

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4413179号  
(P4413179)

(45) 発行日 平成22年2月10日(2010.2.10)

(24) 登録日 平成21年11月27日(2009.11.27)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 V
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 5
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/545 B
	GO 1 N 33/577 A

請求項の数 5 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2005-277556 (P2005-277556)  
 (22) 出願日 平成17年9月26日(2005.9.26)  
 (62) 分割の表示 特願平8-267918の分割  
 原出願日 平成8年9月18日(1996.9.18)  
 (65) 公開番号 特開2006-17745 (P2006-17745A)  
 (43) 公開日 平成18年1月19日(2006.1.19)  
 審査請求日 平成17年10月6日(2005.10.6)  
 審判番号 不服2008-5947 (P2008-5947/J1)  
 審判請求日 平成20年3月10日(2008.3.10)

(73) 特許権者 000120456  
 栄研化学株式会社  
 東京都台東区台東4丁目19番9号  
 (72) 発明者 和田 厚文  
 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内  
 (72) 発明者 窪田 信幸  
 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内  
 (72) 発明者 山田 美知子  
 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的粒子凝集反応方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラテックス粒子に固定した抗ヒト血清アミロイドA抗体を血清アミロイドA抗原と反応させ、抗原抗体反応によって生じるラテックス粒子の凝集を観察することによって血清アミロイドA抗原を検出、または測定する方法において、抗体として各々単独でも凝集する血清アミロイドA抗原に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を用いる免疫学的ラテックス凝集反応方法

【請求項2】

各々単独でも凝集する血清アミロイドA抗原に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体が別のラテックス粒子上に固定されている請求項1の免疫学的ラテックス凝集反応方法

【請求項3】

ラテックス粒子の凝集を光学的に測定する請求項1の免疫学的ラテックス凝集反応方法

【請求項4】

ラテックス粒子に固定した抗ヒト血清アミロイドA抗体を血清アミロイドA抗原と反応させ、抗原-抗体によって生じるラテックス粒子の凝集を光学的に測定することによって血清アミロイドA抗原を検出、または測定する方法に用いる試薬であって、抗体として各々単独でも凝集する血清アミロイドA抗原に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を用いる免疫学的ラテックス凝集反応方法のための試薬

【請求項5】

ラテックス粒子に固定した抗ヒト血清アミロイドA抗体を血清アミロイドA抗原と反応させ、抗原抗体反応によって生じるラテックス粒子の凝集を光学的に測定することによって血清アミロイドA抗原を検出、または測定する方法において、抗体として各々単独でも凝集する血清アミロイドA抗原に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を用いるプロゾーン現象の抑制方法

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原抗体反応に基づく免疫学的粒子凝集反応に関するものである。抗原抗体反応を利用した物質の測定方法には、様々な技術が知られている。本発明は、これらの免疫学的な測定方法の中で、免疫成分を不溶性担体粒子に固定して用い、抗原抗体反応によって生じる不溶性担体粒子の凝集を観察する免疫学的粒子凝集反応に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

免疫学的粒子凝集反応は、B/F分離が必要なELISAやRIAに比べて反応ステップが少ないため機械化に適している。このような特徴から早くから機械化が進み、種々の自動分析装置が商品化されている。また最近では専用の自動分析装置のみならず、酵素反応などに基づく他の測定項目とともに汎用の自動分析装置を利用して測定されるようになってきた。こうして免疫学的粒子凝集反応が広く普及するのに伴って、幅広い成分が測定対象として採用されるようになってきている。測定対象成分には、たとえばイムノグロブリン、補体、ホルモン、ウイルス抗原、腫瘍マーカー、炎症マーカー、あるいは薬剤等が知られている。これらの測定対象成分が狭い濃度範囲にあれば、免疫学的粒子凝集反応によって正しい測定値を得ることができる。ところが実際には、もともと高い濃度で含まれている成分や、あるいは低濃度から非常に高い濃度まで広い濃度範囲にわたって濃度が変動するような成分については場合によって不正確な測定値を与えることがある。

20

【0003】

血清中にもともと高い濃度で存在している成分としては、イムノグロブリンを挙げられる。特にIgGはヒト血清中に7-15mg/mLの濃度で存在する主要な血漿蛋白質である。このような高い濃度は通常の測定操作では正確に測定することができない。測定対象成分が多量に存在する時には、抗原過剰となりプロゾーン現象と呼ばれる見かけの測定値が低くなる現象が現れるためである。したがって、あらかじめ試料を希釈して抗原濃度を下げる、あるいは遊離の抗体を同時に反応させて粒子上の抗体と競合させることによって抗原過剰の状態を緩和する(特許文献1)といった操作が必要であった。免疫学的粒子凝集反応におけるこのような問題点を解消するために、試料のサンプリング量を少なくする方法も考えられるが機械的な分注精度を維持できる範囲には限度がある。あるいは試料を希釈するにしても分注精度の影響は考慮しなければならないし、先に述べた汎用の分析装置においては予め試料を希釈する機構を持たないものも多い。また、たとえ希釈機構を備えていたとしても、多くの場合希釈操作は作業効率の低下につながるので歓迎されない。

30

【0004】

このような背景から、モノクローナル抗体を利用することによって希釈操作を省略する方法が報告された。第一の方法ではモノクローナル抗体のみで免疫比濁法を実施している。またモノクローナル抗体のみでは非特異反応の原因となりやすい増感剤を多量に添加しなければならないため、ポリクローナル抗体をモノクローナル抗体と組み合わせることで試料を希釈することなく高い精度を達成した報告もある(特許文献2)。しかしこれらの報告はあくまでも粒子担体を利用しない免疫比濁法に基づくものであり、免疫学的粒子凝集反応に関してはこの種の改善策は知られていないのが現状である。一方これらの先行技術はいずれも免疫比濁法を採用しているため、抗体分子と抗原分子のみで光学的に検出可能な大きさの沈降物を生成しなければならない。したがって用いる抗体はいずれもFcと呼ばれる定常領域を備えた完全な分子形態を保っていた。Fcを備えた抗体は、免疫学

40

50

的粒子凝集反応に用いた場合にリウマチ因子や補体の干渉を受けて非特異的な凝集の原因となることが知られている。

【 0 0 0 5 】

この他にモノクローナル抗体 1 種のみで粒子凝集阻止反応系を構成した報告が有るが、この報告は高濃度域の精度の改善を目的としたものではなくモノクローナル抗体の特異性を凝集反応系に活用するために 1 種の抗体による反応系を提案している。同じく感度や特異性を達成するためにモノクローナル抗体を逆受け身赤血球凝集反应用試薬に応用した報告や、凝集反应用的の溶媒にモノクローナル抗体を加える技術も知られている。更に免疫学的粒子凝集反応に着目すれば、モノクローナル抗体のみで反応系を構成する試みも報告されているが（特許文献 3）、高濃度域における定量性の改善をもたらすものではない。

10

【 0 0 0 6 】

血清中の成分には、イムノグロブリンのように高濃度で存在するもののみならず、低濃度から高濃度にいたる幅広い濃度範囲で存在する成分も知られている。炎症マーカーである C 反応性蛋白質（以下 CRP と省略する）や血清アミロイド A（以下 SAA と省略する）、あるいはアレルギー症状などの指標となる IgE は、このようなダイナミックレンジの広い成分の代表的なものである。SAA は、ある種のアミロイドーシスにおいて組織に沈着するアミロイド蛋白 A（以下、AA 蛋白と省略する）の前駆体蛋白とされる、分子量約 12000 の血清蛋白である。近年になって、この SAA の血清値が炎症性疾患で上昇することが明らかにされ、鋭敏な炎症マーカーとして評価されている（非特許文献 1）。SAA は血清中で通常は 0.5 - 50  $\mu\text{g/ml}$  程度の濃度範囲にある。しかし、急性期には 100 - 10000  $\mu\text{g/ml}$  にも達することのあるたいへんダイナミックレンジの広い成分である。この種の成分では、先に述べたような希釈操作を省略する方法では、特に高い濃度域で正確な測定結果を得られない可能性が有る。

20

【 0 0 0 7 】

たとえば、サンプリング量を減らしたり、あるいは遊離の抗体を共存させる方法では、結果的に感度を下げていることになり、低濃度域での精度を下げることになりかねない。この他にも SAA の免疫学的な測定に関する報告は多いが、免疫学的粒子凝集反応法において広い濃度範囲にわたり高い測定精度を実現した報告はない。

【 0 0 0 8 】

具体的には、たとえばネフェロメトリックアッセイを利用した報告では、1 - 13  $\mu\text{g/ml}$  の間で直線性を確認している。ELISA で 1.5 - 30  $\mu\text{g/ml}$ 、あるいは 55 - 750  $\text{ng}/200\ \mu\text{L}$  を測定した報告が有る。また免疫学的ラテックス凝集法による測定例（非特許文献 2）では、検出限界が 0.5  $\mu\text{g/ml}$  であるのに対して反応曲線は 30  $\mu\text{g/ml}$  付近で傾きを失っている。すなわちこの文献では 60 倍程度の濃度差しか測定できていないことになる。この値は必ずしも不十分なものではない。しかし先に述べたように SAA の血中濃度は大きく変動するので、たくさんの検体を測定する場合には測定範囲の上限を越えることも少なからず観察される。SAA では、ドットプロットと酵素標識抗体を組み合わせた特殊な反応系で 1.25 - 160  $\mu\text{g/ml}$  という測定レンジを実現した報告も有る。しかしこの報告においては加熱処理によって抗原性を強める処理が必要であり、本発明のように試料を前処理無しで測定する方法とは区別される。また固相イムノラジオメトリックアッセイによって、試料の変性処理を行うことなく 1000 倍に及ぶ測定範囲を実現した報告もある。ただしこの結果は RI 標識抗体を使い固相の洗浄工程を実施して得たものである。更に標準に利用された SAA の濃度が不明なので、測定範囲の評価を行うことができない。

30

40

【 0 0 0 9 】

一方本発明では、好ましい態様においてモノクローナル抗体の反応性を増強し、またリウマチ因子等の干渉を防ぐ目的で各種の変性処理を施す。IgG の抗体活性が、酸、加温、あるいは尿素のようなカオトロピック剤の処理によって高まる現象は ELISA で確認されている。しかしこれらの報告は ELISA 用の固相抗体に関するものであり、免疫学的粒子凝集反応において測定レンジの拡大が期待できることを示唆するものではない。

50

【特許文献1】特開昭59-46856号公報

【特許文献2】特開昭63-206657号公報

【特許文献3】特開昭57-118159号公報

【非特許文献1】臨床検査、32(2)、168、1988

【非特許文献2】Ann. Clin. Biochem., 30, 72-76, 1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、SAAのようなダイナミックレンジの広い成分を免疫学的粒子凝集反応によって測定するための新しい技術を提供することに有る。より具体的には、測定対象成分のダイナミックレンジに応じた広い濃度範囲で高い精度を実現できる免疫学的粒子凝集反応を提案するものである。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の課題は、不溶性担体粒子に固定した抗体を抗原と反応させ、抗原-抗体によって生じる不溶性担体粒子の凝集を観察することによって抗原を検出、または測定する方法であって、抗体として分析対象抗原に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を用いる免疫学的粒子凝集反応方法によって達成される。

【0012】

20

本発明のポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体には、分析対象抗原を認識する公知の抗体を利用することができる。これらの抗体は、それぞれを不溶性担体粒子に固定してから混合するか、あるいは抗体を混合したものを不溶性粒子に固定することによって利用される。測定性能を経験的に設定するには、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とを個別に固定した不溶性担体粒子を抗体固定後に混合する方が容易である。

【0013】

不溶性粒子には、ポリスチレン等の合成重合体粒子(ラテックス粒子)、ゼラチン粒子、金属コロイド、顔料、動物の血球、細菌菌体、あるいはリポソーム等を利用することができる。これらの不溶性担体粒子へ抗体を固定する方法も公知である。基本的な方法では、ポリスチレン製のラテックス粒子に抗体溶液を接触させることによって抗体が物理吸着される。またSH基、カルボキシル基、あるいはアミノ基のような官能基を導入したラテックス粒子には、化学的な結合によって抗体を固定することができる。いずれの方法を採用するにしろ、抗体を固定した粒子は十分に洗浄され、更に必要に応じてウシ血清アルブミン(以下BSAと省略する)、正常動物血清、乳タンパク成分等の不活性成分でブロックし、必要な濃度になるように適当な分散媒で希釈して抗体固定粒子懸濁乳液(以下、単に乳液とする)とし測定に利用する。

30

【0014】

乳液を用いて測定対象抗原を測定するには、抗原を含む試料溶液と混合して粒子担体の凝集を観察すれば良い。凝集反応は、肉眼的に凝集塊の形成を確認する、あるいは凝集反応を光学的に追跡することによって観察する。たとえば不溶性担体としてポリスチレンラテックス粒子を利用した場合、免疫学的な粒子の凝集は、600nm前後の近赤外部における吸収、あるいは散乱光強度の変化としてとらえることができる。光学測定は、たとえばLX-3000(栄研化学・アナリティカルインストルメント製、商品名)等の免疫学的ラテックス凝集反応分析専用の免疫学的自動分析装置や、あるいは汎用の自動分析装置を利用して自動的に行わせることができる。本発明の測定方法は高濃度域での定量性に優れるので、試料の希釈機構を持たない汎用の自動分析装置でも容易に実施することができる。

40

【0015】

本発明で測定対象とする抗原性の物質には、公知の免疫学的測定方法によって測定されていた多くの成分を挙げるることができる。これらの公知の抗原性成分の中でも、ダイナミ

50

ックレンジの広い、つまり抗原濃度の変動幅の大きい成分では特に本発明の効果が大きくなる。具体的には、先に紹介したS A A、あるいはC R PやI g Eがダイナミックレンジの広い代表的な成分と言える。以下にS A Aを測定対象とする場合を例に本発明を具体的に説明する。

【0016】

S A Aを認識するポリクローナル抗体には公知の抗体を利用できる。これまでに報告されたS A Aに対するポリクローナル抗体は、ウサギ等を精製S A Aで免疫して得たものである。免疫原とする精製S A Aを得る方法は公知である。たとえば、S A Aを豊富に含むヒト血清を出発原料とし、超遠心分離によって得た高比重リポ蛋白質（以下H D Lと省略する）分画から疎水クロマトグラフィーやゲルろ過等の操作を経てS A Aを高度に精製した状態で得ることができる。あるいは同じくH D L分画をもとに、ゲルろ過や抗アポA 1抗体等によるイムノアフィニティクロマトグラフィーを組み合わせて精製S A Aを得る方法も公知である。また血清のみならず遺伝子組み換え体として発現させたS A Aも免疫原に利用することができる。免疫にはフロイントのコンプリートアジュバント（以下F C Aと省略する）、百日咳トキソイド、あるいは結核死菌等のアジュバントを利用することにより良好な免疫応答を期待できる。たとえば結核死菌を増強したF C Aは、S A Aの免疫にあたって凝集活性に優れた抗体を効率良く生成させるために有効なアジュバントである。必要に応じて追加免疫した後に、抗体価の上昇を確認してから採血し公知の方法で抗体を精製すれば本発明に用いるポリクローナル抗体を得ることができる。

10

【0017】

一方本発明に用いるモノクローナル抗体も、やはり公知の方法によって得ることができる。すなわち、マウスやラット等の免疫動物をポリクローナル抗体の免疫操作と同じように免疫し、抗体価の上昇を確認したところでその抗体産生細胞を回収する。回収した抗体産生細胞は、ミエローマとの細胞融合でハイブリドーマとする、あるいはE B Vトランスフォーム等により形質転換させ不死化する。これを抗体産生能でスクリーニングし、更に必要な活性を持つ抗体を産生する株をクローニングすれば抗体産生株を樹立することができる。抗体産生株は、マウスの腹腔に接種して培養すれば腹水としてモノクローナル抗体を得られる。また*in vitro*で抗体産生株を大量に培養してモノクローナル抗体を製造する技術も公知である。

20

【0018】

本発明で利用するモノクローナル抗体は、単独で用いても良いし複数のモノクローナル抗体を組み合わせて用いることもできる。複数種のモノクローナル抗体を利用する時には、抗体の混合物を不溶性担体粒子に結合する方法、別々に結合した後に混合する方法のいずれを採用してもよい。ただし試薬性能を抗体の混合割合で経験的に制御しようとする、ポリクローナル抗体との混合と同じように別々に結合したものを後から混合する方が混合割合の変更を容易に行えるので有利である。

30

【0019】

本発明で利用するモノクローナル抗体は、S A Aを特異的に認識するものであれば特に限定されない。本発明者らの知見によればS A Aに関しては抗体の凝集活性には多くの要因が影響を与えている。そのためモノクローナル抗体の反応性を評価するための一般的な指標であるエピトープや親和性のみでは凝集活性の強弱を説明することができない。本発明者らは、S A Aと反応させたときに様々な凝集活性を示すいくつかのモノクローナル抗体を得ているが、本発明の効果はいずれのモノクローナル抗体を用いても達成することができる。

40

【0020】

本発明の好ましい態様によれば、S A Aと反応して単独でも凝集を生じるモノクローナル抗体、あるいは他のモノクローナル抗体と組み合わせた時に強い凝集活性を示すモノクローナル抗体をポリクローナル抗体と組み合わせることによって、高濃度域における高い定量性を実現できる。このようなモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして本発明者らはS A A - 17およびS A A - 21を樹立している。S A A - 17はF E R M

50

BP-5616として、またSAA-21はFERM BP-5617として特許微生物寄託センターに寄託されている。SAA-17とSAA-21は、SAA高値のヒト血清からゲルろ過とイムノアフィニティークロマトグラフィーによって精製したSAAを免疫原に用い、結核死菌と沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンをアジュバントとしてラットを免疫し、その抗体産生細胞をマウス・ミエローマ細胞X-63-Ag8-653と細胞融合することによって樹立したものである。SAA-17は、ラテックス粒子に結合させてSAAと反応させた時に単独でも明瞭な凝集を示す。一方SAA-21は単独で反応させた時の凝集は弱い、SAA-17と組み合わせるときわめて強い凝集活性を示す。

#### 【0021】

本発明において利用する抗体は、リウマチ因子や補体による非特異的な影響を抑制することを目的として適当な酵素で消化した断片として用いることもできる。抗体断片としては、ペプシンによるF(ab')<sub>2</sub>、プラスミンによるFabc'等が知られている。このような酵素処理は、非特異的な反応を抑制するのみならず高濃度域における定量性の向上にも大きく貢献する。抗体の定常領域を酵素的に切断することが、どのような機序でこのような作用をもたらすのかは明らかでないが、本発明においては明らかに定量性の向上という効果の現れることを確認した。酵素処理にあたっては、処理後に必ずしも定常領域を分離しなくても良い。定常領域に起因する非特異的な反応は、酵素処理によって効果的に抑制することが可能で、定常領域を除去してしまう操作は必ずしも要求されない。

#### 【0022】

定量性の向上という効果は、酵素処理の他に抗体を各種の変性条件にさらすことによっても得ることができる。変性処理には、先に述べたような酸を始めとするいくつかの処理技術が知られている。たとえば酸性処理した抗体による免疫学的な測定は、先行技術として紹介したELISAの他に甲状腺刺激ホルモンのRIA、逆受け身凝集反応への応用が知られている。しかし酸処理のみでは抗体の定常領域を残すおそれが有り、実際の血清試料と接触した時にはリウマチ因子や補体の影響を受けて非特異的な反応の原因となる可能性が有る。したがって、非特異反応の防止と高濃度域における定量性の向上という2つの効果をもたらす酵素処理が本発明のより望ましい態様ということができる。

#### 【0023】

本発明は、前記免疫学的粒子凝集反応方法を実施するのに必要な、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせた新規な試薬を提供する。本発明の試薬には、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を結合した粒子の他に公知の成分を組合せることができる。すなわち、免疫反応に必要なpHを与える緩衝剤、免疫反応を促進する反応増強剤、非特異反応を抑制する反応安定剤やブロッカー、試薬の保存性を高めるアジ化ナトリウムのような防腐剤等を組合せても良い。

#### 【0024】

緩衝剤としては、次のようなものが利用されている。

GOOD緩衝剤

3-[ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid、DIPSOと省略する)

2-ヒドロキシエチルピペラジン-3-プロパンスルホン酸(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid、EPPSと省略する)

トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid、TESと省略する)

ヒドロキシエチルピペラジン-2-エタンスルホン酸(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid、HEPESと省略する)

2-ヒドロキシエチルピペラジン-2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid、HEPPOと省略する)

ピペラジン-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)(Piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropane-3-sulfonic acid))

10

20

30

40

50

roxypropanesulfonic acid)、P O P S O と省略する)

N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid、T A P S と省略する)  
 トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-hydroxy-3-aminopropanesulfonic acid、T A P S O と省略する)

その他の緩衝剤

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)とも呼ばれる

リン酸緩衝液

アンモニウム緩衝液

これらの緩衝剤の中でもH E P E S等のG O O D緩衝剤は、免疫反応に有利なpHを与えるのみならず、蛋白質への影響が小さいので特に好ましい緩衝剤として挙げられる。

【0025】

更に反応安定剤やブロッカーとしては、B S A(ウシ血清アルブミン)、動物血清、I g G、I g G断片(F a bやF c)、アルブミン、乳蛋白、アミノ酸、ポリアミノ酸、コリン、ショ糖等の多糖類、ゼラチン、ゼラチン分解物、カゼイン、グリセリン等の多価アルコール等が免疫反応において反応の安定化や非特異反応の抑止に有効なことが知られている。

【0026】

これらの各種成分を含む本発明による試薬は、溶液状態で、あるいは乾燥状態で供給することができる。溶液状態で流通させるには、粒子担体の分散状態の維持や蛋白の安定性を高めることを目的として、更に各種界面活性剤、糖、不活性蛋白等を加えても良い。これらの安定化剤は、試薬を乾燥するときにも安定剤として、あるいは賦形剤として有効である。

【0027】

本発明でポリクローナル抗体と組み合わせて用いるモノクローナル抗体は、ダイナミックレンジの大きな測定対象成分に対して高濃度域におけるプロゾン現象を抑制し、結果として定量レンジを拡大する作用を持つ。公知のポリクローナル抗体のみで構成された免疫学的粒子凝集反応方法では、試料を希釈しなければ測定することができなかつた濃度域であっても、モノクローナル抗体を結合した粒子を組み合わせることによって希釈すること無く測定することが可能である。

【0028】

モノクローナル抗体との組み合わせによる高濃度域での測定範囲拡大効果は、先行技術として知られている免疫比濁法におけるモノクローナル抗体の応用で得られるものとよく似ている。しかし本発明では、ポリクローナル抗体もモノクローナル抗体も不溶性担体粒子に結合された形で利用している。免疫比濁法と不溶性担体粒子を用いた免疫学的な凝集反応は基本的に異なった反応原理に基づく分析方法である。したがって、一方で得られる効果が他方でも容易に実現するとは限らない。特にモノクローナル抗体を利用する場合には、等価な抗体結合部位を抗原分子上に複数備えた特殊な構造の抗原でなければ凝集は起きないものと認識されている。そのモノクローナル抗体を粒子に結合してポリクローナル抗体による粒子凝集反応系に組み合わせた時に、予想を越えてプロゾン現象の抑制作用の得られることを確認し本発明にいたったものである。

【0029】

更に本発明ではモノクローナル抗体として酵素処理を施した特殊なものを利用することで、より確実な定量レンジの拡大効果を実現した。免疫学的粒子凝集反応において、変性処理を施したモノクローナル抗体をポリクローナル抗体と組み合わせたときに広い定量レンジを期待できることは新規な知見である。

【発明の効果】

【0030】

10

20

30

40

50

本発明によって、SAAやCRPといったダイナミックレンジの大きな測定対象成分を希釈操作無しで広い濃度範囲にわたって測定することが可能となる。試料の希釈機構を持たない、あるいは希釈操作によって処理能力が低下する自動分析装置であっても、本発明を利用すれば処理能力を犠牲にすることなく正しい測定値を得ることができる。たとえばSAAにおいては、 $33\mu\text{g}/\text{mL}$ を越える検体が平均すると40 - 50%程度の確率で存在する。このような検体は公知の免疫学的粒子凝集反応法では確実に測定範囲をオーバーする。その結果、半数近い試料は希釈再測定を行わざるをえず、著しい作業能率の低下をもたらす恐れがある。本発明によって $330\mu\text{g}/\text{mL}$ まで定量レンジを拡大(10倍)した場合、測定可能レンジの上限を越える試料に遭遇する確率は理論的には10%程度にまで減少する。この程度の確率であれば、その他の測定項目で発生する日常的な再測定の頻度と大差が無く許容範囲と言える。

10

#### 【実施例】

##### 【0031】

以下の実施例では、ポリクローナル抗体を固定したラテックス粒子とモノクローナル抗体を固定したラテックス粒子を別々に調製後、両者を混合することによって本発明によるポリクローナル抗体 - モノクローナル抗体混合試薬とする方法を採用した。そして本発明による定量レンジを、ポリクローナル抗体のみで構成される従来の試薬と比較した。

##### 1. SAA免疫原の調製

SAA高値血清( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ )1Lを出発原料とし、まず超遠心法により比重1.23の上層部を採取、次いで比重1.063の下層部を採取し、冷却下メタノール/エーテル(1:3)で脱脂後、セファデックスG-200カラム(6M尿素、0.5% Tween 20を含む0.01Mトリス - 塩酸緩衝液pH8.6で平衡化)にアプライし、更にブロムシアンで活性化したセファロース4B(ファルマシア)に常法により、抗ApoA-1抗体、抗ApoC3抗体、および抗ヒト血清アルブミン抗体を結合させたカラムに通して夾雑蛋白を除去し、1Lの血清より精製SAA30mgが得られた。精製SAAはSDS-PAGEにより、分子量12000の位置に単一のバンドを示し、他のアポリポ蛋白抗体とは反応しなかった。また、アミノ酸配列はN末端からSer Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyrであり、データベース検索から、ダウレット他の報告によるN末端のArgを欠いたform 2、4と同一であることがわかった。

20

30

##### 【0032】

##### 2. モノクローナル抗体を使ったラテックス乳液

##### 2-1. ラットの免疫

1で精製したSAA $100\mu\text{g}$ /頭とヒト型結核死菌 $4\text{mg}/\text{mL}$ を加えたFCAで常法によりエマルジョンを作製し、9週齢のWKAH/HKマットのメスに免疫した。同時に沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン(武田薬品工業製) $100\mu\text{l}$ /頭を左後肢腿に筋肉注射した。この後3週おきにSAA $50\mu\text{g}$ /頭をFCAと常法によりエマルジョンとしたものを免疫原として腹腔内注射し、定期的に採血してELISAで抗体価を測定した。ELISAの操作は次のとおりである。

##### 【0033】

##### 2-2. SAA抗体のELISA

抗体価の測定と抗原特異的抗体活性の確認は、ELISAで行った。ブロック、コンジュゲート希釈、血清希釈には1%のBSAを加えた0.15MのNaClを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.2、以下BSA-PBSと省略する)を用いた。精製SAAを $10\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように20mMリン酸緩衝液(pH7.2、以下PBSと省略する)に溶解し住友ベークライトメディカル社製60穴テラサキプレート(MS-31600)に $10\mu\text{L}/\text{well}$ 入れ37で2時間感作し、PBSで洗浄後1%BSA-PBSを $10\mu\text{L}/\text{well}$ 入れ、37で2時間ブロックし、4で保存する。

40

##### 【0034】

プレートをPBSで1回洗浄後、抗体活性を調べようとする検体 $10\mu\text{L}$ をテラサキP

50

プレートに採り37℃で30分インキュベートした。このプレートをPBSで3回洗浄し、1%BSA-PBSで10,000倍に希釈した市販の抗ラットIgG-PODコンジュゲート(Cappel社製)10μLを入れ、37℃30分インキュベートし、PBSで3回洗浄後、OPDと過酸化水素を含む基質液10μLを加え37℃で30分インキュベートして発色を測定した。陰性対照として1%BSA-PBSを、陽性対照として10<sup>2</sup>に希釈した免疫ラット血清10μLを用意し、検体にかえて同じ操作を行った。

#### 【0035】

##### 2-3. 細胞融合とクローニング

ELISAによる抗体価が10<sup>4</sup>に上昇したことを確認したところで、生理食塩水に溶解したSAA50μgを腹腔内注射し3日後に脾臓を摘出した。脾細胞を採取してRPMI1640培地で洗浄し、マウスミエローマ細胞X-63-Ag8-653とポリエチレングリコール(以下PEGと省略する)法によって細胞融合させた。融合条件は次のとおりである。すなわち、脾細胞:ミエローマ細胞が3:1となるように遠心管に分注し、50%PEG溶液1mLを加え、更に加温した50mLのRPMI1640をゆっくり加えてPEGを希釈した。次いで遠心してPEGを除き、脾細胞として7.1×10<sup>5</sup>/wellとなるようにHAT培地に分散し、これを96穴プレートにプレATINGした。HATセレクション後にほとんどのウエルでコロニーが観察された。各ウエルの培養上清はPOD標識抗ラットIgG抗体を用いてELISAでスクリーニングし、発色した30ウエルからクローニングを始め、3回から4回の限界希釈法によるクローニングを行い、最終的にSAAとの反応性を示すIgGクラスのモノクローナル抗体を産生する13クローンを確立した。

#### 【0036】

##### 2-4. モノクローナル抗体による試薬の調製

2-3で得たハイブリドーマ13クローンを、それぞれプリスタン処理したヌードマウス(BALB/c-nu)の腹腔に接種し2週間後腹水を採集した。この腹水を遠心(3000rpm、5分)後、上清から硫酸分画によってモノクローナル抗体を沈殿させた。沈殿を回収してPBSに溶解し、同じPBSに対して透析し抗SAAモノクローナル抗体(10mg/mL)とした。用いたモノクローナル抗体のサブクラスは以下のとおりである。サブクラスは、Bethyl社製抗ラットサブクラス抗血清と精製モノクローナル抗体とのオクテロニー法で決定した。

クローン 3: IgG<sub>2a</sub>

クローン 6: IgG<sub>2b</sub>

クローン 7: IgG<sub>2a</sub>

クローン14: IgG<sub>2c</sub>

クローン15: IgG<sub>2a</sub>

クローン16: IgG<sub>2a</sub>

クローン17: IgG<sub>1</sub>

クローン18: IgG<sub>2a</sub>

クローン20: IgG<sub>2a</sub>

クローン21: IgG<sub>2a</sub>

クローン22: IgG<sub>2a</sub>

クローン25: IgG<sub>2a</sub>

クローン27: IgG<sub>2a</sub>

このモノクローナル抗体を公知の方法に基づいてプラスミン処理した。すなわち、100mLのモノクローナル抗体(10mg/mL)を塩酸でpH2.8に調整し、プラスミン(SIGMA製)を5U添加して30℃で1時間反応させた。反応後NaOHでpH7.0に調整し、37℃で2時間放置してプラスミン処理IgGとした。この状態では、反応液中にFabとpFcとが混在している状態にある。また酸処理による効果を確認するために、プラスミンを添加しないで同じ操作を行うことにより酸処理したモノクローナル抗体を調製した。

## 【0037】

プラスミン処理、または酸処理した抗SAAモノクローナル抗体(0.5%)をポリスチレンラテックス(平均粒径0.109 $\mu$ m)に37で1時間物理吸着させ、最終的にラテックス濃度0.4%となるように分散媒(1%BSAを含む10mMのHEPES緩衝液pH7.4)に懸濁させてモノクローナル抗体感作SAAラテックス凝集反应用試薬(以下モノクローナル抗体感作乳液と呼ぶ)を得た。これらモノクローナル抗体感作乳液には、SAAと反応させたときに単独でも凝集するもの、単独では凝集しないが他の乳液の凝集を増強するもの、複数種を組み合わせたときに始めて凝集を認められるものといった様々な反応性を持つものが含まれていた。

## 【0038】

## 3. ポリクローナル抗体による試薬の調製

## 3-1. ポリクローナル抗体

1で得た精製SAA(2mg/mL生理食塩水)をヒト型結核死菌を加えたFCA(FCA1mLに対して結核死菌を4mg)と等量混合し、じゅうぶんに乳化させた後に1mLを家兎の四肢に免疫した。同時に百日咳ワクチンを後足基部に筋注した。免疫は2週間ごとに行った。4ヶ月後に一部採血して得られる抗血清について、SAAに対する反応性をオクテロニー法によって確認した。高い抗体価が確認された個体の抗血清をヒトHDLで吸収してから40%硫酸分画してIgGを回収し、PBSに対して透析して抗SAA抗体(10mg/mL)を得た。更に得られた抗体をモノクローナル抗体と同様に公知の方法に基づいてプラスミン処理してプラスミン処理IgGとした。この状態では、反応液中にFacbとpFcとが混在している状態にある。

## 【0039】

## 3-2. ポリクローナル抗体による試薬の調製

3-1で得た抗SAA・プラスミン処理IgG(0.5%)をポリスチレンラテックス(平均粒径0.109 $\mu$ m)に37で1時間物理吸着させた後、10mMのHEPES緩衝液で洗浄し、最終的にラテックス濃度0.4%となるように分散媒(1%BSAを含む10mMのHEPES緩衝液、pH7.4)に懸濁させてSAAラテックス凝集反应用試薬(以下単に乳液と呼ぶ)を得た。

## 【0040】

## 4. 本発明によるポリクローナル抗体・モノクローナル抗体混合試薬

2で調製したモノクローナル抗体感作乳液と、3で得た乳液とを1:4となるように混合して本発明によるモノクローナル抗体・ポリクローナル抗体混合感作ラテックス(以下、混合乳液と称する)とした。モノクローナル抗体感作乳液としては、SAAと反応させたときに単独でも強い凝集を示したSAA-17から調製したものを利用した。比較に用いた従来の試薬には、3で得たポリクローナル抗体による乳液をそのまま用いた。

## 【0041】

## 5. 定量レンジの比較

本発明の混合乳液によって得られるSAAの免疫学的測定試薬の直線性を、従来の抗体によって得られる試薬と比較した。0-2800 $\mu$ g/mLのSAAを含む希釈系列を用意し、4で得た乳液による測定を試みた。操作は次のとおりである。希釈系列は、あらかじめ濃度を検定したSAAを高濃度で含む血清をSAA濃度が2800 $\mu$ g/mLとなるように馬血清(50mMのHEPES緩衝液pH7.4で10倍に希釈したもの)で濃度を調整し、更に倍々希釈して作成した。希釈液には、0.5%BSA、12%塩化コリン、および0.9%NaClを含む0.1MのHEPES緩衝液(pH7.4、以下、希釈液と記載する)を用いた。希釈液225 $\mu$ Lと各濃度のSAA含有溶液3 $\mu$ Lを測定セルに分注し、5分後に乳液75 $\mu$ Lを添加して更に1分後-5分後にかけて波長660nmで吸光度を測定し各測定点の間の吸光度変化量を求めた。測定には全自動分析装置日立7070(日立製作所製)を用いた。

## 【0042】

結果は、図1(プラスミン処理)、および図2(酸処理)に示した。図から明らか

10

20

30

40

50

うに、本発明の抗体を利用した試薬では0.52~2800 μg/mLまで測定値が増加し続けている。この濃度範囲においては、本発明によって同じ条件の基で測定が可能となることを示している。一方ポリクローナル抗体のみで構成された従来の試薬を用いた場合、測定値が濃度に応じて変化している範囲は700 μg/mL程度までである。従来の抗体による測定範囲も不十分なものではなく、むしろサンプルボリュームが小さいために従来の定量レンジに比べればかなり高濃度までカバーできていると言うべきかもしれない。しかしそれでも本発明に比べれば測定可能範囲が狭いために希釈を要するサンプルが発生する可能性が有る。従来抗体に対して非常に測定範囲が広い本発明の抗体によれば、測定範囲を越えるために希釈再測定しなければならないサンプルに遭遇する機会を大きく減らすことが可能である。

10

【産業上の利用可能性】

【0043】

本発明によれば、免疫学的粒子凝集反応におけるプロゾーン現象を抑制し、ダイナミックレンジの広い抗原性成分でも、広い濃度範囲にわたって正しい測定値を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】 プラスミン処理したモノクローナル抗体を利用した本発明の試薬によるSAAの測定結果。図中、縦軸は吸光度の差(OD)を、横軸は試料のSAA濃度(μg/mL)を示す。

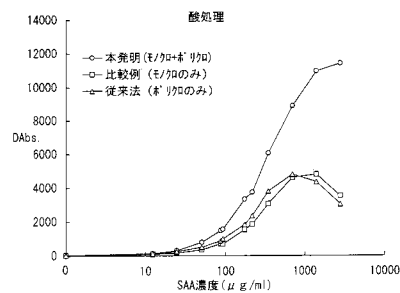
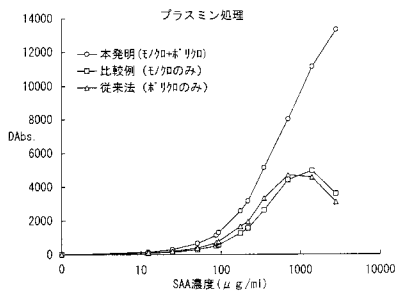
20

【0045】

【図2】 酸処理したモノクローナル抗体を利用した本発明の試薬によるSAAの測定結果。図中、縦軸は吸光度の差(OD)を、横軸は試料のSAA濃度(μg/mL)を示す。

【図1】

【図2】



---

フロントページの続き

合議体

審判長 秋月 美紀子

審判官 宮澤 浩

審判官 後藤 時男

- (56)参考文献 特開平1 - 301165 (JP, A)  
特開平6 - 3358 (JP, A)  
特開平8 - 43389 (JP, A)  
特開昭63 - 206657 (JP, A)  
特開平9 - 67398 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N33/543,581

专利名称(译)	免疫学的粒子凝集反应方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4413179B2</a>	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	JP2005277556	申请日	2005-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
[标]发明人	和田厚文 窪田信幸 山田美知子		
发明人	和田 厚文 窪田 信幸 山田 美知子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.581.V G01N33/543.585 G01N33/545.B G01N33/577.A		
助理审查员(译)	宫泽浩 东京转到		
其他公开文献	JP2006017745A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新技术，即使用不具有样品稀释机制的分析装置，也能够抑制由于不溶性载体颗粒（例如胶乳）引起的免疫颗粒的凝集反应中的前带现象，并测量高浓度区域。解决方案：本发明是免疫颗粒的凝集反应，使用多克隆抗体和单克隆抗体和试剂的组合，并有效地抑制前带现象。即使对于血清淀粉样蛋白A等宽动态范围的抗原成分，也可以在很宽的浓度范围内获得正确的测量值。由于可以扩大高浓度区域的测定范围，因此可以测量不必稀释样品的样品。之

