明　細　書

発明の名称 ： 抗体検出用試薬の製造方法、及びその用途

技術分野

[0001] 本発明は、抗体検出用試薬の製造方法に係る。また、同方法によって製造された抗体検出用試薬とその用途に係る。

背景技術

[0002] 液体サンプル中に含まれる抗体の検出する方法は、例えば、ラジオイムノアッセイやELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay；酵素免疫測定法）等多数存在する。ELISAは、マイクロプレート上に特定の抗原を固定化し、抗体を含むサンプルを系列希釈した後に、マイクロプレート上で抗原・抗体の反応を行い、結合した抗体を酵素標識二次抗体により検出する方法である。この方法では、個々の抗原に対する抗体検査を、個別のアッセイプレートを用いて評価する必要があった。

[0003] 上記の問題を解決する手法として、固定化する担体にレポーター蛍光を保持したマイクロビーズを用いることにより、多種多様な抗原に対する抗体を同時に解析できるマルチプレックス技術が注目を集めている。

[0004] いずれの技術を活用する場合においても、多様な抗原を水溶性として調製することが必須である。従来は、水溶性として調製できるNative構造のタンパク質や化学合成されたポリペプチド断片を用いる例がほとんどである。

[0005] 例えば、がん患者の血液中に含まれる抗体を検出する方法が特許文献１又は２に記載されている。抗原エピトープペプチド（数個のアミノ酸からなる抗原ペプチド）をビーズに固定化し、ビーズと被験者の血液成分を接触させて、被験者の血液中に含まれる抗原エピトープペプチド特異的な抗体を検出する方法である。しかし、抗体が結合するエピトープ部分はHLAのタイプによって異なるため、特許文献１又は２に記載された方法を使用するためには、被験者のHLAのタイプを調べること、被験者のHLAタイプに合うエピトープペプチドが同定されていること等様々な条件をクリアする必要がある。

[0006] 特定の抗原タンパク質に対する抗体の検出試薬を調製する際に、１種類のビーズ表面に１種類の抗原タンパク質に由来するすべてのエピトープ部分を含み、高感度かつ安定的に検出する試薬を調製するためには、水溶性でフレキシブルな構造を持った抗原の取得が好ましい。しかし、多くの変性タンパク質、膜タンパク質等の難溶性のタンパク質や不安定な物性のタンパク質は凝集しやすい。そのため、従来は、安定な物性を示しうる部分ペプチドを使用することが多かった。

[0007] 部分ペプチドを使用する場合には、すべてのエピトープを網羅するために多種多様なオーバーラップペプチドを合成する必要があり、多種類のビーズを準備する必要があるほか、シームレスなエピトープペプチドを提供することは現実的には困難である。また、運よく全長のNative構造の抗原が取得できる場合も、一般にタンパク質は疎水的な部分を内部に埋め込むような高次構造を形成しているため、必ずしも抗体と反応するエピトープが露出していない場合がある。

[0008] さらに、可溶化したタンパク質を用いて抗体検出用の試薬を作製しても、時間経過とともに、タンパク質に含まれるチオール基同士がジスルフィド結合を形成してしまい、抗体の検出に影響を与える可能性がある。

[0009] 例えば、特許文献３には、ヒトC型肝炎ウイルス（HCV）の長鎖ポリペプチドを使用して、被験者の血清中に含まれる抗HCV抗体を検出する方法が記載されている。特許文献３には、時間経過とともに発生するタンパク質内又はタンパク質間のジスルフィド結合が、抗体の検出感度を低下させることが記載されている。その解決方法として、検出前や検出中に還元剤を用いてタンパク質内又はタンパク質間のジスルフィド結合を開放することで、抗体の検出感度が向上することも記載されている。つまり、可溶化したタンパク質であっても、時間の経過とともに沈澱してくる可能性があり、解消するためには何らかの手段を講じる必要がある。

[0010] タンパク質を可溶化する化合物として、TAPS-Sulfonate（トリメチルアンモニオプロピルメタンチオスルホナート、以下、TAPSと記す）が知られてい

る。TAPSは、タンパク質のチオール基に結合し、タンパク質を可逆的にカチオン化することができる（例えば、非特許文献１、２参照）。

[0011] カチオン化されたタンパク質は水に対する溶解性が改善される。また、タンパク質とTAPSの結合は可逆的な反応であるため、細胞内に取り込まれた際には、TAPSがタンパク質からはずれることで、リフォールディングが起こり、タンパク質本来の機能を発揮できることが知られている。しかし、抗体検出用試薬を作製する工程において、TAPSを用いた可溶化を利用するという試みはこれまでなされていない。また、糖鎖で修飾されたタンパク質に抗体が結合することは公知であるが、TAPSのような人工的に合成された化合物を結合させたタンパク質に抗体が結合できるかどうかについての報告はない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特許第3960614号（イムノディア）

特許文献2：特開2005-098877号（日立ソフトウェア）

特許文献3：特許第3225468号（ダイナボット）

非特許文献

[0013] 非特許文献1：M. Seno et al., Growth Factors, 15, 215-229 (1998)

非特許文献2：M. Inoue et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 28, 207-213 (1998)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は上記事情を鑑みてなされたものであり、液体サンプル中に存在する難溶性抗原タンパク質に特異的に結合する抗体を検出するための試薬を効率よく製造する方法、前記製造方法によって製造された抗体検出用試薬とその用途を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0015] すなわち、本発明は以下の手段を提供することを目的とする。

[0016] （１）抗原タンパク質と担体とで構成される抗体検出用試薬の製造方法であって、抗原タンパク質をカチオン化して可溶化する工程と、カチオン化した抗原タンパク質を担体に結合させる工程と、を含む抗体検出用試薬の製造方法、

（２）前記抗原タンパク質が、全長タンパク質であることを特徴とする、（１）に記載の抗体検出用試薬の製造方法、

（３）前記抗原タンパク質が、膜タンパク質であることを特徴とする、（１）又は（２）に記載の抗体検出用試薬の製造方法、

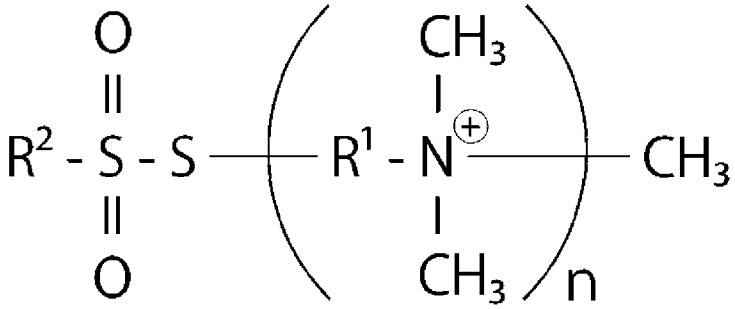
（４）前記抗原タンパク質が、がん抗原タンパク質であることを特徴とする、（１）～（３）のいずれか一つに記載の抗体検出用試薬の製造方法、

（５）前記カチオン化が、抗原タンパク質のチオール基にカチオン化剤を結合させることによって行われることを特徴とする、（１）～（４）のいずれか一つに記載の抗体検出用試薬の製造方法。

[0017] （６）前記カチオン化剤が、チオスルホナート化合物、混合ジスルフィド化合物、ピリジルスルフィド系のカチオン化剤、ハロゲン化アルキル系カチオン化剤のいずれか１つ、又はその混合物から選択されることを特徴とする、（５）に記載の抗体検出用試薬の製造方法、

（７）前記チオスルホナート化合物が、以下の式の化合物である

[化1]



（６）に記載の抗体検出用試薬の製造方法（式中、Ｒ[1]は、炭素原子数２～２０の直鎖アルキレン基を表し、Ｒ[2]は、炭素原子数１～３のアルキル基を表し、ｎは１～３のいずれかの整数である）、

（８）前記化合物が、Ｒ^{1}がー（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$ーであり、Ｒ^{2}がＣＨ$_{3}$ーであり、ｎが１で表されるTAPS-Sulfonateであることを特徴とする、（７）に記載の製造方法、

（９）前記化合物が、Ｒ^{1}がー（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$ーであり、Ｒ^{2}がＣＨ$_{3}$ーであり、ｎが３で表されるTAP3S-Sulfonateであることを特徴とする、（７）に記載の抗体検出用試薬の製造方法、

（１０）前記ハロゲン化アルキル系カチオン化剤が、TAP－Brであることを特徴とする、（６）に記載の抗体検出用試薬の製造方法、

（１１）前記担体が、磁気ビーズであることを特徴とする、（１）～（１０）のいずれか一つに記載の抗体検出用試薬の製造方法。

[0018] （１２）（１）～（１１）の製造方法によって製造された抗体検出用試薬。

[0019] （１３）サンプル中に含まれる抗原特異的な抗体の検出方法であって、（１２）に記載の抗体検出用試薬とサンプルとを接触させる工程と、抗体に結合する標識した二次抗体を添加し、抗体と結合させる工程と、抗体検出用試薬を回収する工程と、抗体が結合した抗体検出用試薬を検出する工程とを含む、抗体検出方法、

（１４）前記サンプルが、単離された体液であることを特徴とする、（１３）に記載の抗体検出方法。

[0020] 本発明者らは、以上のような構成により、抗原タンパク質に対する抗体を検出するための抗体検出用試薬を製造できることを見いだし、本発明を完成させた。

発明の効果

[0021] 抗原タンパク質の可溶化工程において、カチオン化剤を使用することで効率よく抗原タンパク質を可溶化、回収することができるため、従来方法に比べ、担体に多数の抗原タンパク質分子が結合した抗体検出用試薬を効率よく製造することができる。

更に、かかる抗体検出用試薬は従来方法で製造された試薬に比べ安定性にすぐれ、長期の保存が可能である。

[0022] さらに本願発明の一態様として、抗体を検出するための抗原として、難溶性抗原タンパク質を使用することができる。タンパク質を利用するため、HLAにより認識できるエピトープ部分が異なっていても検出することができる。そのため、エピトープペプチドをビーズに固定化する場合と比較して、被験者のHLAのタイプに合わせて複数の試薬を製造しておく必要がなく、製造効率がよい方法であるといえる。

[0023] さらに、カチオン化剤が抗原タンパク質のチオール基に結合していることで、時間経過とともに発生するタンパク質内又はタンパク質間のジスルフィド結合を抑制することができる。そのため、時間経過によるタンパク質間のジスルフィド結合による抗体検出用試薬同士の凝集を抑制する効果が期待される。したがって、難溶性抗原タンパク質を担体に結合させた場合にあっても、あるいは、室温もしくは４度あるいはー２０度において長期の保存をした後であっても、従来法に比べ抗体検出用試薬はその機能を維持しうる。

[0024] 一方で、人工的に合成された化合物が抗原タンパク質に結合していることで、抗原タンパク質と抗体の結合を抑制してしまう可能性が考えられるが、カチオン化剤が結合した抗原タンパク質であっても、抗体が検出可能であることが発明者らにより明らかとなった。

[0025] 以上のような特徴により、本発明の製造方法を用いることで、抗体検出用試薬を効率よく製造することができる。また、本発明の製造方法で製造した抗体検出用試薬は液体サンプル中に存在する抗原タンパク質に対する抗体を検出することができるため、例えば、がん患者のHLAタイプに関係なく、血清サンプル中からがん抗原タンパク質に特異的な抗体を検出することが可能となる。

[0026] 特に、TAPS-Sulfonate、TAP-Brは低分子量であるため、高い可溶化能を維持しつつ、タンパク質と抗体の反応を阻害するような立体障害を最小限に抑えることができる。また、低分子量であることからタンパク質に複数分子を結合させ易く、タンパク質に含まれるSH基すべてをカチオン化することができるため、長期保存した場合のビーズの凝集を抑制することができる。これ

らの特徴から、TAPS-Sulfonate、TAP-Brを用いた本発明の方法は従来法に比較してより有効である。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]図１は、タンパク質のカチオン化に関する説明図である。

[図2]図２は、WT-1をTAPSによりカチオン化した後、SDS-PAGEで解析を行った結果を示す図である。

[図3]図３は、MAGE-A4をTAPSによりカチオン化した後、SDS-PAGEで解析を行った結果を示す図である。

[図4]図４は、TAPS化したWT-1を、HPLCにより精製を行った結果を示す図である。

[図5]図５は、TAPS化したMAGE-A4を、HPLCにより精製を行った結果を示す図である。

[図6]図６は、TAPS化したWT-1およびMAGE-A4を、HPLCにより精製した後、SDS-PAGEで解析を行った結果を示す図である。MinはHPLCにより精製を行った際（図４、図５）の溶出時間を表している。例えば、49minは、溶出時間49分から1分間分を収集したフラクションを泳動したレーンである。

[図7]図７は、作製した抗原タンパク質をSDS-PAGEで解析した結果を示す図である。各レーンには2μgの抗原タンパク質を充填した。

[図8]図８は、本発明の製造方法により製造した抗体検出用試薬を用いて、がん患者の血清中に含まれる6種のがん抗原タンパク質に対する抗体を検出した結果を示す図である。

[図9]図９は、本発明の製造方法により製造した抗体検出用試薬を用いて、がん患者の血清中に含まれる3種のがん抗原タンパク質に対する抗体を検出した結果を示す図である。

[図10]図１０は、本発明の製造方法により製造した抗体検出用試薬を用いて、がん患者の血清中に含まれる3種のがん抗原タンパク質に対する抗体を検出した結果を示す図である。

[図11]図１１は、TAPS化、TAP3S化、Native及び還元したリゾチームについて

、逆相HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を実施した結果を示す図である。

[図12]図１２は、TAPS化、TAP3S化、Native及び還元したMAGE-A4を固定化したビーズを４℃で５日間、３７℃で１０日間又は４１日間保存した懸濁液中に含まれるビーズ凝集体の割合を示す図である。

[図13]図１３は、TAPS化MAGE-A4固定化ビーズ（レーン2）、TAP3S化MAGE-A4固定化ビーズ（レーン3）、Native MAGE-A4固定化ビーズ（レーン4）を104日間保存した保存液について、ウェスタンブロッティングを行った結果を示す図である。レーン1は、コントロールとして、100ngのMAGE-A4タンパク質を泳動した。

[図14]図１４は、Bio-Plex COOHビーズ、104日間保存したTAPS化MAGE-A4固定化ビーズ、TAP3S化MAGE-A4固定化ビーズ又はNative MAGE-A4固定化ビーズ表面に結合しているタンパク質を検出した画像である。左が共焦点レーザー蛍光顕微鏡による撮影画像、右は同時に撮影した微分干渉画像（明視野）である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明の実施の形態を説明する。

[0029] まず、本発明の抗体検出用試薬の製造方法（以下、本発明の製造方法とも記す）について説明する。

[0030] 本発明の製造方法は、抗原タンパク質をカチオン化して可溶化する工程と、カチオン化した抗原タンパク質を担体に結合させる工程と、を含む抗体検出用試薬の製造方法である。かかる抗原タンパク質は難溶性タンパク質であってもかまわない。

[0031] 本明細書において「難溶性」とは、タンパク質の特性を説明するためのものであり、液体に溶解して均一な混合液を形成せず、特に水または生理的溶媒に溶解できない、もしくは溶解しにくいという特性を指す。本明細書に説明する種類の難溶性のタンパク質は、そのタンパク質が水、水および塩、水およびそのタンパク質を変性しない生理的溶媒中にある際、１５，１００×

ｇで一時間遠心した後に、実質的に大部分が沈殿画分に回収される場合に、難溶性のタンパク質と定義されうる。

[0032] ここでいう「タンパク質」とは、ペプチド、ポリペプチド等を含み、自然界に存在する天然由来のタンパク質に限定されず、遺伝子導入等により形質転換した細胞由来の組換えタンパク質、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで無細胞蛋白質発現系を用いて発現させたタンパク質、また、有機合成化学的に作製する合成タンパク質も含まれる。さらに、タンパク質を構成するアミノ酸の一部又は全部がアセチル化、リン酸化、メチル化等の官能基が付加されたもの、糖類、蛋白質、脂質等で修飾されたものであっても構わない。

[0033] ここでいう「難溶性タンパク質」とは、室温において、水や生理的溶媒中に攪拌しても溶解せずもしくは溶解しにくく、例えば変性剤を用いることで溶解しても、生理的溶媒に置換すると沈殿を生ずるタンパク質を指す。また、元来天然型が可溶性のタンパク質であっても、組換えタンパク質として異種生物を用いて発現させた場合（例えば、遺伝子組換え技術を用いて大腸菌での発現系を構築した場合等）、目的タンパク質はインクルージョンボディ（封入体）として回収される場合、その目的タンパク質も難溶性タンパク質と言う。難溶性タンパク質としては、全長タンパク質、膜タンパク質、がん抗原タンパク質などが挙げられるがこれに限定されない。

[0034] 本明細書において「可溶化」とは、タンパク質を、アミノ酸配列を維持したまま生理的溶媒中に溶解させることをいい、変性剤によって溶解したタンパク質を含む溶液を生理的溶媒に置換し、遠心した際に、該タンパク質が遠心後に上清に回収される量を増加させることをいう。

[0035] 全長タンパク質とは、生体内に存在することが確認されている天然のタンパク質だけでなく、ゲノム配列上から予測されるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の一番大きなタンパク質をも意味する。このような全長タンパク質のアミノ酸配列は例えば、The ORFeome Collaboration (http://www.orfeomecollaboration.org/)、ＧｅｎｅＣａｒｄ（登録商標）（http://www.genecards.org/）などのデータベースより取得することが可能であるが、これ

に限定されない。

[0036] 膜タンパク質とは、膜貫通構造を有するタンパク質で、細胞膜、核膜およびその他の細胞内オルガネラ表面に存在しているタンパク質である。細胞内又は細胞外に接している親水性の部分と、細胞膜内に埋もれている疎水性の部分とが、一つのタンパク質分子中に存在する。そのため、大腸菌等に発現させて取得する場合に、水溶液中で立体構造を形成しづらく、封入体を形成しやすいタンパク質である。

[0037] がん抗原タンパク質とは、腫瘍に発現し、免疫応答を誘導する抗原タンパク質あるいは、腫瘍の存在の指標となりうる抗原タンパク質のことをいう。細胞ががん化することによって発現が増加するタンパク質、細胞ががん化することによってアミノ酸の一部が突然変異したタンパク質等がある。

[0038] 本発明の製造方法は、タンパク質をカチオン化することを特徴とする。より好ましくは難溶性タンパク質をカチオン化することを特徴とする。

[0039] タンパク質のカチオン化とは、タンパク質に過剰な正電荷を付加することである。カチオン化されたタンパク質は電荷の反発により、水への可溶性が改善される。タンパク質をカチオン化するためには、カチオン化剤をタンパク質に結合させることが挙げられる。

[0040] 「担体」とは上記抗原タンパク質を固相面に結合させるものをいう。具体的にはガラス、ナイロンメンブレン、半導体ウェハー、マイクロビーズなどが挙げられるがこれに限定されない。

[0041] 抗原タンパク質を担体に結合させるとは、公知の技術を用いて、直接「抗原タンパク質」を担体の表面に固定させることを意味し、あるいはビオチンーアビジンなどの結合を介して、あるいはリンカー分子を介して間接的に固定させることであってもよい。

[0042] 「サンプル」とは本願発明に係る抗体検出用試薬が検出する抗体（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥなどのサブタイプを含む）、およびその活性を維持した断片（例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片などを含む）を含む試料をいう。

[0043] 「体液」とは、生体から採取できる液体状の試料を指す。末梢血、骨髄液、臍帯血、胸水、腹水、尿等がこれに該当するが、これらを当業者が周知の方法で処理した試料（例えば、末梢血を遠心して上清から得られる血漿、血清など）もこれに該当する。

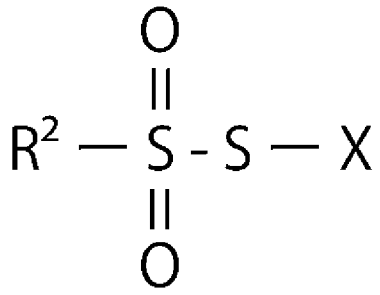
[0044] 「二次抗体」とは本願発明に係る抗体検出用試薬が検出しようとする抗体（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥなどのサブタイプを含む）、およびその活性を維持した断片（例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片などを含む）を認識する抗体及びその活性断片を指す。「標識した二次抗体」とはラジオアイソトープ（radio isotope）、発光剤(luminescent agent)、蛍光剤（fluorophore）等の標識と結合した二次抗体を指す。あるいは、かかる「標識」としてルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチンや緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, ＧＦＰ）などのタンパク質も用いることが出来る。かかるタンパク質由来の「標識」の場合、「標識した二次抗体」は、融合タンパク質の形で１つの組み換えタンパク質として遺伝子工学的に作製することも可能である。

[0045] 本発明の製造方法で使用するカチオン化剤としては、ジスルフィド結合を介して、タンパク質に正電荷を付加できる化合物であれば、様々な化合物を使用することができる（図１）。例えば、チオスルホナート化合物、混合ジスルフィド化合物、ピリジルジスルフィド系のカチオン化剤、ハロゲン化アルキル系カチオン化剤等を使用することができる。

[0046] 本発明の製造方法で使用するチオスルホナート化合物は、以下の式［化２］によって表わされる化合物である。式中、Xはカチオンを有する基である。Xのカチオンを有する基は１つ又は複数連結していても構わない。式中、R^2は、炭素原子数１～３の低級アルキル基を表す。すなわち、本発明の製造方法で使用するチオスルホナート化合物は、１分子内にXに由来するカチオンを1つ以上有するチオルホナート化合物である。Xとしては、例えば、第4級アンモニウム基等が挙げられる。

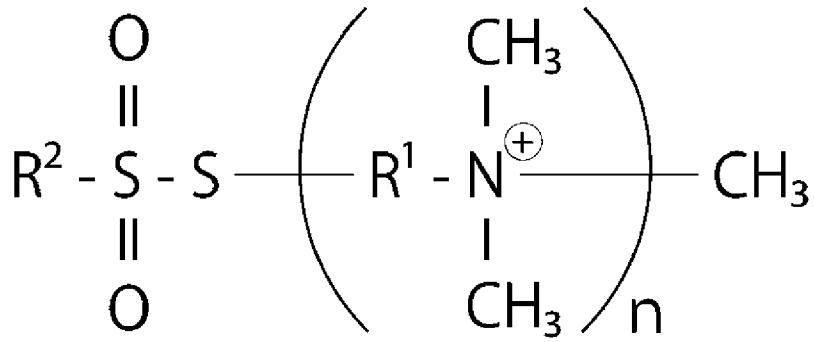
[0047]

[化2]



[0048] 本発明の製造方法で使用するチオスルホナート化合物は、１分子内に第４級アンモニウム基に由来するカチオンを１つ以上有する以下の式［化３］で表されるチオスルホナート化合物である。

[0049] [化3]



[0050] （式中、R^1は、炭素原子数２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０の直鎖又は分岐アルキレン基を表し、R^2は、炭素原子数１、２又は３の低級アルキル基を表し、ｎは１、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０のいずれか、より好ましくは１、２、３のいずれかの整数である）

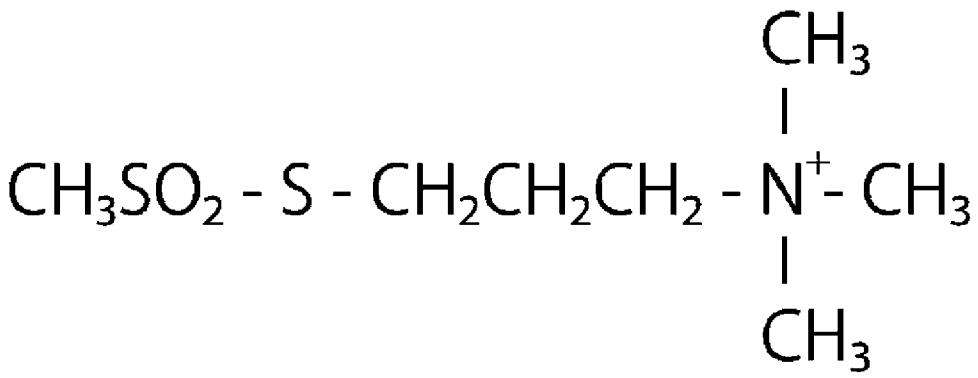
[0051] チオスルホナート化合物の特徴として、図１に示す説明図において、タンパク質のカチオン化反応後にできる解離基R^2が不活性な解離基であることが挙げられる。

[0052] １分子内に第４級アンモニウム基に由来するカチオンを１つ含んでいる化合物としてはトリメチルアンモニオプロピルメタンチオスルホナート（TAPS-

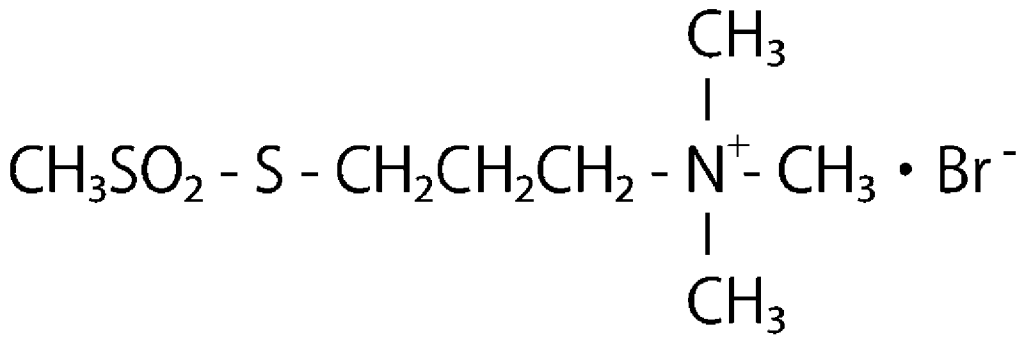
Sulfonate：以下、TAPSと記す）が挙げられる。また、１分子内に第４級アンモニウム基に由来するカチオンを３つ含んでいる化合物としてはTAP3S-Sulfonate（以下、TAP3Sと記す）が挙げられる。

[0053] TAPSとは、以下の式［化４］によって表わされる化合物である。TAPSは、分子内に強い正電荷を帯びた4級アミンを有しており、システイン残基を介してタンパク質に結合することで、タンパク質をカチオン化する。カチオン化されたタンパク質は、可溶性が改善され、SH基が安定に保護される。TAPSは、例えば、Biotechnol. Appl. Biochem. (1998) 28, 207-213を参照して合成すること、またはBr塩の形（以下の式［化５］）（分子量292.26）の試薬として購入することが可能である（和光純薬、片山化学工業など）。

[0054] [化4]



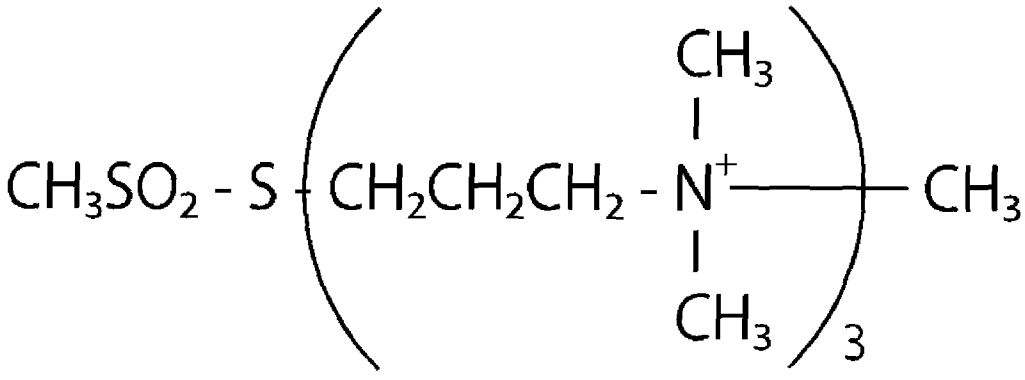
[0055] [化5]



[0056] TAP3Sとは、以下の式［化６］によって表わされる、分子量の化合物である

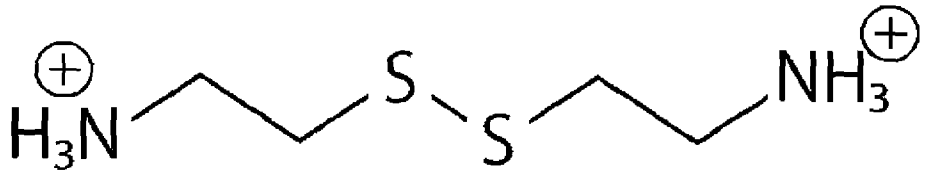
。TAP3Sは、分子内に強い正電荷を帯びた４級アミンを３つ有しており、TAPSより強くカチオン化することができる。TAP3Sは、例えば、国際公開第2011/118731号を参照して合成することができる。

[0057] [化6]



[0058] 本発明の製造方法で使用する混合ジスルフィド化合物としては、以下の式［化７］に示すようなシスタミンが挙げられる。シスタミンの場合、NH_3^+がカチオンを有する基である。

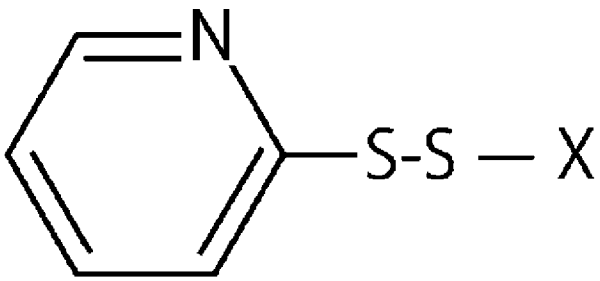
[0059] [化7]



[0060] 本発明の製造方法で使用するピリジルスルフィド系のカチオン化剤としては、以下の式［化８］に示すような化合物が挙げられる。Xはカチオンを有する基である。Xのカチオンを有する基は１個又は複数個つながっていても構わない。

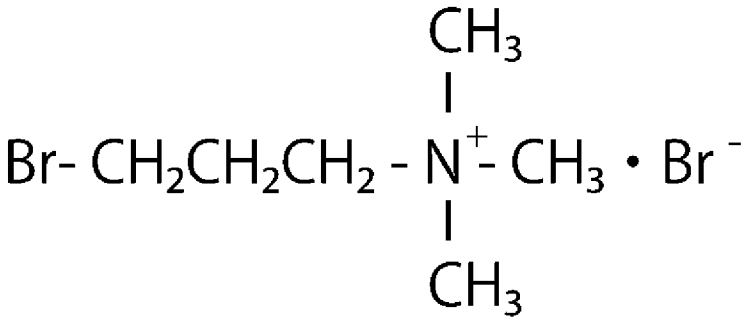
[0061]

[化8]



[0062] 本発明の製造方法で使用するカチオン化剤としては、S-アルキル化により、タンパク質に正電荷を付加できるハロゲン化アルキル系カチオン化剤も使用することができる。例えば、（3-ブロモプロピル）トリメチルアンモニウム（TAP-Br）を使用することができる。TAP-Brは、タンパク質のSH基に不可逆的に結合し、タンパク質の可溶化能を向上させる。TAP-Br（分子量261.00）は、例えば、Br塩の形（［化９］）で試薬として購入することが可能である（例えば、SIGMA-ALDRICH社）。

[0063] [化9]



[0064] 本発明の製造方法で使用するカチオン化剤として、様々なものが使用できるが、特にTAPS-SulfonateやTAP-Brは低分子量であるため、高い可溶化能を維持しつつ、タンパク質と抗体の反応を阻害するような立体障害を最小限に抑えることができる。また、低分子量であることからタンパク質に複数分子を結合させ易く、タンパク質に含まれるSH基すべてをカチオン化することが

できるため、長期保存した場合のビーズの凝集を抑制することができる。

[0065] 以下にカチオン化抗原タンパク質の取得の一例として、抗原タンパク質を作製し、TAPSを用いてTAPS化抗原タンパク質を作製する工程を説明する。

[0066] 抗原タンパク質の遺伝子を大腸菌に導入し、大腸菌の培養を行う。培養した大腸菌を破砕し、抗原タンパク質を回収する。回収時に、抗原タンパク質は封入体を形成していてもよい。

[0067] 回収した封入体を変性剤で可溶化する。使用する変性剤としては、尿素や塩酸グアニジン、界面活性剤等が挙げられるがこれに限定されない。

[0068] 抗原タンパク質を変性させた後、還元剤で処理し、SS結合を切断する。還元剤としては、ジチオスレイトール（DTT）、２－メルカプトエタノール（2ME）等が挙げられるがこれに限定されない。

[0069] 変性させた抗原タンパク質を含む溶液に、TAPSを添加し、室温で30分静置する。TAPSを添加する量としては、抗原タンパク質と溶液中に含まれるチオール基のモル濃度に対して、TAPSが１～１０倍のモル濃度となるように添加することが好ましい。より好ましくは、１．１～１．２倍である。

[0070] 30分後、TAPS化抗原タンパク質を含む溶液に平均分子量600のポリエチレンイミンを終濃度0.2%となるように添加した後、10%酢酸を溶液の4倍量添加する。TAPS化抗原タンパク質を含む溶液を遠心分離にかけ、上清を回収する。

[0071] 次いで、上清に含まれるTAPS化抗原タンパク質の精製を行う。精製には、透析やカラムクロマトグラフィー等の方法を利用することができる。たとえば、透析チューブに移し、4℃にて純水～0.5%酢酸に対して透析し、変性剤を除去する。透析した液体を12,000rpm、4℃～室温、15分間遠心分離にかけ、上清を回収する。

[0072] 以上の工程により、カチオン化抗原タンパク質を取得する。

[0073] カチオン化した抗原タンパク質は、高い水溶性を示し、調製も容易で、弱酸性条件下（好ましくはpH6以下、さらに好ましくはpH2～5）で極めて高い安定性を示す。そのため、シームレスに全長タンパク質のエピトープを露出さ

せた状態で水溶性を維持することができる。このため、１つの抗原タンパク質に含まれるすべてのエピトープを、抗体と反応しやすい状態で１種類のビーズ上に固定化することができる。

[0074] 次に、TAPS化タンパク質を担体に結合させる。

[0075] 一態様として、担体としては、磁気性ビーズ、非磁気性ビーズ、マイクロプレート等を使用することができるが、解析の操作の簡便性から磁気性ビーズを使用することが好ましい。以下、担体としてビーズを使用する例を記載する。

[0076] ビーズを結合用の溶液に懸濁する。ビーズにすでにタンパク質との結合を補助するような修飾が施されている場合には、そのままビーズとTAPS化タンパク質との結合を行う。ビーズとタンパク質との結合を補助するような修飾がなされていない場合には、スキムミルク等、抗体検出時に、TAPS化タンパク質と抗体の反応を阻害しないような物質を用いて、ビーズの修飾を行う。

[0077] TAPS化タンパク質の溶液とビーズの懸濁液を混合する。例えば、アミノ基と反応できる状態に活性化されたビーズと混合する場合の時間は2～16時間が好ましい。

[0078] ビーズを回収し、洗浄用溶液に懸濁して、遠心分離を行い、洗浄する。洗浄用溶液としてはリン酸緩衝液等があげられる。洗浄後にビーズを保存する場合には、保存用のバッファーに懸濁して、保存する。保存用のバッファーとしてはBio-Rad社の保存バッファー等が挙げられる。保存用のバッファーが弱酸性（好ましくはpH6以下、さらに好ましくはpH2～5）であれば、TAPS化タンパク質の可溶性がより安定的に保たれる。

[0079] 以上の工程により、抗体検出用試薬を製造することができる。

[0080] 次に、本発明の製造方法によって製造された抗体検出用試薬（以下、本発明の試薬と記す）を用いた、一態様としての、抗体検出方法について詳説する。

[0081] 本発明の試薬は、カチオン化した難溶性抗原タンパク質とビーズによって構成される抗体検出用試薬であってもよい。

[0082] 被験者から抗体が含まれると予想される試料を入手する。試料としては体液を用いることができる。体液としては、末梢血、骨髄液、臍帯血、胸水、腹水、尿等を利用することができる。採取の容易さ、被験者への負担の少なさを考慮すると末梢血を利用することが好ましい。採取量は被験者の負担とならない程度の量を採取することが好ましい。末梢血を採取する場合の方法としては、真空採血管、採血バッグ等による全血採取を利用することができる。採血の際、血液の凝固を防止するためにヘパリン等を添加しても構わない。

[0083] 採取した血液から、遠心分離によって血漿を採取する。また、成分採血装置を使用して血液の部分採取を行う際に、血漿を取得することも可能である。

[0084] また、末梢血を採取し、血球成分と血液凝固成分を除去し、血清を取得し、試料として使用することもできる。

[0085] 抗体の検出にあたり、血漿又は血清を必要に応じて希釈する。

[0086] 本発明の試薬と血漿とを混合する。混合する時間として、例えば、室温で反応させる場合は2時間程度、4℃で反応させる場合は一晩程おくことが好ましい。本発明の試薬を、遠心分離法や磁気装置により回収し、洗浄する。

[0087] カチオン化が抗原抗体反応に影響していることが懸念される場合には、ジチオスレイトール等の還元剤で処理することで容易にカチオン化を解除することができるため、その影響を容易に検証することができる。

[0088] 抗体を検出するため二次抗体を結合させる。例えば、被験者がヒトである場合には、本発明の試薬に結合している抗体はヒト抗体である。そのため、二次抗体としては標識化した抗ヒト抗体を用いて標識を行う。例えば、ビオチン化抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体や等が挙げられる。

[0089] フローサイトメーターを用いて二次抗体が結合したビーズを検出する。検出を行う際、ビーズそのものにも染色が行われているBio-Plex (Bio-Rad社)を使用していれば、複数種のビーズを同時に装置にかけることが可能となり、一度の操作で複数種の抗体を解析することができる。そのため、解析時間

の短縮が図れる。

[0090] 前段落の説明の血漿を、血清等の液体サンプルに読み変えることで、本発明の試薬により、他の液体サンプルから抗体を検出することができる。

[0091] 以上のような実施形態で、被験者の血液中に含まれる抗体の解析を行うことにより以下のような状況が想定される。

・被験者の生体内抗体の解析により、被験者のアレルギー反応性を判定する。

・治療の前後において抗体の解析を行い、治療の効果や治療後の経過と相関関係を有する抗体を見出す。見出した抗体を指標として治療方針の決定、予後の予測・判定を行う。

・免疫細胞療法において、患者血清中に抗原特異的抗体が検出された抗原を治療に用いることにより、治療効果の向上を図る。

・放射線療法の前後に、抗体の解析を行うことで、アブスコパル効果等の免疫機能が関与するとされている治療効果の予測を行う。

[0092] 前述の効果を得ることは、エピトープペプチドを用いた抗体検出用試薬でも可能ではあるが、本発明の試薬ではタンパク質を使用することができる点において優れている。タンパク質を利用することで、被験者のHLAタイプに制限されることなく抗体を検出することができるためである。そのため、一般にマイナーとされ、エピトープペプチドの解析が進んでいないようなHLAタイプであっても、解析を行うことが出来る。

実施例 1

[0093] 以下、実施例をあげて本発明を詳細に説明する。ただし、本発明はこれに限定されるものでないことは言うまでもない。

[0094] ＜MAGE-A4とWT-1の大量培養と調製方法の検討＞

まず、抗体検出に使用する抗原タンパク質の調製を行った。

[0095] pET28bベクターにクローニングされたHis-tag融合MAGE-A4（配列番号１６、１７、抗原タンパク質の配列は配列番号３、４）とHis-tag融合WT-1（配列番号１４、１５、抗原タンパク質の配列は配列番号１、２）の二種類のプラ

スミドDNAで大腸菌T7expressを形質転換し、プレート上に形成されたコロニー数個とり10mLのLB/Kan25培地に添加し、２時間振盪培養した。

[0096] 次に400mLのTB培地に少量培養したしたものを添加し、さらに37℃で培養を続けた。菌体の濃度がOD600で0.7～0.8となったとき、IPTGを終濃度0.5mMになるように添加し、さらに37℃で3時間培養した。

[0097] 菌体を40mLの溶菌buffer（20mM Tris HCl pH8.0、50mM NaCl、5mM $MgSO_4$、0.2% Tween20）中で超音波破砕機を使用して分散し、さらに1分×3セットの破砕をおこなった。

[0098] 菌体破砕物が含まれる溶液に強力な核酸分解酵素であるBenzonase(HC)を1μL加えて、室温で15分程度静置した。

[0099] WT-1は、遠心分離（8krpm, 10-15min, 室温）により沈殿（inclusion body）を回収し、上清を除去した。回収された沈殿に50-100mLのRO水を加え、再度ソニケーターを用いて沈殿を懸濁し、遠心分離（8krpm, 10-15min, 室温）により沈殿を回収した。

[0100] MAGE-A4は、遠心分離（8krpm, 10-15min, 室温）により上清を回収した。

[0101] ＜WT-1の沈殿画分の可逆的変性カチオン化法による可溶化＞

[0102] 沈澱を5-10mLの6Mグアニジン0.1M Tris-HCl pH8 ＋ 1mM EDTAで溶解した。脱気・窒素置換後に30mMのDTT(固体)を加え、37℃で１時間ほど処理した。

[0103] WT-1を含む溶液に70mM TAPS-Sulfonateを添加し、37℃で30分ほど処理した。

[0104] WT-1、TAPS-Sulfonateを含む溶液に1/10量の酢酸と0.1%PEI600を添加した後、4℃でmilliQ水に対してよく透析した。透析後、SDS-PAGEを行った結果を図２に示した。Supは透析後の溶液を泳動したレーンを、pptは透析後に不溶性画分として得られたサンプルを泳動したレーンを示している。「還元」は、サンプルに還元剤を添加して、TAPSを分離したタンパク質を泳動したレーンを、「非還元」は、サンプルに還元剤を添加せず、TAPS化したタンパク質を泳動したレーンを示す。図２に示したSDS-PAGEの解析結果により、WT-1をT

APS化および可溶化できていることが確認できた。

[0105] ＜MAGE-A4のCo^{2+}カラムによるHis-tag精製＞

[0106] Co^{2+}カラムをA液(20mM Tris HCl pH8.0、50mM NaCl、0.2% Tween20)で平衡化後、MAGE-A4の上清を樹脂に吸着させた。その後、A液で十分洗浄した。次にA液＋5mMイミダゾールを30mL流した。カラムにA液＋200mMイミダゾールを4mL加えて5min静置後タンパクを溶出させた。この動作を５回繰り返し、精製MAGE-A4を回収した。

[0107] ＜MAGE-A4のTAPS化＞

[0108] ナス型フラスコに上記アフィニティー精製後のMAGE-A4を加え、水分を凍結乾燥機で除去したものを3mLの6M グアニジン、0.1M Tris-HCl pH8で溶解した。脱気・窒素置換後に30mMのDTT(固体)を加え、37℃で１時間ほど処理した。MAGE-A4の含まれる溶液に70mM TAPS-Sulfonateを添加し、37℃で30分ほど処理した。

[0109] MAGE-A4、TAPS-Sulfonateを含む溶液に1/10量の酢酸と0.1%PEI600を添加した後、4℃でMilli-Q水に対してよく透析した。透析後、SDS-PAGEを行った結果を図3に示した。

[0110] ＜HPLCによる精製＞

TAPS化したMAGE-A4、WT-1に対し逆相HPLCを用いて精製を行った。精製図を図４、５に示す。

[0111] HPLC後のTAPS化MAGE-A4、WT-1に対しSDS-PAGE解析を行った結果を図６に示す。解析の結果から、TAPS化タンパク質を逆相HPLCにより精製することで、高純度な抗原タンパク質として調製可能であることが確認された。MAGE-A4は溶出時間50分から51分（図６のレーン50min）のフラクションを、WT-1は溶出時間52分から53分（図６のレーン52min）のフラクションをそれぞれ回収して、以降の工程に使用した。

[0112] His-tagが融合したNY-ESO-1（配列番号１８、１９、抗原タンパク質の配列は配列番号５、６）、XAGE1b（配列番号２０、２１、抗原タンパク質の配列は配列番号７、８）、gp100（配列番号２２、２３、抗原タンパク質の配列は

配列番号９、１０）、Survivin-2B（配列番号２４、２５、抗原タンパク質の配列は配列番号１１、１２）はWT-1と同様の方法で調製した。作製したタンパク質に対しSDS-PAGE解析を行った結果を図７に示す。

[0113] ＜Bio-Plex COOHビーズ（Bio-Rad社製）への結合＞

[0114] 6種類のBio-Plex COOHビーズ（1/10量(1.25×10^6beads)）と、Bio-Plexアミンカップリングキット（Bio-Rad社製）を用いて、固定化を行った。使用した抗原は各１１μgで、すべてTAPS化により可溶化した変性状態の抗原である。

[0115] 可溶化したタンパク質はバッファーに溶解させ、氷上に静置した。

COOHビーズの容器をボルテックスミキサーで30秒間振盪し、超音波を30秒かけて、懸濁した。

COOHビーズ懸濁液を14,000×gで4分間遠心し、上清を除去した。

[0116] 回収した沈澱にビーズ洗浄バッファーを100μL加え、ボルテックスミキサーで10秒間振盪し、超音波を10秒間かけて懸濁した。COOHビーズ懸濁液を14,000×gで4分間遠心し、上清を除去した。

[0117] 回収した沈澱にビーズ活性化バッファーを80μL加え、ボルテックスミキサーで30秒間よく振盪し、超音波を30秒間かけて懸濁した。

[0118] COOHビーズ懸濁液に50mg/mL EDACを10%加えた後、50mg/mL S-NHS（N-hydroxysulfosuccinimide）を10μL加えた。COOHビーズ懸濁液をボルテックスミキサーで30秒間振盪した。

[0119] ビーズに光が当たらないよう遮光し、COOHビーズ懸濁液を回転培養器で20分間振盪した。

[0120] COOHビーズ懸濁液にPBSを150μL加え、ボルテックスミキサーで10秒間振盪した。COOHビーズ懸濁液を14,000×gで4分間遠心し、上清を除去した。この作業は再度繰り返した。

[0121] 回収した沈澱にPBSを100μL加え、ボルテックスミキサーで30秒間振盪し、超音波を15秒間かけて懸濁した。

[0122] COOHビーズ懸濁液と、TAPS化タンパク質懸濁液とを混合し、全量が500μＬとなるようにＰＢＳを加えた。

[0123] ビーズに光が当たらないよう遮光し、室温で２時間回転培養器を用いて浸透した。

[0124] COOHビーズ、TAPS化タンパク質の懸濁液を14,000×gで4分間遠心し、上清を除去した。

[0125] 沈澱として回収したCOOHビーズ（TAPS化タンパク質が固定化されている）にＰＢＳを500μＬ加え、洗浄した。COOHビーズの懸濁液を14,000×gで4分間遠心し、上清を除去した。

[0126] 沈澱として回収したCOOHビーズにBlocking Bufferを250μＬ加え、再び懸濁した。COOHビーズ懸濁液をボルテックスミキサーで15秒間振盪した。

[0127] COOHビーズに光が当たらないようアルミホイルで遮光し、室温で30分間、回転培養器を用いて振盪した。

COOHビーズ懸濁液を14,000×gで4分間遠心し、上清を除去した。

[0128] 沈澱として回収したCOOHビーズに保存用バッファーを500μＬ加え、再懸濁した。COOHビーズ懸濁液を16,000×gで6分間遠心し、上清を除去した。

[0129] このようにして取得したTAPS化タンパク質を固定化したビーズは、保存バッファー150μLに懸濁して、保存した。表１にそれぞれのビーズの濃度を示す。

[0130] [表1]

がん抗原タンパク質	ビーズ番号	ビーズ濃度（個/mL）
NY-ESO-1	26	4.33×10^6
XAGE1b	28	5.59×10^6
MAGE-A4	43	3.68×10^6
WT-1	45	1.95×10^6
gp100	62	6.09×10^6
Survivin-2B	64	1.61×10^6

実施例 2

[0131] ＜がん患者の血清中に含まれる抗体の解析１＞

2名のがん患者（Donor1及びDonor2）から血液を採取し、血清を取得した。

[0132] 抗原たんぱく質（NY-ESO-1、WT-1、MAGE-A4、XAGE1b、gp100、Survivin-2B）をそれぞれ固定化した磁気ビーズ6種を同じ濃度になるように混合し、96wellプレート（Bio-Rad、#171-025001）に分注した。各ウェルに患者の血清を加えて、アルミホイルで遮光し、室温で1時間振盪し、反応させた。ビーズをウォッシュステーション（Bio-Rad）により洗浄し、抗体を検出するため二次抗体として、ビオチン化anti-human IgG（H+L）（Vector Laboratories社製、BA-3000）を添加し、アルミホイルで遮光し、室温で30分間振盪し、反応させた。ビーズをウォッシュステーション（Bio-Rad）により洗浄し、（Ｒ－）フィコエリスリン（Phycoerythrin（ＰＥ））標識ストレプトアビジン（Vector Laboratories）を添加して、アルミホイルで遮光し、室温で10分間振盪して反応させた。ビーズをウォッシュステーション（Bio-Rad）により洗浄し、Bio-Plex（Bio-Rad）を用いて解析した。患者血清は400倍、1600倍、6400倍に希釈したものを使用した。

[0133] 図８に示す通り、Donor1ではNY-ESO-1に対する反応が確認された。

[0134] この結果から、Donor1の血液中にNY-ESO-1を認識する抗体が存在すること、Donor1のがんがNY-ESO-1を発現していること、NY-ESO-1を使用したペプチドワクチンやDCワクチン治療が有効である可能性が示唆された。

[0135] この結果、Donor2ではXAGE1bに対する反応が確認された。

[0136] この結果から、Donor2の血液中にXAGE1bを認識する抗体が存在すること、Donor2のがんがXAGE1bを発現していること、XAGE1bを使用したペプチドワクチンやDCワクチン治療が有効である可能性が示唆された。

実施例 3

[0137] ＜がん患者の血清中に含まれる抗体の解析２＞

腎細胞がん患者8名（Donor２～Donor９）から、EP-DC治療の前後で、血清を取得した。

EP-DC治療は、がん患者から手術によって除去した腫瘍組織を凍結融解法などによりライセートとして調製し、エレクトロポレーション法により樹状細胞に取り込ませ、樹状細胞ワクチンを調製したものを、当該患者へ投与する治療方法である。

[0138] 抗原たんぱく質を固定化した磁気ビーズ６種を同じ濃度になるように混合し、96wellプレート（Bio-Rad、#171-025001）に分注した。各ウェルに患者の血清を加えて、アルミホイルで遮光し、室温で1時間振盪し、反応させた。ビーズをウォッシュステーション（Bio-Rad）により洗浄し、抗体を検出するため二次抗体として、ビオチン化anti-human IgG（H+L）（Vector Laboratories、BA-3000）を添加し、アルミホイルで遮光し、室温で30分間振盪し、反応させた。ビーズをウォッシュステーション（Bio-Rad）により洗浄し、PE標識ストレプトアビジン（Vector Laboratories）を添加して、アルミホイルで遮光し、室温で10分間振盪して反応させた。ビーズをウォッシュステーション（Bio-Rad）により洗浄し、BioPlex（Bio-Rad）の測定装置を用いて解析した。患者血清は400倍、1600倍、6400倍に希釈したものを使用した。

[0139] 図９に示す通り、Donor６とDonor８の血清で、MAGE-A4に対する反応が認められた。Donor６とDonor８の血液中にMAGE-A4を認識する抗体が存在していることから、Donor６とDonor８の患者体内の腫瘍組織がMAGE-A4を発現している可能性が示唆される。その場合には、MAGE-A4を使用したペプチドワクチンやDCワクチン治療を行うことが適切であると推察される。

[0140] また、図１０に示す通り、Donor３の血清では、DCワクチン治療前と治療後とを比較して、DCワクチン治療後に、WT-1に対する反応が高くなっていることが確認された。Donor３の血液中にWT-1を認識する抗体が存在していることから、Donor３の腫瘍組織がWT-1を発現している可能性が示唆される。その場合には、WT-1を使用したペプチドワクチンやDCワクチン治療を行うことが適切であると推察される。

実施例 4

[0141] ＜カチオン化試薬のSH基保護能の評価＞

ニワトリ卵白リゾチーム（配列番号１３、以下、単にリゾチームとも記す、キューピー社製）をサンプルとして、カチオン化試薬のSH基保護能の評価を行った。

[0142] 100mLナシ型フラスコにリゾチームを15mg量り取り、２ｍＬの６Ｍ塩酸グアニジン、0.1M Tris-HCl、pH8.5, 2mM EDTAに溶解した。得られた溶液を脱気及び窒素置換後、ジチオスレイトール（DTT）を終濃度30mMとなるように加え、37℃の恒温槽で2時間反応させた。得られた還元リゾチームに、終濃度70mMの各カチオン化試薬（TAPS-sulfonate（片山化学工業社製）、またはTAP3S-sulfonate）を添加し、さらに室温で2時間反応させた。得られた溶液に1/10量の酢酸を加えて反応を停止させた後、Milli-Q水に対して4℃で1日間透析をし、TAPS化リゾチーム、TAP3S化リゾチームを取得した。なお、TAP3S-sulfonateは特願2010-070804に記載の手法で合成したものを使用した。

[0143] TAPS化、TAP3S化、Native及び還元したリゾチームについて、逆相HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を実施した。Nativeのリゾチームには、1分子内に４つのSS結合が存在し、疎水基が露出していないため、ある程度の親水性を有する。還元リゾチームはSS結合を還元した変性タンパク質であり疎水性が最も高い（水への溶解度が低い）ものである。カラムはCOSMOSIL Protein-R（ナカライテクス社製）を使用し、溶媒はＯ．１％塩酸で希釈したアセトニトリルを使用し、アセトニトリル濃度は１％から５０％までに設定した。

[0144] 逆相HPLCのチャートをまとめた結果を図１１に示す。直線はアセトニトリルの濃度を示しており、ピークが左にあるほど、サンプルの疎水性度が低い（水への溶解度が高い）ことを示している。TAP3S化したリゾチームはNative及び還元したリゾチームより親水性が高く、低濃度のアセトニトリル溶媒で溶出している。しかし、TAP3Sではリゾチームの８つすべてのSH基を保護・カチオン化するのは困難であり、一部のSH基が保護されていない不完全体が混入してしまうため、ピークが分散している。一方、TAPS化したリゾチームは８つのSH基がすべて保護・カチオン化されており、均一性が高いことが確認された。TAPSとTAP3SによるSH基の保護能の差は、分子の大きさによるもので

あり、タンパク質分子上である程度密集したSH基を保護する場合には分子の大きいTAP3Sは、カチオン化の際にタンパク質分子上で立体障害を起こし、TAP3Sと結合できない微量のSH基が残ってしまうため、その後ゆっくりとSH/SS交換反応が進行するためと推察される。

実施例 5

[0145] ＜ビーズの保存安定性の評価＞

タンパク質のSH基がすべて保護されていない状態で抗体検出用試薬を調製・保存した場合には、保護されずに残ったSH基がSS結合を形成し、タンパク質の凝集や抗体検出用試薬の凝集が起こることが想定される。そこで、抗体検出用試薬の保存安定性を、以下の手順により確認した。

[0146] 実施例１に記載した手順により、TAPS化、TAP3S化、NativeのMAGE-A4をそれぞれ作製し、それぞれのタンパク質を固定化したビーズを調製した。

[0147] 調製したビーズを保存用バッファーに懸濁し、４℃又は３７℃の条件下で保存した。一定期間経過した後、懸濁液中のビーズのうち、凝集しているビーズがどの程度存在するかを血球計数盤により測定した。結果に示すビーズ凝集体の割合は、３つ以上のビーズで形成された凝集体の数÷ビーズの総数×１００により算出した。

[0148] 図１２に、４℃で５日間、３７℃で１０日間又は４１日間保存した懸濁液中に含まれるビーズ凝集体の割合を示す。４℃で保存した場合、NativeのMAGE-A4を固定化したビーズを保存した場合と比較して、TAPS化又はTAP3S化したMAGE-A4を固定化したビーズを保存した場合において、ビーズの凝集体の割合が低下している。また、３７℃で保存した場合、NativeのMAGE-A4を固定化したビーズを保存した場合と比較して、TAPS化したMAGE-A4を固定化したビーズを保存した場合において、ビーズの凝集体の割合が低下している。

[0149] 次に、ビーズの凝集体の割合の減少が、固定化した抗原タンパク質のビーズから遊離によるものでないかを確認するため、ビーズ保存液のSDS-PAGEを行った。

[0150] ビーズに固定化したMAGE-A4はN末端側にHis-tagが付加されている。そこで

、抗His-tag抗体（OGHis、MBL社製）を用いたウェスタンブロッティング法により、MAGE-A4を固定化したビーズの保存液中に含まれる遊離したMAGE-A4タンパク質を検出した。

[0151] 結果を図１３に示す。レーン2-4に泳動したサンプルは、それぞれTAPS化MAGE-A4固定化ビーズ、TAP3S化MAGE-A4固定化ビーズ、Native MAGE-A4固定化ビーズを104日間保存したものの保存液を使用した。いずれのサンプルからも同程度の遊離タンパク質が検出され、カチオン化したことで抗原タンパク質がビーズから遊離しやすくなっているという現象は確認されなかった。

[0152] さらに、Bio-Plex COOHビーズ、104日間保存したTAPS化MAGE-A4固定化ビーズ、TAP3S化MAGE-A4固定化ビーズ又はNative MAGE-A4固定化ビーズについて、結合しているタンパク質の検出を行った。

[0153] PBS中で200ng/mLに希釈した抗His-tag抗体(OGHis、MBL社製)と、各ビーズを室温で30分間混合した後、PBSを用いて各ビーズを2回洗浄した。次に、PBS中で200ng/mLに希釈した抗マウスIgG-Alexa488（2次抗体：Invitrogen)と、各ビーズを室温で30分間混合した後、PBSを用いて2回洗浄した。これらのビーズを共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察（励起光488nm, 蛍光フィルターLP505）し、ビーズ表面にHis-tag付加MAGE-A4タンパク質が存在することを可視化した。撮影画像を図１４に示す。なお、いずれの画像も全て同じ検出感度で撮影している。図１４に示したように、いずれのビーズの表面にもMAGE-A4タンパク質が結合していることが確認できた。

[0154] 実施例５の結果から、本発明に開示された抗体検出用試薬の製造方法により調製されたビーズは、Nativeのタンパク質を用いてビーズを調製するよりも凝集体の形成を抑制する効果を有することが明らかとなった。この凝集体の形成抑制は、ビーズ表面の抗原タンパク質が遊離することによるものではないことも確認した。さらに、タンパク質の可溶化能については、TAPSよりもTAP3Sが優れていることは公知であったが、調製されたビーズの凝集抑制効果については、可溶化能と異なり、TAPSのほうが優れていることが明らかとなった。

実施例 6

[0155] ＜TAP-Brによるタンパク質のカチオン化＞

ナス型フラスコに上記アフィニティー精製後のXAGE1b又はNY-ESO-1を加え、水分を凍結乾燥機で除去したものを3mLの6M グアニジン，0.1M Tris-HCl pH8で溶解した。脱気・窒素置換後に30mMのDTT(固体)を加え、37℃で１時間ほど処理した。XAGE1b又はNY-ESO-1の含まれる溶液に70mM TAP-Brを添加し、37℃で60分ほど処理した。

[0156] XAGE1b又はNY-ESO-1とTAP-Brを含む溶液に1/10量の酢酸を添加した後、4℃でMilli-Q水に対してよく透析した。TAP化したXAGE1b、NY-ESO-1を逆相HPLCにより精製した。

[0157] 実施例１に記載した方法により、TAP化XAGE1b、TAPS化XAGE1b、TAP化NY-ESO-1、TAPS化NY-ESO-1をそれぞれ固定化したビーズを調製した。TAP化した抗原タンパク質もTAPS化した抗原タンパク質と同様にビーズに固定化できることを確認した。

[0158] なお、本明細書中で引用したすべての刊行物、特許をそのまま参考として本明細書中に取り入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0159] 以上、説明したように、本発明の製造方法を用いることにより、抗原タンパク質を用いた抗体検出用試薬を効率よく製造することができる。本発明の製造方法によって製造された抗体検出用試薬は、安定性が高く、また液体サンプル中の抗体を効率よく検出できることも確認された。本発明の試薬を用いることで、被験者のHLAタイプに拘束されない抗体解析検査を提供することが可能である。この検査を実施することで、例えば、免疫が関与する疾患の治療方針の決定や治療効果の予測・判定等が行えると考えられる。

請求の範囲

［請求項1］ 抗原タンパク質と担体とで構成される抗体検出用試薬の製造方法であって、抗原タンパク質をカチオン化して可溶化する工程と、カチオン化した抗原タンパク質を担体に結合させる工程と、を含む抗体検出用試薬の製造方法。

［請求項2］ 前記抗原タンパク質が、全長タンパク質であることを特徴とする、請求項１に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

［請求項3］ 前記抗原タンパク質が、膜タンパク質であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

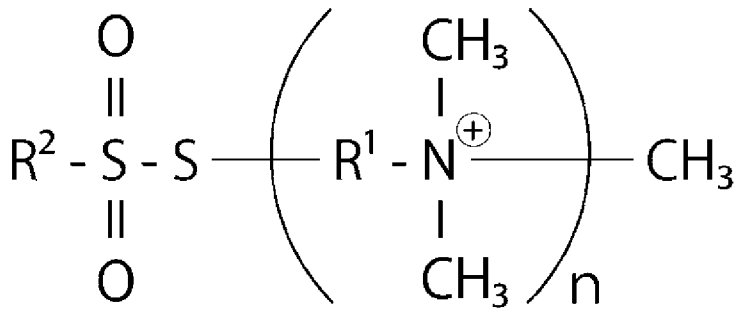
［請求項4］ 前記抗原タンパク質が、がん抗原タンパク質であることを特徴とする、請求項１乃至３のいずれか一項に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

［請求項5］ 前記カチオン化が、抗原タンパク質のチオール基にカチオン化剤を結合させることによって行われることを特徴とする、請求項１乃至４のいずれか一項に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

［請求項6］ 前記カチオン化剤が、チオスルホナート化合物、混合ジスルフィド化合物、ピリジルスルフィド系のカチオン化剤、ハロゲン化アルキル系カチオン化剤のいずれか１つ、又はその混合物から選択されることを特徴とする、請求項５に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

［請求項7］ 前記チオスルホナート化合物が、以下の式の化合物である

［化1］



請求項６に記載の抗体検出用試薬の製造方法（式中、Ｒ１は、炭素原

子数２～２０の直鎖アルキレン基を表し、R^2は、炭素原子数１～３のアルキル基を表し、ｎは１～３のいずれかの整数である）。

[請求項8] 前記化合物が、R^1が－（CH_2）$_3$－であり、R^2がCH_3－であり、ｎが１で表されるTAPS-Sulfonateであることを特徴とする、請求項７に記載の製造方法。

[請求項9] 前記化合物が、R^1が－（CH_2）$_3$－であり、R^2がCH_3－であり、ｎが３で表されるTAP3S-Sulfonateであることを特徴とする、請求項７に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

[請求項10] 前記ハロゲン化アルキル系カチオン化剤が、TAP－Brであることを特徴とする、請求項６に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

[請求項11] 前記担体が、磁気ビーズであることを特徴とする、請求項１乃至１０のいずれか一項に記載の抗体検出用試薬の製造方法。

[請求項12] 請求項１乃至１１の製造方法によって製造された抗体検出用試薬。

[請求項13] サンプル中に含まれる抗原特異的な抗体の検出方法であって、請求項１２に記載の抗体検出用試薬とサンプルとを接触させる工程と、抗体に結合する標識した二次抗体を添加し、抗体と結合させる工程と、抗体検出用試薬を回収する工程と、抗体が結合した抗体検出用試薬を検出する工程とを含む、抗体検出方法。

[請求項14] 前記サンプルが、単離された体液であることを特徴とする、請求項１３に記載の抗体検出方法。