



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 ⁶ C07K 16/40, C12P 21/08, G01N 33/577, 33/573 // C12N 15/06, (C12P 21/08, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/14042 (43) 国際公開日 1995年5月26日 (26.05.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01728 (22) 国際出願日 1994年10月14日 (14. 10. 94) (30) 優先権データ 特願平5/286861 1993年11月16日 (16. 11. 93) JP 特願平6/207123 1994年8月31日 (31. 08. 94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ポーラ化成工業株式会社 (POLA CHEMICAL INDUSTRIES INC.) (JP/JP) 〒420-91 静岡県静岡市弥生町6番48号 Shizuoka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 滝本浩之 (TAKIMOTO, Hiroyuki) (JP/JP) 鈴木 聡 (SUZUKI, Satoshi) (JP/JP) 柴田孝史 (SHIBATA, Koushi) (JP/JP) 増居茂樹 (MASUI, Shigeki) (JP/JP) 〒244 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ化成工業株式会社 戸塚研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : ANTIHUMAN TYROSINASE MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称 抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体

Q: Detection of human tyrosinase with antihuman tyrosinase monoclonal antibody

lane A: tyrosinase activity staining of MeWo cell extract
 lane B: western blotting of MeWo cell extract
 lane C: western blotting of HeLa cell extract

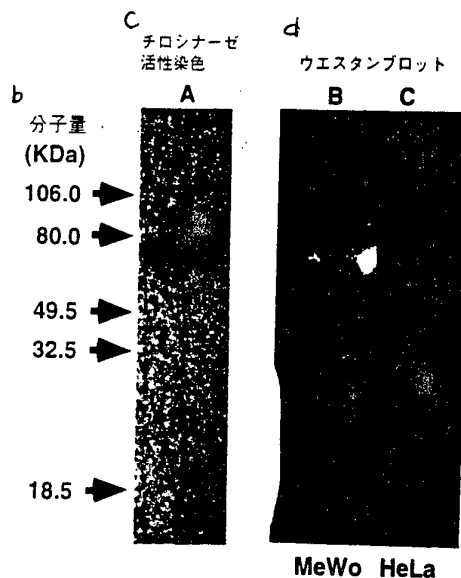
(57) Abstract

A human tyrosinase is detected by using a monoclonal antibody prepared by immunizing a mammal by using as an antigen a peptide having that region of the amino acid sequence of a human tyrosinase which is low in the homology with the amino acid sequence of a tyrosinase-associated protein, preparing a hybridoma by fusing the splenocytes of the mammal and cultured cells, culturing the hybridoma, and harvesting a monoclonal antibody that combines with human and mouse tyrosinases but does not combine with the tyrosinase-associated protein from the medium.

b ... Mol. wt.

c ... Tyrosinase activity staining

d ... Western blotting



Q 抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体によるヒトチロシナーゼの検出
 レーンA: MeWo細胞抽出物のチロシナーゼ活性染色
 レーンB: MeWo細胞抽出物のウエスタンブロット
 レーンC: HeLa細胞抽出物のウエスタンブロット

(57) 要約

ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうち、チロシナーゼ関連蛋白のアミノ酸配列と相同性の低い領域のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原に用いて哺乳動物を免疫し、その哺乳動物の脾細胞と培養細胞とを融合してハイブリドーマを作製し、そのハイブリドーマを培養してその培養液から、ヒトチロシナーゼ及びマウスチロシナーゼに結合し、チロシナーゼ関連蛋白に結合しないモノクローナル抗体を採取し、得られるモノクローナル抗体を用いてヒトチロシナーゼを検知する。

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をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

- 1 -

明細書

抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体

技術分野

本発明は、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体とその製造法、及びこのモノクローナル抗体を用いたヒトチロシナーゼの検知法に関する。

背景技術

チロシナーゼは生体内でメラニン色素を生合成する上で最も重要な酵素であり、粗面小胞体のリボソームで生成され、次いでゴルジ器官関連小胞体で濃縮、活性化され、ゴルジ器官より生成されるプレメラノソームへ選択的に転送されると考えられている。

チロシナーゼの生合成が阻害されると、重大な皮膚障害が起こることが知られている。例えば、色素異常症は、チロシナーゼ自身の構造の変異やその生合成過程での異常により起こることが知られており、チロシナーゼのプレメラノソームへの選択的転送が関与している可能性もある。また、近年オゾンホールが増大が地表に届く紫外線量の増加をもたらし、それに伴う皮膚癌の増加が世界的に懸念されている。その中で悪性黒色腫は、メラノサイトがその機能、特にチロシナーゼの産生能を維持したまま癌化した皮膚癌の一種であり、非常に悪性度が強く、リンパ節に高頻度で転移することが知られている。早期であれば外科的な広範囲切除により治療できるが、その際、患者の負担をできるだけ少なくするために、切除は最小限にとどめながら、確実に病巣を除くことが必要である。しかし、この病巣の完全に判定できる診断薬は、現在のところない。

このような疾病の診断あるいは原因の究明には、生体或いは細胞に於けるチロシナーゼの挙動を知ることがたいへん有益であると考えられ、かかる観点から、従来よりチロシナーゼの挙動を知るための努力がなされてきた。特に抗原・抗体反応を用いた方法は、感度も高いことから種々の検討がなされてきており、チロシナーゼに対するポリクローナル抗体の作製が古くからなされてきた（例えば、

Jimenez, M. et al., (1991) J. Biol. Chem. 266(2), 1147-1156、Bouchard, B. et al., (1994) J. Invest. Dermatol. 102(3), 291-295)。

しかしながらポリクローナル抗体は、その都度動物を免疫してその血中より取り出して作るため、ロットごとの抗体価のバラツキが大きく、再現性に乏しいと言う大きな欠点があるため、実用的ではなく製品化には至っていない。そのため、チロシナーゼを抗原として動物を免疫した後、この動物のリンパ球とミエローマ等の培養細胞を融合させてハイブリドーマを作製し、これに抗チロシナーゼモノクローナル抗体を作らせる試みがなされてきた (Margherita Cuomo et al., J. Invest. Dermatol., 96(4), 446-451 (1991); Yasushi Tomita et al., J. Invest. Dermatol., 85(5), 426-430 (1985))。

しかし、上記の報告で抗チロシナーゼモノクローナル抗体とされたものは、チロシナーゼ関連蛋白に対するモノクローナル抗体であったことが、その後明らかにされた (Yasushi Tomita et al., J. Invest. Dermatol., 96(4), 500-504, 1991)。これは、生体に於いて、アミノ酸配列及び分子量がチロシナーゼと極めて類似したチロシナーゼ関連蛋白 (以下、「TRP」という) と呼ばれている蛋白が存在しているため、チロシナーゼをTRPから完全に分離することが極めて困難であり、細胞あるいは組織より精製したチロシナーゼを抗原として動物を免疫するという従来技術では、混入しているTRPが抗原となり、抗TRP抗体が生成してしまうためである。したがって、このようなモノクローナル抗体を用いてチロシナーゼを正確に検知することは困難である。

また、McEvanらは、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体について報告している (McEvan, M. et al., Pigment Cell Res. 2, 1-7 (1989)) が、このモノクローナル抗体が認識する抗原の分子量 (約58 k d) は、本発明者らが認識しているヒトチロシナーゼの分子量 (約75 k d) とは異なっている。また、McEvanらのモノクローナル抗体は、マウスチロシナーゼにも弱く交差するが、ヒトチロシナーゼに比べて結合は弱く、エピトープも不明確である。ちなみに、McEvanらの抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を用いてマウスメラノーマ細胞を免疫染色したときの染色率は0.1%であった。更に、この抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体は、抗原として培養細胞より精製したヒトチロシナーゼそのもの

を用いているため、モノクローナル抗体を産生する細胞を作製する上で、TRPなどの除去しにくい夾雑物が混在する中からチロシナーゼを単離する技術が必須になり、手軽にこの抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を産生する細胞を得ることはできない。

ところで、前記したように、チロシナーゼの異常に起因する疾病の原因の究明には、生体或いは細胞に於けるチロシナーゼの挙動を知ることがたいへん有益であると考えられるが、このような実験あるいは試験は、実験動物を用いることが好ましく、ヒト以外の動物のチロシナーゼにも結合するモノクローナル抗体が必要となる。したがって、ヒトチロシナーゼ及びヒト以外の動物のチロシナーゼに結合し、かつ、TRPに結合しないモノクローナル抗体が望まれていた。

発明の開示

本発明は上記観点からなされたものであり、TRPを抗原として認識せず、ヒトチロシナーゼ及びヒト以外の動物のチロシナーゼに結合するモノクローナル抗体、及びこのモノクローナル抗体を用いてヒトチロシナーゼを検知する方法を提供するものである。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうちTRPの配列と相同性が低い配列を有するペプチドを抗原に用いることにより、TRPに結合せず、ヒトチロシナーゼに結合するモノクローナル抗体が得られ、これを用いるとヒトチロシナーゼを特異的に検知できることを見だし、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、下記性質を有するモノクローナル抗体である。

- (a) ヒトチロシナーゼに結合する。
- (b) マウスチロシナーゼに結合する。
- (c) チロシナーゼ関連蛋白に結合しない。

また本発明は、下記工程を含む請求項1記載のモノクローナル抗体の製造法である。

- (a) ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうち、チロシナーゼ関連蛋白のアミノ酸配列と相同性の低い領域のアミノ酸配列の少なくとも一部を有するペプチ

- 4 -

ドと担体との結合物を用いて哺乳動物を免疫した後、その動物の脾細胞を取り出し、培養細胞と融合してハイブリドーマを作製し、

(b) ヒトチロシナーゼ及びマウスチロシナーゼに結合し、かつ、チロシナーゼ関連蛋白に結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択し、

(c) 前記ハイブリドーマを適当な培地で培養した培養上清、あるいは前記ハイブリドーマをマウス腹腔内で培養して得られる腹水から抗体蛋白を採取する。

さらに本発明は、モノクローナル抗体を用いた免疫学的方法によりヒトチロシナーゼを検知する方法において、前記モノクローナル抗体を用いる方法を提供する。

尚、本願において、「ヒトチロシナーゼに特異的に結合する」とは、ヒトチロシナーゼに結合し、かつ、チロシナーゼ関連蛋白に結合しないことをいうが、マウスチロシナーゼに結合しないことを意味するものではない。

以下、本発明を詳細に説明する。

ヒトチロシナーゼの c D N A 配列は既に知られており (Sigeiki Shibahara et al., Tohoku J. exp. Med., 156, 403-414(1988))、ヒト T R P の c D N A 配列も既に知られている (Tirza Cohen et al., Nucleic Acid Reserch, Vol.18, No. 9, 2807-2808 (1990))。本発明者らはこれらの c D N A 配列をアミノ酸配列に翻訳し、比較した (図 1)。図 1 において、上のレーンはヒトチロシナーゼのアミノ酸配列を、下のレーンは T R P のアミノ酸配列を 1 文字記号で示したものである。レーンとレーンの間に示してある (:) は、アミノ酸が完全に一致している部分であり、(.) は同種のアミノ酸 (疎水性、親水性、塩基性等) として一致している部分である。その結果、ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうち、T R P と相同性が低い部分がいくつか存在することを見いだした。

本発明者らは、この点に注目し、これらの部分のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを合成した ((株) ペプチド研究所に合成を依頼)。入手した 5 種類のペプチドを用いて哺乳動物を免疫した後、脾細胞を取り出し、これを培養細胞と融合することによりハイブリドーマを作製し、これらのハイブリドーマにモノクローナル抗体を産生させ、ヒトチロシナーゼ及びマウスチロシナーゼに結合し、か

つ、チロシナーゼ関連蛋白に結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを検索した。その結果、配列番号 1 に示す配列を有する合成ペプチド（以下、「ヒトチロシナーゼに特異的なペプチド」ともいう）で免疫した動物の脾細胞を用いて作製したハイブリドーマのみから、チロシナーゼに特異的なモノクローナル抗体を生産させるハイブリドーマを得ることに成功した。さらに、こうして得られたモノクローナル抗体を用いてヒトチロシナーゼを特異的に検知することに成功した。

< 1 > 発明に用いるモノクローナル抗体

はじめに、ヒトチロシナーゼに特異的なモノクローナル抗体、及びその製造法を、製造の手順に沿って説明する。

(1) 抗原

哺乳動物を免疫する際に用いるヒトチロシナーゼに特異的なペプチドは、配列番号 1 に示す配列又はその一部の配列を有するペプチドが挙げられる。後記実施例に示すように、ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうち、チロシナーゼ関連蛋白のアミノ酸配列と相同性の低い領域のうち、配列番号 2 ～ 5 に示す配列を有するペプチドを用いて免疫した哺乳動物の脾細胞を用いて作製したハイブリドーマからは、ヒトチロシナーゼを検出できるモノクローナル抗体を産生する株が得られなかったことから、抗原としては少なくとも配列番号 1 に示す配列の一部を有するペプチドが好ましいと考えられる。

しかしながら、チロシナーゼ関連蛋白のアミノ酸配列と相同性の低い他の領域を用いても、ヒトチロシナーゼを特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることが可能であることは否定できない。そのような領域の配列を有するペプチドを用いて得られるヒトチロシナーゼに特異的なモノクローナル抗体も、本発明のモノクローナル抗体に包含される。

上記のようなペプチドは、例えばチロシナーゼの酵素分解物から単離することにより、部分的に得ることができるが、常法により化学合成することが好ましい。例えば、市販されているペプチドシンセサイザーを用いて、上記配列を入力すれば上記ペプチドを得ることができる。また、ペプチドの受託合成サービスを行っ

ている会社に依頼して入手してもよい。

かくして得られるペプチド（以下、「合成ペプチド」ともいう）は、そのまま抗原としても用いることができるし、キーホールリンペットヘモシアニン（K L H : Keyhole Limpet Hemocyanin）、ウシ血清アルブミン（B S A : Bovine Serum Albumin）、卵白アルブミン（O V A : Ovalbumin）等の担体と結合させて用いることもできる。このような担体を用いると、ペプチドのみでは抗原性が低い場合、あるいは抗原性がない場合でも抗原性を上げることができる。尚、この場合は担体に対する抗体もできるが、それらはハイブリドーマを選択する段階で取り除くことができる。

（２）哺乳動物の免疫

上記抗原で免疫する哺乳動物は、免疫実験に通常用いられている哺乳動物であれば特に制限がなく、マウス、ラット、ウサギ等が例示できる。また、免疫する方法は、通常の免疫の手法に則って行えば良く、例えば、合成ペプチド或いは担体に結合させた合成ペプチドを、 $0.5 \text{ mg/kg} \sim 50 \text{ mg/kg}$ の用量で、フロイントの完全アジュバントまたは不完全アジュバントとともに１～２週間毎に数回投与を繰り返し、最終投与の２週間以上後に、合成ペプチドのみを投与して最終免疫を行う方法が挙げられる。

このときの合成ペプチドあるいは担体に結合させた合成ペプチドの投与量は、１回当たり $0.5 \text{ mg/kg} \sim 50 \text{ mg/kg}$ 程度が適当である。投与量が 0.5 mg/kg 未満では抗体を十分に生成しないことがある。また、 50 mg/kg を越えても更なる免疫効果は期待できず、さらに、生体内で免疫抑制が生じ、目的とする抗体が得られない恐れがある。

（３）ハイブリドーマの調製

上記のようにして免疫した動物を、最終免疫後３～４日後に屠殺し、脾臓を摘出し、脾細胞を取り出す。この細胞と、融合相手である培養細胞とを融合促進剤の存在下で融合し、得られた融合細胞を選別することにより脾細胞－培養細胞ハイブリドーマを得ることができる。

融合相手の培養細胞としては、脾細胞と融合するものであれば特に制限はないが、一般には、ミエローマ細胞（骨髓腫細胞）が適当である。また、細胞融合の

- 7 -

後に未融合細胞と融合細胞とを区別できるようにするために、特定の選別用の薬物マーカーを有するものが好ましい。

例えば、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損したものが挙げられる。このような細胞は、ヒポキサンチン・アミノプテリン及びチミジンを添加した培地（HAT培地）中で生育できないが、この細胞と正常細胞との融合細胞はHAT培地中でも生育できるようになり、未融合細胞と区別できる。具体的には、P3X63Ag8.653株、P3/NSI/1-AG4-1株、FO株、SP2/0-Ag14株等のミエローマ細胞の市販株が挙げられるが、これらには限定されない。

細胞融合は通常RPMI 1640、MEM等の培地中で、抗体産生細胞（脾細胞）とミエローマ細胞とを10：1～2：1の混合比で、融合促進剤とともに混合することにより行われる。融合促進剤としては、細胞融合実験で通常用いられている融合剤であれば特に制限はなく、具体的には、センダイウイルスや平均分子量500～7000のポリエチレングリコールが例示できる。また電気パルスによって融合させてもよい。細胞融合を終えた細胞は、例えばRPMI 1640あるいはMEM培地などで希釈し、遠心分離により洗浄した細胞をHAT培地等の選択培地に浮遊させ、マルチプレート等に分注して培養を行い、ハイブリドーマのみを生育させる

（4）ハイブリドーマの選別

上記のようにして得られるハイブリドーマは、抗原に用いたペプチドのうち異なる抗原決定部位に対するモノクローナル抗体や担体に用いた蛋白に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの混合体であるので、これらの中から前記合成ペプチド、すまわちヒトチロシナーゼに特異的なペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別する。

この選別の方法としては、抗原に用いた合成ペプチドを使用した酵素免疫測定法（ELISA法）が好ましい。例えば、合成ペプチドをプラスチックプレート等に固相化しておき、これにハイブリドーマの培養上清、さらに酵素、蛍光物質或は発光物質の結合量から合成ペプチドに結合する抗体量を知ることができる。或は、ハイブリドーマが産生する抗体を固相化し、これに合成ペプチド、酵素等で標識第2抗体と順次インキュベートしてもよい。

さらに、合成ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、ヒトチロシナーゼ及びマウスチロシナーゼに結合し、チロシナーゼ関連蛋白に結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。

このようにして得られたハイブリドーマの1株は、平成5年10月28日より工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、FERM P-13937として寄託されており、平成6年10月6日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号FERM BP-4824として寄託されている。

また、このようにして得られたハイブリドーマの他の1株は、平成6年5月27日より工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、FERM P-14340として寄託されており、平成6年9月14日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号FERM BP-4801として寄託されている。

（5）ヒトチロシナーゼに特異的に結合するモノクローナル抗体の調製

上記のようにして得られたハイブリドーマからヒトチロシナーゼに特異的に結合するモノクローナル抗体を得るには、例えば、適当な培地中で培養した抗体産生ハイブリドーマの培養上清、あるいは抗体産生ハイブリドーマをマウス腹腔内で培養して得られた腹水を常法にしたがって、硫酸分画、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー等で精製すれば、ヒトチロシナーゼに特異的なモノクローナル抗体が得られる。

本発明の抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体は、生体或いは細胞に於けるチロシナーゼの挙動調査に使用することができ、また、チロシナーゼが関連する疾病の診断あるいは原因の究明、例えば白髪や白皮症といった色素異常症の病態解明、さらには悪性黒色腫の病巣の検出や転移の判定等に用いる診断薬に利用することができる。また、本発明の抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体はマウスチロシナーゼに結合するので、有色マウスを用いたチロシナーゼ蛋白の挙動を調べる動物試験において、チロシナーゼ蛋白の挙動を調べる手段として本発明のモノクローナル抗体を利用することができる。

< 2 > 本発明のヒトチロシナーゼの検知法

上記のようにして得られるヒトチロシナーゼに特異的に結合するモノクローナル抗体は、ヒトチロシナーゼに選択的に結合するので、通常の抗原抗体反応を用いた抗原の検知方法を適用することにより、ヒトチロシナーゼを検知することができる。例えば、ヒト由来の培養細胞、皮膚組織等の免疫染色、さらにはウエスタン・ブロット（エンザイムイムノブロット）あるいはマイクロオートラジオグラフィにおける染色用抗体として使用することにより、ヒトチロシナーゼを検知できる。また、単に定性的に検知できるのみでなく、染色の度合等により、定量的にも検知することができる。

免疫組織染色による検知の方法としては、例えば、ヒト表皮組織の凍結切片、あるいはヒト由来培養細胞をPBSにより洗浄後、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を用いて染色し、再びPBSにより洗浄した後、ヒトの組織および培養細胞に結合したモノクローナル抗体を、FITC標識した第2抗体を用いて検出すれば、ヒトの組織および培養細胞中のヒトチロシナーゼを検知することができる。

また、エンザイムイムノブロットによる検知の方法としては、次の方法が挙げられる。例えば、ヒト由来培養色素細胞の抽出物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、泳動物をニトロセルロースメンブレン等に写し取る。次に、メンブレンをPBS等で洗浄した後、メンブレン上のヒトチロシナーゼのバンドを抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を用いて染色する。再びPBS等で洗浄した後、市販の酵素標識した第2抗体を用いて染色されたバンドを検出し、そのバンドの強さを測定すれば、ヒトチロシナーゼを定量的に検知することができる。

本発明のヒトチロシナーゼの検知法は、生体或いは細胞に於けるチロシナーゼの挙動調査、チロシナーゼ関連疾病の診断あるいは原因の究明、例えば白髪や白皮症といった色素異常症の病態解明、さらには悪性黒色腫の病巣の検出や転移の判定等の診断に利用することができる。チロシナーゼ関連疾病としては、白髪、シミ、ソバカス、肝斑、白皮症、老人性黒子など、メラノサイトが関与して起こる疾病が挙げられる。

さらに、動物に試料を投与し、本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫学的方法によりその動物におけるチロシナーゼ蛋白を測定し、投与前後のチロシナーゼ蛋白の量的変動を生じさせる試料を選択することにより、メラニン産生を抑制あるいは促進する物質を検索できることが期待される。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトチロシナーゼ及びTRPのアミノ酸配列のホモロジー及びヒトチロシナーゼ蛋白上の合成ペプチドの位置を示す図である。

図2は、ヒトチロシナーゼ遺伝子導入細胞中で遺伝子が発現していることをチロシナーゼ活性染色法により調べた結果を示す写真である。

図3は、ヒトチロシナーゼ遺伝子導入細胞を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で免疫染色した結果を示す写真である。

図4は、マウスチロシナーゼ遺伝子導入細胞を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で免疫染色した結果を写真である

図5は、遺伝子を導入していない細胞を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で免疫染色した結果を示す写真である。

図6は、ヒトTRP-1遺伝子導入細胞中で遺伝子が発現していることを抗TRP-1抗体を使用した免疫染色により調べた結果を示す写真である。

図7は、ヒトTRP-1遺伝子導入細胞を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で免疫染色した結果を示す写真である。

図8は、ヒトTRP-2遺伝子導入細胞中でヒトTRP-2が発現していることを抗ヒトTRP-2抗体を使用した免疫染色により調べた結果を示す写真である。

図9は、ヒトTRP-2遺伝子導入細胞を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で免疫染色した結果を示す写真である。

図10は、チロシナーゼの活性染色及びエンザイムイムノブロットによる電気泳動の結果を示す写真である。

図11は、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色したヒト皮膚を示す写真である。

図12は、ヒトのリンパ節へ悪性黒色腫が転移していることをチロシナーゼの活性染色により調べた結果を示す写真である。

図13は、ヒトリンパ節の悪性黒色腫の転移巣を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を使用して免疫染色した結果を示す写真である。

図14は、ヒトリンパ節の悪性黒色腫の転移巣を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体を使用しないで免疫染色した結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 ヒトチロシナーゼに特異的なモノクローナル抗体の調製

<1>ハイブリドーマの作製

配列番号1～5に示すアミノ酸配列を有するペプチドの合成および担体（KLH）への結合は、株式会社ペプチド研究所に依頼した。

上記の5種類の担体結合合成ペプチド100 μ gを生理食塩水100 μ lに溶かし、完全フロイントアジュバント（SIGMA製）100 μ lと混合乳化したものを、それぞれ8週令のBALB/cマウス（日本クレア）の腹腔内に投与した。その後1週間目と2週間目に、上記担体結合合成ペプチド-不完全フロイントアジュバント等量混合乳化液200 μ lを腹腔内投与した。更に、3回目の投与から2週間後に、50 μ gの合成ペプチドを溶解した生理食塩水100 μ lを静脈注射した。

3日後、上記の各マウスから脾臓を摘出し、脾細胞をRPMI1640培地に懸濁し、洗浄を行った。一方、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8.653（大日本製薬よから購入）を、細胞融合に合わせて対数増殖期になるように培養し、遠心分離により集めた。

10⁸個の脾細胞に対し、2 $\times$ 10⁷個のミエローマを上記培地中で混合し、遠心分離により細胞をペレットにした。上清を除いた後、37℃に保温した50%PEG4000（SIGMA製）を含むRPMI1640培地1mlを1分間で徐々に滴下し、1分間穏やかに攪拌した。更に、37℃のRPMI1640培地

- 12 -

2 ml を 2 分間で、更に 8 ml を 3 分間で攪拌しながら滴下する。

滴下終了後、遠心分離により上清を除いた後、細胞ペレットを G I T 培地（和光純薬製）40 ml に懸濁し、これを 4 枚の 96 ウェルプレート（住友ベークライト製）に、1 ウェルにつき 100 μ l ずつ分注した。翌日 25 μ l の H A T 培地を添加し、更に 4 日後 25 μ l の H A T 培地を添加した。1 週間培養した後、培養上清を半分除き、100 μ l の G I T 培地を添加した。

細胞融合から約 2 週間後、ミエローマと脾細胞が融合したハイブリドーマのみがコロニーを形成したが、さらに、コロニーの直径が約 1 mm になるまで培養を続けた。この時点で培養上清に分泌された抗体を、上記の合成ペプチドと市販の二次抗体（西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）標識ヤギ抗マウス I g ' s

（ γ + L）抗体：T A G O 社製）を用いたサンドウィッチ E L I S A 法により検定した。このうち、抗体価の高かったウェル中のハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を得た。

さらに、得られたハイブリドーマ株から、ヒトチロシナーゼに結合するモノクローナル抗体を産生する株を、ヒト皮膚を使用した免疫染色法により選択した。その結果、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する合成ペプチドを用いて免疫した動物に由来するハイブリドーマのみから、ヒトチロシナーゼに結合するモノクローナル抗体を産生する株が得られた。

このようにして得られたハイブリドーマの 1 株（AHT-C2-H12）は、平成 5 年 10 月 28 日より工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号 305 日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番 3 号）に、F E P M P - 13937 として寄託されており、平成 6 年 10 月 6 日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号 F E R M B P - 4824 として寄託されている。また、このようにして得られたハイブリドーマの他の 1 株（AHT-C2-H31）は、平成 6 年 5 月 27 日より工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号 305 日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番 3 号）に、F E P M P - 14340 として寄託されており、平成 6 年 9 月 14 日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号 F E R M B P - 4801 として寄託されている。

< 2 > ヒトチロシナーゼに特異的に結合するモノクローナル抗体の調製

(1) 上記で得られたハイブリドーマの培養上清からの調製

上記ハイブリドーマ (F E P M P - 1 4 3 4 0) を 1 L の G I T 培地中で培養し、細胞密度が約 5×10^6 個 / m l になったところで培養上清を遠心分離により回収し、これをポアサイズ 0. 22 μ m のフィルターでろ過し、ろ液を氷温下で 50 % の硫酸塩析に供し、得られた沈殿物を遠心分離により回収した。沈殿物を 2 m l の P B S に溶解し、透析チューブ (三光純薬より購入) に移した後、2 L の P B S 中で 4 °C で透析した。透析終了後、溶液をプロテイン A カラムキット (アマシャム・ジャパン製) で精製した。その結果、ろ液 1 L から 3. 5 m g (500 μ g / m l $\times$ 7 m l) の抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体溶液が得られた。

(2) マウス腹水からの調製

マウスへの投与の前日、上記で得られたハイブリドーマ (対数増殖期) を 2×10^5 個 / m l の細胞密度で培養フラスコに播種し、G I T 培地で培養した。1 日後、細胞を遠心分離により回収し、再び G I T 培地に 10^7 個 / m l の細胞密度で懸濁した。この懸濁液を、S P F 区域で飼育した 8 週齢の B A L B / c ヌードマウス (クレアより購入) 1 匹に対して 1 m l を腹腔内に投与した後、引き続き S P F 区域でマウスを飼育することにより腹腔内でハイブリドーマを生育させた。3 週間後、腹部が十分肥大 (出産直前の妊娠マウス程度の大きさ) し、腹水の貯留が認められた。そこで 10 m l 容のシリンジ (テルモ製) を使用し腹水を回収した。さらに、マウス 1 匹当たり約 3 m l の P B S で腹腔内の洗浄を行い、洗浄液も同時に回収した。得られた腹水および洗浄液を混合し (1 匹当たり 6 m l になった。) 、ポアサイズ 0. 22 μ m のフィルターでろ過し、ろ液を抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体含有腹水 (以後、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体含有腹水を、簡単に「モノクローナル抗体含有腹水」という。) とした。さらに得られたモノクローナル抗体含有腹水を上記のプロテイン A カラムキットにより精製した。その結果、モノクローナル抗体含有腹水 1 m l から約 1. 2 m g / m l の濃度の抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体溶液が得られた。

実施例2 抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体の解析及び評価

<1>抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体の特異性の評価

上記で得られたモノクローナル抗体の特異性を評価するために、マウス色素非産生メラノーマ：K1735細胞（チロシナーゼおよびTRP-1非生産：Yasushi Tomita et. al., J. Invest. Dermatol., 96(4), 500-504, 1991; 東北大学医学部より供与）にヒトチロシナーゼ、マウスチロシナーゼ、ヒトTRP-1およびヒトTRP-2遺伝子を導入し、発現した細胞を用いて、上記で得られたモノクローナル抗体による免疫染色を行った。

(1) ヒトチロシナーゼ、マウスチロシナーゼ、ヒトTRP-1およびヒトTRP-2導入細胞の作製

K1735細胞を直径6cmの培養用シャーレ（FALCON社製）に約 5×10^5 個の細胞（シャーレに対して約75%コンフルエント）を播種し、10% FBSを含むDME培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium: SIGMA社より購入）中で一晩培養した後、培地を交換し、さらに2時間培養した。一方、10倍に希釈したTE緩衝液（10mM Tris: 1mM EDTA: pH 7.5）に導入する遺伝子発現用プラスミド（pRHOHT2、pRHOHT α 及びpCMVDTS: 下記参照）を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解し、プラスミド溶液とした。2倍濃度のHBS緩衝液（10mM KCl; 10mM D-グルコース; 1.5mM Na₂HPO₄; 50mM HEPES: pH 7.1） $175.0 \mu\text{l}$ と2MのCaCl₂ $22.05 \mu\text{l}$ を混合し氷冷したものを、あらかじめ氷冷した上記プラスミド溶液 $152.95 \mu\text{l}$ 中へ徐々に滴下混合し、プラスミドを沈殿させた。さらに10分間氷冷した後、上記のK1735細胞の培地中へ添加し培養を続けた（なお、ここで使用する全ての溶液は、ポアサイズ $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターであらかじめ滅菌を行った）。5時間後、培地を除き、TBS緩衝液（137mM NaCl; 2.7mM KCl; 25mM Tris: pH 7.4）を使用して細胞を1回洗浄した。そして、5mlの10%グリセリンを含むTBS緩衝液を添加し5分間室温に放置した。溶液を除き再びTBS緩衝液で2回洗浄した後、10% FBSを含むDME培地中で培養した。20時間後、導入した遺伝子を発現させるため、

細胞を42℃で1時間熱ショック処理（なお、pCMVDTSを導入する場合には熱ショック処理を行わない。）を行った。さらに16時間培養を行い、これを遺伝子導入細胞とした。

尚、上記で用いた遺伝子発現用プラスミドとしては、ヒトチロシナーゼ遺伝子発現用にはpRHOHT2 (Takeda A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 162, 984-990(1989))、ヒトTRP1遺伝子発現用にはpRHOHT α 、及びヒトTRP2遺伝子発現用にはpCMVDTS (Kouji Yokoyama et al., Biochim. Biophys. Acta, 1217, 317-321(1994)) を各々使用した。これらの遺伝子発現用プラスミドは、全て東北大学医学部より供与されたものである。

(2) ヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼ遺伝子の発現の確認

(1) で作製したヒトチロシナーゼ遺伝子導入細胞およびマウスチロシナーゼ遺伝子導入細胞中でヒトチロシナーゼ遺伝子およびマウスチロシナーゼ遺伝子が発現していることを確認するため、ヒトチロシナーゼ遺伝子導入細胞およびマウスチロシナーゼ遺伝子導入細胞を使用してチロシナーゼ活性染色(DOPA染色)を行った。方法を以下に示す。

遺伝子導入細胞をPBSで洗浄した後、10%ホルマリンを含むPBSを添加し、30分間氷冷した。さらに、pH6.8のPBSに10分間3回浸し、0.1%L-DOPAを含むpH6.8のPBSを添加し、37℃で3時間反応させた。反応終了後PBSで3回洗浄し、再び10%ホルマリンを含むPBSを添加し、室温で30分間インキュベートした後、顕微鏡下で観察した。その結果を図2に示す。

この図からわかるように、ヒトチロシナーゼ遺伝子を導入した細胞は活性染色により黒色に染色された（写真は示していないが、マウスチロシナーゼ遺伝子を導入した細胞も活性染色により黒色に染色された。）。一方、遺伝子を導入していない細胞は染色されなかった。すなわちヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼ遺伝子導入細胞がヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼ遺伝子を発現していることが明らかとなった。

(3) 抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体のヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼとの反応性

(2) で発現を確認したヒトチロシナーゼ遺伝子導入細胞およびマウスチロシナーゼ遺伝子導入細胞を使用し、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体とヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼとの反応性を免疫染色により調べた。方法を以下に示す。

上記で得られた培養中のヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼ遺伝子導入細胞から培地を除いた後、10%ホルマリンを含むPBSを添加し、室温で20分間処理した。PBSで3回洗浄後、さらに0.5%Triton X-100を含むPBSを添加し室温で5分間処理し、PBSで1回洗浄した。次に一次抗体としてPBSで10 μ g/mlの濃度に希釈した上記の抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体溶液（培養上清から調製した抗体溶液あるいは、抗体含有腹水から調製した抗体溶液のどちらでもよい）を細胞表面に滴下した後、37℃で30分間インキュベートした。再びPBSで3回洗浄後、二次抗体としてPBSで50倍に希釈した市販のビオチン結合抗マウスIgG（CHEMICON社製）を細胞表面に滴下し、37℃で30分間処理し、PBSで3回洗浄した。次にPBSで100倍に希釈した市販のFITC結合アビジン（BIOMEDA社製）を添加し37℃で30分間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。最後に50%グリセリン含有PBSを添加しカバーガラスを静かに置いて封入した後、蛍光顕微鏡（オリンパス製、BH2-RFCA）下で観察および写真撮影を行った。その結果を図3、4および5に示す。

この図からわかるようにヒトチロシナーゼ遺伝子およびマウスチロシナーゼ遺伝子を導入した細胞は抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体により、強く染色されていることがわかる。すなわち、本モノクローナル抗体はヒトチロシナーゼだけでなくマウスチロシナーゼとも結合することが明らかとなった。従って、本モノクローナル抗体はヒトだけでなくマウス（実験動物）での試験に利用可能である。一方、遺伝子を導入していない細胞は全く染色されないことから、本モノクローナル抗体は元のK1735細胞とは反応しないことがわかった。

さらに、マウス及びヒト由来の培養細胞（メラノーマ細胞）に対する染色性を比較することにより、本抗体のヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼとの反応性を比較した。

ヒト由来のメラノーマ細胞MeWo、HMV II（RCB777: RIKEN Tsukuba Cell Bank, Japan）、G 3 6 1（ATCC CRL1424）及びマウス由来のメラノーマ細胞B 1 6（ATCC CRL6233）及びS 9 1（ATCC CLL 53.1）を各々シャーレで培養した後、培養上清を除き、PBSで数回洗浄した。それぞれのシャーレにブロッキング溶液（5% FBSと1% BSAを含んだPBS）を注ぎ、室温で20分間インキュベートした。さらに、シャーレを湿箱中に入れ、ブロッキング溶液で10 μ g/mlに希釈した上記モノクローナル抗体溶液をシャーレに加え、室温でインキュベートした。1時間後、シャーレをPBSで5分間3回洗浄した。これらのシャーレにブロッキング溶液で50倍に希釈した市販のビオチン結合抗マウスIgGヤギ抗体（Chemicon社製）溶液を注ぎ、室温でインキュベートした。1時間後、シャーレを前述のようにPBSで洗浄し、ブロッキング溶液で100倍に希釈したFITC結合アビジン（BIOMEDA社製）溶液を注ぎ、暗所、室温で1時間インキュベートした。再びシャーレを前述のようにPBSで洗浄した後、シャーレが乾かないうちに、50%グリセリンを含んだPBSでプレート表面を覆い、カバーガラスを乗せた。各々のシャーレを蛍光顕微鏡（オリンパス社製：BH2-RFCA）を使用して観察し、染色された細胞の割合を調べた。結果を表1に示す。

表 1

細胞種（メラノーマ）	染色された細胞の割合（%）
ヒト由来	
MeWo	98
HMV II	95
G 3 6 1	97
マウス由来	
B 1 6	96
S 9 1	96

この結果から、本抗体はヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼに対して同等の反応性を有することがわかる。

(4) ヒトTRP-1 遺伝子の発現の確認

(1) で作製したヒトTRP-1 遺伝子導入細胞中でヒトTRP-1 遺伝子が発現しているかどうかを調べるために、抗TRP-1 抗体（秋田大学医学部より供与）を使用してヒトTRP-1 導入細胞の免疫染色を行った。なお、免疫染色は(3) に記載の方法とほぼ同じである。ただし、一次抗体としては上記抗ヒトTRP-1 抗体を使用し、二次抗体としてはPBSで50 倍に希釈した市販のテキサスレッド結合抗ラットIgGヤギ抗体（CALTAG社製）を使用した。また、FITC 結合アビジン処理およびその後のPBSによる洗浄の操作は除いた。結果を図6 に示す。

図からわかるように、ヒトTRP-1 遺伝子を導入した細胞は抗TRP-1 抗体で染色された。一方、遺伝子を導入していない細胞は抗TRP-1 抗体で染色されなかった（写真は示さない）。このことからヒトTRP-1 遺伝子導入細胞がヒトTRP-1 を発現していることが明らかとなった。

(5) 抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体とヒトTRP-1 との反応性

(4) で遺伝子の発現を確認したヒトTRP-1 遺伝子導入細胞を使用し、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体とヒトTRP-1 との反応性を免疫染色により調べた。なお、免疫染色は(3) に記載した方法で行った。その結果を図7 に示す。

図からわかるように、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体はヒトTRP-1 遺伝子を導入した細胞を全く染色しないことから、本モノクローナル抗体はヒトTRP-1 と反応しないことが明らかとなった。

(6) ヒトTRP-2 遺伝子の発現の確認

(1) で作製したヒトTRP-2 遺伝子導入細胞中でヒトTRP-2 が発現しているかどうかを調べるために、抗TRP-2 抗体（東北大学医学部より供与）を使用して、ヒトTRP-2 遺伝子導入細胞を免疫染色を行った。なお、免疫染

色は（３）記載の方法とほぼ同じである。ただし、一次抗体にはPBSで100倍に希釈した上記の抗TRP-2抗体を、また二次抗体にはPBSで50倍に希釈した市販のビオチン結合抗ラビットIgGヤギ抗体（TAGO社製）を使用した。結果を図8に示す。

図からわかるようにヒトTRP-2遺伝子を導入した細胞は抗ヒトTRP-2抗体により染色された。一方、遺伝子を導入していない細胞は抗ヒトTRP-2抗体により染色されなかった（写真は示していない。）。このことからヒトTRP-2導入細胞がヒトTRP-2遺伝子を発現していることが明らかとなった。

（７）抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体とヒトTRP-2との反応性

（６）で遺伝子の発現を確認したヒトTRP-2遺伝子導入細胞を使用し、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体とヒトTRP-2との反応性を免疫染色により調べた。免疫染色は（３）に記載した方法で行った。その結果を図9に示す。

図からわかるように、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体はヒトTRP-2遺伝子を導入した細胞を全く染色しないことから、本モノクローナル抗体はヒトTRP-2と反応しないことが明らかとなった。

すなわち上記で得られたモノクローナル抗体は、従来技術の抗チロシナーゼモノクローナル抗体（抗TRP-1抗体）とは全く異なった抗体であり、TRP-1さらには、TRP-2と結合しないことがわかった。

<2>抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体のアイソタイプ

上記で得られたモノクローナル抗体のアイソタイプをアイソタイピングキット（アマシャム・ジャパン製）を使用して調べたところ、イムノグロブリンG1（IgG1）であり、L鎖はkappa（κ）であった。

<3>抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体のエピトープの解析

実施例1で得られた抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体のエピトープを、エピトープ決定キット（SPOTsキット：フナコシ（株）製）を使用して調べた。その結果、本抗体のエピトープはGlu Asp Tyr His（配列番号6）であり、特にAsp Tyr Hisが本抗体による認識に必須であることがわかった。このエピトープ

は、ヒトチロシナーゼに含まれる配列と完全に一致している（配列番号1においてアミノ酸番号4～7に相当）。

一方、マウスチロシナーゼのアミノ酸配列中にもAsp Asp Tyr His（配列番号7）なる配列がカルボキシル末端に存在しており、GluおよびAspがどちらもカルボキシル基を側鎖に有する非常によく似たアミノ酸であることから、この配列を本抗体がエピトープとして認識し得ることは十分理解できる。

実施例3 ヒトチロシナーゼの検知（I）

実施例1で得られたモノクローナル抗体について、MeWo細胞（ヒト悪性黒色腫由来培養細胞）およびHeLa細胞（ヒト子宮頸ガン由来培養細胞）の抽出物を用いて、特異性の評価をエンザイムイムノブロット法により行った。以下に方法を詳述する。

培養フラスコで培養したMeWoおよびHeLa細胞の培養上清を除き、PBSで数回洗浄した後、細胞をラバーポリスマンを用いて回収した。回収した細胞を、再び、PBSで数回洗浄し、細胞溶解懸濁液（Triton X-100を0.5%含んだ0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液，pH8.9）を懸濁した。

この細胞を、超音波細胞破碎装置（東湘電気製）で30秒破碎し、16,000Gで10分間遠心分離を行った。得られた上清に含まれる蛋白濃度を測定し、細胞抽出液とした。これを4℃で、5～20%の密度勾配ポリアクリルアミドゲル（パジェル：ATTO製）電気泳動に供した（アプライ量は1レーン当り蛋白量として20μgである。）。なお、電気泳動は常法に従って行った。電気泳動終了後、ゲルを取り出し、トランスファーバッファー（100mM, Tris；192mM, glycine）に浸漬した後、ブロッティング装置（セミドライブロッティング装置：ATTO製）を用い、その泳動物を、予めトランスファーバッファーに浸漬したメンブレン（Immobilon：ミリポア製）へ4℃で16時間転写した（転写の際の電流はメンブレン1cm²当り0.25mAである。）。

泳動物を転写したメンブレンの一部（電気泳動の際の1レーンに相当する部分）を切りとり、0.3Mリン酸緩衝液（pH6.6）で5分間2回洗浄後、0.1%L-DOPAを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH6.8）中で37℃で3時間

反応する事によりヒトチロシナーゼの活性染色（DOPA染色）を行い、メンブレン上のヒトチロシナーゼの位置を検出した。

一方、メンブレンの残りをTBS緩衝液（20mM, Tris; 500mM, NaCl pH7.5）に15分間浸漬した後、ブロッキングバッファー（5% スキムミルクあるいは1% BSA、及び0.1% Tween 20/TBS緩衝液）に浸し、室温で1時間緩やかに振とうした。

その後、メンブレンを0.1% Tween 20/TBS緩衝液（TTBS緩衝液）を用いて洗浄（15分間1回、5分間2回）し、製造例で得られたモノクローナル抗体溶液の希釈液（TTBS緩衝液で2.5 μ g/mlに希釈した溶液約2ml）に浸漬し、室温で約1時間緩やかに振とうした。メンブレンをTTBS緩衝液で上記のように洗浄した後、さらに市販の二次抗体溶液（西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗マウスIg's（ γ +L）ヤギ抗体：TAGO社製、15,000倍希釈を約2ml）に浸漬し、室温で約1時間緩やかに振とうした。

メンブレンをTTBSバッファーで洗浄（15分1回、5分4回）した後、市販のHRP検出キット（アマシャム製ECLキット）を使用して、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体が結合した泳動物のバンドを検出した。尚、HRPの結合したバンドの検出は、4-クロロ-1-ナフトールを基質として使用しても検出する事ができる。

前記活性染色の結果及びエンザイムイムノブロット法の結果を図10に示す。この結果から明らかなように、上記で得られたモノクローナル抗体は、ヒトチロシナーゼ活性を有する蛋白のバンド、すなわちヒトチロシナーゼに結合する。さらにこのモノクローナル抗体は、HeLa細胞の抽出物には結合しない。したがって、本発明により、ヒトチロシナーゼを検知できることが明かである。

実施例4 ヒトチロシナーゼの検知（Ⅱ）

実施例1で得られたモノクローナル抗体を使用してヒト表皮組織の免疫染色を行った。詳細を以下に示す。

あらかじめ-80℃に凍結したヒト表皮組織（東北大学医学部より供与）を包

埋剤 (Tissue-Tek O.C.T. Compound: マイルズ社製) を用いて包埋し、凍結切片作製装置 (クリオスタット: ブライト社製) を使用して、厚さ約 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ の凍結組織切片 (一辺は約 5 mm) にした後、 1% ゼラチンでコーティングしたスライドガラス (以後、ヒト表皮組織切片を置いたスライドガラスを簡単に「スライドガラス」という。) 上に置いた。このスライドガラスを 37°C で 1 時間インキュベートした後、PBS に 1 回浸した。次にブロッキング溶液 (5% FBS と 1% BSA を含んだ PBS) を組織切片上に滴下し、室温で 20 分間インキュベートした。さらに、スライドガラスを湿箱中に入れ、組織切片上にブロッキング溶液で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した上記モノクローナル抗体を滴下し、室温でインキュベートした。1 時間後、スライドガラスを湿箱より取り出し、PBS で 5 分間 3 回洗浄した。再び、スライドガラスを湿箱中に入れブロッキング溶液で 50 倍に希釈した市販のビオチン結合抗マウス IgG ヤギ抗体 (Chemicon 社製) を切片上に滴下し、室温でインキュベートした。1 時間後、スライドガラスを前述のように PBS で洗浄し、湿箱中に入れ、組織切片上にブロッキング溶液で 100 倍に希釈した FITC 結合アビジン (BIOMEDA 社製) を滴下し、暗所、室温で 1 時間インキュベートした。再びスライドガラスを取り出し、前述のように PBS で洗浄した後、組織切片が乾かないうちに、 50% グリセリンを含んだ PBS を組織切片上に滴下し、カバーガラスを乗せ、蛍光顕微鏡 (オリンパス社製: BH2-RFCA) を使用して観察及び写真撮影を行った。その結果を図 11 に示す。

この結果から、ヒト組織では成熟型チロシナーゼが存在しているメラノサイトが強く染色されており、表皮中のケラチノサイトや真皮中の繊維芽細胞は全く染色されていないことがわかる。以上より、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体がヒトチロシナーゼに対して優れた特異性を有しており、それによりヒトチロシナーゼを検知できることが明かである。

実施例 5 ヒトチロシナーゼの検知 (Ⅲ) - 悪性黒色腫の転移巣の免疫染色

実施例 1 で得られたモノクローナル抗体を使用してヒトのリンパ節への悪性黒色腫の転移巣の免疫染色を行った。詳細を以下に示す。

悪性黒色腫の転移したヒトのリンパ節の凍結組織あるいはパラフィン包埋組織を実施例4に記載した方法により抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体により染色した。なお、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で処理しない組織を対象区とした。なお、リンパ節に悪性黒色腫が転移していることを確認するために組織のDOPA染色を実施例1で示した方法により行った。これらの結果を図12、13および14に示す。

図12から、DOPA染色よりリンパ節組織が染色されており、使用したリンパ節には確かに悪性黒色腫が転移していることがわかる。一方、図13および14より、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で処理しなかった組織は全く染色されなかったが、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体で処理した組織はDOPA染色より、高感度で染色された。従って、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体は、正常なリンパ節内ではなく、悪性黒色腫が転移したリンパ節内にだけ存在しているチロシナーゼを検出することができる。すなわち、抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体はヒトのリンパ節への悪性黒色腫の転移を判定するための診断薬として使用できることが明らかである。この他、悪性黒色腫の原発巣においても染色が可能であり、その染色像は健常人の皮膚とは全く異なることから悪性黒色腫の切除の範囲を決定するための診断薬としても使用できる。さらに、これらの病巣のサンプルはパラフィン包埋されたものでよいため、一般的な臨床の場面での使用が可能である。

産業上の利用可能性

本発明は、ヒトのチロシナーゼに対して優れた特異性を有するモノクローナル抗体を使用するので、ヒトチロシナーゼを特異的に検知することができる。また、本抗体はマウスチロシナーゼとも結合するので、実験動物のチロシナーゼも検知することができる。さらに、白髪、白皮症等の色素異常症の病態解明、あるいは悪性黒色腫の原発巣および転移巣の診断に使用することができる。

- 24 -

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Glu Lys Glu Asp Tyr His Ser Leu Tyr Gln Ser His Leu

1 5 10

配列番号 : 2

配列の長さ : 17

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

His Phe Pro Arg Ala Cys Val Ser Ser Lys Asn Leu Met Glu Lys Glu

5 10 15

Cys

配列番号 : 3

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Pro Glu Gly Pro Leu Arg Arg Asn Pro Gly Asn His Asp Lys Ser Arg

5 10 15

- 25 -

Thr Pro Arg

配列番号 : 4

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ile Ser Ser Lys Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Ser Tyr Leu Gln Asp Ser

5

10

15

Asp Pro Asp

配列番号 : 5

配列の長さ : 25

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gly Leu Val Ser Leu Leu Cys Arg His

5

10

15

Lys Arg Lys Gln Leu Pro Glu Glu Lys

20

25

配列番号 : 6

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

- 26 -

Glu Asp Tyr His

配列番号 : 7

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Asp Tyr His

請求の範囲

1. 下記性質を有するモノクローナル抗体。
 - (a) ヒトチロシナーゼに結合する。
 - (b) マウスチロシナーゼに結合する。
 - (c) チロシナーゼ関連蛋白に結合しない。
2. ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうち、チロシナーゼ関連蛋白のアミノ酸配列と相同性の低い領域を抗原として認識する請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. 前記領域が、配列表配列番号1に示すアミノ酸配列の少なくとも一部であることを特徴とする請求項1記載の抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体。
4. アイソタイプがIgG1である請求項1記載のモノクローナル抗体。
5. 下記工程を含む請求項1記載のモノクローナル抗体の製造法、
 - (a) ヒトチロシナーゼのアミノ酸配列のうち、チロシナーゼ関連蛋白のアミノ酸配列と相同性の低い領域のアミノ酸配列の少なくとも一部を有するペプチドと担体との結合物を用いて哺乳動物を免疫した後、その動物の脾細胞を取り出し、培養細胞と融合してハイブリドーマを作製し、
 - (b) ヒトチロシナーゼ及びマウスチロシナーゼに結合し、かつ、チロシナーゼ関連蛋白に結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択し、
 - (c) 前記ハイブリドーマを適当な培地で培養した培養上清、あるいは前記ハイブリドーマをマウス腹腔内で培養して得られる腹水から抗体蛋白を採取する。
6. モノクローナル抗体を用いた免疫学的方法によりヒトチロシナーゼを検知する方法において、請求項1記載のモノクローナル抗体を用いる方法。
7. 請求項6記載の方法によりヒトチロシナーゼを検知することを特徴とする色素関連疾病の診断法。

8. 有色マウスを用いたチロシナーゼ蛋白の挙動を調べる動物試験において、チロシナーゼ蛋白の挙動を請求項1記載のモノクローナル抗体を用いた免疫学的方法により調べることを特徴とする方法。
9. 請求項1記載のモノクローナル抗体を有効成分とする悪性黒色腫の診断薬。
10. 請求項1記載のモノクローナル抗体を用いた免疫学的方法によりチロシナーゼを検知することを特徴とする動物の悪性黒色種の検出法。
11. 動物に試料を投与し、請求項1記載のモノクローナル抗体を用いた免疫学的方法によりその動物におけるチロシナーゼ蛋白を測定し、投与前後のチロシナーゼ蛋白の量的変動を生じさせる試料を選択することを特徴とするメラニン産生を抑制あるいは促進する物質を検索する方法。

1 / 8

Fig. 1

```

      1      10      20      30      40      50      60
ヒトチロシナーゼ M----LLAVLYC----LLWSPQTSAGHFPRAC--VSSKNL---MEKECCP---PWSG---
      :      ::      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
ヒト TRP1 MSAPKLLS-LGCIFFPLLLFQQARAQFF-RQCATVEA--LRS6M---CCPDLSPVSGPGT

      70      80      90      100      110      120
DRSPCGQLSGRGSCQNILL-SNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNC
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
DR--CGSSSGRGRCEAVTADSR PHSPQTPHDGRRRREVWPLRFFNRTCHCNGNFS6HNC

      130      140      150      160      170      180
GNCKFGFWGPNCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFF-AY---L-T---L---AKHTISSDY
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
GYCRPGYRGAACDERVLIVRRNLLDSKEEKNHFVRALDMALRTTHPLFVIA--TRSEE

      190      200      210      220      230      240
VIPIGTYGQMKNGSTPMF-NDINIYDLFVWMHYY-VSMDALLG-G--S---EIWRDIDFAH
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
-IL-GPDG---NY--PQFEN-ISITNTFVWTHYYSVKKTFL-GVGQESFGEV--D--FSH

      250      260      270      280      290      300
EAPAFLPWHRLFLLRWE---QEIQKLTGDEN-FTIRYWDWRDAE-K--CDICTDEYMG6Q
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
EGPAFLTWHRYHLLRLEKDMQEM--LQ--EPSFSLPYWNF--ATGKNVCDICTDDL6MSR

      310      320      330      340      350      360
HPTNPNL-L-SPASFFSSWQIVC-SRLEEYNHQSLCNGTPE-GPLRRNP-GNHDKSRTP
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
S--NFDSTLISPNSVFSQWRVVCDS-LEDYDTLGTLCNST-EDGPIRRNPAGNVA--R-P

      370      380      390      400      410      420
---RLPSS-ADVEFCLS--L--TQYE-SGSMDKAANFSFRNTLE6FAS-PLTGIAD-ASQ
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
MVQRLPEPQAVVQ CLEVGLFDTPPFTSNST----N-SFRNTVEGT-SDP-TGLYDPAVR

      430      440      450      460      470      480
SSMHNAL-HIYMNGT--NSQVQGSANDPIF-LLHHAFVDSIF-EQWLRRHR-----PLQ
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
SL-HN-LAHLFLNGTGGNTHL--SPNDPIPVLLHT-FTDAVFDE-WLRRYNADISTFPL-

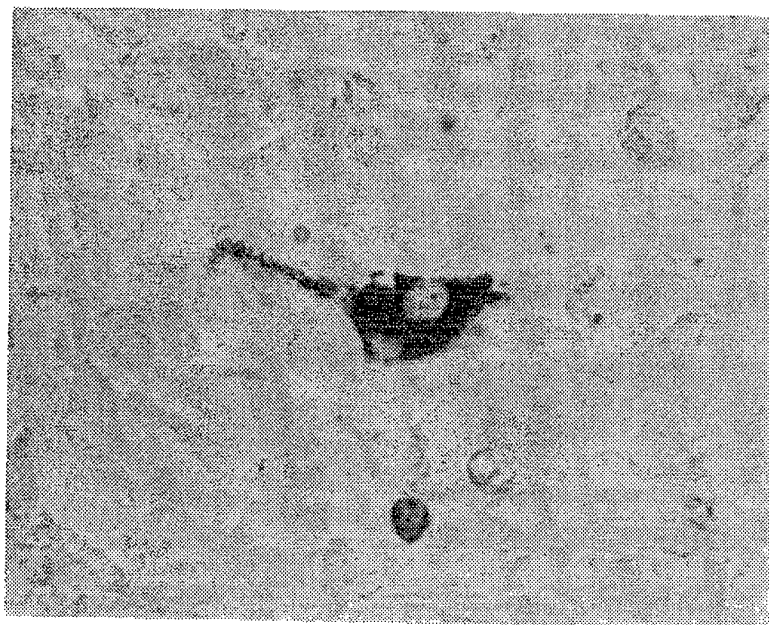
      490      500      510      520      530      540
EVYPEANAPIGHNRESY-MVPFIPLYRNGDFFISSKD-LGYDYSYLQSDPDS--FQDYI
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
E-----NAPIGHNHQ-YNMVPFWPPVTNTQMFVTAPDNLGYTYEI-QW--P-SREF---

      550      560      570      580      590      600
KSYLEQ-ASRIWSWLLGAAMVGAVLTALL-A---GLVSLLCRHKRQQLPEEKQPLLMEKE
      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
-SVPEIIA--I-----AV-VGA-L--LLVALIFGTASYLIRARRSMD-EANQPLLT---

      610
DYHSLYQSHL
      :      :
DQ---YQC--

```

F i g . 2



F i g . 3

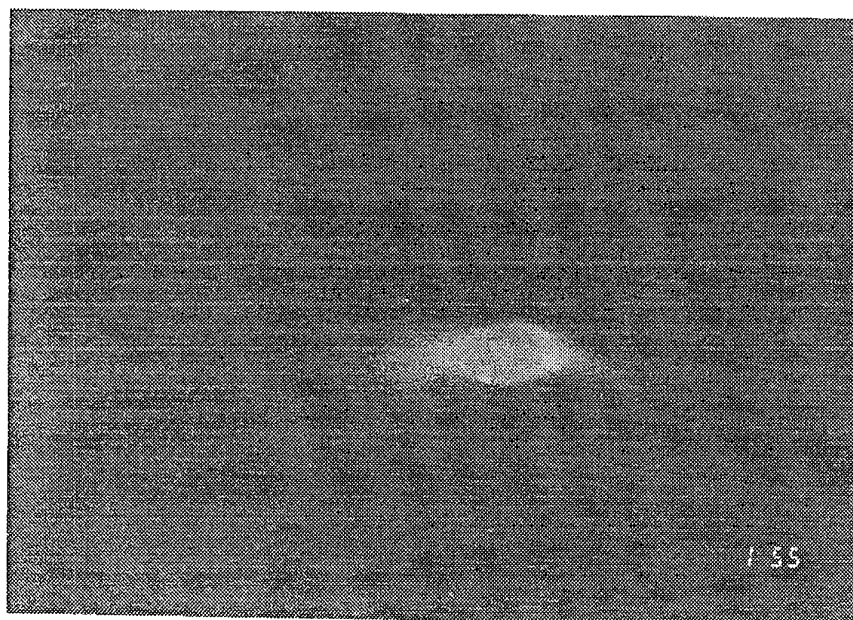


Fig. 4

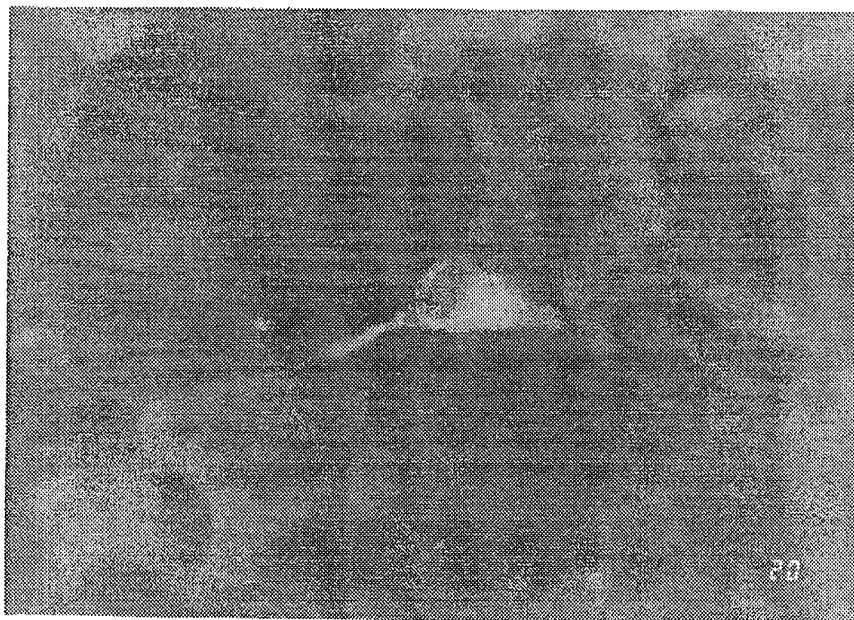
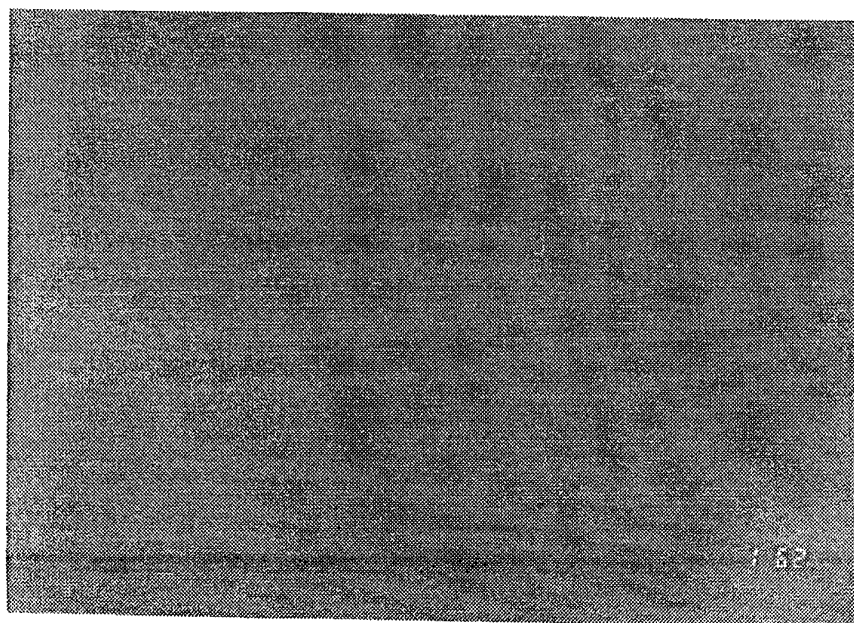
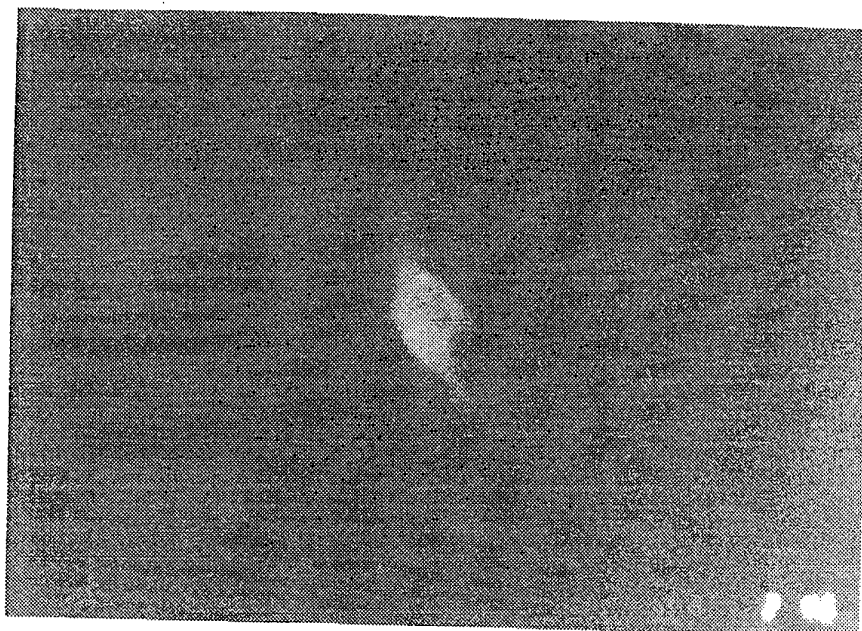


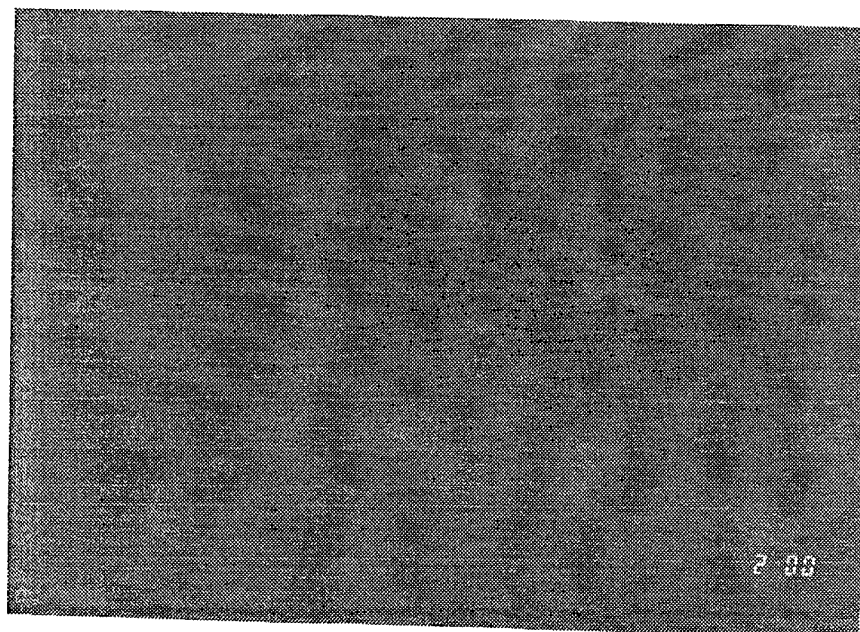
Fig. 5



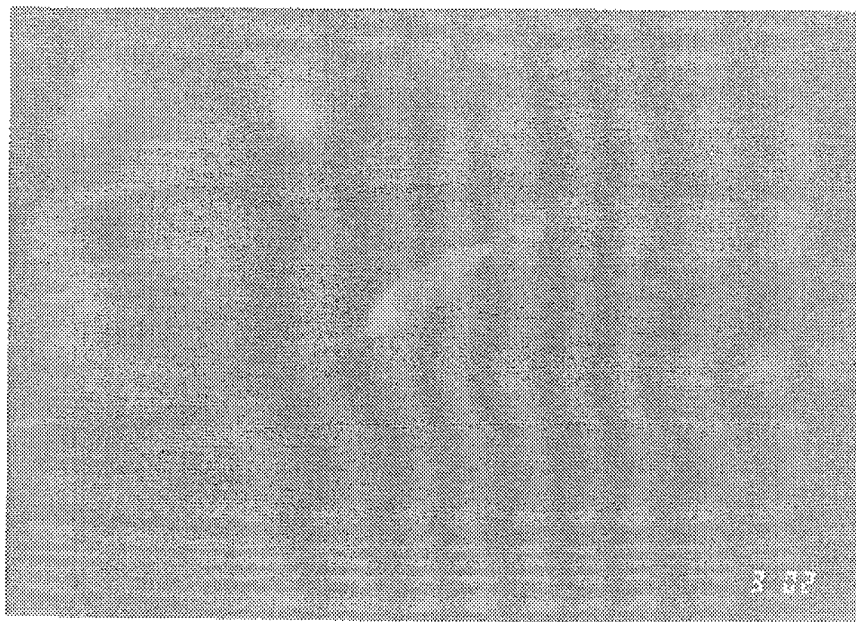
F i g . 6



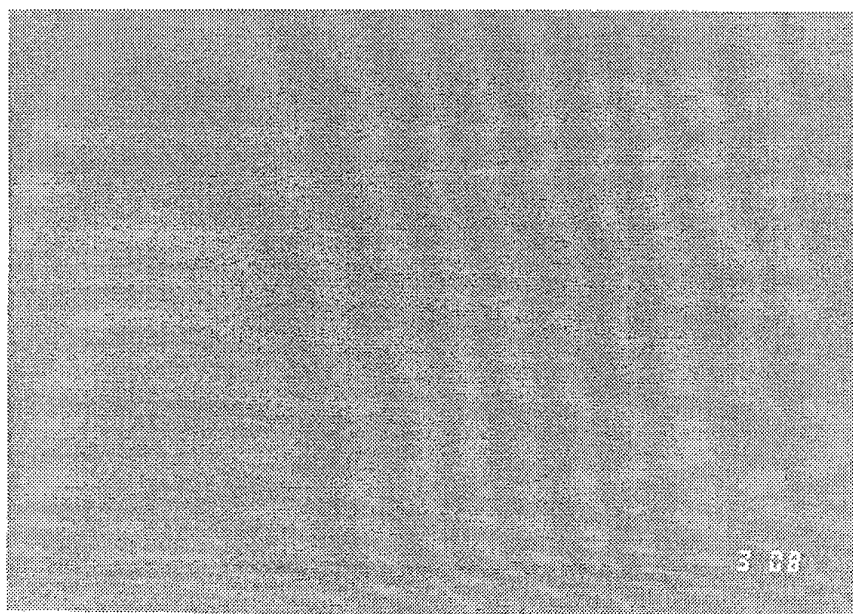
F i g . 7



F i g . 8



F i g . 9



6 / 8

Fig. 10

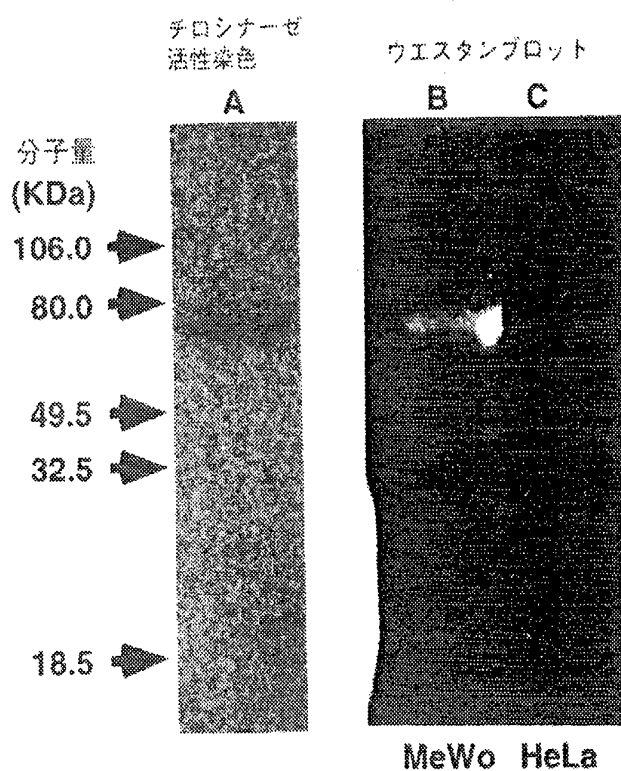
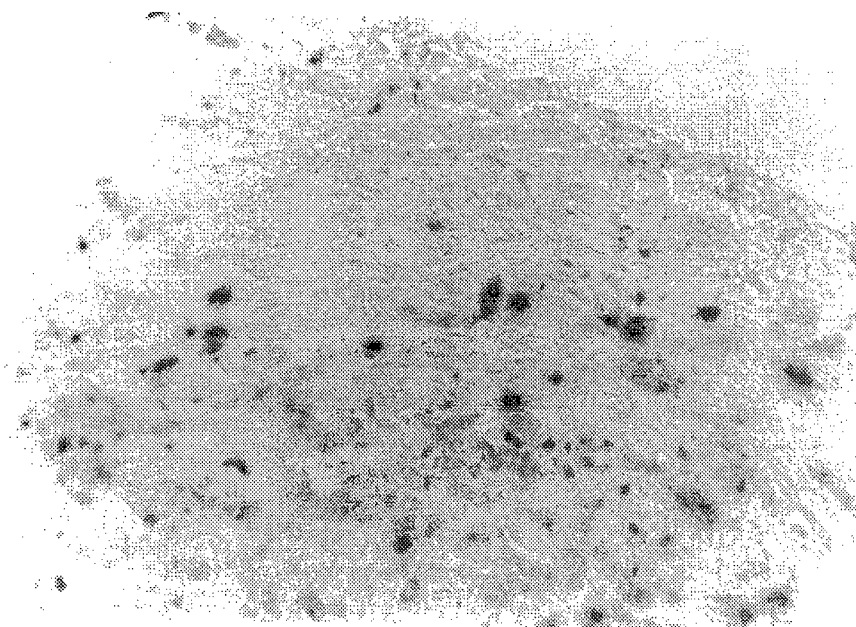


図1. 抗ヒトチロシナーゼモノクローナル抗体によるヒトチロシナーゼの検出
 レーンA: MeWo細胞抽出物のチロシナーゼ活性染色
 レーンB: MeWo細胞抽出物のウェスタンブロット
 レーンC: HeLa細胞抽出物のウェスタンブロット

Fig. 11



F i g . 1 2



F i g . 1 3

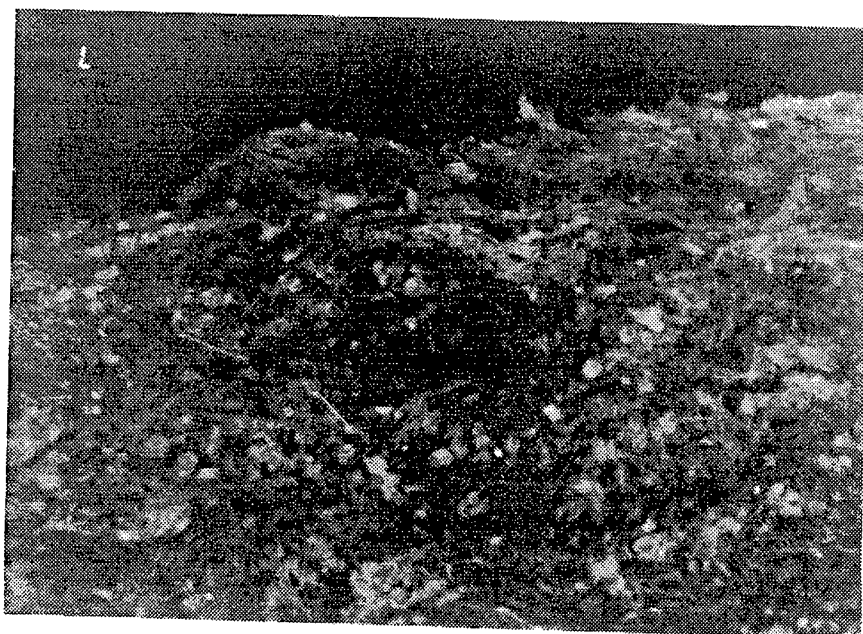
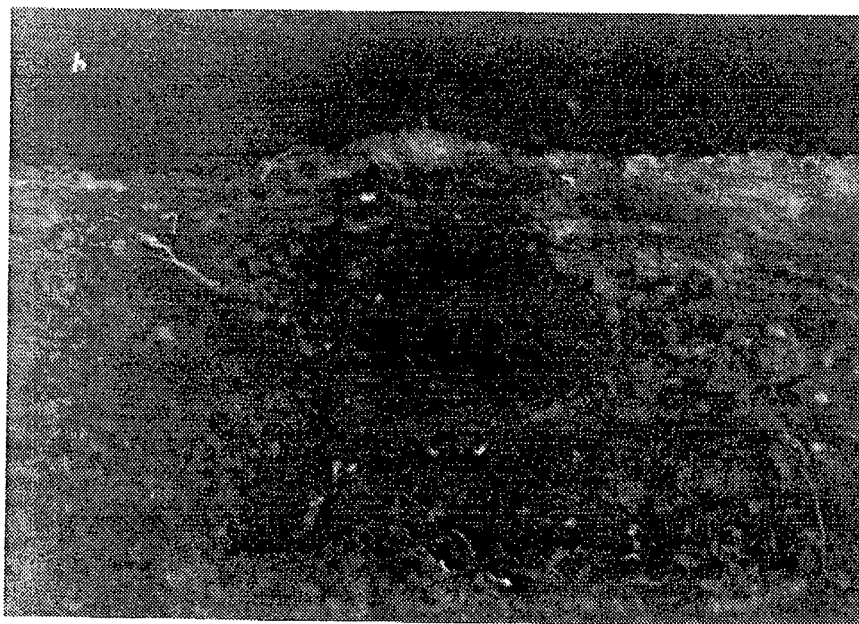


Fig. 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K16/40, C12P21/08, G01N33/577, G01N33/573//C12N15/06,
(C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K16/40, C12P21/08, G01N33/577, G01N33/573

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Journal of Investigative Dermatology, Vol. 102, No. 3, (March, 1994), B. Bouchard et al, "Production and characterization of antibodies against Human Tyrosinase", P. 291-295	1, 4, 6, 8-11
A	Journal of Investigative Dermatology, Vol. 90, No. 4, (1988), M. McEwan et al. "Monoclonal antibody against human tyrosinase and reactive with melanotic and Amelanotic melanoma cells", P. 515-519	1-6, 8-11
A	Pigment Cell Research, Vol. 2, No. 1, (1989) M. McEwan et al. "Monoclonal antibody against a melanosomal protein in melanotic and amelanotic human melanoma cells", P. 1-7	1-6, 8-11

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier 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 when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 10, 1995 (10. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

January 31, 1995 (31. 01. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C07K16/40, C12P21/08, G01N33/577, G01N33/573//C12N15/06, (C12P21/08, C12R1:91)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C07K16/40, C12P21/08, G01N33/577, G01N33/573		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Journal of Investigative Dermatology, 第102巻, 第3号, (3月, 1994), B. Bouchard et al, [Production and characterization of antibodies against Human Tyrosinase] p. 291-295	1, 4, 6, 8-11
A	Journal of Investigative Dermatology, 第90巻, 第4号, (1988), M. McEwan et al. [Monoclonal antibody against human	1-6, 8-11
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 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後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
10.01.95	31.01.95	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 河野直樹 印	4B 9161
電話番号 03-3581-1101 内線		3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	tyrosinase and reactive with melanotic and Amelanotic melanoma cells] p.515-519 Pigment Cell Research, 第2巻, 第1号, (1989) 1-6, 8-11 M. McEwan et al. [Monoclonal antibody against a melanosomal protein in melanotic and amelanotic human melanoma cells] p.1-7	