

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-189665
(P2004-189665A)

(43) 公開日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18	C07K 16/18	4B064
C12P 21/08	C12P 21/08	4H045
G01N 33/53	G01N 33/53 X	
G01N 33/543	G01N 33/543 521	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2002-359053 (P2002-359053)	(71) 出願人	000005821 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22) 出願日	平成14年12月11日 (2002.12.11)	(74) 代理人	100097445 弁理士 岩橋 文雄
		(74) 代理人	100103355 弁理士 坂口 智康
		(74) 代理人	100109667 弁理士 内藤 浩樹
		(72) 発明者	高橋 三枝 愛媛県温泉郡川内町南方2131番地1 松下寿電子工業株式会社内
		(72) 発明者	灘岡 正剛 愛媛県温泉郡川内町南方2131番地1 松下寿電子工業株式会社内

最終頁に続く

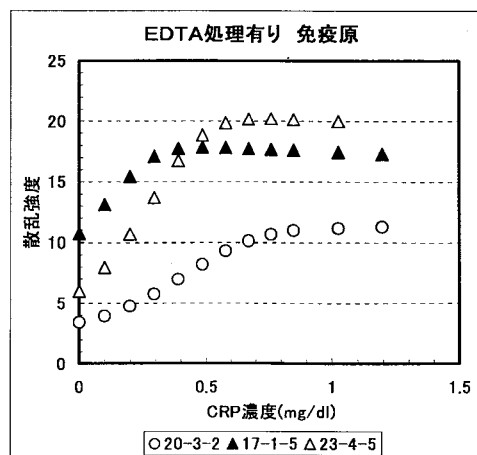
(54) 【発明の名称】 抗C反応性タンパク質抗体、この抗体を用いたバイオセンサ、この抗体の作製方法、及びこの抗体を用いた免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】 抗凝固剤であるEDTAなどのキレート試薬によって構造変化したCa欠損型CRPに対しても特異的に反応することが可能な抗CRP抗体及びその抗体作製方法と、それを用いた高感度・高性能なバイオセンサと免疫測定方法を提供する。

【解決手段】 抗体を得るための免疫時に、免疫原としてEDTA・2Kによる前処理を行ったCa欠損型CRPを接種する。EDTA・2Kを添加した状態でスクリーニング作業を行い、Ca欠損型CRPと特異的に反応する抗体を選択することで、精製CRP及び、Ca欠損型CRPのいずれにも特異的に反応することが可能な抗CRP抗体を取得することができる。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C 反応性タンパク質と特異的に反応する抗体であって、前記抗体は、キレート試薬にて予め前処理されカルシウム欠損型となった C 反応性タンパク質を免疫原として接種することによって得られたことを特徴とする抗 C 反応性タンパク質抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗 C 反応性タンパク質抗体において、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする、抗 C 反応性タンパク質抗体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗 C 反応性タンパク質抗体において、前記キレート試薬が、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムあるいはエチレンジアミン四酢酸二カリウムであることを特徴とする、抗 C 反応性タンパク質抗体。

【請求項 4】

抗 C 反応性タンパク質抗体は、前記抗体を含む溶液に C 反応性タンパク質を加え、所定の時間反応させた後に、C 反応性タンパク質の添加量に応じて光散乱強度が変化することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 記載の抗 C 反応性タンパク質抗体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗 C 反応性タンパク質抗体を利用して血液中の C 反応性タンパク質を測定するためのバイオセンサであって、乾燥多孔質担体上に、溶解し移動可能な標識試薬が保持されている標識試薬保持部と、特異的タンパク質が流出しないように固定化されている固定化部とが構成されており、前記標識試薬と前記特異的タンパク質のいずれか一方、あるいは双方が前記抗体から作られていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のバイオセンサにおいて、前記バイオセンサが乾式分析素子であることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のバイオセンサにおいて、前記バイオセンサが免疫クロマトセンサであることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 8】

請求項 5 に記載のバイオセンサにおいて、前記血液が、全血または血漿あるいは血清の何れかであることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 9】

C 反応性タンパク質に特異的に反応する抗体作製方法であって、前記抗体は、キレート試薬にて予め前処理されカルシウム欠損型となった C 反応性タンパク質を免疫原として接種することによって、抗体を得ることを特徴とする、抗体作製方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の抗体作製方法において、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする、抗体作製方法。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の抗体作製方法において、前記キレート試薬が、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムあるいはエチレンジアミン四酢酸二カリウムであることを特徴とする、抗体作製方法。

【請求項 12】

請求項 9 に記載の抗体作製方法によって得られた抗体を利用して血液中の C 反応性タンパク質を測定することを特徴とする、免疫測定方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の免疫測定方法において、
前記免疫測定方法が乾式分析素子を用いることを特徴とする、免疫測定方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 に記載の免疫測定方法において、
前記免疫測定方法が免疫クロマトセンサを利用することを特徴とする、免疫測定方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 に記載の免疫測定方法において、
前記血液が、全血または血漿あるいは血清の何れかであることを特徴とする、免疫測定方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C 反応性タンパク質と特異的に反応する新規抗体、その新規抗体を作製する抗体作製方法、及びその抗体を用いたバイオセンサと免疫測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

C 反応性タンパク質 (C - r e a c t i v e p r o t e i n ; 以下、CRP と記す) は、血漿タンパク質成分の 1 種である。通常、正常人血液中には微量 (1 μ g / ml 以下) しか認められないのに対して、細菌感染やウイルス感染のような炎症性疾患、又は心筋梗塞などの組織崩壊性疾患の際に血中濃度が急増することが知られている。この現象を利用して、CRP 検査は炎症性疾患又は組織崩壊性疾患の診断及び、その重傷度の判定や経過の観察及び予後の判定に有用とされている。

20

【0003】

また、CRP は 5 つのサブユニット (分子量約 21,000) から構成される 5 量体である。

【0004】

この CRP を測定する方法としては、定性法としての毛細管法や定量法としての一元免疫拡散法が主に用いられていたが、これらはいずれも判定までに非常に長時間を要する。そこで最近では、迅速性及び定量性の高いラテックス法や免疫比濁法を用いた自動分析機による CRP 測定方法が広く用いられるようになった。

30

【0005】

従来の技術としては、この免疫比濁法における測定感度向上のために、CRP の 5 つのサブユニットの側面に特異的に結合する抗体を用いて不溶性担体に固定化させた抗体と CRP との間で生じる凝集反応を測定する方法が知られている。(特許文献 1 参照。)

また、CRP と特異的に反応する抗体の作製方法として鶏卵由来の抗体を用いる方法が知られている。(特許文献 2 参照。)

これらの方法を含む従来の抗体作製方法としては、免疫原を免疫動物に数週間の期間をあけて数回接種する。十分に免疫されたことを確認した後に、免疫動物から取り出された脾臓細胞と、ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマ細胞を作製する。こうして得られた抗体をそのスクリーニングの状態に応じて、ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体と呼んでいる。この際、免疫する免疫原は測定したい対象物そのままを接種するのが常識とされている。あるいは、近年ではペプチド合成された抗原決定部位のみを接種して得る抗体作製方法が広く知られている。

40

【0006】

【特許文献 1】

特許第 2 8 4 0 8 5 2 号公報

【特許文献 2】

特開平 5 - 3 4 3 4 4 号公報

【0007】

50

【発明が解決しようとする課題】

近年、医療診断現場では、POCT (Point Of Care Testing; 以下POCTと記す) が次第に普及している。POCTにおいては、特に、迅速、簡便、正確に測定できる装置が望まれており、一般的に用いられる測定装置として、免疫クロマトセンサがある。この免疫クロマトセンサの代表例としては、抗体が固定化され、そのクロマト上流側に標識抗体が担持された展開層の一方の端に被検査溶液を添加する添加部分を、他方の端に流れてきた被検査溶液を吸収するための吸水部を具備して構成されており、添加部分に被検査溶液を必要量添加すると前記展開層を浸透して測定が開始され、抗体固定化部分に結合した標識抗体により測定結果は検出される。

【0008】

通常、生体内に存在するCRPは、一般的にカルシウム結合タンパク質と呼ばれ、そのタンパク質の立体構造中にカルシウム(以下、Caと記す。)を含んでいる。しかしながら、この構造中のCaは、キレート試薬と反応することによって奪われてしまう。例えば、採血時に用いられる抗凝固剤であるエチレンジアミン四酢酸二カリウム(以下、EDTA・2Kと記す。)の作用によってCa基はキレート化される為に、EDTA・2Kを抗凝固剤とした保存血液中に含まれるCRPの立体構造は、本来生体内に存在するものとは異なる構造となってしまう。その為、CRPを測定するためには、Ca欠損型CRPと特異的結合反応することのできる抗体が必要とされていた。

【0009】

一般的に、CRPを抗原として認識するためのエピトープはこのCa結合部位に多く存在すると言われており、市販されている人体から抽出・精製されて得られたCRP、あるいは遺伝子操作にて得られたリコンビナントCRPを抗原として動物に免疫して得られた抗体は、CRPに対しては特異的結合反応をするのに対し、Ca欠損型CRPに対してはそのほとんどが反応しないという結果が生じていた。すなわち、抗凝固剤であるEDTA・2Kの影響を受けたCRPは、構造変化を生じるため、通常のCRPに特異的に反応する抗体を用いてCRPの検出をしようとしても、EDTA・2Kを含む血液検体中のCRPに対しては特異的な反応がでないために、CRPの存在を正確に検出できず、誤判定を生じる結果となっていた。

【0010】

また、仮にCaを取り除いたCa欠損型CRPを免疫原として免疫動物に接種したとしても、生体内中に含まれるCaイオンがCa欠損型CRPに吸収され、本来のCaが補われた構造となり、本来のCRPの立体構造に対する抗CRP抗体が作製されと考えられていた。その為、Ca欠損型CRPに対する抗体は、CRPを免疫原として接種して得られる抗体の中からCa欠損型CRPにも結合する抗体を選別して得る他に方法はないと予測されていた。

【0011】

更に、例えそうしてCa欠損型CRPに対する抗体が得られたとしても、Ca欠損型CRPを認識する為のエピトープは非常に限られており、免疫比濁法に見られるような溶液中でCRPと抗体とを反応させて生じる反応度合を計測することには何ら差し障りはないものの、その抗体を免疫クロマトセンサ上に組み込む場合、CRPがもつ5量体の性質から、抗原抗体反応の際に立体障害を生じてしまい、反応性が上がらない、すなわち免疫クロマトセンサ上でのCRPの存在度合の計測は不可能であると言われてきた。

【0012】

本発明は、かかる問題点を解消するためになされたものであり、より好ましい抗CRP抗体を得るべく鋭意研究を重ねた結果、通常CRPにも、Ca欠損型CRPに対しても特異的結合反応を示し、かつ免疫クロマトセンサ上でも十分な反応性を示す抗体とその作製方法、及びその抗体を用いたバイオセンサと免疫測定方法を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

本発明の請求項 1 に係る抗 C R P 抗体は、C R P と特異的に反応する抗体であって、前記抗体は、キレート試薬にて予め前処理され C a 欠損型となった C R P を免疫原として接種することによって得られた抗 C R P 抗体であることを特徴とするものである。

【 0 0 1 4 】

本発明の請求項 2 に係る抗 C R P 抗体は、請求項 1 に記載の抗 C R P 抗体において、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とするものである。

【 0 0 1 5 】

本発明の請求項 3 に係る抗 C R P 抗体は、請求項 1 に記載の抗 C R P 抗体において、前記キレート試薬が、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムあるいはエチレンジアミン四酢酸二カリウムであることを特徴とするものである。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の請求項 4 に係る抗 C R P 抗体は、請求項 1 ~ 3 に記載の抗 C R P 抗体において、前記抗体を含む溶液に C 反応性タンパク質を加え、所定の時間反応させた後に、C 反応性タンパク質の添加量に応じて光散乱強度が変化することを特徴とするものである。

【 0 0 1 7 】

本発明の請求項 5 に係るバイオセンサは、請求項 1 に記載の抗 C 反応性タンパク質抗体を利用して血液中の C 反応性タンパク質を測定するためのバイオセンサであって、乾燥多孔質担体上に、溶解し移動可能な標識試薬が保持されている標識試薬保持部と、特異的タンパク質が流出しないように固定化されている固定化部とが構成されており、前記標識試薬と前記特異的タンパク質のいずれか一方、あるいは双方が前記抗体から作られていること

20

を特徴とするものである。

【 0 0 1 8 】

本発明の請求項 6 に係るバイオセンサは、請求項 5 に記載のバイオセンサにおいて、前記バイオセンサが乾式分析素子であることを特徴とするものである。

【 0 0 1 9 】

本発明の請求項 7 に係るバイオセンサは、請求項 5 に記載のバイオセンサにおいて、前記バイオセンサが免疫クロマトセンサであることを特徴とするものである。

【 0 0 2 0 】

本発明の請求項 8 に係るバイオセンサは、請求項 5 に記載のバイオセンサにおいて、前記血液が、全血または血漿あるいは血清の何れかであることを特徴とするものである。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の請求項 9 に係る抗体作製方法は、C 反応性タンパク質に特異的に反応する抗体において、前記抗体は、キレート試薬にて予め前処理され C a 欠損型となった C R P を免疫原として接種することによって、抗体を得ることを特徴とするものである。

【 0 0 2 2 】

本発明の請求項 1 0 に係る抗体作製方法は、請求項 9 に記載の抗体作製方法において、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とするものである。

【 0 0 2 3 】

本発明の請求項 1 1 に係る抗体作製方法は、請求項 9 に記載の抗体作製方法において、前記キレート試薬が、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムあるいはエチレンジアミン四酢酸二カリウムであることを特徴とするものである。

40

【 0 0 2 4 】

本発明の請求項 1 2 に係る免疫測定方法は、請求項 9 に記載の抗体作製方法において、前記抗体作製方法によって得られた抗体を利用して血液中の C R P を測定することを特徴とするものである。

【 0 0 2 5 】

本発明の請求項 1 3 に係る免疫測定方法は、請求項 1 3 に記載の免疫測定方法において、前記免疫測定方法が乾式分析素子を用いることを特徴とするものである。

【 0 0 2 6 】

本発明の請求項 1 4 に係る免疫測定方法は、請求項 1 3 に記載の免疫測定方法において、

50

前記免疫測定方法が免疫クロマトセンサを利用することを特徴とするものである。

【0027】

本発明の請求項15に係る免疫測定方法は、請求項13に記載の免疫測定方法において、前記血液が、全血または血漿あるいは血清の何れかであることを特徴とするものである。

【0028】

【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施の形態について、図面を参照しながら説明する。なお、ここで示す実施の形態はあくまでも一例であって、必ずしもこの実施の形態に限定されるものではない。

【0029】

10

(実施の形態1)

本発明によるCRPに対する抗CRP抗体は、新規マウス・ハイブリドーマ細胞を培地中などのイン・ビトロ、またはマウス腹腔内などのイン・ビボで培養することによって製造することができる。

【0030】

まず、精製ヒトCRPにキレート試薬を添加した後、しばらくインキュベートすることによってCRP中のCaが奪われたCa欠損型CRPが作製できる。これを免疫原として、マウスに接種する。数回の免疫を繰り返したマウスから脾臓細胞を取りだし、ハイブリドーマ細胞を作製する。

【0031】

20

ここで用いるマウス・ハイブリドーマ細胞は、一般的にはマウスの脾臓細胞とマウスのミエローマ細胞とを細胞融合することで製造することができる。

【0032】

このマウス・ハイブリドーマ細胞を培養して得られた培養液あるいはマウスの腹水から抗体を分離・精製する場合には、硫安沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの方法が用いられる。こうして得られた抗CRP抗体は、CRPとのみ特異的に結合反応する能力を有する。しかも、この発明による抗CRP抗体は、通常のCRPのみならず、Ca欠損型CRPとも特異的に反応することが可能である。更に、この抗CRP抗体を標識物に標識した標識試薬として免疫クロマトセンサに組み込んだ場合、通常の抗CRP抗体を用いた免疫クロマトセンサと比較して、呈色反応が著しく上昇することが確認されている。

30

【0033】

その確認方法としては、標識物に抗体を結合させた標識抗体に対して濃度の異なるCRPを添加し、その光散乱強度を測定する。この方法によって確認された抗体であり、CRPの濃度上昇に応じて光散乱強度も上昇する抗体であれば、クロマトセンサ上で標識試薬として用いた場合、呈色反応が著しく上昇することが確認されている。

【0034】

(実施の形態2)

図5(A)(B)は、本実施の形態2によるクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを示す図である。

40

【0035】

図5(A)に示されるように、本実施の形態2によるバイオセンサは、ニトロセルロース等からなる反応層2上に、CRPと反応する抗体Aが標識された標識試薬が溶解可能に保持された標識試薬保持部位3と、特異的タンパク質である抗CRP抗体Bが固定化された抗体固定化部4が形成されており、その反応層2と、液体試料を毛細管現象により一定量だけ吸引するためのキャピティ部7と液体試料を最終的に吸収する吸水部5とがプラスチック等からなる担体支持体1の上部に形成されている。また、キャピティ部7の先端は液体試料を吸引するための入口である試料吸引部9があり、キャピティ部7と反応層2との間には、赤血球などの細胞成分を収縮させる働きがある細胞収縮剤が溶解可能に保持された収縮剤保持部位6があり、反応層2の表面及び側面は液体不透過性シート8で覆われて

50

いる。

【0036】

なお、ここで示す特異的タンパク質とは、特異的に結合反応するタンパク質を指し、分析対象物に対する抗体あるいは、標識試薬に対する抗体などが挙げられる。

【0037】

収縮剤保持部位6が保持する細胞収縮剤は、例えば、無機塩、アミノ酸、及び糖類等である。なお、ここで無機塩とは、塩化ナトリウムや塩化カリウム、リン酸ナトリウム等、塩を含む無機化合物を示す。また、ここでアミノ酸とは、グリシンやグルタミン酸等同一分子内にカルボキシル基とアミノ基とを有する化合物を示し、プロリンやヒドロキシルプロリンのようなイミノ酸も含む。また、ここで糖類とは、グルコースやスクロース、トレハロース等の糖質や、グルシトール等の糖アルコールを示す。

10

【0038】

ここで用いている抗体Aと抗体Bは、本発明による抗体であり、免疫原としてCa欠損型CRPを用いることで得られた抗体であり、好ましくは光散乱強度が添加するCRPの量に応じて上昇するものであるのがよい。

【0039】

また、標識試薬保持部位3が保持する標識試薬は、金コロイド等の金属ゾルや、非金属ゾル、染料ゾル、着色粒子、色素、酵素、タンパク質等を示す。

【0040】

次に、本実施の形態2によるバイオセンサを用いた免疫測定方法について説明する。

20

【0041】

まず、血液などの液体試料が試料吸入部9に添加されると、キャビティ部7による毛細管現象によって一定量の液体試料が吸引される。液体試料が吸引されると、収縮剤保持部位6に保持されている収縮剤が、液体試料の浸透により溶解され、細胞成分を収縮させる。これにより液体試料は、細胞成分が混在下状態でも、目詰まりを起こすことなく反応層2をクロマト下流側に浸透していく。

【0042】

次いで、収縮された細胞成分が混在する液体試料が、標識試薬保持部位3に達すると、標識試薬保持部位3に保持された標識試薬が、液体試料の浸透により溶解され、反応層2上に浸透・展開する。このとき、液体試料中に分析対象物であるCRPが存在すれば、標識試薬に標識されている抗CRP抗体Aとの結合反応が行われる。

30

【0043】

そして、反応層2の領域上の抗体固定化部4に標識試薬が到達する。このとき、液体試料中に分析対象物が存在すれば、抗体固定化部4の抗CRP抗体BとCRPとの結合反応が行われる。液体試料中のCRPは、反応層2上を展開する過程で既に標識試薬と結合反応しており、抗体固定化部4に何らかの呈色反応が見られる。もし、液体試料中に分析対象物が存在しなければ、標識試薬と固定化抗体においては何ら特異的結合反応は行われないうために、呈色反応は生じない。

【0044】

最終的に、液体試料は吸水部5に吸収され反応は終了する。

40

【0045】

このように、本実施の形態2によるバイオセンサ、及び免疫測定方法によれば、収縮剤保持部位に保持された細胞収縮剤が、液体試料中の細胞成分を収縮させるようにしたので、細胞成分が混在した状態でも液体試料が目詰まりを起こすことなくクロマト下流側に浸透するようになり、抗凝固剤を含まない全血あるいは、抗凝固剤によって処理された血液のいずれを検体としてもCRPの測定が可能で、簡便かつ迅速な高精度の免疫測定を行うことができる。

【0046】

なお、上記実施の形態2によるバイオセンサは、その吸水部を省いた反応層のみからなる単層の構成にしてもよい。

50

【0047】

また、ここでは標識試薬は抗CRP抗体Aが標識されたものとし、固定化部にも特異的タンパク質である抗CRP抗体Bが固定化されている免疫反応のうちサンドイッチ反応の一つを例に挙げ記しているが、CRPを予め標識した標識試薬を利用し、液体試料中のCRPとの固定化抗体に対する競争反応による競合反応を用いても何ら問題はなく、本発明により作製された抗体を少なくとも1つ使用した抗原抗体反応の原理を利用したものであれば、前記1例であるサンドイッチ反応または競合反応などの反応系は、前記の形態以外を用いても何ら差し障りはない。

【0048】

【実施例】

以下の実施例により、本発明を実施する方法をさらに詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例になんら制約されるものではない。

実施例1.

(抗体の採取)

マウスへ調整した免疫原を接種し、その後細胞融合及び培養とスクリーニングをくり返して抗CRPモノクローナル抗体を作製した。

【0049】

a) 免疫原の調製

精製ヒトCRP (ADVYケミカル社製) 10mgに対して、EDTA・2Kを100mg添加し、溶解させる。十分に反応させた後に、PBS (Phosphate Buffer Saline) にて透析しながらセントリプラス遠心式フィルターユニット (アミコン社製) を用いて濃縮、最終濃度1mg/mlにしたCa欠損型CRPを調製する。

【0050】

1mg/mlに調整した上記Ca欠損型CRP溶液1mlに対して、アジュバントを1mlを加え、混合溶液が乳化するまで混合して免疫原を調整する。

【0051】

b) マウスへの免疫

ヌードマウスを準備し、上記調整された免疫原をマウス腹腔内に200 μ l接種する (第1回免疫)。接種から2週間経過後に再び免疫原を接種して免疫を行い、2週間毎の免疫を4回以上くり返した。

【0052】

c) 細胞融合および培養

十分に免疫され、IgG (Immuno Globuline G) が産生されていることをELISA法によって確認した後に、最終免疫を行い、その3日後、マウスより脾臓細胞を取り出す。このマウス脾臓細胞とマウスミエロマ細胞とを融合し、CRPに特異的に反応する抗体を分泌することを特徴とするハイブリドーマ細胞を作製する。

【0053】

ハイブリドーマ細胞の増殖状態を確認しながら、10日目にELISA法によってCRP抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。

【0054】

こうして得られたハイブリドーマ細胞を培養し、限界希釈法によるクローニングの作業をくり返すことで、Ca欠損型CRPとの反応性の好ましい、増殖の良い、抗体分泌能の高い安定なモノクローナル抗体産生細胞株を選択する。このクローニング作業を行わないハイブリドーマ細胞を用いることでポリクローナル抗体を得ることもできる。

【0055】

上記で得られた細胞株を、イン・ビトロ (例えば培地中) またはイン・ビボ (例えばマウスの腹腔内) で培養することによって、抗CRPモノクローナル抗体を製造することができる。イン・ビトロの場合には例えば培地中で5%CO₂濃度及び37 $^{\circ}$ Cで約3日間の経代培養を繰り返し、またイン・ビボ例えばマウスの腹腔内で培養する場合には最低1 \times 10⁵ Cell/mlに培養された細胞を接種した後に約14日間培養する。

10

20

30

40

50

【0056】

d) 抗体の精製

このようにして製造された培養液又はマウスの腹水からアフィニティカラムクロマトグラフィーを利用してモノクローナル抗体を分離・精製する。

【0057】

Protein A Sepharose 4 Fast Flow (ファルマシア製) を充填したカラムに培養液を浸透させ、モノクローナル抗体とProtein Aとを十分に結合反応させる。展開用Buffer (3M NaCl - 1.5M Glycine pH 8.9) を用いてProtein Aと結合していない余分なタンパク質を除去した後、pH 4の溶出Buffer (0.1Mクエン酸Buffer) を用いて、抗体を溶出させる。こうして単離・精製されたモノクローナル抗体溶液をPBS・Azを用いて透析し、限外濾過装置を用いて濃縮し、モノクローナル抗体溶液として保管する。

10

実施例 2 .

(モノクローナル抗体の光散乱強度の確認)

金コロイドにモノクローナル抗体を標識し、標識試薬である標識抗体を作製した後、この標識抗体溶液にCRP溶液を加え、その光散乱強度を測定した。

【0058】

a) 金コロイドの調製

金コロイドは、0.01%塩化金酸の還流中の100溶液に1%クエン酸3ナトリウム溶液を加えることによって調製した。還流を15分間続けた後に、室温放置にて冷却した。0.2Mの炭酸カリウム溶液によって、pH 9に調製した前記金コロイド溶液に、上記方法によって得られた抗CRP抗体を加えて数分間攪拌した後に、pH 9の10%BSA (牛血清アルブミン) 溶液を最終1%になる量だけ加えて攪拌することで、抗体-金コロイド複合体 (標識抗体) を調製した。前記標識抗体溶液を4、20000Gで50分間遠心分離することによって、標識抗体を単離して、それを洗浄緩衝液 (1%BSA・リン酸緩衝液) 中に懸濁した後に、前記遠心分離を行って、標識抗体を洗浄単離した。この標識抗体を洗浄緩衝液で懸濁して、0.8µmのフィルタにて濾過した後に、当初の金コロイド溶液量の10分の1に調製して、4で貯蔵した。

20

【0059】

b) 光散乱強度の測定

免疫比濁法を用いて、抗原抗体反応に伴う凝集複合体量を光散乱強度で測定し、抗原量に伴う凝集反応による変化の確認を行った。CRPの場合、多価抗原 (5量体) であるから標識に用いられる抗体がポリクローナル抗体でない、すなわちモノクローナル抗体であっても凝集複合体を形成するので、抗原量に応じて光散乱強度に上昇変化が生じる。ここでは蛍光分光計 (RF-5300PC; 島津製作所製) をもちいて、分光器条件を励起側、蛍光側、いずれも700nmに設定して計測を行った。

30

【0060】

反応セルにPBS・4%PEG (Mw 6000) 溶液890µl、及び数種類の濃度に調整されたCRP溶液 (PBS) をそれぞれ45µl加えて攪拌させた。その後、測定を開始してから、10秒後に1mg/mlに調整された選別対象抗体を35µl添加して、さらに20秒間攪拌させた後に、攪拌を停止し引き続き測定を行い、5分後の光散乱強度を測定した。なお、ここで示す反応時間は一例であって、上記以外の時間であっても何ら差し障りない。

40

【0061】

図1、2は、本発明の実施例2による添加するCRP濃度の変化による光散乱強度の変化を示す図である。図1は、免疫原として精製ヒトCRPをそのまま接種して得られた抗Ca欠損型CRP抗体の光散乱強度を、図2は、免疫原として精製ヒトCRPにEDTAを加え予めCa欠損型CRPとして調整されたCRPを接種して得られた抗Ca欠損型CRP抗体の光散乱強度を示す。図1では、4種類の抗体全てが添加されたCRPの濃度変化に対して光散乱強度に変化は見られないが、図2では3種類の抗体全てが、添加されるC

50

R P濃度が上昇するのに比例して光散乱強度も上昇していることがわかる。抗原抗体反応は、本来、濃度依存性であるため、図2のような、濃度に応じた上昇変化から、通常の確実な抗原抗体反応が起こったことが明白である。

【0062】

このように、免疫原として予め処理したCRPを接種したものとそうでないものとは、得られた抗体の反応性が異なることがこの結果から判断することができる。

【0063】

図3は、我々が作製した抗体を免疫原別に光散乱強度の上昇有無をまとめたものである。この表からは、EDTAによる前処理をしていない抗体20種類全てに関し、光散乱強度が上昇変化しないのに対して、驚くべきことにEDTAによる前処理を行ったCa欠損型CRPを免疫原として得られた抗体3種類については、すべて光散乱強度の上昇変化が見られた。このことから、免疫原の前処理によって明らかに性状の異なる抗体が得られると判断することが可能である。

実施例3.

(クロマトグラフィーを利用したバイオセンサによる性能確認)

ニトロセルロース膜上に抗CRP抗体B固定化ライン、及び抗CRP抗体Aと金コロイドとの複合体の含浸部を含むバイオセンサを製造した。このバイオセンサは、図5に示されるような形状の免疫クロマトセンサであり、次のようにして製造した。

【0064】

a) バイオセンサの調製

リン酸緩衝溶液にて希釈して濃度調整をした抗CRP抗体B溶液を準備した。この抗体溶液を、溶液吐出装置を用いてニトロセルロース膜上に塗布した。これにより、ニトロセルロース膜上に検出用の抗体固定化ラインが得られた。このニトロセルロース膜を乾燥後、1%スキムミルクを含有するTris-HCl緩衝溶液中に浸漬して30分間緩やかに振った。30分後、Tris-HCl緩衝溶液槽に膜を移動し、10分間緩やかに振った後に、別のTris-HCl緩衝溶液槽にて更に10分間緩やかに振り、膜の洗浄を行った。2度洗浄を行った後に、膜を液槽から取り出して、水気を切り室温で乾燥させた。

【0065】

金コロイドは、0.01%塩化金酸の還流中の100溶液に1%クエン酸3ナトリウム溶液を加えることによって調製した。還流を15分間続けた後に、室温放置にて冷却した。0.2Mの炭酸カリウム溶液によって、pH9に調製した前記金コロイド溶液に、抗CRP抗体Aを加えて数分間攪拌した後に、pH9の10%BSA(牛血清アルブミン)溶液を最終1%になる量だけ加えて攪拌することで、抗体-金コロイド複合体(標識抗体)を調製した。前記標識抗体溶液を4、20000Gで50分間遠心分離することによって、標識抗体を単離して、それを洗浄緩衝液(1%BSA・リン酸緩衝液)中に懸濁した後に、前記遠心分離を行って、標識抗体を洗浄単離した。この標識抗体を洗浄緩衝液で懸濁して、0.8μmのフィルタにて濾過した後に、当初の金コロイド溶液量の10分の1に調製して、4で貯蔵した。

【0066】

前記標識抗体溶液を溶液吐出装置にセットして、抗CRP抗体B固定化乾燥膜上の抗体固定化位置から離れた位置に塗布した後に、膜を乾燥させた。これによって、固定化膜上に標識試薬保持部位を持つ反応層担体が得られた。

【0067】

次に、上記のように調製された標識試薬を含む反応層担体を、厚さ0.25mmの白色PET(Polyethylene terephthalate)からなる基板上に貼り付け、更にこの反応層担体上部の標識試薬保持部分から終端部分にかけて、標識試薬保持部分の一部と終端部の一部を解放した状態で厚さ100μmの透明PETからなる液体不透過性シートを貼り付け、その後、2.5mmの幅でCO₂レーザーを用いて裁断した。この反応層担体の液体不透過性シートを貼り付けていない始端部分上に、幅2mm×長さ7mm×厚さ0.2mmのキャビティ部を形成し、これを試料吸入部とした。前記キャ

10

20

30

40

50

ピティ部には予め、1.5 Mに調製された塩化カリウム水溶液を点着した後に、液体窒素にて直ちに凍結し、凍結乾燥を行い、これによって、塩化カリウムが乾燥状態で保持された細胞収縮剤保持部を持つキャビティ部として作製されているものを用いる。こうしてバイオセンサを製造した。

【0068】

こうして調製された標識試薬保持部位を含む反応層を、担体支持体上に貼付け、試料吸入部として収縮剤保持部を含むキャビティ部を、ガラス繊維濾紙を吸水部として、付け加えてから0.5 cm幅の細片に切断して、バイオセンサを作製した。

【0069】

b) 試料の調製

抗凝固剤としてEDTA・2Kを加えた人の血液を、ヘマトクリット値45%になるように調製した。この血液に既知濃度のCRP溶液を加えることにより、さまざまな既知濃度のCRP溶液を調製した。

【0070】

c) バイオセンサ上の呈色度合の測定

バイオセンサ上の試料導入部にCRPを含む全血を5 μ l程度添加して、終端部方向へと展開処理して、抗原抗体反応をさせて抗体固定化部における呈色反応を行った。このバイオセンサへの試料添加から5分後の呈色状況を反射吸光度測定器にて計測した。さらに、この際の呈色部と反応層部分のバックグラウンド値とを計測しそのS/N比を比較した。

【0071】

図4は、本発明の実施例3によるバイオセンサの、反応部である抗体固定化部における呈色状況を示す図である。標識抗体としては、EDTA・2Kによる前処理を行ったCa欠損型CRPを免疫して得られた抗体と、EDTA・2Kによる前処理をしていない精製ヒトCRPを免疫して得られた抗体2種類をそれぞれ金コロイドに標識したものであり、固定化抗体にはいずれも同じ抗体を使用している。また、この3種類の抗体はアフィニティが同程度のものを選択し、標識抗体とした。この図4の結果から明らかなように、EDTA・2Kによる前処理を行ったCa欠損型CRPを免疫原として得られた抗体を標識抗体とした場合、EDTA・2Kによる前処理を行っていない精製ヒトCRPを免疫原として得られた抗体2種類の標識抗体による性能と比べ、驚くべきことに、呈色強度が明らかに高く、CRP高濃度領域においても十分に反応していることがうかがえる。また、直線領域が広く、この抗体を用いたバイオセンサであれば、測定レンジの広い高性能なCRP測定用バイオセンサを提供することが可能となる。

【0072】

以上の結果から、本実施例3によるバイオセンサに使用された抗Ca欠損型CRP抗体は、血液中のCRPの免疫測定において、その性能及び、測定可能領域の向上に大きく寄与していることがわかる。

【0073】

なお、上記実施例3によるバイオセンサには、ニトロセルロースやガラス繊維濾紙のような、任意の多孔質性担体で構成されたクロマトグラフィー材料が用いられており、一般に、このような材料からなるバイオセンサは、抗原抗体反応の測定原理を用いて、ある特定物質を分析検出し、定性または定量する機能を持っている。ここで、上記実施例3では、反射吸光度測定器を用いて呈色強度を測定し、全血中のCRP濃度を定量する方法について説明を行ったが、このバイオセンサを用いて反射吸光度測定器を用いずに定性判断を行うに関しても何ら問題はなく、EDTA・2Kを抗凝固剤として採血された血液を用いての性能評価を例に出したが、EDTA・2K以外の抗凝固剤、例えばヘパリンなどで採血された血液や、抗凝固剤を用いずに採血された血液を検体として評価しても何ら問題はない。

【0074】

また、サンドイッチ反応を用いたバイオセンサの構成及びそれを用いての反応測定について述べたが、の反応形態としては競合反応を用いてもよく、抗原抗体反応を用いて、その

10

20

30

40

50

反応系の中に本発明にて作製された抗体を少なくとも一つ用いているものであれば何を用いてもかまわない。

【0075】

【発明の効果】

本発明の請求項1に係る抗CRP抗体は、CRPと特異的に反応する抗体であって、前記抗体は、キレート試薬にて予め前処理されCa欠損型となったCRPを免疫原として接種することによって得られた抗体であり、かつCRP及びCa欠損型CRPのいずれにも特異的に反応することを特徴とする。その抗体は、Ca欠損型CRP、Caを含むCRP、Ca欠損型CRPにCaを加え補った状態のCRP、のいずれに対しても特異的に反応することが可能であり、CRPが本来の立体構造をしていても、Ca欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行うことができる。

10

【0076】

なおここで示すキレート試薬とは、不対電子をもち金属イオンと配位結合を生じる二つ以上の電子供与性基をもつ多座配位子の事をいい、例えばEDTAのようなポリアミノカルボン酸類や、クエン酸のようなオキシカルボン酸類、ジメチルグリオキシム、オキシシなどがあ

【0077】

本発明の請求項2に係る抗CRP抗体は、請求項1に記載の抗CRP抗体において、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする。その抗体は、Ca欠損型CRP、Caを含むCRP、Ca欠損型CRPにCaを加え補った状態のCRP、のいずれに対しても特異的に反応することが可能であり、CRPが本来の立体構造をしていても、Ca欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行うことができる。また、モノクローナル抗体であるため、特異的結合反応を行う性能の安定が可能となる。

20

【0078】

本発明の請求項3に係る抗CRP抗体は、請求項1に記載の抗CRP抗体において、前記キレート試薬が、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムあるいはエチレンジアミン四酢酸二カリウムであることを特徴とし、抗凝固剤として用いられる試薬によってCa欠損型CRPを調製していることから、生体内血液中に存在するCRPに対しても、抗凝固剤が添加されている採血済血液中のCRPに対しても、確実に結合することが可能となる。

【0079】

本発明の請求項4に係る抗CRP抗体は、請求項1～3に記載の抗CRP抗体において、抗C反応性タンパク質抗体は、前記抗体を含む溶液にC反応性タンパク質を加え、所定の時間反応させた後に、C反応性タンパク質の添加量に応じて光散乱強度が変化することを特徴とする。その抗体は、Ca欠損型CRP、Caを含むCRP、Ca欠損型CRPにCaを加え補った状態のCRP、のいずれに対しても特異的に反応することが可能であり、CRPが本来の立体構造をしていても、Ca欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行うことができる。また、その抗体は、CRPの濃度に応じて散乱強度が変化することから、その抗体を用いることで、CRPを定量的に、高感度かつ高性能に測定することが可能となる。

30

【0080】

なお、ここで示す光散乱強度とは、単色光を入射し溶液中を通過させた際に観測される光の直進方向以外において放射された光である散乱光の強度を示す。

【0081】

本発明の請求項5に係るバイオセンサは、請求項1に記載の抗C反応性タンパク質抗体を利用して血液中のC反応性タンパク質を測定するためのバイオセンサであって、乾燥多孔質担体上に、溶解し移動可能な標識試薬が保持されている標識試薬保持部と、特異的タンパク質が流出しないように固定化されている固定化部とが構成されており、前記標識試薬と前記特異的タンパク質のいずれか一方、あるいは双方が前記抗体から作られていることを特徴とし、Ca欠損型CRP、Caを含むCRP、Ca欠損型CRPにCaを加え補った状態のCRP、のいずれに対しても特異的に反応することが可能である。その為、その

40

50

抗体を用いればCRPが本来の立体構造をしていても、Ca欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行うことができ、血液中のCRPを測定する際に、血液の抗凝固剤の影響を受けずにCRPを検出することが可能であり、高感度かつ高性能なバイオセンサを提供することができる。

【0082】

なお、ここで示す特異的タンパク質とは、分析対象物であるCRPと特異的に反応することが可能なタンパク質を示す。

【0083】

本発明の請求項6に係るバイオセンサは、請求項5に記載のバイオセンサにおいて、前記バイオセンサが乾式分析素子であることを特徴としたので、バイオセンサ全体が乾燥担体であることから持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いが容易で、簡便かつ迅速に、より高い精度のバイオセンサを提供することが可能となる。

10

【0084】

本発明の請求項7に係るバイオセンサは、請求項5に記載のバイオセンサにおいて、前記バイオセンサが免疫クロマトセンサであることを特徴としたので、特別な測定機器を利用しなくとも、検体を添加することで、いつでも・何処でも・誰でも測定することが可能で、簡便かつ迅速に、より高い精度のバイオセンサを提供することが可能となる。

【0085】

なお、ここで示す免疫クロマトセンサとは、吸水性に優れたクロマトデバイス上に液体試料を展開しながら抗原抗体反応を利用して分析対象物の検出を行う方法を示し、サンドイッチ反応及び競合反応のいずれの方法を用いてもよい。

20

【0086】

本発明の請求項8に係るバイオセンサは、請求項5に記載のバイオセンサにおいて、前記血液が、全血または血漿あるいは血清の何れかであることを特徴としたので、検体がいかなる状態のものであっても、いかなる抗凝固剤を用いていても測定することが可能で、簡便かつ迅速に、より高い精度のバイオセンサを提供することが可能となる。

【0087】

本発明の請求項9に係る抗体作製方法によれば、CRPに特異的に反応する抗体において、キレート試薬にて予め前処理されCa欠損型となったCRPを免疫原として接種することによって、Ca欠損型CRP、Caを含むCRP、Ca欠損型CRPにCaを加え補った状態のCRP、のいずれに対しても特異的に反応することが可能である。その為、CRPが本来の立体構造をしていても、Ca欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行う抗体を作製することができる。

30

【0088】

本発明の請求項10に係る抗体作製方法によれば、請求項9に記載の抗体作製方法において、前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴としたので、Ca欠損型CRP、Caを含むCRP、Ca欠損型CRPにCaを加え補った状態のCRP、のいずれに対しても特異的に反応することが可能である。その為、CRPが本来の立体構造をしていても、Ca欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行う抗体が入手できる。また、モノクローナル抗体であるため、特異的結合反応を行う性能の安定した抗体を常に維持し続けることが可能となる。

40

【0089】

本発明の請求項11に係る抗体作製方法によれば、請求項9に記載の抗体作製方法において、前記キレート試薬が、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムあるいはエチレンジアミン四酢酸二カリウムであることを特徴とし、抗凝固剤として用いられる試薬によってCa欠損型CRPを調製していることから、生体内血液中に存在するCRPに対しても、抗凝固剤が添加されている採血済血液中のCRPの対しても確実に結合することの可能な抗CRP抗体を作製することが可能となる。

【0090】

50

本発明の請求項 1 2 に係る免疫測定方法によれば、請求項 9 に記載の抗体作製方法において、前記抗体作製方法によって得られた抗体を利用して血液中の C R P を測定すること特徴とし、C a 欠損型 C R P、C a を含む C R P、C a 欠損型 C R P に C a を加え補った状態の C R P、のいずれに対しても特異的に反応することが可能である。その為、その抗体を用いれば C R P が本来の立体構造をしていても、C a 欠損型の構造をしていても確実に特異的結合反応を行うことができることから、血液中の C R P を測定する際に、血液の抗凝固剤の影響を受けない免疫測定を行うことができる。

【 0 0 9 1 】

本発明の請求項 1 3 に係る免疫測定方法によれば、請求項 1 2 に記載の免疫測定方法において、前記免疫測定方法が乾式分析素子を用いることを特徴とし、バイオセンサ全体が乾燥担体であることから持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いが容易で簡便かつ迅速に、より高い精度の免疫測定を行うことが可能となる。

10

【 0 0 9 2 】

本発明の請求項 1 4 に係る免疫測定方法によれば、請求項 1 2 に記載の免疫測定方法において、前記免疫測定方法が免疫クロマトセンサを利用することを特徴とし、特別な測定機器を利用しなくとも、検体を添加することでいつでも・何処でも・誰でも測定することが可能で、簡便かつ迅速に、より高い精度の免疫測定を行うことが可能となる。

【 0 0 9 3 】

本発明の請求項 1 5 によれば、請求項 1 2 に記載の免疫測定方法において、前記血液が、全血または血漿あるいは血清の何れかであることを特徴とし、検体がいかなる状態のものであっても、いかなる抗凝固剤を用いていても測定することが可能で、簡便かつ迅速に、より高い精度の免疫測定を行うことが可能となる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 免疫原として、E D T A ・ 2 K による前処理を行っていない精製ヒト C R P を用いて得られた抗体の光散乱強度を示す図

【 図 2 】 免疫原として、E D T A ・ 2 K による前処理を行った C a 欠損型精製ヒト C R P を用いて得られた抗体の光散乱強度を示す図

【 図 3 】 免疫原別に得られた抗体の光散乱強度の上昇の有無をまとめた図

【 図 4 】 本発明の実施の形態 2 によるバイオセンサ上に、免疫原別に得られた抗体を標識抗体として使用した際の測定結果を示す図

30

【 図 5 】 (A) 本発明の実施の形態 2 によるバイオセンサを示す分解斜視図

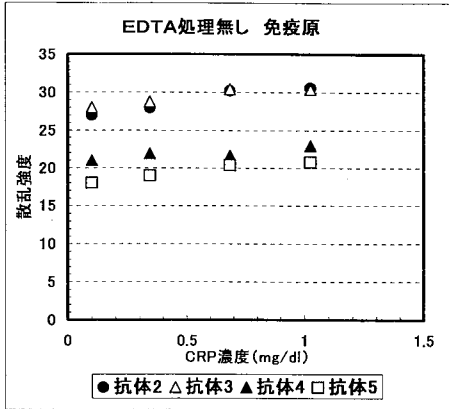
(B) 本発明のバイオセンサの液体不透過性シート 8 を透かして示す斜視図

【 符号の説明 】

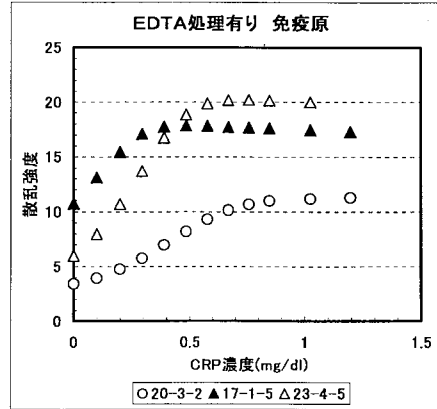
- 1 担体支持体
- 2 反応層
- 3 標識試薬保持部位
- 4 抗体固定化部
- 5 吸水部
- 6 収縮剤保持部位
- 7 キャビティ部
- 8 液体不透過性シート
- 9 試料吸入部

40

【 図 1 】



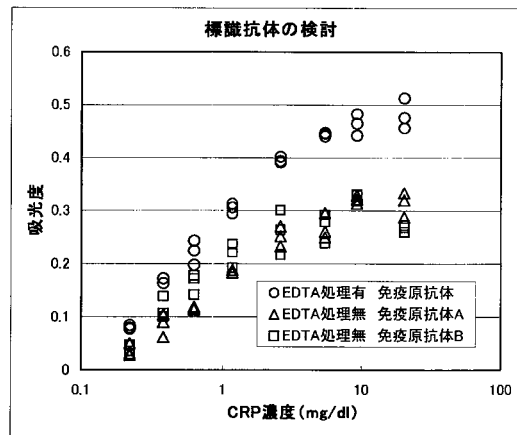
【 図 2 】



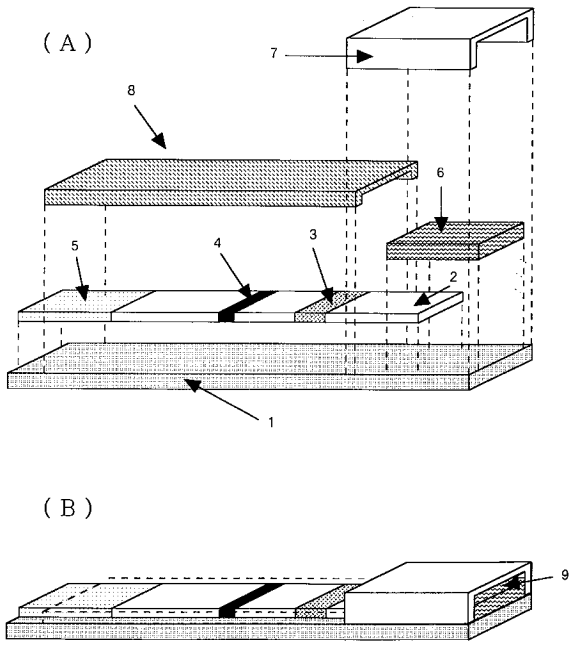
【 図 3 】

免疫原	抗体No.	散乱強度の上昇
EDTA による 処理無し	4-57-40	×
	4-11-8	×
	4-73-25	×
	3-10-3	×
	3-21-12	×
	3-61-23	×
	3-94-8	×
	4-2-4	×
	3-2-15	×
	3-72-5	×
	3-105-17	×
	4-23-2	×
	3-62-4	×
	3-65-5	×
	4-79-4	×
	3-24-7	×
	3-55-5	×
	1-14-17	×
1-371-13	×	
3-107-27	×	
EDTA による 処理有り	17-1-5	○
	20-3-2	○
	23-4-5	○

【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 中山 浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13

4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 EA52 FA72 GA26

专利名称(译)	抗C反应蛋白抗体，使用该抗体的生物传感器，该抗体的制备方法和使用该抗体的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2004189665A	公开(公告)日	2004-07-08
申请号	JP2002359053	申请日	2002-12-11
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	高橋三枝 灘岡正剛 中山浩		
发明人	高橋 三枝 灘岡 正剛 中山 浩		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/543		
FI分类号	C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.X G01N33/543.521		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	内藤裕树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够与钙缺乏型CRP特异性反应的抗CRP抗体，该螯合剂的结构被螯合剂（如抗凝剂EDTA）改变，该抗体的制备方法以及使用该抗体的高灵敏度·提供高性能的生物传感器和免疫测定方法。 解决方案：在进行免疫以获得抗体时，接种了用EDTA·2K预处理的缺钙CRP作为免疫原。 通过添加EDTA·2K进行筛选，然后选择与缺钙CRP特异性反应的抗体，可以与纯化的CRP和缺钙的CRP特异性反应。 可以获得抗CRP抗体。 [选择图]图2

