

(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2004-301646

(P2004-301646A)

(43) 公開日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/531

F I

GO 1 N 33/543 5 8 3

GO 1 N 33/531 B

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2003-94616 (P2003-94616)

(22) 出願日 平成15年3月31日 (2003.3.31)

(71) 出願人 390014960

シスメックス株式会社

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

(74) 代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(74) 代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(72) 発明者 松井 勝弘

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(72) 発明者 宮地 峰輝

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫検査用非特異反応吸収剤

(57) 【要約】

【課題】より効果的な非特異反応抑制効果が得られる非特異反応吸収剤を提供し、非特異反応の抑制された測定方法を提供することを課題とする。

【解決手段】免疫検査に使用する抗原又は抗体の産生細胞と同種の細胞で、前記抗原又は抗体を含まない細胞成分の水抽出物を加熱処理し、生成した不溶性画分を該水抽出物から除去して得られた免疫検査用非特異反応吸収剤による。また、該免疫検査用非特異反応吸収剤を免疫検査の反应用緩衝液に添加した測定方法による。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫検査に使用する抗原又は抗体の産生細胞と同種の細胞で、前記抗原又は抗体を含まない細胞成分の水抽出物を加熱処理し、生成した不溶性画分を該水抽出物から除去してなる免疫検査用非特異反応吸収剤。

【請求項 2】

抗原又は抗体の産生細胞が大腸菌である請求項 1 に記載の免疫検査用非特異反応抑制物質。

【請求項 3】

加熱処理温度が、80℃～100℃である請求項 1 又は 2 に記載の免疫検査用非特異反応吸収剤。 10

【請求項 4】

加熱処理時間が 3 分～10 分である請求項 1～3 のいずれか 1 に記載の抗体検出用試薬の非特異反応吸収剤。

【請求項 5】

加熱処理が非加圧条件下で行われることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 に記載の抗体検出用試薬の非特異反応吸収剤。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか 1 に記載の非特異反応吸収剤を含む免疫検査用試薬。

【請求項 7】

請求項 1～5 のいずれか 1 に記載の非特異反応吸収剤を使用する免疫検査方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、各種細胞により産生された抗原または抗体を用いて免疫検査を行う場合の非特異反応吸収剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

臨床検査で用いられる免疫検査法としては、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、免疫比濁法、ラテックス凝集法等の種々の検査方法が公知であるが、いずれの場合も測定 30
の目的とする抗原又は抗体と、それに反応する抗体又は抗原を反応させることにより測定が行われる。検体中の抗原、抗体等を免疫測定する方法は、例えば対応する抗体、抗原等を免疫測定用の固相に結合させて感作し、試薬と検体とを反応させ、この固相での免疫反応により免疫複合体を形成させて結合する抗原、抗体等を測定する。例えば検体中の抗体を測定する場合には、抗原を結合した固相が用いられる。この抗原は、生体や培養液から得られた天然型蛋白質、遺伝子組換え法によって製造した組換え蛋白質、アミノ酸を縮合反応させて製造した合成蛋白質等が知られている。遺伝子組換え技術が開発されて以来、所望の抗原をコードする遺伝子を組み込んだ宿主細胞を培養することによって、均一な性質を有する蛋白質を大量かつ安価に、また感染の危険を伴うことなく得ることができるようになった。さらに、遺伝子組換え蛋白質は検体中の抗体との特異的な反応性が高いため、免疫検査 40
において広く用いられるようになった。

【0003】

例えば、肝炎ウイルス、HIVウイルス、HTLVウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルスなどの関連抗原が遺伝子組換え技術によって製造され、実際に診断薬に利用されている。

【0004】

抗原又は抗体産生細胞から目的とする抗原又は抗体を生成して得たものを固相に感作して免疫測定を行う場合に、所望の抗原又は抗体の他に産生細胞成分が固相に感作されることがある。このような場合に、測定試薬や測定検体中に産生細胞成分と反応しうる物質が混入していると、産生細胞成分と該反応しうる物質が免疫複合体を形成することで、所望の 50

測定結果が得られない。このような非特異反応を回避する方法が検討されてきた。例えば、抗原産生に利用する宿主となる細菌と同種細菌成分を反応液中に添加することが行われている（特許文献１）。あるいは、抗原産生に用いられるベクターと同種であって、且つ上記抗原をコードする遺伝子を含まないベクターを組み込んだ宿主細胞の培養成分を用いた方法が知られている（特許文献２）。

【０００５】

【先行技術】

【特許文献１】

特公平３－５９３８２号公告公報

【特許文献２】

特開平８－４３３９２号公開公報

【０００６】

【発明が解決しようとする課題】

上記の方法は、非特異反応抑制には効果がみられた。しかしながら、遺伝子組み換え抗原を用いた抗体検出試薬を感染症の診断薬として実用化するにはまだその効果は十分とは言えなかった。本発明は、より効果的な非特異反応抑制効果が得られる非特異反応吸収剤を提供することを課題とする。

【０００７】

【課題を解決するための手段】

本発明の抗体検出用試薬の非特異反応吸収剤は、免疫検査に使用する抗原又は抗体の産生細胞と同種の細胞の水抽出物を加熱処理し、生成した不溶性画分を該水抽出物から除去することにより、効果的な非特異反応吸収剤が得られる。

【０００８】

すなわち本発明は、

- １．免疫検査に使用する抗原又は抗体の産生細胞と同種の細胞で、前記抗原又は抗体を含まない細胞成分の水抽出物を加熱処理し、生成した不溶性画分を該水抽出物から除去してなる免疫検査用非特異反応吸収剤、
- ２．抗原又は抗体の産生細胞が大腸菌である前項１に記載の免疫検査用非特異反応抑制物質、
- ３．加熱処理温度が、８０℃～１００℃である前項１又は２に記載の免疫検査用非特異反応吸収剤、
- ４．加熱処理時間が３分～１０分である前項１～３のいずれか１に記載の抗体検出用試薬の非特異反応吸収剤、
- ５．加熱処理が非加圧条件下で行われることを特徴とする前項１～４のいずれか１に記載の抗体検出用試薬の非特異反応吸収剤、
- ６．前項１～５のいずれか１に記載の非特異反応吸収剤を含む免疫検査用試薬、
- ７．前項１～５のいずれか１に記載の非特異反応吸収剤を使用する免疫検査方法、からなる。

【０００９】

【発明の実施の形態】

本発明において、免疫検査に使用する抗原又は抗体の産生細胞は、抗原又は抗体を産生しうる細胞であれば真核細胞であっても原核細胞であっても良い。該細胞は、遺伝子組換え技術や、モノクローナル抗体産生技術等の遺伝子や蛋白質の情報を人為的に加工することにより得られる抗原又は抗体を産生しうる細胞であることが好ましい。具体的には、宿主として大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を本発明の産生細胞とすることができる。また、抗体産生細胞としては、マウスのＢ細胞とマウスの骨髄腫細胞とのハイブリドーマのように公知の細胞を本発明の産生細胞とすることができる。さらに具体的には、試薬用遺伝子組換え技術において汎用される大腸菌が抗原産生細胞として好適である。

【００１０】

本発明で使用される細胞は、抗原や抗体として使用される所望の遺伝子や蛋白質が含まれていない宿主細胞となりうる細胞である。例えば遺伝子組換え技術に使用される宿主では、遺伝子組み換え操作を行っていないものを適用することができ、抗原産生に用いられるベクターであって抗原をコードする遺伝子を含まないベクターを組み込んだ宿主細胞であっても良い。

【0011】

上記産生細胞となりうる細胞の水抽出物は、例えば細胞培養後、培養液を超音波処理して細胞成分を破碎後、遠心分離を行って細胞成分を分離し上清分画を回収することによって得ることができる。超音波処理条件や遠心分離条件は、大腸菌等の菌体細胞内から遺伝子組み換え抗原を取り出すときと同様の条件で行うことができる。

10

【0012】

次に、得られた水抽出物を加熱処理する。加熱処理にあたっては、加熱温度は80℃以上で行うことが好ましく、具体的には80～100℃、より具体的には90～100℃の範囲で行うことが好ましい。加熱時間は3～10分であれば良く、4～8分で行うことが好ましい。また、加熱処理は常圧下で行うことが望ましい。

【0013】

水抽出物を加熱処理した後、生成した不溶性画分を除去したものを非特異反応吸収剤とすることができる。加熱処理後に生成する不溶性画分は、加熱処理による変性蛋白質などが主なものである。不溶性画分の除去はいかなる方法によっても良いが、例えば遠心分離やろ過膜を用いて処理する方法、これらを組み合わせた方法等を適用することができる。

20

【0014】

本発明の非特異反応吸収剤は、抗原抗体反応を行うときに用いる水性溶媒（希釈液等）に添加して用いることができる。また、この水性溶媒には、緩衝剤、塩類やアルブミン、あるいはデキストランのような増感剤等を含有させることができる。本発明では、このような水性溶媒も免疫検査用試薬として取り扱う。また、本発明の非特異反応吸収剤それ自体も免疫反应用試薬として取り扱うことができる。

【0015】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を示して具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

30

【0016】

（実施例1）非特異反応吸収剤の調製（本発明法）

1）大腸菌をLB培地中で37℃で一晩培養し、増殖した大腸菌を含む培養液を6l採取し、遠心分離（3000rpm×15分）した。

2）沈殿した菌体に10mMリン酸緩衝液（pH7.0）110mlを加え、5分間超音波処理した。

3）超音波処理により破碎した溶液全量を遠心分離（12000rpm×10分）し、上清画分を回収した（大腸菌成分濃度は7.90mg/ml）。

4）上記回収した上清画分を100℃で5分間加熱処理し、さらに遠心分離（12000rpm×10分）により沈殿画分を除去し上清画分を得た。

40

加熱処理後の上清画分中には、大腸菌成分は1.87mg/ml含まれる。この水溶液を非特異反応吸収剤とし、反応緩衝液に添加した。

また、上記3）で回収した上清画分を上清画分を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で希釈して上清中の大腸菌成分濃度を4mg/mlに調製し、上記4）と同じように加熱処理して非特異反応吸収剤とし、反応緩衝液に添加した。

【0017】

（比較例1）非特異反応吸収剤の調製（従来法）

実施例1の1）～3）の処理を行った水溶液を従来法による非特異反応吸収剤とした。この非特異反応吸収剤には、大腸菌成分は7.90mg/ml含まれる。該非特異反応吸収剤を反应用緩衝液に添加した。

50

【0018】

(実験例1) 免疫凝集試験

(材料)

1) ラテックス試薬:

大腸菌由来リコンビナントHIV抗原感作ラテックス試薬

HIV抗原は、特開平8-43392号の記載に従って調製し、抗原感作ラテックスは、特開2002-286720号の記載に従って調製した。

2) 検体:

陰性コントロール (5w/v%ウシ血清アルブミンを含む10mM PBS (pH7.2) 水溶液)

正常血清 (オーソ社製)

非特異反応検体 (抗大腸菌ウサギ抗体 (DAKO社製))

(1倍 (×1)、2倍 (×2)、5倍 (×5)、10倍 (×10) 希釈試料)

3) 反応緩衝液:

7.5w/v%ウシ血清アルブミンを含む0.12w/v% Tris 緩衝液 (pH7.0)

4) 非特異反応吸収剤:

従来法による非特異反応吸収剤 100 μg/ml

本発明の非特異反応吸収剤 100 μg/ml

【0019】

(方法)

測定は、シスメックス社製測定装置 (PAMIA-50) を用いて Sysmex Journal Vol. 20 No. 1, p77-86 (1997) に記載の方法に従った。

反応プレートのウェルに、ラテックス凝集反应用緩衝液を80 μl、検体を10 μl 及び上記ラテックス粒子を含む溶液を10 μl を添加し、45℃で反応させた。反応を開始してから約20秒後に、19 μl の反応混合物を950 μl のシース液に加えて51倍に希釈した。希釈された反応混合物を、PAMIA-50の光学検出部に導き、凝集度 P/T (%) (T1) を測定した。

反応を開始してから約15分後に、凝集度 P/T (%) (T1) の測定と同様にして凝集度 P/T (%) (T2) を測定した。なお、T1は反応初期の凝集度であり、試料が測定範囲内にあるかどうか確認する際に利用されるもので、通常はT2を試料の凝集度 (凝集率) として採用する。ここで、凝集していないラテックス粒子のカウント数をM (Monomer: モノマー)、2個以上のラテックス粒子が凝集したもののカウント数をP (Polymer: ポリマー)、MとPの和をT (Total) とする。

【0020】

(結果)

その結果を表1に示した。加熱処理しない大腸菌水抽出物を添加した場合 (従来法) は、対照である大腸菌水抽出物を添加しない場合と比較して抗大腸菌抗体に対する反応性が低下すること確認された。一方、水抽出物を熱処理した場合、加熱前の大腸菌水抽出物の濃度に関わらず、抗大腸菌抗体に対する反応性が更に低下することが確認された。このことから、従来法によってもある程度 of 非特異反応が抑制されたが、加熱処理によりさらに効果的に非特異反応が抑制されたものと考えられた。

【0021】

【表1】

吸収剤種類及び 加熱前破碎上清濃度	対照 (PBS添加)		従来法		4mg/mLを 熱処理		7.90mg/mLを 熱処理	
非特異反応吸収剤添加量	0 μ g/mL		100 μ g/mL		100 μ g/mL		100 μ g/mL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
陰性コントロール	0.36	0.85	0.30	1.09	0.35	0.94	0.36	1.00
正常血清	0.41	1.11	0.38	1.17	0.41	1.20	0.44	1.09
抗大腸菌ウサギ抗体 ×1	2.29	53.91	1.39	32.35	0.80	19.84	0.77	19.55
抗大腸菌ウサギ抗体 ×2	1.37	45.31	0.90	21.20	0.61	11.46	0.56	12.10
抗大腸菌ウサギ抗体 ×5	0.85	32.37	0.55	10.57	0.49	5.47	0.41	5.58
抗大腸菌ウサギ抗体 ×10	0.57	21.68	0.44	6.09	0.45	3.67	0.44	3.40

【0022】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の非特異反応吸収剤を使用して免疫検査を行うと、従来法の非特異反応吸収剤を使用した場合に比べて非特異反応が抑制され、正しい測定結果が得られることとなった。

专利名称(译)	用于免疫测定的非特异性反应吸收剂		
公开(公告)号	JP2004301646A	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2003094616	申请日	2003-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	松井勝弘 宮地峰輝		
发明人	松井 勝弘 宮地 峰輝		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.583 G01N33/531.B		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
其他公开文献	JP2004301646A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够获得更有效的非特异性反应抑制效果的非特异性反应吸收剂，并提供一种抑制非特异性反应的测定方法。 解决方案：将不含抗原或抗体的细胞成分的水提取物用与产生免疫测定中所用抗原或抗体的细胞相同种类的细胞进行热处理，然后从水提取物中除去产生的不溶级分。 这取决于通过去除获得的用于免疫测定的非特异性反应吸收剂。 此外，其基于将免疫测定用非特异性反应吸收剂添加到免疫测定用反应缓冲液中的测定方法。