

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6829689号
(P6829689)

(45) 発行日 令和3年2月10日 (2021.2.10)

(24) 登録日 令和3年1月26日 (2021.1.26)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/531 (2006.01)

GO 1 N 33/531 B

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 J

CO 7 K 7/08 (2006.01)

CO 7 K 7/08 Z N A

CO 7 K 14/47 (2006.01)

CO 7 K 14/47

請求項の数 14 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2017-536397 (P2017-536397)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月19日 (2016.8.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/074181
 (87) 国際公開番号 W02017/033846
 (87) 国際公開日 平成29年3月2日 (2017.3.2)
 審査請求日 令和1年7月23日 (2019.7.23)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-163839 (P2015-163839)
 (32) 優先日 平成27年8月21日 (2015.8.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000238201
 扶桑薬品工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
 (73) 特許権者 000001007
 キヤノン株式会社
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫試験方法および免疫試験キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H M G B 2 吸収剤の存在下で H M G B 1 抗体と試料を接触させる工程を含む、該試料中の
 H M G B 1 の測定または検出方法であって、

前記 H M G B 2 吸収剤が少なくとも、以下 (I) または (I I) で表されるアミノ酸配列
 を認識する H M G B 2 抗体を含む、前記方法；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3)、または

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

【請求項2】

H M G B 2 吸収剤の存在下で H M G B 1 抗体と試料を接触させる工程を含む、該試料中の
 H M G B 1 の測定または検出方法であって、

前記 H M G B 2 吸収剤が少なくとも以下 (I) または (I I) に記載されたペプチドを含
 む、前記方法；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3) で表されるアミノ酸配列において1または
 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、H
 M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド、または

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4) で表されるアミノ酸配列において1ま
 たは2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり
 、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド。

【請求項3】

10

20

H M G B 1 抗体が H M G B 1 と H M G B 2 の両方に結合性を示す抗体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

H M G B 1 の測定または検出を免疫試験方法によって行うことを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも H M G B 1 抗体を含む第 1 の試薬および H M G B 2 吸収剤を含む第 2 の試薬を含む、H M G B 1 の測定または検出用キットであって、
前記 H M G B 2 吸収剤が少なくとも以下 (I) または (I I) で表されるアミノ酸配列を認識する H M G B 2 抗体を含む、前記キット；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3)、または

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

【請求項 6】

少なくとも H M G B 1 抗体を含む第 1 の試薬および H M G B 2 吸収剤を含む第 2 の試薬を含む、H M G B 1 の測定または検出用キットであって、
前記 H M G B 2 吸収剤が少なくとも以下 (I) または (I I) に記載されたペプチドを含む、前記キット；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3) で表されるアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド、または

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4) で表されるアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド。

【請求項 7】

H M G B 1 抗体が H M G B 1 と H M G B 2 の両方に結合性を示す抗体である、請求項 5 または 6 に記載のキット。

【請求項 8】

免疫試験方法を使用して H M G B 1 を測定または検出するために用いるための請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載のキット。

【請求項 9】

少なくとも H M G B 1 抗体および H M G B 2 吸収剤を含む、H M G B 1 の測定または検出用試薬であって、

前記 H M G B 2 吸収剤が少なくとも以下 (I) または (I I) で表されるアミノ酸配列を認識する H M G B 2 抗体を含む、前記試薬；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3)、または

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

【請求項 10】

少なくとも H M G B 1 抗体および H M G B 2 吸収剤を含む、H M G B 1 の測定または検出用試薬であって、

前記 H M G B 2 吸収剤が少なくとも以下 (I) または (I I) に記載されたペプチドを含む、前記試薬；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3) で表されるアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド、または

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4) で表されるアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド。

【請求項 11】

H M G B 1 抗体が H M G B 1 と H M G B 2 の両方に結合性を示す抗体である、請求項 9 または 10 に記載の試薬。

【請求項 1 2】

免疫試験方法を使用して H M G B 1 を測定または検出するために用いるための請求項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 1 3】

以下 (I) または (I I) に記載されたペプチドであって、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合を阻害するペプチド：

(I) : MGKGDPNKPGRKMSSYA (配列番号 : 3) で表されるアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなるペプチド、または

(I I) : CREEHKKKHDPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4) で表されるアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなるペプチド。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載のペプチドを含む試料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、敗血症等の疾患マーカーとなり得る High Mobility Group Box 1 (以下「H M G B 1」と略することがある) の測定または検出方法および測定または検出用キット等に関する。

20

【背景技術】

【0002】

High Mobility Group Protein (以下「H M G」) は、クロマチン構造に含まれる非ヒストンタンパク質であり、多くの高等動植物に共通して含まれるタンパク質である。H M G には、例えば H M G B 1、H M G B 2、H M G B 3、H M G B 8、H M G B 1 7 等、いくつかの種類が存在する。これら H M G は、互いにアミノ酸配列の相同性が高いことが特徴として挙げられる。例えば、ヒト由来の H M G B 1 に対するヒト由来の H M G B 2 の相同性は 8 0 % 以上である。

【0003】

1 9 9 9 年、W a n g ら (非特許文献 1) により、H M G B 1 が敗血症のマーカーとなり得ることが示され、H M G B 1 は敗血症性ショック時の晩期に発現するメディエーターとして注目されるようになった。また、H M G B 1 は、敗血症発症時に核外へと遊離され、重度の細胞障害性を示すことから、敗血症時の致死性に関与する可能性が指摘されている。

30

一方、H M G B 2 の血中放出に関する報告もある (非特許文献 2) 。丸山らはウエスタンブロットにより、潰瘍性大腸炎患者の血清中に H M G B 2 が放出されていることを確認している。つまり、ヒトの血中においては、H M G B 1 と H M G B 2 が同時に検出される可能性がある。そのため敗血症の判別においては、H M G B 2 共存下であっても、H M G B 1 を特異的に測定する方法や測定試薬が必要である。

【0004】

40

特許第 5 0 5 5 5 9 8 号 (特許文献 1) には、試料中の H M G B 1 を特異的に測定するための方法として、H M G B 1 と H M G B 2 を識別し得る抗体の獲得に関する記載がある。具体的には、まず、H M G B 1 のアミノ酸配列を含むペプチドを免疫原として動物に免疫し、H M G B 1 抗体の産生を促す。しかし前述したように、H M G B 1 と H M G B 2 のアミノ酸配列の相同性が極めて高い。そのため実際には、H M G B 1 だけではなく H M G B 2 にも結合する H M G B 1 抗体が数多く産生される。そこで、抗体産生後に、H M G B 2 をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー法により H M G B 2 にも結合する H M G B 1 抗体を除去し、H M G B 1 特異的に結合する H M G B 1 抗体を獲得している。

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】特許第 5 0 5 5 5 9 8 号

【特許文献 2】特開 2 0 1 3 - 1 2 2 4 0 2 号公報 検体検査用分析装置（キヤノン株式会社、キヤノン化成株式会社）

【非特許文献】

【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】SCIENCE、285、248～251、1999

【非特許文献 2】Clinical Chemistry、49、9、1535～1537、2003

【非特許文献 3】ロックランドイムノケミカルズ社 / Rockland Immunochemicals, Inc. ホームページ、[online]、[平成27年6月1日検索]、インターネット <URL : <http://www.rockland-inc.com/uploadedFiles/Support/Protocols/Peptide-Competition-Protocol.pdf>>

10

【非特許文献 4】Intensive Care Medicine、33、1347～1353、2007

【非特許文献 5】Blood Purification、32、139～142、2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

前述したように、敗血症の判別においては、HMGB2 共存下であっても HMGB1 を特異的に測定することが求められる。しかし、HMGB1 と HMGB2 のアミノ酸配列の相同性が極めて高いために、免疫動物に HMGB1 抗体を産生させた場合、HMGB1 だけではなく HMGB2 にも結合する HMGB1 抗体が数多く産生される。

20

【 0 0 0 8 】

産生された抗体の中から HMGB1 のみに結合する HMGB1 抗体を取得する手段として、前述の特許第 5 0 5 5 5 9 8 号に示されるように、アフィニティークロマトグラフィーによる方法が知られている。しかしこの方法は、工程数が増えるだけではなく精製により目的物の回収量も減少するため、製造コストが上昇するという問題がある。

【 0 0 0 9 】

このように、HMGB1 を特異的に測定する手段の確立が求められる一方で、HMGB1 特異的に結合する HMGB1 抗体の取得は容易ではない。本発明はこのような状況を鑑みてなされたものであり、HMGB1 抗体を用いて HMGB1 を選択的に測定または検出する方法および当該方法に使用するためのキット等を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果本発明者らは、HMGB2 にも結合する HMGB1 抗体を用いて試料中の HMGB1 を測定する際に、HMGB2 吸収剤を共存させることで、HMGB2 と HMGB1 抗体の結合を抑制し、HMGB1 を特異的に検出できることを見出した。

本発明はこのような知見に基づくものであり、試料に含まれる HMGB1 を HMGB1 抗体を用いて測定または検出するための方法であって、HMGB2 吸収剤の存在下において試料と HMGB1 抗体を接触させることを特徴とする方法に関する。

40

また本発明は、HMGB1 抗体を用いて試料に含まれる HMGB1 を測定または検出するためのキットまたは試薬であって、少なくとも、HMGB1 抗体および HMGB2 吸収剤を具備し、HMGB2 吸収剤の存在下において試料と HMGB1 抗体を接触させて使用することを特徴とするキットまたは試薬に関する。

【 0 0 1 1 】

本発明の方法では、試料中に HMGB1 抗体と HMGB2 吸収剤を共存させることで、HMGB2 と HMGB1 抗体の結合を抑制することができる。それゆえ、試料中に HMGB1 と HMGB2 の両方が含まれている場合にも、HMGB1 を正確に測定することが可能となる。

50

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明の方法では、H M G B 2にも結合性を示すH M G B 1抗体を利用することができる。それゆえ、一般的に知られる免疫動物を用いた抗体産生技術により容易に獲得される多くのH M G B 1抗体を、本発明の方法に利用することが出来る。

【 0 0 1 3 】

さらに、本発明の方法では、H M G B 2吸収剤として、H M G B 2抗体を利用することができる。H M G B 2抗体は一般的に知られる免疫動物を用いた抗体産生技術により獲得できるため、容易にH M G B 2吸収剤を作製できる。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明の方法では、H M G B 2吸収剤として、式(I)または(I I)に記載のH M G B 2由来のアミノ酸配列を含むペプチドを利用することができる。これらのペプチドは容易に合成することができるため、より安価にH M G B 2吸収剤を作製することが出来る。

(I) : MGKGDPNKPGRKMSSYA (配列番号 : 3)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)

【 0 0 1 5 】

さらに、本発明のキット、試薬では、H M G B 2吸収剤をキット、試薬に具備させておけばよく、測定時に試料と混合するだけで、H M G B 2とH M G B 1抗体の結合を抑制することが出来る。それゆえ、簡素なキット、試薬の構成で、H M G B 1を正確に測定することが出来る。

【 0 0 1 6 】

さらに、本発明のキット、試薬では、H M G B 2にも結合性を示すH M G B 1抗体を利用することができる。それゆえ、一般的に知られる免疫動物を用いた抗体産生技術により獲得される多くのH M G B 1抗体の利用が可能となり、容易にキット、試薬を作製することができる。

【 0 0 1 7 】

さらに、本発明のキット、試薬では、H M G B 2吸収剤として、H M G B 2抗体を利用することができる。H M G B 2抗体は一般的に知られる免疫動物を用いた抗体産生技術により獲得できるため、容易にH M G B 2吸収剤を作製できる。

【 0 0 1 8 】

さらに、本発明のキット、試薬では、H M G B 2吸収剤として、式(I)または(I I)に記載のH M G B 2特異的なアミノ酸を含むペプチドを利用することができる。これらのペプチドは容易に合成することができるため、より安価にH M G B 2吸収剤を作製することが出来る。

(I) : MGKGDPNKPGRKMSSYA (配列番号 : 3)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)

【 0 0 1 9 】

本発明は、より具体的には以下〔 1 〕から〔 1 7 〕に関する。

〔 1 〕H M G B 2吸収剤の存在下でH M G B 1抗体と試料を接触させる工程を含む、該試料中のH M G B 1の測定または検出方法。

〔 2 〕H M G B 1抗体がH M G B 1とH M G B 2の両方に結合性を示す抗体である、〔 1 〕に記載の方法。

〔 3 〕H M G B 2吸収剤が少なくともH M G B 2抗体を含む、〔 1 〕または〔 2 〕に記載の方法。

〔 4 〕H M G B 2吸収剤が少なくとも次式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、〔 1 〕または〔 2 〕に記載の方法；

(I) : MGKGDPNKPGRKMSSYA (配列番号 : 3)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

〔 5 〕H M G B 1の測定または検出を免疫試験方法によって行うことを特徴とする、〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載の方法。

〔 6 〕 少なくとも H M G B 1 抗体を含む第 1 の試薬および H M G B 2 吸収剤を含む第 2 の試薬を含む、H M G B 1 の測定または検出用キット。

〔 7 〕 H M G B 1 抗体が H M G B 1 と H M G B 2 の両方に結合性を示す抗体である、〔 6 〕に記載のキット。

〔 8 〕 H M G B 2 吸収剤が少なくとも H M G B 2 抗体を含む、〔 6 〕または〔 7 〕に記載のキット。

〔 9 〕 H M G B 2 吸収剤が少なくとも次式 (I) または (I I) で表されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、〔 6 〕または〔 7 〕に記載のキット；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

〔 1 0 〕 免疫試験方法を使用して H M G B 1 を測定または検出するために用いるための〔 6 〕～〔 9 〕のいずれかに記載のキット。

〔 1 1 〕 少なくとも H M G B 1 抗体および H M G B 2 吸収剤を含む、H M G B 1 の測定または検出用試薬。

〔 1 2 〕 H M G B 1 抗体が H M G B 1 と H M G B 2 の両方に結合性を示す抗体である、〔 1 1 〕に記載の試薬。

〔 1 3 〕 H M G B 2 吸収剤が少なくとも H M G B 2 抗体を含む、〔 1 1 〕または〔 1 2 〕に記載の試薬。

〔 1 4 〕 H M G B 2 吸収剤が少なくとも次式 (I) または (I I) で表されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、〔 1 1 〕または〔 1 2 〕に記載の試薬；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

〔 1 5 〕 免疫試験方法を使用して H M G B 1 を測定または検出するために用いるための〔 1 1 〕～〔 1 4 〕のいずれかに記載の試薬。

〔 1 6 〕 次式 (I) または (I I) で表されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合を阻害するペプチド；

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4)。

〔 1 7 〕 〔 1 6 〕に記載のペプチドを含む試料。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

本発明により、試料中の H M G B 1 を特異的に測定または検出する方法および試料中の H M G B 1 を特異的に測定または検出するためのキットおよび試薬が提供された。本発明の方法やキット、試薬は、H M G B 2 吸収剤 (H M G B 2 抗体および / または H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合を阻害する H M G B 2 由来ペプチド) の存在下で、H M G B 1 抗体と試料を接触させることを特徴とする。本発明においては、取得が困難な H M G B 1 特異的抗体ではなく、H M G B 2 にも結合性を示す H M G B 1 抗体を利用することができる。そのような抗体は、一般的に知られる免疫動物を用いた抗体産生技術により容易に取得することができる。したがって本発明の方法やキット、試薬を用いると、容易かつ簡便に、試料中の H M G B 1 を選択的に検出することが可能である。

また本発明の H M G B 2 吸収剤を構成する物質のうち H M G B 2 抗体と H M G B 2 由来ペプチド (I I) (CREEHKKKHPDSSVNFAEFS / 配列番号 : 4) は、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合を阻害する効果、または H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合と競合する効果に加え、H M G B 1 抗体と H M G B 1 の結合を促進あるいは増幅する効果をも有する。したがって H M G B 2 吸収剤として H M G B 2 抗体や H M G B 2 由来ペプチド (I I) を使用する場合、より効率的に、試料中の H M G B 1 を選択的に検出することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】 H M G B 1 - E L I S A における H M G B 2 による非特異的反応と抗 H M G B 2 抗体による抑制を示すグラフである。

【図2】抗HMGB2抗体によるHMGB1-ELISAへの影響を示すグラフである。

【図3】HMGB1-ELISAによるHMGB2の測定と抗体による吸収について示すグラフである。

【図4A】HMGB1/2混合サンプルに対する吸収剤(HMGB2抗体No.3)の効果を示すグラフである。

【図4B】低濃度領域のHMGB1/2混合サンプルに対する吸収剤の効果を示すグラフである。

【図5】HMGB1とHMGB1/2混合物に対する吸収剤(HMGB2抗体)の効果を示すグラフである。

【図6】HMGB1ポリクローナル抗体No. 12を用いたELISAにおける抗HMGB2抗体による吸収効果を示すグラフである。A: HMGB-1(50 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 12)を用いて測定した。B: HMGB-2(1,820 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 12)を用いて測定した。

10

【図7】HMGB1ポリクローナル抗体No. 14を用いたELISAにおける抗HMGB2抗体による吸収効果を示すグラフである。A: HMGB-1 (50 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 14)を用いて測定した。B: HMGB-2 (1,820 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 14)を用いて測定した。

【図8】ペプチドMH2-1によるHMGB1およびHMGB2の測定に対する影響を示すグラフである。A: HMGB1 12.5 ng/ml。B: HMGB2 1,820 ng/ml。

【図9】ペプチドMH2-2によるHMGB1およびHMGB2の測定に対する影響を示すグラフである。A: HMGB1 12.5 ng/ml。B: HMGB2 1,820 ng/ml。

20

【図10】HMGB1ポリクローナル抗体No. 12を用いたELISAにおけるHMGB2ペプチドによる効果を示すグラフである。A: HMGB-1 (50 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 12)を用いて測定した。B: HMGB-2 (1,820 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 12)を用いて測定した。

【図11】HMGB1ポリクローナル抗体No. 14を用いたELISAにおけるHMGB2ペプチドによる効果を示すグラフである。A: HMGB-1 (50 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 14)を用いて測定した。B: HMGB-2 (1,820 ng/ml)を標識HMGB1ポリクローナル抗体(No. 14)を用いて測定した。

【図12】HMGB1モノクローナル抗体HMa176を用いたELISAにおけるHMGB2ペプチドによる効果を示すグラフである。A: HMGB-1 (50 ng/ml)を標識HMGB1抗体HMa176を用いて測定した。B: HMGB-2 (1,820 ng/ml)を標識HMGB1抗体HMa176を用いて測定した。

30

【図13】ヒトHMGB1のアミノ酸配列(配列番号: 1 / NCBIアクセッション番号CAG33144.1)およびヒトHMGB2のアミノ酸配列(配列番号: 2 / NCBIアクセッション番号AAI00020.1)のアライメントを示す図である。

【図14】HMGB2抗体やHMGB2ペプチドによる、HMGB2非特異的反応の阻害を示す図である。A) HMGB1抗体が相同性の高いHMGB2にも弱く結合してしまう。B) HMGB2抗体を加える事でHMGB1抗体(抗体A)がHMGB2に結合するのをブロックし、HMGB1を特異的に測定する。HMGB2抗体は分子量も大きく、立体障害が出やすい為、抗体(抗体B)もブロックすることがある。C) HMGB2のペプチドを加える事でHMGB2に対するHMGB1抗体Aの結合を中和し、HMGB1を特異的に測定する。しかしながらペプチドの分子量は小さく、エピトープの異なるHMGB1抗体Bにはペプチドによる中和反応がおこらない。

40

【図15】HMGB1の立体構造モデルとDNA結合部位を示す図である。HMGB1のN末側のDNA結合部位を示す。H1-H3に囲まれた領域に、H1-H3のヘリックス構造に含まれるリジン等塩基性アミノ酸を介してDNA等の酸性物質が結合すると考えられている。

【図16】HMGB1とDNA結合部位を示す図である。A) DNA、ヘパリン等マイナスにチャージした物質がHMGB1のリジン等塩基性アミノ酸リッチな領域に結合する。その為、立体障害等により、抗体が十分に結合できない。B) HM2ペプチドがDNA、ヘパリン等マイナスにチャージした物質に結合し、HMGB1への結合を阻害するため、立体障害等による抗体の結合阻害が起きにくい。

50

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に示す実施の形態はあくまでも一例であって、本発明は必ずしも以下の内容に限定されるものではない。

【0023】

本発明は、H M G B 2 吸収剤の存在下でH M G B 1 抗体と試料を接触させる工程を含む、該試料中のH M G B 1 の測定または検出方法に関する。

本発明において試料とは、H M G B 1 が含まれるもしくは含まれると疑われる溶液を意味する。例えば、ヒトやその他の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、犬、猫、牛、馬、豚、ヤギ、羊、サル（例えば、アカケザル、カニクイザル）、チンパンジー、鶏、ゼブラフィッシュなど）由来の血液、血清、血漿、尿、精液、ずい液、唾液、汗、涙、腹水、羊水など単離された生体試料、あるいはそれらを含む希釈液などを挙げることができるが、これらに限定されない。さらに、H M G B 1 が含まれるもしくは含まれると疑われる溶液を緩衝液などと混合して得られる溶液も、本発明の試料に含まれる。これらの試料の取得方法は当業者に周知である。混合あるいは希釈する溶媒としては、各種の水系溶媒を用いることができる。例えば、精製水、生理食塩水、またはトリス緩衝液、リン酸緩衝液もしくはリン酸緩衝液生理食塩水などの各種緩衝液を挙げることができるがこれらに限定されない。さらに、緩衝液のp Hについても特に限定されず、適宜、好適なp Hを選択することができる。一般的には、p H 3 ~ 1 2 の範囲内のp Hを選択して用いることができるが、これに限定されない。また溶媒には、被測定物質の構造的な保護を目的として、ウシ血清アルブミン（B S A）、ヒト血清アルブミン（H S A）、カゼインなどのタンパク質、各種糖類、脱脂粉乳、正常ウサギ血清などの各種動物血清、アジ化ナトリウムもしくは抗生物質などの各種防腐剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等のうち1種または2種以上を適宜含有させてもよい。

【0024】

本発明においては、H M G B 1 の由来は限定されない。本発明においては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、犬、猫、牛、馬、豚、ヤギ、アカケザル、カニクイザル、チンパンジー、鶏、ゼブラフィッシュ等由来のH M G B 1 を測定または検出することができるが、これらに限定されない。

以下に、各々のH M G B 1 のアミノ酸配列のNCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) databaseにおけるアクセッション番号と、本願明細書における配列番号を示す。

- ・ヒト[Homo sapiens] CAG33144.1 / 配列番号：1
- ・マウス[Mus musculus] AAI10668.1 / 配列番号：7
- ・ラット[Rattus norvegicus] NP_037095.1 / 配列番号：8
- ・ウサギ[Oryctolagus cuniculus] NP_001164752.1 / 配列番号：9
- ・イヌ[Canis lupus familiaris] AAN11319.1 / 配列番号：10
- ・ネコ[Felis catus] XP_006927254.1 / 配列番号：11
- ・ウシ[Bos taurus] AAI02930.1 / 配列番号：12
- ・ウマ[Equus caballus] BAF33339.1 / 配列番号：13
- ・ブタ[Sus scrofa] NP_001004034.1 / 配列番号：14
- ・ヤギ[Capra hircus] XP_005687595.1 / 配列番号：15
- ・アカケザル[Macaca mulatta] AFJ72047.1 / 配列番号：16
- ・カニクイザル[Macaca fascicularis] NP_001270285.1 / 配列番号：17
- ・チンパンジー[Pan troglodytes] XP_509611.1 / 配列番号：18
- ・ニワトリ[Gallus gallus] NP_990233.1 / 配列番号：19
- ・ゼブラフィッシュ[Danio rerio] AAH67193.1 / 配列番号：20

【0025】

本発明のH M G B 1 抗体は、H M G B 1 に対する結合活性を有するものであれば特に限

定されない。本発明においては、H M G B 1 に特異的に結合するH M G B 1 抗体、H M G B 1 およびH M G B 2 の両方に結合性を示すH M G B 1 抗体のいずれも使用することができるが、後者の抗体が好適に用いられる。

【0026】

また本発明においては、H M G B 1 抗体の種類や由来なども限定されない。例えば、M o u s e、R a b b i t、G o a t 等の種々の免疫動物から獲得される抗体が利用できる。また、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体からなる抗血清、モノクローナル抗体、またはこれらの抗体の断片（例えば、F a b、F (a b ') 2、F a b ' 等）や低分子化抗体（例えば、s c F v (s i n g l e - c h a i n F v)、ダイアボディー (D i a b o d y)、s c (F v) 2 (s i n g l e - c h a i n (F v) 2 等）、これらの多

10

【0027】

例えば、ポリクローナル抗体は、精製したH M G B 1 若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血べいを除去することにより調製することが可能である。またモノクローナル抗体は、H M G B 1 若しくはその一部のペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。

【0028】

抗体断片は、抗体を酵素で消化して生成させることができる。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミンなどが公知である。あるいは、これら抗体断片をコードするD N A を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることができる。

20

【0029】

s c F v は、抗体のV H とV L とを連結することにより得られる。s c F v において、V H とV L は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される。V 領域を連結するペプチドリリンカーには、特に制限はない。例えば3 から25 残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。ダイアボディーは、2 本のs c F v から構成されるダイマーである。s c (F v) 2 は、2 つのV H および2 つのV L をリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である。s c (F v) 2 は、例えば、2

30

【0030】

本発明のH M G B 1 抗体は、例えば、H M G B 2 のアミノ酸配列との間で相同性の低いH M G B 1 由来のアミノ酸配列を含む領域を認識する抗体とすることができる。H M G B 2 との間でアミノ酸配列の相同性の低いH M G B 1 由来のアミノ酸配列を含む領域とは、H M G B 1 とH M G B 2 の間でアミノ酸配列が一致しないアミノ酸配列の領域であって、H M G B 1 由来のアミノ酸配列を含む領域、あるいはH M G B 1 とH M G B 2 の間で立体構造が異なるアミノ酸配列の領域であってH M G B 1 由来のアミノ酸配列を含む領域と言い換えることもできる。このような領域として、例えば、式 (I ') または (I I ') に記載のH M G B 1 特異的なアミノ酸配列を含む領域を挙げることができるが、これらに限定

40

(I ') : M G K G D P K K P R G K M S S Y A (配列番号 : 5 / ヒト全長H M G B 1 (配列番号 : 1) の1 ~ 17 番目に記載のアミノ酸配列)

(I I ') : C R E E H K K K H P D A S V N F S E F S (配列番号 : 6 / ヒト全長H M G B 1 (配列番号 : 1) の23 ~ 42 番目に記載のアミノ酸配列)

【0031】

本発明においては、2 種類のH M G B 1 抗体を使用することもできる。その場合、2 種類の抗体のいずれもが、H M G B 1 特異的抗体であってもよいし、H M G B 1 およびH M G B 2 の両方に結合性を示すH M G B 1 抗体であってもよい。あるいは本発明においては、H M G B 1 特異的抗体とH M G B 1 およびH M G B 2 の両方に結合性を示すH M G B 1

50

抗体を組み合わせ使用することもできる。しかし本発明においては、2種類の抗体のいずれも、HMGB1およびHMGB2の両方に結合性を示す抗体であることが好ましい。例えば、後述するELISA法においては、固相化抗体および酵素標識抗体の両抗体が、HMGB1およびHMGB2の両方に結合性を示すHMGB1抗体であることが好ましい。

さらに、HMGB1およびHMGB2の両方に結合性を示すHMGB1抗体は、HMGB1に対する結合の強さとHMGB2に対する結合の強さの異同も特に限定されない。例えば、HMGB1に対する結合性とHMGB2に対する結合性は同程度であってもよいし、HMGB2よりもHMGB1に対して強く結合してもよい。また、2種類のHMGB1抗体のうち一方をHMGB1に対する結合性とHMGB2に対する結合性が同程度のHMGB1抗体とし、他方をHMGB2よりもHMGB1に対して強く結合するHMGB1抗体とすることもできる。

【0032】

本発明においてHMGB2吸収剤とは、HMGB2とHMGB1抗体の結合を阻害する物質、またはHMGB2とHMGB1抗体の結合と競合する物質をいう。

本発明の吸収剤は、HMGB2とHMGB1抗体の結合を阻害またはHMGB2とHMGB1抗体の結合と競合する作用（以下、HMGB2とHMGB1抗体の結合阻害作用）を有する限り特に限定されるものではないが、例えば以下のものを例示することができる。

・HMGB2抗体

・式(I)または(II)で表されるアミノ酸配列を含む、または式(I)または(II)で表されるアミノ酸配列からなる、HMGB2由来のペプチド

(I)：MGKGDPNKPRGKMSSYA（配列番号：3 / ヒト全長HMGB2（配列番号：2）の1～17番目に記載のアミノ酸配列）

(II)：CREEHKKKHPDSSVNFAEFS（配列番号：4 / ヒト全長HMGB2（配列番号：2）の23～42番目に記載のアミノ酸配列）

・式(I)または(II)で表されるアミノ酸配列において1または複数（例えば2、3、4、5又は10個）のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、HMGB2とHMGB1抗体の結合阻害作用を有するHMGB2由来のペプチド

本発明の吸収剤は、これらの抗体またはペプチドの1つまたは複数を含むことができる。

【0033】

HMGB1とHMGB2の同一性は、ヒトの場合、アミノ酸レベルで81.2%と高く、また、アミノ酸配列の共通する領域も多く認められる（図13）。ゆえに、HMGB1を通常の方法で免疫して得られるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体は、HMGB1のみならず、弱いながらも同一性の高いHMGB2にも結合することがある（図14A）。このような非特異的な結合を防止する方法として、Peptide competition assay (PCA) やblocking peptideと呼ばれる方法がよく使われている。ある抗原のペプチド配列(A)とAの一部が修飾された、もしくは1～数個のアミノ酸を置換したA'ペプチド配列を持つ抗原が共存している場合に、Aのみを特異的に認識したい場合、Aを認識する抗体のblocking peptideとして、A'ペプチドを反応系に共存させるもしくはA'を認識する抗体とあらかじめ反応させておくことで、Aを認識する抗体がA'と非特異的に結合することを防止する。

【0034】

HMGB2を認識するHMGB2抗体はHMGB2に反応し、HMGB1抗体Aが認識するHMGB2に存在するエピトープ類似配列付近をマスクし、もしくはその立体障害により、HMGB1抗体AがHMGB2に反応するのを阻害する。これにより、HMGB1抗体のHMGB1への結合が容易になる（図14B）。また、抗体分子は分子量が大きいいため、立体障害が起こりやすい。そのため、異なるエピトープを認識するHMGB1抗体B等による非特異的反応が阻害される（図14B）。

【 0 0 3 5 】

一方、H M G B 2 ペプチドは、H M G B 2 と競合的に働き、H M G B 2 に対するH M G B 1 抗体AがH M G B 2 に結合するのを阻害する。よって、抗H M G B 1 抗体AはH M G B 1 に特異的に反応する（図14C）。しかしながら、H M G B 2 ペプチドは分子量が小さいため、類似したエピトープのみにしか競合阻害効果を発揮できないと考えられる。すなわち、H M G B 1 抗体Bのような抗体は、ペプチドによる阻害が困難である（図14C）。その際、抗体のエピトープに近い部分のペプチドを選択した場合、ペプチドによる阻害が可能であると考えられる。

【 0 0 3 6 】

なお、実施例に示すように、ペプチド（I I）（HM2-2ペプチド）添加群ではH M G B 1 測定において、濃度依存的な反応の上昇が認められた。すなわち本発明のペプチド（I I）（HM2-2ペプチド）は、H M G B 2 とH M G B 1 抗体の結合阻害活性に加え、H M G B 1 とH M G B 1 抗体の結合の増強効果作用を有する。この増強効果を考察する。H M G B 1 の立体構造モデルを図15に示す。クロマチン構造に含まれる非ヒストンタンパク質であるH M G B 1 は、ここに示した3つのヘリックス構造（H1～H3）で挟み込むようにDNAを結合することが知られている（図15中の楕円の領域にDNAが結合する）。HM2-2ペプチドは図15のリボン模型において、斜線部分に該当するペプチドである。また、HM2-2ペプチド領域にはリジン（K）が多く含まれるドメイン構造が含まれている。このような塩基性アミノ酸であるリジンやアルギニン（R）、ヒスチジン（H）が連続または1 - 2アミノ酸置きに出現する構造はヘパリン（BBXB等：Bは塩基性アミノ酸）やフォスファチジルセリン等、マイナスにチャージした分子（H M G B 1 結合性阻害物質）が結合しやすい領域である。

【 0 0 3 7 】

H M G B 1 に結合するDNAやRNA、ヘパリンなどは高分子体である為、H M G B 1 に対して立体障害を起こしやすいと考えられる。故にH M G B 1 やH M G B 2 の塩基性アミノ酸を含むペプチドは、抗体のエピトープにあまり依存せずにH M G B 1 に対する立体障害を除去できる。その為、HM2-2ペプチドは様々なH M G B 1 抗体の結合を増強させる事ができたと考えられる。

H M G B 1 に結合する物質による立体障害防止には、H M G B 1 抗体による反応の特異性を担保するためにも、H M G B 2 ペプチドを使用する必要がある。H M G B 1 ペプチドでも結合物質の除去は可能であるが、同時に抗体が結合してしまう恐れがあるためである。

【 0 0 3 8 】

このように本発明においては、HM2-2ペプチドを試料中に共存させることにより、反応系に存在するヘパリン等の微量なH M G B 1 結合性阻害物質にHM2-2ペプチドが結合する。これによりH M G B 1 の立体障害が解消され、抗H M G B 1 抗体が容易にH M G B 1 に結合できるようになったと考えられる（図16）。

本発明の吸収剤を構成するH M G B 2 ペプチドは、H M G B 2 とH M G B 1 抗体の結合阻害作用に加え、H M G B 1 とH M G B 1 抗体の結合の増強作用を有していてもよい。このような作用を有するペプチドを用いれば、特に効率よくH M G B 1 を特異的に測定または検出することができる。

【 0 0 3 9 】

このようなことから、H M G B 1 とH M G B 2 の間のアミノ酸配列の比較の結果同一性が低く、なおかつ、抗原性解析により抗原性の強い領域であることが確認された式（I）または（I I）で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、H M G B 1 抗体に弱く反応し、試料中に含まれるH M G B 2 とH M G B 1 抗体との結合を抑制することが期待される。したがって、このようなペプチドは、H M G B 1 の抗体を用いたイムノアッセイにおいて、blocking peptideとして利用できる。

【 0 0 4 0 】

本発明においては、H M G B 2 抗体は、試料中に含まれるH M G B 2 に対し選択的に結

合し、その結果、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合が阻害あるいは抑制する。それゆえ、本発明において用いられる H M G B 2 抗体は、H M G B 2 と結合する性質を有している限り、抗体の種類や由来等は限定されない。例えば、M o u s e、R a b b i t、G o a t 等の種々の免疫動物から獲得される抗体を利用することができる。また、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体からなる抗血清、モノクローナル抗体、または、これらの抗体の F a b、F (a b ') 2、F a b ' 等のフラグメントや低分子化抗体（例えば、s c F v、ダイアボディー、s c (F v) 2 等）も利用可能である。これらは当業者に周知の方法によって取得することができる。

【 0 0 4 1 】

本発明の H M G B 2 抗体は、H M G B 2 のみに結合性を示す抗体であってもよいし、H M G B 2 に加え H M G B 1 にも結合性を示す抗体であってもよい。ただし、H M G B 1 にも結合性を示す H M G B 2 抗体を使用する場合は、H M G B 1 よりも H M G B 2 に対して大きな結合活性を有する抗体が好適である。抗体の結合活性は、酵素免疫測定法（E L I S A、E I A）、蛍光免疫測定法（F I A）、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、免疫沈降法、放射免疫測定法（R I A）、発光免疫測定法（L I A）、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法等、当業者に周知の方法によって測定することができる。

【 0 0 4 2 】

本発明において H M G B 2 抗体は、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合を阻害できるものである限り、当該抗体が結合する H M G B 抗原の結合部位は限定されない。しかし、H M G B 2 抗体の H M G B 2 に対する結合性は、H M G B 2 抗体の H M G B 1 に対する結合性よりも大きいことが好ましいことから、本発明において使用する H M G B 2 抗体は、式（I）または（I I）に示すアミノ酸配列を認識する抗体であることが望ましい。これらのアミノ酸配列は、H M G B 1 のアミノ酸配列と相同性が少ないため、H M G B 2 に対する強い抗原性が期待できるためである。

また実施例に示すように、H M G B 2 抗体 N o . 1 および 2 添加群では、H M G B 1 測定において、濃度依存的な反応の上昇が認められた。すなわち本発明の H M G B 2 抗体 N o . 1 および 2 は、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害活性に加え、H M G B 1 と H M G B 1 抗体の結合の増強効果を有する。本発明の吸収剤を構成する H M G B 2 抗体は、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害活性に加え、H M G B 1 と H M G B 1 抗体の結合の増強作用を有するものであってもよい。

【 0 0 4 3 】

一方本発明の H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有する H M G B 2 由来のペプチドは、H M G B 1 の対応する領域との間で一致しないアミノ酸残基を含むペプチドであることが好ましい。当該アミノ酸残基が、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の間の結合阻害に重要と考えられるためである。本発明の式（I）または（I I）で表されるアミノ酸配列を含む H M G B 2 由来のペプチドは、いずれも、H M G B 1 の対応する領域との間で一致しないアミノ酸を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明においては、式（I）または（I I）で表されるアミノ酸配列を含む H M G B 2 由来のペプチドは、例えば 3 0 アミノ酸未満、好ましくは 2 5 アミノ酸未満、より好ましくは 2 2 アミノ酸未満、特に好ましくは 2 0 アミノ酸未満からなる。本発明においては、式（I）または（I I）で表されるアミノ酸配列からなる H M G B 2 由来のペプチドが特に好ましいがこれらに限定されない。

【 0 0 4 5 】

例えば式（I）で表されるペプチド（配列番号：3）は、7 番目のアミノ酸が、H M G B 1 の対応する領域と異なる（H M G B 1 ではリジン / K であるのに対し、H M G B 2 ではアスパラギン / N である）。

また式（I I）で表されるペプチド（配列番号：4）は、1 2 番目と 1 7 番目のアミノ酸が、H M G B 1 の対応する領域と異なる（1 2 番目については、H M G B 1 ではアラニ

10

20

30

40

50

ン / A であるのに対し H M G B 2 ではセリン / S である。17 番目については、H M G B 1 ではセリン / S であるのに対し H M G B 2 ではアラニン / A である)。

【0046】

本発明における、式 (I) または (II) で表されるアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および / または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有する H M G B 2 由来のペプチドは、H M G B 1 の対応する領域との間で一致しないアミノ酸残基が保存され、それ以外のアミノ酸残基が改変されたペプチドであることが好ましい。

【0047】

なお、一般に、ペプチドにおける 1 つまたは複数 (例えば 3、4、5、又は 10) のアミノ酸の改変 (例えば、保存的な置換、欠失、挿入、および / または付加) は、そのペプチドの機能に影響を及ぼさず、または元のタンパク質の機能を強化しさえすることが知られている。アミノ酸は、その側鎖の特徴に応じて、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T) に分類される。またアミノ酸の側鎖は、脂肪族側鎖 (G、A、V、L、I、P)、ヒドロキシル基を含む側鎖 (S、T、Y)、硫黄原子を含む側鎖 (C、M)、カルボン酸およびアミドを含む側鎖 (D、N、E、Q)、塩基を含む側鎖 (R、K、H)、および芳香族を含む側鎖 (H、F、Y、W) に分類することもできる。式 (I) または (II) で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに含まれるアミノ酸を、同じ特徴を有するグループに分類される他のアミノ酸で改変されたペプチドもまた、本発明の H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有する H M G B 2 由来のペプチドに含まれる。ただし、本発明の H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有する H M G B 2 由来のペプチドは、H M G B 2 と H M G B 1 抗体との結合を抑制する効果を保持する限り、非保存的改変も含んでよい。

【0048】

ペプチドの獲得方法に関しては、特に限定されない。例えば、ヒトまたは他の動物の体液、細胞、組織もしくは臓器等から、公知の方法により H M G B 2 を抽出し、目的のペプチドを獲得する方法が挙げられる。また、目的のアミノ酸配列をコードした DNA 断片をベクターに組み込み、大腸菌等に取り込ませ、ペプチドを産生させるといふ、遺伝子工学的なペプチド合成方法も利用できる。さらには、ペプチド固相合成法に代表されるペプチド合成方法により、手技もしくは自動合成装置を用いて上記ペプチドを獲得することが可能である。

【0049】

本発明において、H M G B 2 吸収剤として H M G B 2 と H M G B 1 抗体の結合阻害作用を有する H M G B 2 由来ペプチドを使用する場合、H M G B 1 抗体と当該ペプチドの組み合わせは特に限定されるものではないが、例えば H M G B 1 抗体は、H M G B 2 由来ペプチドのアミノ酸配列に対応する H M G B 1 上のアミノ酸配列をエピトープとして認識する抗体とすることができる。具体的には、例えば、H M G B 2 由来ペプチドとして H M G B 2 上の 1 ~ 17 番目のアミノ酸配列を含むペプチドを用いる場合、H M G B 1 抗体は、H M G B 2 由来ペプチドのアミノ酸配列に対応する H M G B 1 上のアミノ酸配列、すなわち、H M G B 1 上の 1 ~ 17 番目のアミノ酸配列をエピトープとして認識する抗体とすることができるが、これに限定されない。

【0050】

H M G B 2 抗体の濃度や配合量としては、好ましくは 0.5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、特に好ましくは 5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が挙げられるが、これらに限定されない。

H M G B 2 由来ペプチドの濃度、配合量としては、好ましくは 10 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、特に好ましくは 50 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が挙げられるが、これらに限定されない。

さらに、H M G B 2 吸収剤は液状、乾燥状態いずれのものであってもよい。

【0051】

本発明においては、上記 H M G B 2 抗体や H M G B 2 由来ペプチドは、緩衝液などと混

合あるいは希釈した溶液として使用することもできる。混合あるいは希釈する溶媒としては、各種の水系溶媒を用いることができる。例えば、精製水、生理食塩水、またはトリス緩衝液、リン酸緩衝液もしくはリン酸緩衝液生理食塩水などの緩衝液や、グッドの緩衝液を挙げることができるが、これらに限定されない。さらに、緩衝液のpHについても特に限定されず、適宜、好適なpHを選択することができる。一般的に、pH 3 ~ 12の範囲内のpHを選択して用いることができるがこれに限定されない。また、被測定物質の構造的な保護を目的として、溶媒にウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)、カゼインなどのタンパク質、各種糖類、ポリマー類、脱脂粉乳、正常ウサギ血清などの各種動物血清、アジ化ナトリウムもしくは抗生物質などの各種防腐剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等のうち1種または2種以上を適宜含有させてもよい。

10

【0052】

H M G B 2 吸収剤の存在下でH M G B 1 抗体と試料を接触させる手段もまた、特に限定されない。本発明においては、H M G B 2 吸収剤、試料、H M G B 1 抗体をいずれの順番で接触させてもよい。即ち、試料の存在する容器にH M G B 2 吸収剤及びH M G B 1 抗体が加えられてもよい(H M G B 2 吸収剤とH M G B 1 抗体を加える順序は問わない。例えば試料とH M G B 1 抗体を先に接触させその後にH M G B 2 吸収剤を接触させてもよいし、試料とH M G B 2 吸収剤を先に接触させその後にH M G B 1 抗体を接触させてもよい。H M G B 2 吸収剤とH M G B 1 抗体を同時に試料と混合してもよい)。

また、H M G B 2 吸収剤の存在する容器に、試料とH M G B 1 抗体が加えられてもよい(試料とH M G B 1 抗体を加える順序は問わない。例えば、H M G B 2 吸収剤と試料を先に接触させその後にH M G B 1 抗体と接触させてもよいし、H M G B 2 吸収剤とH M G B 1 抗体を先に接触させその後に試料と接触させてもよい。あるいは、試料とH M G B 1 抗体を同時にH M G B 2 吸収剤に混合してもよい)。

20

また、H M G B 1 抗体の存在する容器にH M G B 2 吸収剤と試料を加えてよい(H M G B 2 吸収剤と試料を加える順序は問わない。例えば、H M G B 1 抗体とH M G B 2 吸収剤を先に接触させその後に試料と接触させてもよいし、H M G B 1 抗体と試料を先に接触させその後にH M G B 2 吸収剤と接触させてもよい。H M G B 2 吸収剤と試料を同時にH M G B 1 抗体に混合してもよい)。

その他、あらゆる順序を取り得る。

30

【0053】

本発明においては、H M G B 1 の測定または検出方法も特に限定されるものではなく、公知の手法が利用できる。例えば、酵素免疫測定法(ELISA、EIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、免疫沈降法、放射免疫測定法(RIA)、発光免疫測定法(LIA)、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法などの免疫試験方法を挙げることができるが、これらに限定されない。また、本発明における測定または検出は、用手法で行ってもよいし、分析装置等の装置を用いて行ってもよい。

【0054】

例えば、酵素免疫測定法を用いる場合は、第一のH M G B 1 抗体が固相化されたマイクロプレートと、H M G B 2 吸収剤、H R P等の酵素が修飾された第二のH M G B 1 抗体、洗浄緩衝液、及び発光/発色基質溶液を用いて行うことができる。またH M G B 1 の測定または検出は、第二のH M G B 1 抗体に修飾されている酵素に、その至適条件下で前記酵素の基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法により測定することによって行うことができる。

40

【0055】

また、蛍光免疫測定法を用いる場合には、第一のH M G B 1 抗体が固相化された光導波路やマイクロプレートと、H M G B 2 吸収剤、蛍光物質が修飾された第二のH M G B 1 抗体、洗浄緩衝液を用いて行うことができる。H M G B 1 の測定または検出は、第二のH M G B 1 抗体に修飾されている蛍光物質に励起光を照射し、その蛍光物質が発する蛍光強度

50

を測定することにより行うことができる。さらに放射免疫測定法を用いる場合には、前述した方法と同様の操作により、放射性物質による放射線量を測定することによって、発光免疫測定法を用いる場合には、発光反応系による発光量を測定することによって、H M G B 1を測定または検出することができる。

【 0 0 5 6 】

ウエスタンブロット法やドットブロット法を用いる場合は、電気泳動後の転写膜や直接サンプルをアプライしたメンブレンをBSAやスキムミルクでブロッキングした後、H M G B 2 吸収剤、H R P 等の酵素が修飾されたH M G B 1 抗体、洗浄緩衝液、及び発光 / 発色基質溶液を用いて行うことができる。また、第一のH M G B 1 抗体に対して、酵素や蛍光色素等で直接標識した二次抗体を反応させてもよい。

10

H M G B 1 の測定または検出は、H M G B 1 抗体や二次抗体に修飾されている酵素に、その至適条件下で前記の基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法により測定することにより行うことができる。

【 0 0 5 7 】

免疫沈降法を用いる場合は、サンプルとH M G B 1 抗体等を反応させる際にBSAやスキムミルク等のブロッキング剤と共にH M G B 2 吸収剤を添加しておくことができる。沈降はH M G B 1 抗体に直接結合させた磁気ビーズやアガロース単体等を用いて行う、もしくはそれらのビーズ等を結合した二次抗体を用いて行うことができる。

【 0 0 5 8 】

また、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法などを用いる場合には、エンドポイント法またはレート法により透過光や散乱光を測定することによりH M G B 1 を測定または検出することができる。そして、イムノクロマトグラフィー法を用いる場合には、テストライン上に現れる標識物質の色を目視的に確認することができる。なお、この目視的に確認する代わりに、分析装置等の機器を用いてもよい。

20

【 0 0 5 9 】

前記免疫測定方法に用いる固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リボソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス、または、磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック、メンブレン、または試験片等の形状の固相担体などを用いることができるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 6 0 】

前記H M G B 1 抗体の固相化方法としては、公知の固相化方法が利用できる。例えば、物理吸着法としては、抗体と担体を緩衝液などの溶液中で混合し接触させる方法、また、緩衝液などに溶解した抗体と担体を接触させる方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 1 】

また、化学的結合法によりH M G B 1 抗体を固相化する場合も公知の方法に従い調整することができる。例えば、抗体と担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステルまたはマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させて、抗体と担体双方のアミノ基、カルボキシ基、チオール基、アルデヒド基、または水酸基等と反応させる方法などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 6 2 】

さらに、非特異的反応や、H M G B 1 抗体を固相化させた担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要があれば、公知の方法により処理することができる。例えば、抗体を固相化させた担体の表面または内壁面に、ウシ血清アルブミン (B S A)、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミンもしくはその塩などのタンパク質、界面活性剤または脱脂粉乳等を接触させ、被覆させる方法などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 3 】

前記第二のH M G B 1 抗体への標識物質の修飾方法としては、公知の修飾方法が利用で

50

きる。物理吸着法としては、第二のH M G B 1抗体と標識物質を緩衝液などの溶液中で混合し接触させる方法、緩衝液などに溶解した抗体と標識物質を接触させる方法などが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、標識物質が金コロイドやラテックスである場合は物理吸着法が有効であり、抗体と金コロイドとを緩衝液中で混合し接触させることで、金コロイド標識を有する抗体を得ることができる。

【0064】

また、化学的結合法により第二のH M G B 1抗体に標識物質を修飾させる場合には、公知の方法に従い調整することができる。例えば、抗体と標識物質をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステルまたはマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させて、抗体と標識物質双方のアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、または水酸基等と反応させる方法などが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、標識物質が蛍光物質や酵素、または化学発光物質である場合、化学結合法が有効である。

10

【0065】

また、非特異的反応や、標識物質を修飾させた抗体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要があれば、公知の方法により処理することができる。例えば、標識物質を結合させた抗体に、ウシ血清アルブミン(B S A)、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミンもしくはその塩などのタンパク質、界面活性剤または脱脂粉乳等を接触させ、被覆させる方法などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0066】

また標識物質としては、酵素免疫測定法の場合、ペルオキシダーゼ(P O D)、アルカリフォスファターゼ(A L P)、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、またはアミラーゼ等を用いることができるが、これらに限定されない。

20

【0067】

また、蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、シアニン、またはメロシアニン等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0068】

また、放射免疫測定法の場合には、トリチウム、ヨウ素125またはヨウ素131等を用いることができるが、これらに限定されない。

30

【0069】

また、発光免疫測定法の場合には、ルミノール系、ルシフェラーゼ系、アクリジニウムエステル系、またはジオキセタン化合物系等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0070】

また、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法の場合には、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸共重合体、ポリアクロレイン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル(メタ)アクリル酸共重合体、スチレン-ブタジエン酸共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、金属コロイド、セラミックス、または磁性体等の材質よりなる微粒子を用いることができるが、これらに限定されない。

40

【0071】

また本発明は、H M G B 2吸収剤の存在下でH M G B 1抗体と試料を接触させる工程を含む該試料中のH M G B 1の測定または検出方法を使用して該試料中のH M G B 1を測定または検出する工程を含む、敗血症、もしくは全身性炎症等の敗血症関連疾患の診断方法に関する。本発明の診断方法においては、H M G B 1が検出された場合、被験者は敗血症

50

もしくはその関連疾患に罹患していると判定される。本発明においては、H M G B 1 が検出された被験者に対し公知の敗血症もしくはその関連疾患の治療薬を投与するもしくは公知の治療法を施す工程を含むことができる。

敗血症やその関連疾患の重症度とH M G B 1 の血中濃度の相関性について、今後のさらなる研究が必要であるが、敗血症患者ではH M G B 1 の血中濃度が高い事が知られている (Wang 1999 / 非特許文献 1)。また、H M G B 1 血中濃度と敗血症の診断基準の一つであるS O F Aスコアやl a c t a t e値、p r o c a l c i t o n i n値などと、高い相関性が報告されている (Gibot 2007 / 非特許文献 4)。また、敗血症発症後、死亡しなかった患者では時間経過に伴ってH M G B 1 の血中濃度が低下するが、予後が悪く、発症後死亡した患者では、H M G B 1 の血中濃度が時間経過に伴って高くなることが報告されている (Gibot 2007 / 非特許文献 4)。また、敗血症患者に血液浄化療法を行ったところ、高かったH M G B 1 濃度が正常にまで回復し、最終的に退院した治療例も報告されている (Nakamura 2011 / 非特許文献 5)。このようにH M G B 1 の血中濃度は様々な治療の開始や離脱に重要な情報となる。

【 0 0 7 2 】

また本発明は、少なくともH M G B 1 抗体を含む第 1 の試薬およびH M G B 2 吸収剤を含む第 2 の試薬を含む、試料に含まれるH M G B 1 を測定または検出するためのキットに関する。さらに本発明は、少なくともH M G B 1 抗体を含む第 1 の試薬およびH M G B 2 吸収剤を含む第 2 の試薬を含む、敗血症の診断用キットに関する。本発明のこれらのキットは、H M G B 2 吸収剤の存在下でH M G B 1 抗体と試料を接触させて使用することの特徴とする。本発明のキットは、H M G B 2 吸収剤の存在下で試料中のH M G B 1 とH M G B 1 抗体の結合が起こるように構成される限り特に限定されない。

【 0 0 7 3 】

前述の通り、H M G B 2 吸収剤の存在下でH M G B 1 抗体と試料を接触させる手段は、特に限定されない。例えば、H M G B 2 吸収剤、試料、H M G B 1 抗体固相化担体がいずれの順番で加えられてもよく、また、H M G B 2 吸収剤が液状、あるいは、乾燥状態で加えられてもよい。即ち、試料、H M G B 2 吸収剤、H M G B 1 抗体固相化担体のいずれかが 1 つまたは 2 つを含む容器に、他の 2 つまたは 1 つを加えてもよい。この際、他の 2 つを加える順序は問わず、同時に加えることもできる。また、H M G B 2 吸収剤、試料、H M G B 1 抗体固相化担体を同時に接触させることもできる。その他、あらゆる手段を取り得る。

【 0 0 7 4 】

さらに、本発明のキットの構成においては、H M G B 2 吸収剤をその他の試薬と組み合わせてもよいし、あるいは、固相にあらかじめ付着させておいてもよい。例えば、その他の試薬に組み合わせる場合、組み合わせる試薬としては、試料中のH M G B 1 とH M G B 1 抗体の結合に必要な緩衝液、試料希釈液、酵素などの標識物質を含有するH M G B 1 抗体溶液、発色などのシグナルを生成する物質を含有する試薬、発色などのシグナルの生成に関与する物質を含有する試薬、校正 (キャリブレーション) を行うための物質を含有する試薬、又は精度管理を行うための物質を含有する試薬などが挙げられる。また、前記固相の例としては、免疫試験キットに用いられる担体や試験紙、マイクロプレート、ガラス板、マイクロチューブ、ろ紙、ポリマー樹脂等を挙げることができる。

【 0 0 7 5 】

本発明においてキットとは、H M G B 1 の測定または検出に必要な試薬等を含むキットをさす。H M G B 1 の測定または検出に必要な種々の試薬のセット、H M G B 1 の測定または検出に必要な種々の試薬を充填した使いきりタイプのキット、複数の試料を同時に測定するためのマイクロプレートタイプの試験キットや、内部に試薬等を含み目視による結果の判定が可能なイムノクロマトグラフィーや、試験紙も、本発明のキットに含まれる。

【 0 0 7 6 】

例えば、使いきりタイプのキットの形態の一例としては、第一のH M G B 1 抗体が固相化された球状や棒状の担体、H M G B 2 吸収剤、試薬希釈液、A L P 等の酵素が修飾され

10

20

30

40

50

た第二のH M G B 1抗体、洗浄液、および発光基質溶液などを、検査容器に充填する構成が考えられるがこれらに限定されない。

【0077】

検査容器の形状は、試料中のH M G B 1の測定または検出を行うことができる限り特に限定されるものではない。例えば、反応槽や試薬格納槽が複数並んだ舟型の容器や、板状の基体に溝を設け、反応槽や格納槽を流路で繋いだ流路型の容器が挙げられるがこれに限定されない。また、検査容器の大きさも特に限定されるものではないが、自動分析装置等に組み込んで用いるためには、10センチメートル×10センチメートル程度以下の小型であることが望ましい。さらに、反応槽への異物の混入や、試薬格納槽に充填しておいた試薬の蒸発・劣化を避けるために、各槽の上部をシールすることもできる。例えば、アルミニウム箔や高分子フィルム等を検査容器の反応槽と格納槽の上部に接着させる方法があげられる。特に、アルミニウム箔によるシールは、分析装置の穿孔機構や分注チップの先端で容易に開封できるので好ましい。検査容器の素材としては、被測定物質を測定するための反応を阻害しない限り特に限定されるものではない。例えば、ポリスチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂等が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0078】

また、マイクロプレートタイプのキットの形態としては、以下の構成が考えられる。例えば、第一のH M G B 1抗体が固相化されたマイクロプレートと共に、H M G B 2吸収剤、試料希釈液、H R P等の酵素が修飾された第二のH M G B 1抗体、洗浄液、および発光基質溶液などを、それぞれ試薬ボトルとして付属する構成である。また、H M G B 2吸収剤を予め試料希釈液に含有させておいても良いし、マイクロプレート上に乾燥状態で付着させておいても良い。

20

【0079】

イムノクロマトグラフィーの形態としては、ハウジングケース、サンプルパット、コンジュゲートパット、メンブレンフィルター、吸収パットから構成されるラテラルフローが好適である。また、ラテラルフローは以下の手順により作製される。まず、金コロイドや着色ビーズを標識した第一のH M G B 1抗体を作製し、これをコンジュゲーションパットに塗布・乾燥させる。一方で、第二のH M G B 1抗体をメンブレンフィルターのテストライン上に塗布・乾燥させる。さらに、前記第二のH M G B 1抗体を特異的に認識する第三の抗体をメンブレンフィルターのコントロールライン上に塗布・乾燥させる。最後に、このフィルターに前記コンジュゲーションパット、サンプルパット、吸収パットを貼りつけたものをラテラルフローとする。そして、H M G B 2吸収剤を、上記のラテラルフローに付属し、これをイムノクロマト測定試験キットとすることができる。また、H M G B 2吸収剤をサンプルパットやコンジュゲートパットに塗布・乾燥させておき、これを前記メンブレンフィルターに貼りつけたものをイムノクロマト測定試験キットとしてもよい。

30

【0080】

本発明のさらに具体的な実施形態として、例えば、H M G B 2吸収剤を含む溶液とH M G B 1抗体固相化担体とを含み、試料中のH M G B 1とH M G B 1抗体の結合反応の際に、前記吸収剤の濃度が、H M G B 2抗体の場合は5～50 μ g/ml、式(I)または(II)で表わされるペプチドの場合は50～500 μ g/mlとなるようなH M G B 1の測定または検出用キットを例示できる。このようなキットは、酵素免疫測定法(E L I S A、E I A)、蛍光免疫測定法(F I A)、放射免疫測定法(R I A)、発光免疫測定法(L I A)、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法など、あらゆる免疫試験に用いることができる。また、それぞれの方法に合わせ、適宜、H M G B 1抗体を修飾し、あるいは、担体に固定してもよい。さらに、本発明のキットは、ラテックスビーズ、マイクロチューブ、あるいは、イムノクロマトグラフィー法に用いられる場合は、ハウジングケース、サンプルパット、コンジュゲートパット、メンブレンフィルター、吸収パット、コロイドなどを含むことができる。

40

【0081】

50

あるいは、別の例として、H M G B 2 吸収剤が付着したH M G B 1 抗体固相化マイクロプレートを含み、試料中のH M G B 1 とH M G B 1 抗体の結合反応の際に、前記吸収剤の濃度が、H M G B 2 抗体の場合は $5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、式(I)または(I I)で表わされるペプチドの場合は $50 \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようなH M G B 1 の測定または検出用キットを例示できる。このようなキットは、酵素免疫測定法(E L I S A、E I A)、蛍光免疫測定法(F I A)、放射免疫測定法(R I A)、発光免疫測定法(L I A)、等の免疫試験に用いることができる。また、それぞれの方法に合わせ、適宜、H M G B 1 抗体は修飾されていてもよい。さらに、免疫試験キットは、基質溶液などを含むことができる。

【 0 0 8 2 】

10

また本発明は、少なくともH M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸収剤を含む、試料に含まれるH M G B 1 を測定または検出するための試薬に関する。また本発明は、少なくともH M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸収剤を含む、敗血症の診断用試薬に関する。本発明のこれらの試薬は、H M G B 2 吸収剤の存在下でH M G B 1 抗体と試料を接触させて使用することを特徴とする。

【 0 0 8 3 】

本発明において、試薬の形状は特に限定されず、前記H M G B 2 抗体やペプチド、またその両方を含む、溶液であってもよいし、あるいは、それらのタブレット、粉末、容器に付着させた乾燥状態など、目的となる試験にあわせた容量、形状をとることができる。

【 0 0 8 4 】

20

また本発明は、式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列において1または複数(例えば2、3、4、5又は10個)のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 とH M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチドに関する。

(I) : M G K G D P N K P R G K M S S Y A (配列番号 : 3)

(I I) : C R E E H K K K H P D S S V N F A E F S (配列番号 : 4)

これらのペプチドは、H M G B 1 の検出に使用することができる。具体的には、これらのペプチドを含む試料にH M G B 1 抗体(例えば、H M G B 2 とH M G B 1 の両方に結合性を示すH M G B 1 抗体)を接触させると、H M G B 1 のみを特異的に検出することができる。

30

【 0 0 8 5 】

さらに本発明は、
上述の式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、
式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または
式(I)または(I I)で表されるアミノ酸配列において1または複数(例えば2、3、4、5又は10個)のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、H M G B 2 とH M G B 1 抗体の結合阻害作用を有するペプチド
を含む試料に関する。このような試料もまた、H M G B 1 抗体(例えば、H M G B 2 とH M G B 1 の両方に結合性を示すH M G B 1 抗体)を使用してH M G B 1 のみを特異的に検出するために使用することができる。

40

【 0 0 8 6 】

また本発明は、H M G B 1 の測定または検出剤の製造における、H M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸収剤の使用に関する。また本発明は、H M G B 1 の測定または検出剤の製造におけるH M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸収剤の使用であって、H M G B 2 吸収剤の存在下で試料とH M G B 1 抗体を接触させる工程を含む使用に関する。

また本発明は、試料中のH M G B 1 の測定または検出に用いるためのH M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸収剤に関する。また本発明は、試料中のH M G B 1 の測定または検出に用いるためのH M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸収剤であって、H M G B 2 吸収剤の存在下で試料とH M G B 1 抗体を接触させる工程を含む、H M G B 1 抗体およびH M G B 2 吸

50

収剤に関する。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0087】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

【0088】

実施例1：抗HMGB2抗体を用いた競合ELISA法によるHMGB1特異的測定法

HMGB1を特異的に測定するために、抗HMGB2抗体を共存させた競合ELISAを行い、HMGB2に対する非特異的な反応を減少できるかどうか検討した。

96 well ELISA plate (Maxsorp, Nunc)に10 µg/mLの抗HMGB1抗体HMa166を100 µL加え、定法に従い、固相化し、イムノブロック (DSファーマバイオメディカル) を精製水で5倍希釈したものを200 µL分注し、ブロッキングを行った。TBSt (10 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)で洗浄した後、1,400 ng/mLとなるようにHMGB2を加え、室温で2時間反応させ、TBStで洗浄後、HRP標識した抗HMGB1抗体CP11-1を加え、洗浄後、定法に従って発色基質TMBZ (KPL) を加え、リン酸で反応を終了させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸収を測定した。また、競合剤として表1に示した市販の抗HMGB2抗体を10 µg/mLとなるように反応系に添加し、抗HMGB2抗体による反応の低下を観察した。

【0089】

【表1】

競合ELISAに用いた抗HMGB2抗体

No.	商品名	抗原	メーカー	商品コード
1	Anti-HMGB2, Mono (3C7)	Human HMGB2	Abnova	H00003148-M03
2	Anti-HMGB2, Mono (3F2)	Human HMGB2	Abnova	H00003148-M06
3	Anti-HMGB2, Mono (X1)	Human HMGB2	Abnova	H00003148-M07

【0090】

HMGB1を免疫して得られたMHa166抗体とCP11-1抗体によるサンドイッチELISAを用いてHMGB2を測定したところ、HMGB1特異的ではなく、HMGB2にも非特異的に反応することがわかった。1,400 ng/mLのHMGB2では0.56の吸光度を示した (図1 吸収剤無し)。しかしながらこの反応系に10 ng/mLの抗HMGB2抗体を共存させたところ、使用した抗体により差は認められたが、吸収剤がない場合に比べて、それぞれ約50%まで吸光度が低下した。抗HMGB2抗体の共存により、非特異的反応が抑えられる効果が認められた。

【0091】

HMGB2の非特異的反応を吸収する効果のあった市販抗HMGB2抗体が、HMGB1の測定にどのような影響を与えるか調べるために、抗HMGB1抗体MHa166を固相化し、イムノブロック (DSファーマバイオメディカル) を精製水で5倍希釈したものでブロッキングを行った後、HRP標識した抗HMGB1抗体CP11-1を用いて行うELISA系に表1で示した抗HMGB2抗体を10 µg/mLとなるように添加した状態で0-50 µg/mLのHMGB1を用いて検量線を作製し、各抗HMGB2抗体の影響を観察した。

【0092】

HMGB1とHMGB2のアミノ酸配列の相同性を考慮した場合、添加した抗HMGB2抗体が一部HMGB1に結合し、立体障害等によりHMGB1抗体の結合を妨げるため、見かけ上反応が低下する事が予測されたが、結果、抗HMGB2抗体の添加により、No. 3のHMGB2抗体を加えた場合、HMGB1の測定に影響は全く認められなかった (図2)。また、No. 1, No. 2の抗HMGB2抗体を添加した場合は、むしろHMGB1の測定値が若干上昇した (図2)。この増幅効果について、詳細は不明であるが、少なくともNo. 3

の抗HMG B 2抗体はHMG B 1の測定に影響を与えないことが分かった。

【0093】

また、HMG B 1を免疫して得られたMHa166抗体とCP11-1抗体によるサンドイッチELISAを用いて、0-1,300 µg/mLのHMG B 2を測定し、MHa166抗体とCP11-1抗体によるELISAによってどの程度HMG B 2が反応するかを観察した。また、そのように作製したHMG B 2の検量線に対して抗HMG B 2抗体を10 µg/mLとなるように添加し、吸収効果が得られるかどうかを観察した。

【0094】

結果、HMG B 1を免疫して得られたMHa166抗体とCP11-1抗体によるサンドイッチELISAでも、HMG B 2に対する反応が認められ、その反応は162.5 ng/mLのHMG B 2では約0.26もの吸光値(A450)を示した(図3)。一方、この系に各種抗HMG B 2抗体を共存させると、抗体により差は見られたが162.5 ng/mLのHMG B 2では約0.08にまで吸光値(A450)を低下させることができた。HMG B 1の測定に影響を与えず、かつ吸収効果が高かったのはNo. 3の抗HMG B 2抗体であった(図2、3)。

【0095】

実際の生体由来測定サンプルによっては、HMG B 1とHMG B 2が混在していることが想定されるが、その際に抗HMG B 2抗体を用いて混在するHMG B 2を吸収し、HMG B 1のみ特異的に測定できるか観察した。表2に従って、HMG B 1を50 ng/mLから二段階希釈したものと、HMG B 2を1820 ng/mLからそれぞれ二段階希釈したものを混合し、擬似的な混在サンプルを作製した。

【0096】

【表2】

擬似的に作製したHMGB1とHMGB2の混合サンプル

HMGB1 (ng/mL)	HMGB2 (ng/mL)	HMGB1/2 (ng/mL)
50	1820	1870
25	910	935
12.5	455	467.5
6.3	227.5	233.8
3.1	113.8	116.9
1.6	56.9	58.4
0.8	28.4	29.2
0	0	0

【0097】

混在サンプルをNo. 3抗HMG B 2抗体の共存、非共存下でMHa166抗体とCP11-1抗体によるサンドイッチELISAにより測定した。結果を図4Aに示す。また、本実験で用いたHMG B 1とHMG B 2混合物の120 ng/mL以下のレンジの実験結果を図4Bに詳細に示した。このように、吸収剤がない場合では実際のHMG B 1の濃度よりも見かけ上、大きな値を示すことがわかった。一方、吸収剤としてNo. 3抗HMBG2抗体を10 µg/mLとなるように添加した群では、HMG B 2への非特異的反応が抑えられ、HMG B 1のみが特異的に測定できることが分かった。

【0098】

さらに、同様の実験について、HMG B 1とHMG B 2混合物(HMG B 1/2)に加えて、混合したHMG B 1と同濃度のHMG B 1に吸収剤である抗HMG B 2抗体を添加した物についても測定し、実際の濃度とどれほどの解離が認められるかを検討した。

【0099】

図5に示すように、HMG B 1とHMG B 2混合物では図4の実験結果と同様、見かけ上高い値を示し、さらに吸収剤として抗HMG B 2抗体を添加した場合はHMG B 2に対す

10

20

30

40

50

る非特異的反応が押さえられた。その際の結果はH M G B 1のみを測定した値にほぼ一致するか、近い値を示し、H M G B 1で作成した検量線にほぼ一致した。これらのことから、抗H M G B 2抗体の添加により、H M G B 1特異的な測定が可能であることが明らかとなった。

【 0 1 0 0 】

また、標識抗体を変えた場合でも、H M G B 2に対する非特異的反応を市販の抗H M G B 2抗体が抑制できるかを検討した。96 well ELISA plate (Maxsorp, Nunc)に10 µg /mLの抗H M G B 1抗体HMa166を固相化し、イムノブロック (DSファーマバイオメディカル)を精製水で5倍希釈したものを200 µL分注し、ブロッキングを行った。TBSt (10 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)で洗浄した後、H M G B 1を50 ng/mL もしくはH M G B 2を1,820 ng/mLとなるように加え、さらに競合剤として市販の抗H M G B 2抗体No. 3を最終濃度が10 µg/mLとなるように反応系に添加し、37 °C 2時間反応後、TBStで洗浄し、次いでウサギにヒトH M G B 1合成ペプチドもしくは組換えヒトH M G B 1を免疫して得られたH M G B 1ポリクローナル抗体No. 12もしくはH M G B 1ポリクローナル抗体No. 14をそれぞれHRP標識した物を加え、室温で1時間反応させた。反応後、TBStで洗浄し、定法に従って発色基質TMBZ (KPL)を加え、リン酸で反応を終了させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸収を測定し、抗H M G B 2抗体による反応の低下を観察した。

【 0 1 0 1 】

結果、No. 12もしくはNo. 14いずれのH M G B 1ポリクローナル抗体を標識抗体として用いた場合でも、H M G B 1の測定に抗H M G B 2抗体は大きな影響を与えなかった (図 6A、図 7A)。一方、高濃度のH M G B 2を用いた場合、No. 12もしくはNo. 14いずれのポリクローナル抗体の場合でもH M G B 2に対する非特異的反応が認められたが、抗H M G B 2抗体を共存させたところ、その反応はNo. 12ポリクローナル抗体では70%に、No. 14ポリクローナル抗体では82%まで低下し、それぞれ抗H M G B 2抗体による吸収効果が得られた。(図 6B、図 7B)

【 0 1 0 2 】

実施例 2 : H M G B 2 ペプチドを用いた競合ELISA法によるH M G B 1特異的測定法

抗リン酸化抗体などを用いた実験の場合、非特異的な反応を防ぐために、あらかじめ抗体とリン酸化されていないペプチドをプレインキュベーションしたり、共存させて使用する方法があり、Peptide Competition Assay (PCA: ペプチド競合法)などと呼ばれている (非特許文献3)。同様の効果を期待して、H M G B 2 ペプチドの添加によるH M G B 1の特異的測定が可能であるか検討した。

【 0 1 0 3 】

H M G B 2のアミノ酸配列の内、H M G B 1とは異なるアミノ酸配列を含み、抗原性検索により抗原性の強い領域から、6種のペプチドを設計し、内 2 種のペプチドを実験に用いた。

(I) : MGKGDPNKPRGKMSSYA (配列番号 : 3) (HM2-1)

(I I) : CREEHKKKHPDSSVNFAEFS (配列番号 : 4) (HM2-2)

【 0 1 0 4 】

抗H M G B 1抗体MHa166を固相化し、HRP標識した抗H M G B 1抗体CP11-1を用いて行うELISA系を用いて、1,820 ng/mLのH M G B 2によって得られる反応がH M G B 2 ペプチドを0-1.0 mg/mLの濃度となるように共存させた場合、H M G B 2による非特異的反応が低下するかどうかを検討した (図8B, 9B)。また、共存させるH M G B 2 ペプチドによるH M G B 1の測定への影響も12.5 ng/mLのH M G B 1を用いて同様に行った (図8A, 9A)。

【 0 1 0 5 】

結果、H M G B 2 ペプチドHM2-1は、H M G B 1の測定値にほとんど影響を与えず、濃度依存的にH M G B 2の非特異的反応が吸収できた。ペプチドを用いて非特異的反応を吸収し、H M G B 1特異的な測定ができることが分かった (図8)。

【 0 1 0 6 】

また、H M G B 2 ペプチドHM2-2は濃度依存的にH M G B 2 の非特異的反応を吸収するだけでなく(図9B)、H M G B 1 測定において、濃度依存的な反応の上昇が認められた。(図9A)。

【 0 1 0 7 】

次に、CP11-1以外の抗体でも同様の効果が得られるかを検討した。抗H M G B 1 抗体MH a166を固相化したELISA系に、ウサギにヒトH M G B 1 合成ペプチドもしくは組換えヒトH M G B 1 を免疫して得られたH M G B 1 ポリクローナル抗体No. 12およびNo. 14をHRP標識し、H M G B 2 ペプチドを0.5 mg/mLの濃度となるように共存させた場合、50 ng/mLのH M G B 1 によって得られる反応がどのように変化するか検討した(図 10A)。また、共存させるH M G B 2 ペプチドによるH M G B 2 の測定への影響も1,820 ng/mLのH M G B 2 を用いて同様に行った(図10B)。

10

【 0 1 0 8 】

結果、No.12 ポリクローナル抗体を用いたELISAでは、H M G B 2 ペプチドHM2-1はH M G B 1、H M G B 2 共に測定に影響を与えなかったが、H M G B 2 ペプチドHM2-2の添加群ではH M G B 1 との反応を約1.6倍に増強し、さらにH M G B 2 との反応を減弱し、非特異的反応を押さえた(図 10)。

【 0 1 0 9 】

また、No. 14ポリクローナル抗体を用いた場合、H M G B 2 ペプチドHM2-1はH M G B 1 の測定には何の影響を与えなかったが、H M G B 2 ペプチドHM2-2はH M G B 1 の反応性を向上させた(図 11A)。しかしながら、H M G B 2 に対する中和効果はいずれのペプチドの場合でも見られなかった(図 11B)。

20

【 0 1 1 0 】

さらに別のモノクローナル抗体を用いた系でも同様の検討を行った。抗H M G B 1 抗体MHa166を固相化したELISA系にH M G B 1 を免疫して得られたHMa176抗体をHRP標識し、H M G B 2 ペプチドを0.5 mg/mLの濃度となるように共存させた場合、50 ng/mLのH M G B 1 によって得られる反応がどのように変化するか検討した(図12A)。また、共存させるH M G B 2 ペプチドによるH M G B 2 の測定への影響も1,820 ng/mLのH M G B 2 を用いて同様に行った(図12B)。

【 0 1 1 1 】

結果、HMa176抗体を用いたELISAではH M G B 2 ペプチドHM2-2によるH M G B 1 の反応性向上のみが見られた(図12)。

30

【 0 1 1 2 】

参考例：実施例 1 で使用した抗体の調製方法

1 . モノクローナル抗体 C P 1 1 - 1 作製法

ハプテンとしてヒトH M G B 1 のアミノ酸配列167～180番のペプチド(KPDAAKKGVVKA EK / 配列番号：21)のC末にシステイン(C)を付加し、システインのSH基を用いて、キャリアーであるK L H (Keyhole limpet hemocyanin)と結合させて作製したハプテン - キャリアータンパク質複合体抗原100 μgをFreundの完全アジュバント(F C A)と共にマウス(B a l b / c)に初回免疫し、14日後に追加免疫として初回免疫に用いたハプテン - キャリアータンパク質複合体50 μgをFreundの不完全アジュバント(F I A)と共に免疫した。以降14日間隔で50 μgのハプテン - キャリアータンパク質複合体をF I Aと共に計4回免疫を行った。最終免疫後、脾臓を取り出し、定法に従ってリンパ球を調整し、ミエローマSp2/0-Ag14(ATCC : CRL-1581)と融合した。融合したハイブリドーマをC l o n a C e l l - H Yハイブリドーマクローニングキット(S T E M C E L L T E C H N O L O G I E S)を用いて培養、クローニングを行った。得られたクローンをピアコア(G E H e a l t h c a r e)を用いてさらに詳細に検討し、C P 1 1 - 1を選択した。

40

なお、モノクローナル抗体C P 1 1 - 1は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに受託番号「N I T E P - 0 2 0 2 0」として寄託されている。

50

【 0 1 1 3 】

2 . モノクローナル抗体 H M a 1 6 6 、 H M a 1 7 6 の作製法

r h H M G B 1 抗原 1 0 0 μ g を Freund の完全アジュバント (F C A) と共にマウス (B a l b / c) に初回免疫した。1 4 日後に追加免疫として初 r h H M G B 1 抗原 5 0 μ g を Freund の不完全アジュバント (F I A) と共に免疫した。以降 1 4 日間隔で 5 0 μ g の r h H M G B 1 抗原を F I A と共に計 4 回免疫を行った。最終免疫後、脾臓を取り出し、定法に従ってリンパ球を調整し、ミエローマ Sp2/0-Ag14 (ATCC : CRL-1581) と融合した。融合したハイブリドーマを定法に従い、限界希釈法により培養、クローニングを行った。得られたクローンをピアコア (G E H e a l t h c a r e) を用いてさらに詳細に検討し、H M a 1 6 6 と H M a 1 7 6 を選択した。

10

なお、モノクローナル抗体 H M a 1 6 6 は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに受託番号「 N I T E P - 0 2 0 2 1 」として寄託されている。

【 0 1 1 4 】

3 . モノクローナル抗体作製の為のスクリーニング法

スクリーニングは各クローンの培養上清を 5 0 μ L の r h H M H B 1 (2 μ g / m L) を定法にて固相化し、精製水で 5 倍希釈したイムノブロック (DSファーマバイオメディカル) でブロッキングした E L I S A プレ - トに加え、2 時間インキュベートした後洗浄し、続いて 2 次抗体として H R P 標識した抗マウス I g G を加え、2 時間インキュベートした後洗浄し、定法に従って発色基質 TMBZ (KPL) を加え、リン酸で反応を終了させ、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸収を測定した。

20

【 0 1 1 5 】

4 . No.12 および No.14 のポリクローナル抗体の作製法

No.12 (F P A b H 1 2) ポリクローナル抗体はハプテンとしてヒト H M G B 1 のアミノ酸配列 167 ~ 180 番のペプチド (KPDAAKKGVVKA EK / 配列番号 : 2 1) の C 末にシステイン (C) を付加し、システインの S H 基を用いて、キャリアーである K L H (Keyhole limpet hemocyanin) と結合させて作製した抗原 0 . 3 m g を Freund の完全アジュバント (F C A) と共にウサギ (ニューゼーランドホワイト種) に初回免疫し、1 0 日後に追加免疫として 0 . 0 5 m g の組換えヒト H M G B 1 (r h H M G B 1) を Freund の不完全アジュバント (F I A) と共に免疫した。以降 1 0 日間隔で 0 . 0 5 m g の r h H M G B 1 を F I A と共に計 5 回免疫を行った。最終免疫後、全血液を採取し、P r o t e i n G カラムで精製し、実験に供した。

30

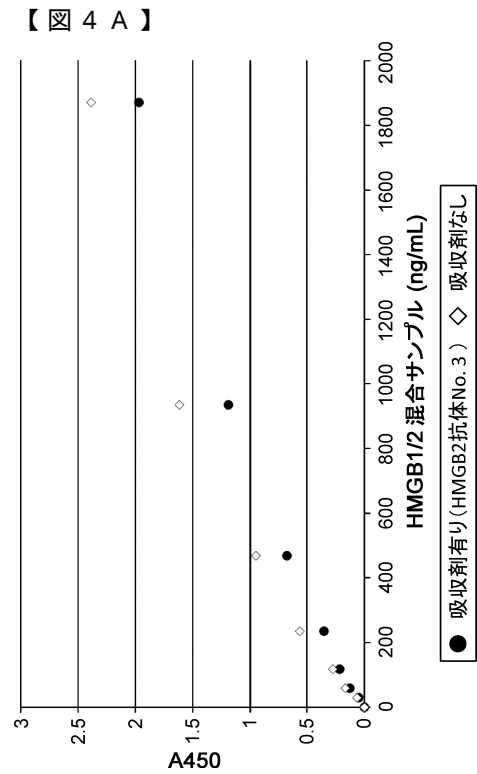
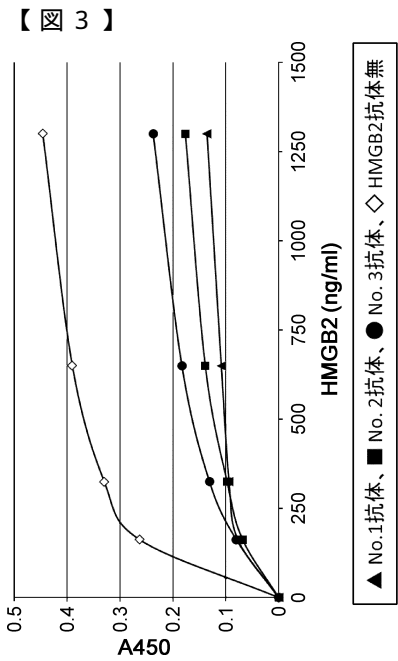
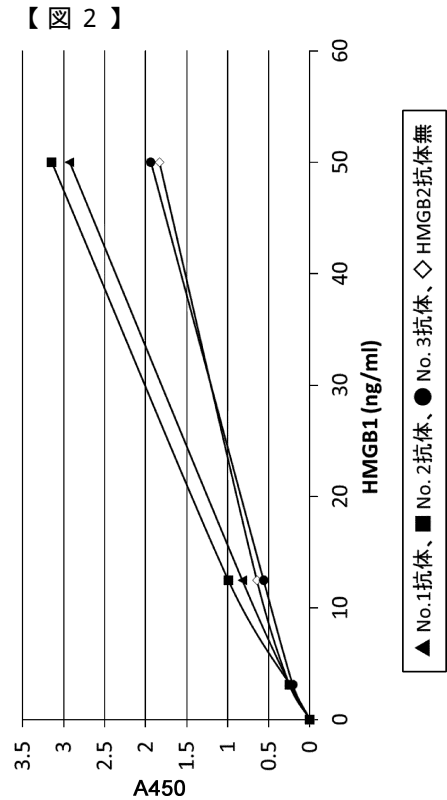
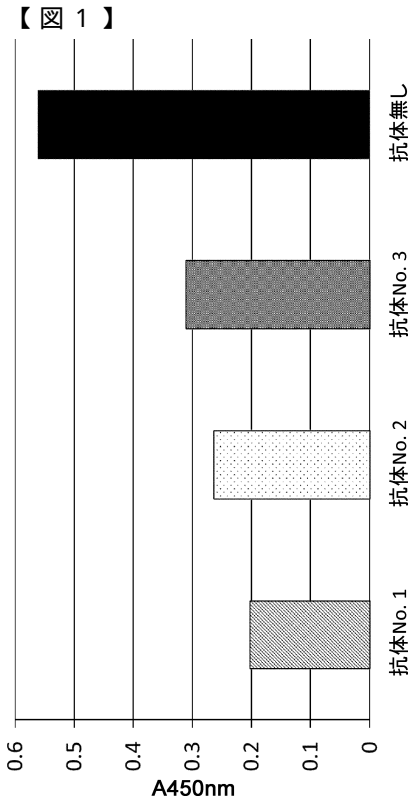
No.14 (F P A b H 1 4) ポリクローナル抗体は r h H M G B 1 0 . 1 m g を F C A と共にウサギ (ニューゼーランドホワイト種) に初回免疫し、1 0 日後に追加免疫として 0 . 0 5 m g の r h H M G B 1 を F I A と共に免疫した。以降 1 0 日間隔で 0 . 0 5 m g の r h H M G B 1 を F I A と共に計 5 回免疫を行った。最終免疫後、全血液を採取し、P r o t e i n G カラムで精製し、実験に供した。

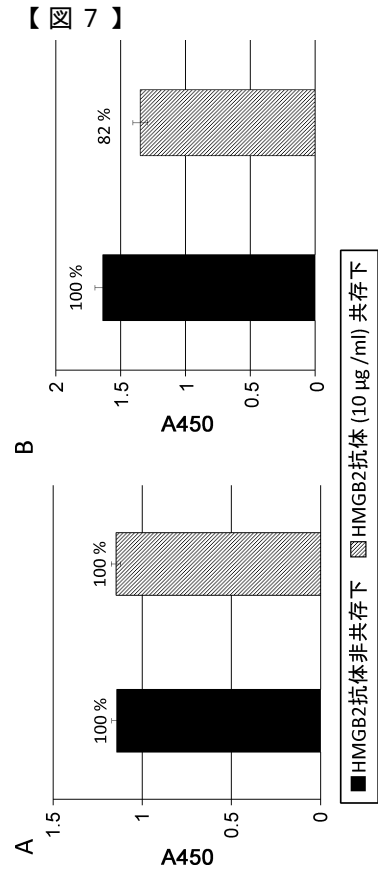
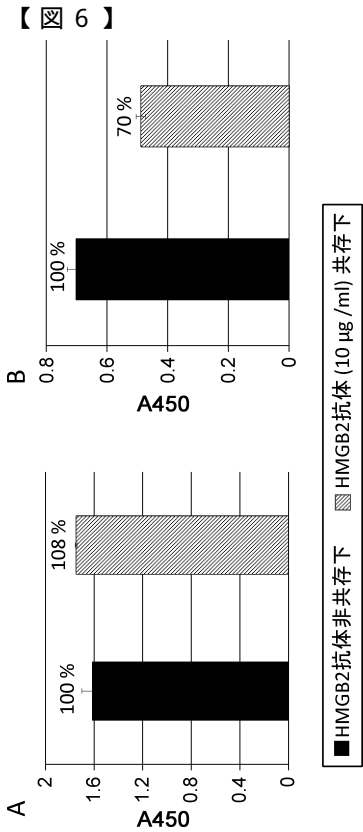
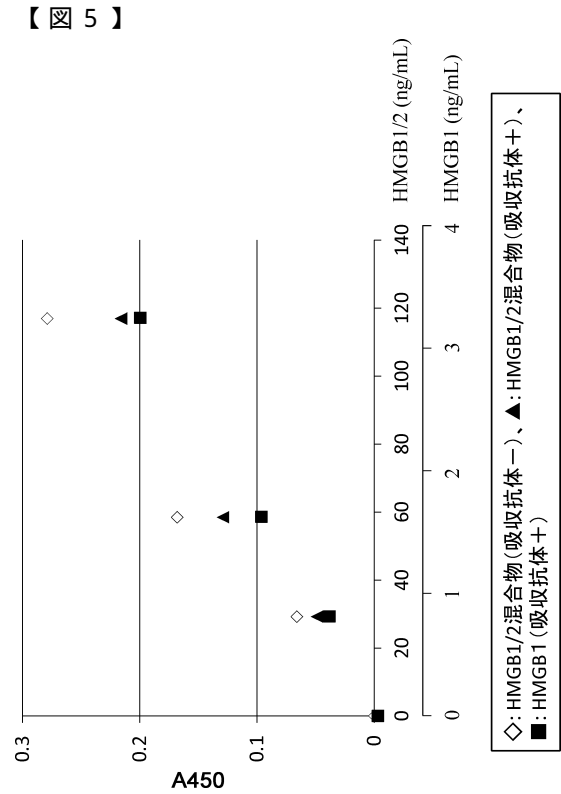
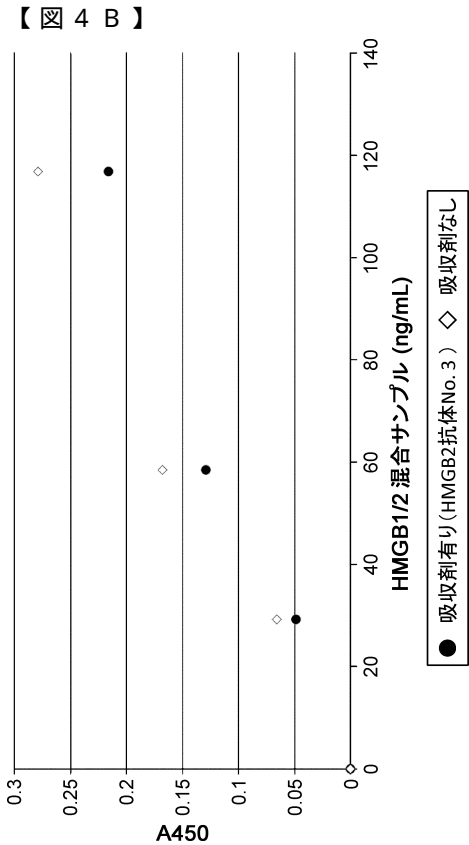
【 産業上の利用可能性 】

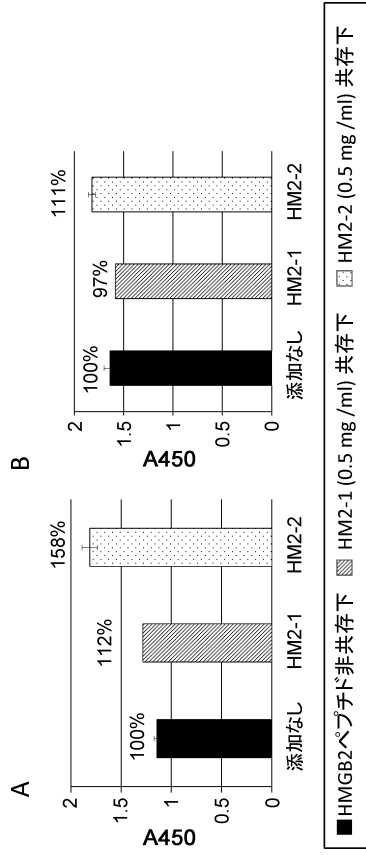
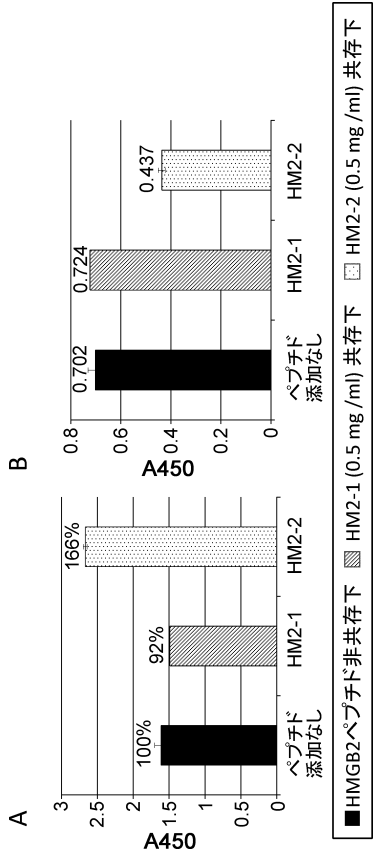
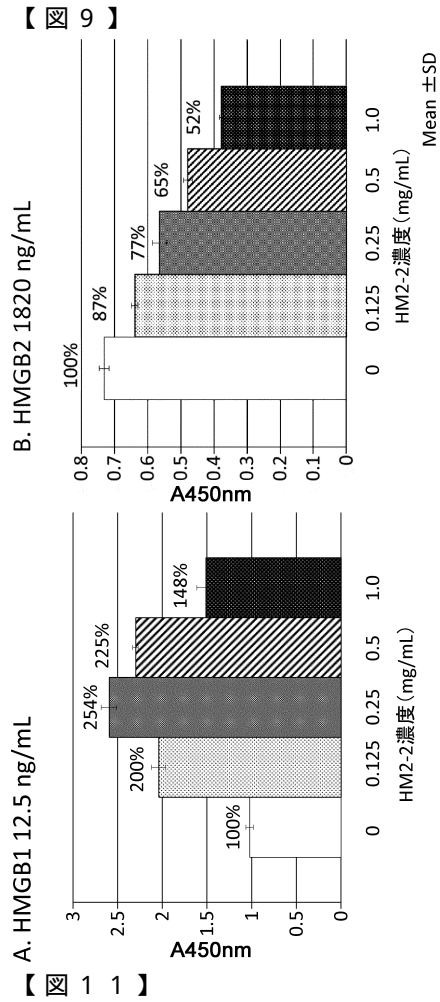
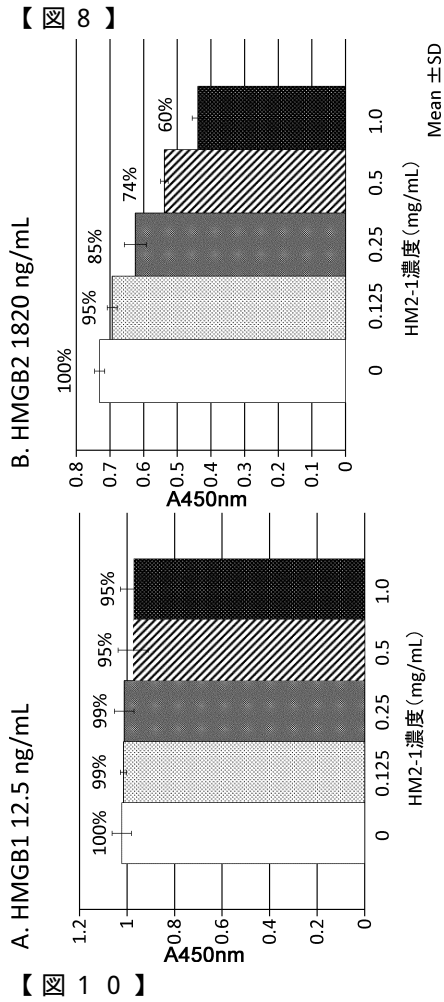
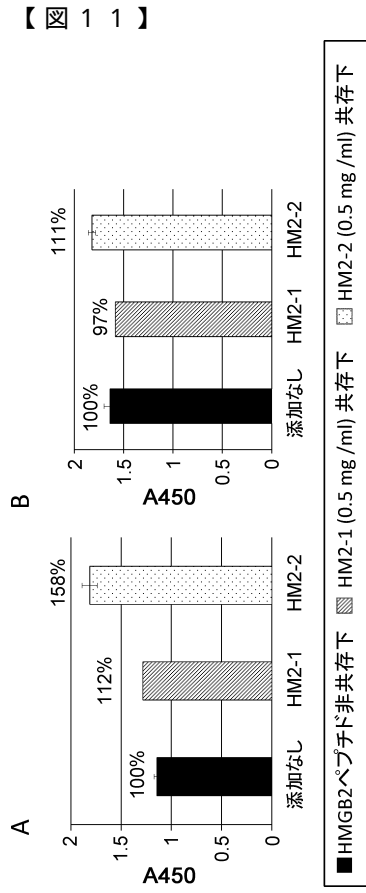
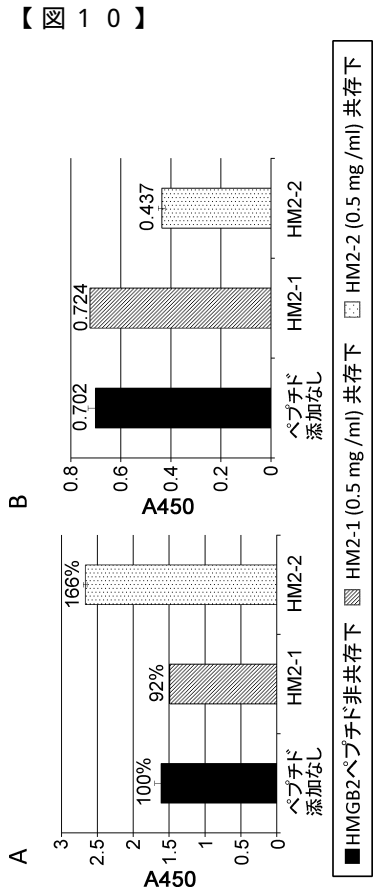
【 0 1 1 6 】

本発明により、試料中の H M G B 1 のみを正確に測定または検出する方法および試料中の H M G B 1 のみを正確に測定または検出するためのキットおよび試薬が提供された。本発明の方法やキット、試薬は、試料中の H M G B 1 の選択的な測定または検出に有用である。また本発明の方法やキット、試薬は、敗血症の診断マーカーとして有用である。

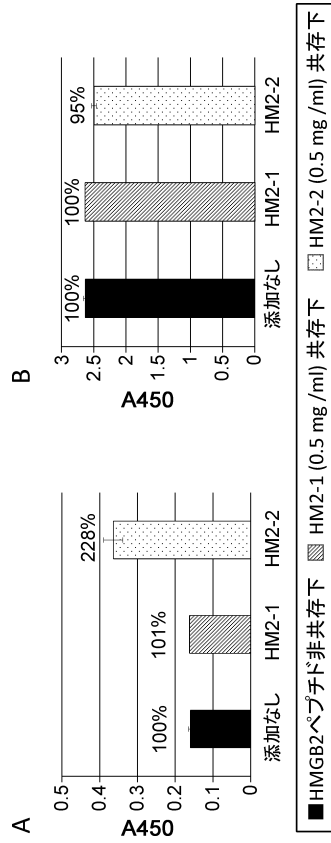
40



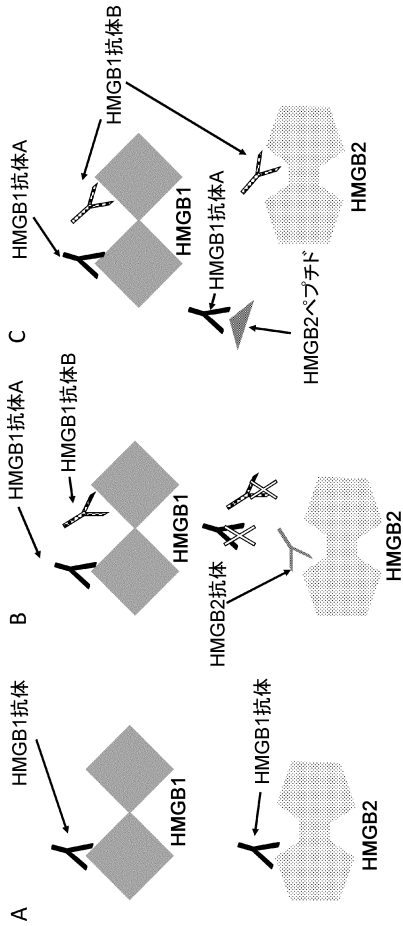




【圖 12】



【 図 1 4 】

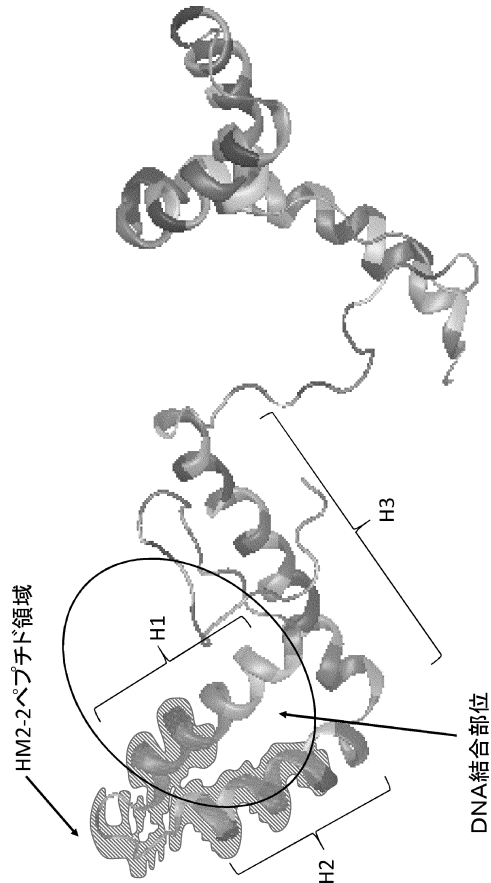


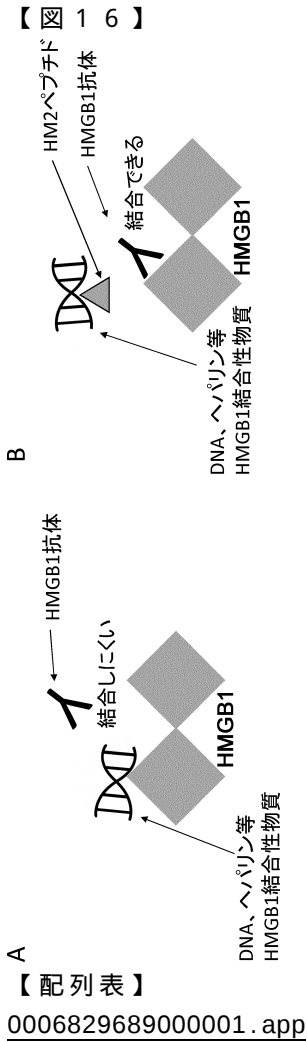
【 図 1 3 】

	10	20	30	40	50	60
hHMB1 (CAG33144.1)	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+
hHMB2 (AAI00020.1)	MCKGDPKPRGMSSYAFVQTCREEHKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGKFN.....S...A.....S....					
hHMB1 (CAG33144.1)	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+
hHMB2 (AAI00020.1)	EDMAKADKARYEREMKTVIPPGETKKFKFDENAPKRPPSAFFLFCSSYRPIKIGEHFGLS.....D...N.V...DK.G.K.....H.....S.....					
hHMB1 (CAG33144.1)	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+
hHMB2 (AAI00020.1)	STGDVAKKLGENMWNNTAADDKQPYEKKAUKLEKEYEKDIATAVRAGKPDAACKGVVRAEKT.....SEQS.K.....Q.....SE.G...PGRFTG					
hHMB1 (CAG33144.1)	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+
hHMB2 (AAI00020.1)	SKKKEEDEDDEDEEEDEEDEDEDEDDDDN.P.D.E..E..D.D.E.....					

・ 相同性のあるアミノ酸

【 図 1 5 】





フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 朝倉 昌博
大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 芥子 亜矢
大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 小林 正昭
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

審査官 竹中 靖典

- (56)参考文献 特開2003-096099(JP,A)
特開2011-095014(JP,A)
特表2002-511143(JP,A)
米国特許第04722889(US,A)
特開平05-052844(JP,A)
特表2009-524807(JP,A)
国際公開第2015/068715(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/00 - 33/92
C07K 7/08
C07K 14/47