された。

【0087】

20

実施例 3

キャリブレーションタンパク質の発現検討

fCK18 の標準物質となるキャリブレーションを、大腸菌を用いて発現させ、精製を行った。その際、コンピテントセルには、J M 1 0 9 株 (富士フィルム和光純薬社)、プラスミドに pBLC を用いた。配列番号 9 で示されるアミノ酸配列の 261 番目から 397 番目のアミノ酸 (配列番号 47) をコードする塩基配列または配列番号 9 で示されるアミノ酸配列の 241 番目から 397 番目のアミノ酸 (配列番号 48) をコードする塩基配列を pBLC にライゲーションさせた (以下、調製したプラスミドをそれぞれ「pBLC-fCK18(261-397)」、「pBLC-fCK18(241-397)」という)。

【0088】

30

<手法>

(1) コンピテントセルにプラスミド (pBLC-fCK18(261-397) または pBLC-fCK18(241-397)) を混合、氷上にてインキュベートすることにより、形質転換体を得た。

(2) Lysogeny broth (LB) 寒天培地へ塗布後、培養 (37 , O/N) した。

(3) 100 μg/mL Ampicillin 含有 LB 液体培地にコロニーを植菌し、前培養 (37 , O/N, 300 rpm/min) した。

(4) 100 μg/mL Ampicillin 含有 LB 培地に前培養液を添加し、37 、200 rpm/min で OD660 が 0.5 から 0.6 になるまで培養した。

(5) 終濃度 0.5 mM となるように Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、培養 (37 , O/N, 200 rpm/min) した。

40

(6) 培養液を遠心分離 (10,000g, 4 , 10 min) 後、菌体を洗浄して集菌した。

(7) 集菌した菌体を緩衝液 (Tris-buffered Saline (TBS), pH 7.5) へ再懸濁し、超音波破碎後、遠心分離し可溶性画分と不溶性画分に分離した。

(8) 破碎にて得た可溶性画分を抗 fCK18 抗体結合カラムにて、アフィニティクロマトグラフィー精製を 2 回繰り返した。

(9) 精製した溶液を脱塩カラム (商品名: PD-10、cytiva 社) にて、溶媒を TBS (pH 7.5) に置換した。

【0089】

rfCK18(241-397) の可溶性画分と不溶性画分についてウェスタンブロットを行った結果を図 3 に示す。rfCK18 (261-397) の可溶性画分と不溶性画分についてウェスタンブロッ

50

トを行った結果を図4に示す。rfCK18(241-397)の可溶性画分を供したレーン(図3、可溶性で示されるレーン)の18KDa付近のバンドに比べて、rfCK18(261-397)の可溶性画分を供したレーン(図4、可溶性で示されるレーン)の16KDa付近のバンドは鮮明であった。この結果から、大腸菌を宿主として、リコンビナントタンパク質を作製した場合において、rfCK18(261-397)はrfCK18(241-397)に比べて、可溶性画分の発現量が高いことが示唆された。

【0090】

実施例4

(i) K18-624抗体を用いた、全自動免疫測定装置HISCL(商標)(シスメックス社)による測定fCK18の測定

10

アポトーシス誘導したHepG2細胞培養上清を希釈液(TBS, pH7.5, 2% BSA)にて3倍希釈系列(3倍~6561倍希釈)の測定サンプルを作製し、fCK18を測定した。また、実施例3で作成したfCK18(261-397)をキャリブレーションとして用いて検量線を作成した。作成した検量線に基づき、測定サンプル中のfCK18を測定した。

【0091】

HISCL(商標)を用いて、測定サンプル中のfCK18を測定した。なお、測定サンプルおよびHISCL(商標)R1~R3試薬を以下の溶液および容量とし、R4試薬およびR5試薬(シスメックス社)は市販品を用いた。操作手順はHISCL(商標)試薬の添付文書の標準操作法に従い、2ステップ法で測定した。

【0092】

20

測定サンプル: 各30 μ L

R1試薬: 希釈液(TBS, pH7.5, 2% BSA) 40 μ L

R2試薬: 0.5% K18-624抗体結合磁性マイクロビーズ液 30 μ L

R3試薬: 0.1 μ g/mL CK18標識抗体(K18-328Fab-ALP) 100 μ L

【0093】

(ii) K18-624抗体結合磁性マイクロビーズを用いた、ELISA法によるfCK18の測定

測定サンプルおよび検量線の作成は実施例4と同様に行い、以下の手法により、測定サンプル中のfCK18を定量した。

【0094】

30

<手法>

(1) 0.5% K18-624抗体結合磁性マイクロビーズを希釈液(TBS, pH7.5, 0.5% BSA)にて希釈し、0.05% K18-624抗体結合磁性マイクロビーズを調製した。この液をELISA用プレートに25 μ L/well添加後、各測定サンプルを25 μ L/well添加し、インキュベート(1500 rpm, RT, 20 min)した。

(2) プレートを洗浄後、抗0.1 μ g/mL CK18標識抗体(K18-328Fab-ALP)を25 μ L/well添加し、インキュベート(1500 rpm, RT, 20 min)した。

(3) プレートを洗浄後、HISCL(商標)R4試薬を50 μ L/well添加後、攪拌(1500 rpm, RT, 1 min)した後、HISCL(商標)R5試薬を100 μ L/well添加後、攪拌(1000 rpm, RT, 10 sec)した。

40

(4) プレートリーダーにて、発光強度を測定した。

【0095】

比較例1

M30抗体を用いたfCK18の測定測定サンプルの調製は実施例4と同様に行った。市販のfCK18測定キット(Diapharma社)を用いて、以下の手法により、測定サンプル中のfCK18を測定した。

【0096】

<手法>

(1) 各測定サンプルをELISA用プレートに25 μ L/well添加後、M30 conjugate を75 μ L/well添加し、インキュベート(600 rpm, RT, 4h)した。

50

(2) Wash Bufferにて洗浄後、TMB 200 μ L/well添加し、インキュベート (静置遮光 , RT , 20 min) した。

(3) Stop Solutionを50 μ L/well添加し、5 min静置後に450nmの吸光度を測定した。

【 0 0 9 7 】

(結果)

実施例 4 および比較例 1 で測定したシグナル値に基づき、S / N比を算出した結果を表 1 0 に示す。感度の基準をS / N比を 2 以上とした場合において、実施例 4 (i) は0.28 ng/mL 以上、実施例 4 (ii) は0.09 ng/mL 以上、比較例は2.23 ng/mL 以上のアポトーシス誘導細胞中のfCK18を検出することができた。実施例 4 (i) は比較例 1 に比べて約 8 倍の検出感度であり、実施例 4 (ii) は比較例 1 と比べて約 2 4 倍のfCK18検出感度であった。以上より、K 1 8 - 6 2 4 抗体はM 3 0 抗体に比べて、より高感度にfCK18を検出することができることが示唆された。

10

【 0 0 9 8 】

【表 1 0 】

fCK18 [ng/mL]	実施例 4 (i)	実施例 4 (ii)	比較例 1
0	-	-	-
0.09	1.9	2.7	1.1
0.28	3.8	5.9	1.2
0.74	9.4	16.1	1.5
2.23	25.9	47.3	2.4
6.79	75.7	157.9	5.1
20.27	225.9	525.3	12.8
60.73	682.9	1848.4	37.5
182.28	2067.1	5564.2	48.3

20

30

【 0 0 9 9 】

実施例 5

血清中のfCK18の測定

健常者から採取した血清検体について、計 2 0 検体中のfCK18濃度を測定した。また、N A S H患者から採取した血清検体について、計 1 4 検体中のfCK18濃度を測定した。なお、手法および条件は実施例 4 と同様にして測定した。

【 0 1 0 0 】

実施例 5 の健常者検体およびN A S H患者検体におけるfCK18濃度の測定結果を表 1 1 に示す。表 1 1 に示されるように、ヒトから採取した血清検体中のfCK18濃度についても測定できることがわかった。

40

【 0 1 0 1 】

50

【表 1 1】

健常者検体	ng/mL	NASH検体	ng/mL
1	1.17	1	1.95
2	0.19	2	5.51
3	0.08	3	5.22
4	0.17	4	7.15
5	0.31	5	15.53
6	0.19	6	5.92
7	0.20	7	4.53
8	0.22	8	5.70
9	0.37	9	4.32
10	3.09	10	6.14
11	0.08	11	2.98
12	2.34	12	3.26
13	0.28	13	4.37
14	2.19	14	11.07
15	0.28		
16	0.42		
17	0.32		
18	0.77		
19	0.45		
20	2.50		

10

20

【0102】

実施例 6

がん患者検体の測定

複数種のがん患者から採取した血清検体について、各がん患者3検体中のfCK18濃度を測定した。なお、手法および条件は実施例4と同様にして測定した。

【0103】

実施例6のがん患者検体におけるfCK18濃度の測定結果を表12に示す。表12に示されるように、がん患者から採取した血清検体中のfCK18濃度についても測定できることがわかった。

30

【0104】

【表 1 2】

がん種	検体数	測定レンジ (ng/mL)
胃がん	3	0.77～1.66
結腸がん	3	0.84～2.41
食道がん	3	0.25～1.60
胆管がん	3	0.54～1.77
乳がん	3	0.53～16.46
肺がん	3	0.61～1.04
膵臓がん	3	0.93～2.83

40

50

【符号の説明】

【 0 1 0 5 】

- 1 1、2 1： 試薬キット
- 1 2、2 2： 第 1 容器
- 1 3、2 3： 第 2 容器
- 2 4： 第 3 容器
- 2 5： 第 4 容器
- 1 4、2 7： 梱包箱
- 1 5、2 6： 添付文書

10

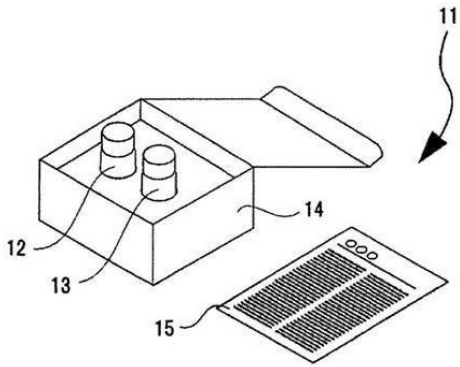
20

30

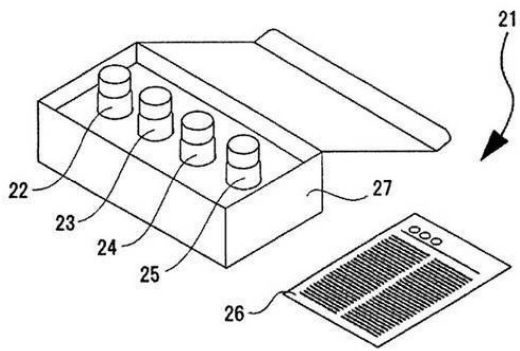
40

50

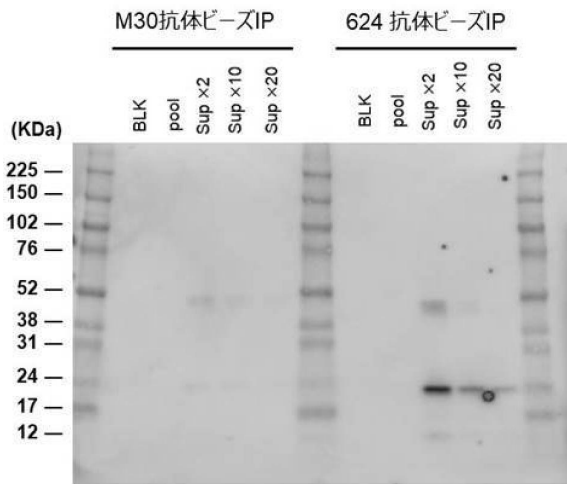
【図面】
【図 1 A】



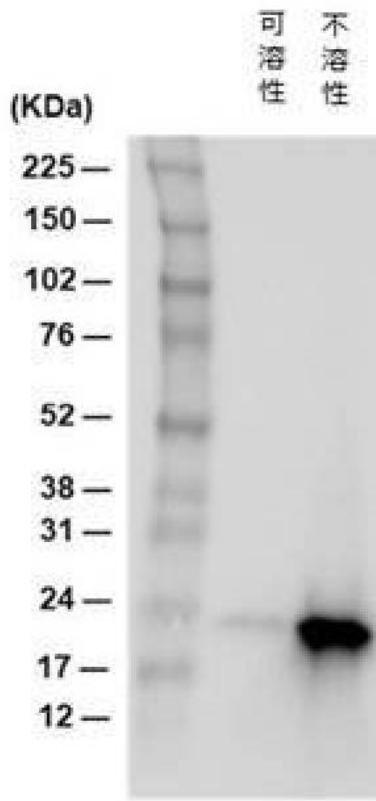
【図 1 B】



【図 2】



【図 3】



10

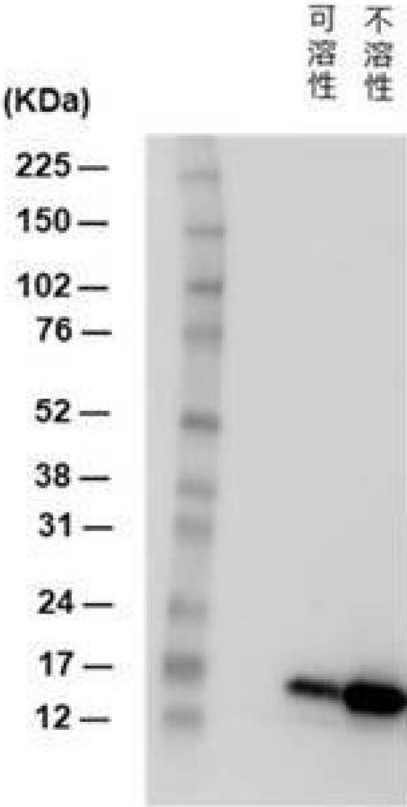
20

30

40

50

【 図 4 】



【 配列表 】

0007685340000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 沖津 直哉
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 山田 みのり
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 北村 奈保子
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 山口 哲司
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2017/0192014(US, A1)

米国特許出願公開第2013/0260388(US, A1)

Journal of Pathology, 1999年, Vol.187, pp.567-572

- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

C12P 1/00 - 41/00

C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E (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)

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d