

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4590117号
(P4590117)

(45) 発行日 平成22年12月1日(2010.12.1)

(24) 登録日 平成22年9月17日(2010.9.17)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/531 (2006.01) GO 1 N 33/531 A
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 B
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 1 5 D

請求項の数 13 (全 14 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2001-45316 (P2001-45316) (22) 出願日 平成13年2月21日(2001.2.21) (65) 公開番号 特開2002-243740 (P2002-243740A) (43) 公開日 平成14年8月28日(2002.8.28) 審査請求日 平成19年3月13日(2007.3.13)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 000006116 森永製菓株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号 (74) 代理人 100062007 弁理士 川口 義雄 (74) 代理人 100103920 弁理士 大崎 勝真 (72) 発明者 本庄 勉 神奈川県横浜市鶴見区下末吉2丁目1番1号 株式会社森永生科学研究所内 (72) 発明者 柴田 治樹 神奈川県横浜市鶴見区下末吉2丁目1番1号 株式会社森永生科学研究所内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 免疫測定試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも2以上のポリクローナル抗体試薬を含む免疫測定キットの製造方法であって、当該ポリクローナル抗体試薬は、互いに抗原上の異なるエピトープを優先的に認識するように選択されることを特徴とし、また当該ポリクローナル抗体はモルモットを免疫動物として得られ、該方法は；

(イ) 少なくとも2以上の免疫されたモルモットから各々の抗血清を得；

(ロ) 該モルモットを免疫した抗原に対する特定のモノクローナル抗体と該抗血清との間でのエピトープの競合を検査し；

(ハ) 該モノクローナル抗体とエピトープの競合を示す抗血清からキャプチャー側または検出側のポリクローナル抗体試薬を調製し；そして

(ニ) 該モノクローナル抗体とエピトープの競合を示さない抗血清から他方のポリクローナル抗体試薬を調製することを特徴とする、前記キットの製造方法。

【請求項2】

上記特定のモノクローナル抗体と抗血清の間でのエピトープの競合の検査が；

(イ) 一定濃度の抗原と抗血清の混合溶液を調製し；

(ロ) 該溶液内で抗原抗体結合体を形成させ；

(ハ) 次いで、該混合溶液を、上記特定のモノクローナル抗体の固相化体に添加し；そして、

10

20

(二) 該固相化モノクローナル抗体と特異的に結合した(ロ)の抗原抗体結合体の量を測定することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

上記一定濃度の抗原と混合される抗血清の濃度を段階的に希釈して上記抗原抗体結合体量を測定することを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ポリクローナル抗体試薬の少なくとも1つが抗体分子の酵素消化体から調製される、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

上記酵素消化体が抗体分子のF(a b')₂フラグメントである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

測定対象がインスリンである、請求項1乃至5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

免疫測定キットであって、

(イ) 測定対象である抗原に対する1のモノクローナル抗体との間でエピトープの競合を示す第1のポリクローナル抗体試薬と、

(ロ) 該抗原に結合し、該モノクローナル抗体との間でエピトープの競合を示さない第2のポリクローナル抗体試薬とを含み、

ここで、当該ポリクローナル抗体はモルモットを免疫動物として得られる、前記キット。

【請求項8】

サンドイッチアッセイのための請求項7に記載の免疫測定キットであって、上記第1のポリクローナル抗体試薬がキャプチャー側または検出側であり、上記第2のポリクローナル抗体試薬がその他方の側である、前記キット。

【請求項9】

上記ポリクローナル抗体試薬の少なくとも一方が抗体分子のF(a b')₂フラグメントから調製される、請求項7または8に記載のキット。

【請求項10】

測定対象がインスリンである、請求項7乃至9のいずれか一項に記載のキット。

【請求項11】

上記インスリンが実験動物由来である、請求項10に記載のキット。

【請求項12】

上記実験動物がマウス、ラット及びハムスターからなる群から選択される、請求項11に記載のキット。

【請求項13】

試料中のインスリンを1 pg/mlの感度で検出可能な請求項10乃至12のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、高い感度を有する免疫測定試薬及びキット並びにその製造方法に関し、特に、インスリンを高感度に測定する免疫測定試薬及びキット並びにその製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】

インスリンは血糖降下作用をもつホルモンとして広く知られており、その血中濃度を測定することは糖尿病の診断や病態の把握に不可欠である。

【0003】

このようなヒト血中インスリン濃度の測定は、当初、放射性同位元素を用いるラジオイム

10

20

30

40

50

ノアッセイで行われてきたが、後に酵素免疫測定法が確立され、これもインスリンの測定に応用されるようになってきており、したがって、当該免疫測定キットとしてはラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法を利用したキットが臨床診断薬キット等の目的で市販されている。

【0004】

しかしながら、上記いずれのキットも、測定試料として数十マイクロリットルから百マイクロリットル程度の試料を必要とし、測定感度は数百pg/ml程度に過ぎない。

【0005】

一方、近年、糖尿病研究が盛んになるにつれて、実験動物でのインスリン測定の必要性も増大してきている。

10

【0006】

このような実験動物でのインスリン測定においても、従来はヒトインスリン測定試薬が用いられ、その抗体の交差反応性を利用して実験動物のインスリンが測定されてきた。しかしながら、標準品としてヒトインスリンを用いることで動物インスリン濃度の真の値が得られないという問題があったことから、実験動物専用の測定試薬が期待されるようになった。

【0007】

このため、ラットインスリン測定用ラジオイムノアッセイ法が最初に開発され、米国Linco Research社、英国Amersham社、米国Inkstar社等から市販されるに至った。これらのキットには、標準品としてラットインスリンが添付されており、ヒトインスリンを標準物質として用いることによるトラブルは回避されるようになった。

20

【0008】

しかし、そのようなキットでは、依然、用いる試料の容量がヒトインスリン測定キットと同じ約100マイクロリットル程度であり、また、後の実験に支障をきたさないように一匹の動物から得ることのできる血液の量にも限界があるため、実験には必然的に多数の動物を使う必要が生じた。とりわけ、体重がラットの十分の一程度のマウスを用いる実験においては、一つのデータを取るために複数のマウスを犠牲にする必要があり、後の実験が不可能となる場合さえあった。

【0009】

上記の問題を解決するために、従来の測定試薬と同程度の感度を有し、且つ微量の試料でも測定可能な方法が開発された。当該測定試薬は、本件出願人の他、株式会社シバヤギやスウェーデンのMerco dia社からも販売されている。

30

【0010】

しかしながら、たとえ微量試料で測定可能な上記の試薬であっても、それが従来の測定試薬と同程度の感度では測定に不十分な場合がある。例えば、ストレプトゾトシン処理ラットやマウスに代表されるI型糖尿病のモデル等が示すような、低濃度の血中インスリンを測定する場合等には、より高い測定感度が要求される。この場合、従来の測定試薬を用いつつ、逆に、比較的大量の血清を試料とすれば、当該血清中に含まれている多量の抗原抗体反応阻害物質により反応系が影響され、その影響を無視できなくなる。したがって、上記のような低濃度の血中インスリン測定等に際しても有効な、極めて高い感度を有する免疫測定試薬の開発が望まれていた。

40

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本願発明は、従来の免疫測定試薬に比べて、極めて高い測定感度を有する免疫測定試薬及びキットを提供することを課題とする。

【0012】

殊に、糖尿病の治療や研究においては血中インスリンの濃度を測定することが必須であり、I型糖尿病患者やストレプトゾトシン処理動物等の血中インスリン濃度も測定できる試薬が求められている。とりわけ、実験用小動物の血中インスリン濃度を測定するにはヒ

50

トインスリン測定に用いられるような100マイクロリットルの試料を用いるのではなく、できるだけ小容量の試料で測定できる極めて高い感度の測定系が必要とされている。

【0013】

したがって、本願の免疫測定試薬及びキットは、インスリンの濃度を測定する際に有利に使用され得る。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記のとおり、本願発明は、従来免疫測定試薬に比べて、極めて高い測定感度を有する免疫測定試薬及びキットを提供することを課題とする。

【0015】

ここで、インスリンを例にとれば、現在市販されているインスリン測定試薬やインスリン測定診断薬の多くには、その特異性を高めるためにマウスを用いて作製された「モノクローナル抗体」が使用されている。

【0016】

ところが、これらのモノクローナル抗体は、その特異性にも拘らず、一般的に抗原（インスリン）に対する親和性がポリクローナル抗体に比べて低く、そのため当該モノクローナル抗体を用いたインスリン測定法の感度には自ずと一定の限界があった。

【0017】

すなわち、モノクローナル抗体は単一分子であるが故に、その特異性も高いことが利点ではあるが、その抗原に対する親和性もまた単一である。一般に、モノクローナル抗体の結合定数は 10^8 程度、高くても 10^9 が限度であり、 10^{10} 程度の非常に高い結合定数を持つモノクローナル抗体を分離するのは容易ではない。

【0018】

これとは対照的に、ポリクローナル抗体は複数の抗体分子の混合物であり、したがって、それが認識する抗原上のエピトープは単一ではないが、その親和性もまた単一ではなく、適当な方法で免疫された抗血清の中には 10^{10} 程度の非常に高い結合定数を持つ抗体も含まれる場合がある。とすれば、これらの高い結合定数を有する抗体をポリクローナル抗体としてそのまま測定に利用することにより、当該測定系の感度を上げ得ることが期待される。

【0019】

ところが、上記のとおり、ポリクローナル抗体には親和性が高い抗体分子が含まれるという利点がある反面、それが抗原分子上の異なるエピトープを認識する抗体分子の集合体であるという欠点も有している。しかも、各免疫動物毎に血中に含まれる抗体分子の比率や量、抗原分子に対する親和性が異なるため、同じ性質を持つ抗血清を安定的に得るには同じ条件で免疫した動物の抗血清を少なくとも数十匹分、理想的には数百匹分をプールし、そこからポリクローナル抗体を調製しなければならないという欠点を有するものであった。したがって、その高い親和性にも拘らず、ポリクローナル抗体の免疫測定法への使用は、近年、一般的ではなかった。

【0020】

しかしながら、本発明者らは、インスリン測定系の開発を進める過程で、驚くべきことに、インスリン免疫したモルモットの抗血清に含まれる抗体群（ポリクローナル抗体）が優先的に認識するエピトープは免疫モルモット個体毎に異なり、極端な例ではその特異性がモノクローナル抗体に近い場合があることを見いだした。

【0021】

更に、本発明者らは、上記のモノクローナル抗体に似た反応性（特異性）を有するという性質と、インスリンに対して非常に高い親和性を持つことの二つの条件を併せ持つポリクローナル抗体を利用することにより、インスリンの測定感度を上昇させる得ることを想到した。

【0022】

すなわち、インスリン分子上の、互いに異なるエピトープを優先的に認識する2以上の高

10

20

30

40

50

親和性ポリクローナル抗体を選択して組み合わせることにより、従来用いられてきた測定試薬より高感度な測定系を組み立てることに成功した。したがって、本願発明の第1は、
(1) 少なくとも2以上のポリクローナル抗体試薬を含む免疫測定キットの製造方法であって、当該ポリクローナル抗体試薬は、互いに抗原上の異なるエピトープを優先的に認識するように選択されることを特徴とする、前記キットの製造方法である。

【0023】

より詳細には、モノクローナル抗体に匹敵する特異性を有し、且つモノクローナル抗体に比べて高い親和性を有する幾つかのポリクローナル抗体を個々の免疫動物の抗血清から得た場合でも、それらを単に任意に組み合わせ、キャプチャー側(固定化抗体側)及び検出側(標識抗体側)の各試薬に用いたのでは、当該ポリクローナル抗体試薬間でエピトープの競合が起って、折角の検出感度が損なわれてしまう場合がある。例えば、キャプチャー側と検出側のポリクローナル抗体試薬が同一のエピトープを優先的に認識したのでは、キャプチャー側のポリクローナル抗体試薬が優先的に認識すべきエピトープが、先に検出側のポリクローナル抗体試薬に優先的に認識されてしまい、当該エピトープが検出側の抗体試薬によって前もって塞がれてもはやキャプチャー側と結合し得なくなり、そのことでサンドイッチアッセイの検出感度が低下する惧れがあるのである。

10

【0024】

これに対し、本願のように、キャプチャー側と検出側が優先的に認識するエピトープが異なったものとなるように夫々を選択して組み合わせれば、上記のようなエピトープの競合が起こらず、したがって、互いのポリクローナル抗体が有するモノクローナル抗体に比べた高い親和性が損われることがなく、結果として高い感度を達成することが可能なのである。

20

【0025】

更に、このような選択及び組み合わせは、均質で安定的な免疫測定キットの供給をも可能にするのである。

【0026】

従来のように、均質なポリクローナル抗体を得る目的で複数の免疫動物からの抗血清を一旦プールし、そこからポリクローナル抗体を得て免疫測定キットの試薬として使用すると、個々のポリクローナル抗体が有する有利な特徴であるモノクローナル抗体に似た高い特異性と、抗原に対する高い親和性が希釈及び/または相殺されて、ポリクローナル抗体を使用する本願の利点が失われてしまう結果となる。

30

【0027】

これに対し、本願のようにポリクローナル抗体を選択すれば、均質で安定的なキットを与えるように各ポリクローナル抗体を簡便に組み合わせることができ、抗血清をプールの必要がなくなるのである。

【0028】

さて、以上の観点からすれば、本願の免疫測定キットの製造方法においては各免疫動物から得られる抗血清に含まれるポリクローナル抗体のエピトープに対する特異性を迅速に判別することが更に望ましい。したがって、本願発明の第2は、

(2) 上記(1)に記載の免疫測定キットの製造方法であって、該方法は;

40

(イ) 少なくとも2以上の免疫動物から各々の抗血清を得;

(ロ) 該免疫動物を免疫した抗原に対する特定のモノクローナル抗体と該抗血清との間でのエピトープの競合を検査し;

(ハ) 該モノクローナル抗体とエピトープの競合を示す抗血清からキャプチャー側または検出側のポリクローナル抗体試薬を調製し;そして

(ニ) 該モノクローナル抗体とエピトープの競合を示さない抗血清から他方のポリクローナル抗体試薬を調製することを特徴とする、

前記キットの製造方法である。

【0029】

上記の構成によれば、特定のモノクローナル抗体は単一のエピトープを認識するので、当

50

該モノクローナル抗体とのエピトープの競合を指標にすることで、ポリクローナル抗体同士のエピトープの競合も迅速に特徴付けることが可能である。すなわち、特定のモノクローナル抗体との間でエピトープの競合を示す抗血清は、そこに含まれる抗体群（ポリクローナル抗体）が当該エピトープ若しくはその近傍を優先的に認識していると考えられる。一方、モノクローナル抗体との間でエピトープの競合が起こらなければ、その抗血清は当該エピトープとは別の、離れたエピトープを優先的に認識する抗体群（ポリクローナル抗体）を含むと判別できるのである。

【0030】

なお、上記の判別は、特定のポリクローナルを固相化して、サンドイッチアッセイ法の原理を利用して行うのが更に簡便である。したがって、本願発明の第3は、

(3) 上記特定のモノクローナル抗体と抗血清の間でのエピトープの競合の検査が；

(イ) 一定濃度の抗原と抗血清の混合溶液を調製し；

(ロ) 該溶液内で抗原抗体結合体を形成させ；

(ハ) 次いで、該混合溶液を、上記特定のモノクローナル抗体の固相化体に添加し；そして、

(ニ) 該固相化モノクローナル抗体と特異的に結合した(ロ)の抗原抗体結合体の量を測定することを特徴とする、

上記(2)に記載の方法である。

【0031】

上記において、固相化モノクローナル抗体と特異的に結合した抗原抗体結合体の量の測定は、抗血清に含まれる抗体分子に特異的に反応する酵素標識抗体を用いて、「固相化モノクローナル抗体」-「抗原」-「抗血清由来の抗体分子」-「酵素標識抗体」の4分子結合体を形成させることで容易に測定できる。例えば、抗原がマウスインスリンであり、免疫動物がモルモットである場合は、「固相化マウスインスリンモノクローナル抗体」-「マウスインスリン」-「モルモット由来の抗インスリン抗体(IgG)」-「抗モルモットIgG抗体(酵素標識付き)」である。酵素標識抗体の固相支持体への結合量が少ないことは、固相化モノクローナル抗体と抗血清に含まれる抗体群（ポリクローナル抗体）との間にエピトープ競合があったことを示し、逆に当該結合量が多いことは、エピトープの競合が少なかったことを示す。

【0032】

なお、抗原と抗血清との混合による上記抗原抗体結合体の形成は、固相化モノクローナル抗体との接触(添加)と同時に進行してもよい。

【0033】

更に、上記サンドイッチアッセイにおいては、検査する抗血清を段階的に希釈してその用量依存性を調べることが、エピトープの競合の判別において有利である。したがって、本願発明の第4は、

(4) 上記一定濃度の抗原と混合される抗血清の濃度を段階的に希釈して上記抗原抗体結合体量を測定することを特徴とする、上記(3)に記載の方法である。

【0034】

なお、本願発明に用いることのできるポリクローナル抗体試薬は、ポリクローナル抗体自身のほか、そのいかなる反応性のフラグメント、例えばポリクローナル抗体の酵素消化体をも含み得る。好適な酵素消化体は、抗体分子をペプシンで消化したF(ab')₂フラグメントであり、そのようなフラグメントの使用は高感度測定では必須とされるバックグラウンドの低減に有効である。したがって、本願発明の第5及び第6は、

(5) ポリクローナル抗体試薬の少なくとも1つが抗体分子の酵素消化体から調製される、上記(1)乃至(4)のいずれかに記載の方法であり、

(6) 上記酵素消化体が抗体分子のF(ab')₂フラグメントである、上記(5)に記載の方法である。

【0035】

本願発明の方法は、抗原の分子量が約5000以下のような場合に特に有効である。その

10

20

30

40

50

ような抗原では、固体に認識されるエピトープの数がそれほど多くないため、任意のポリクローナル抗体の組み合わせの結果生じるポリクローナル抗体試薬間でエピトープの競合が起こりやすいからであり、そのような場合に本願のような特定のポリクローナル抗体どうしの組み合わせが有効になるのである。

【0036】

抗原がインスリンである場合が特に有利である。したがって、本願発明の第7は、
(7)測定対象がインスリンである、上記(1)乃至(6)のいずれかに記載の方法である。

【0037】

また、ポリクローナル抗体の生産性の観点等から、抗原がインスリンであるときは免疫動物としてモルモットを用いることが有利である。したがって、本願発明の第8は、
(8)ポリクローナル抗体がモルモットを免疫動物として得られる、上記(1)乃至(7)のいずれかに記載の方法である。

【0038】

更に本願は、上記のような、エピトープの競合を起こさないポリクローナル抗体の組み合わせ、特に、抗原に対する1のモノクローナル抗体との間でエピトープの競合を示すようなポリクローナル抗体と、競合を示さないようなポリクローナル抗体を組み合わせた免疫測定キットにも関する。したがって、本願発明の第9乃至15は、

(9)測定対象である抗原に対する1のモノクローナル抗体との間でエピトープの競合を示す第1のポリクローナル抗体試薬と、該モノクローナル抗体との間でエピトープの競合を示さない第2のポリクローナル抗体試薬を含む免疫測定キット、

(10)サンドイッチアッセイのための上記(9)の免疫測定キットであって、上記第1のポリクローナル抗体試薬がキャプチャー側または検出側であり、上記第2のポリクローナル抗体試薬がその他方の側である前記キット、

(11)上記ポリクローナル抗体試薬の少なくとも一方が抗体分子のF(ab')₂フラグメントから調製される、上記(9)または(10)に記載のキット、

(12)測定対象がインスリンである、上記(9)乃至(11)のいずれかに記載のキット、

(13)上記インスリンが実験動物由来である、上記(12)に記載のキット、

(14)上記実験動物がマウス、ラット及びハムスターからなる群から選択される、上記(13)に記載のキットであり、また、

(15)ポリクローナル抗体がモルモットを免疫動物として得られる、上記(9)乃至(14)のいずれかに記載のキットである。

【0039】

上記のようなキットを用いれば、インスリンを5 pg/mlの感度で検出可能である。したがって、本願発明の第16は、

(16)試料中のインスリンを1 pg/mlの感度で検出可能な上記(12)乃至(15)のいずれかに記載のキットである。

【0040】

【発明の実施の形態】

本願発明に用いるポリクローナル抗体は、測定対象である抗原で免疫した実験動物からの抗血清を使用して調製する。抗原の調製、免疫動物への投与及び当該動物からの抗血清の採取は当業者にとって周知のいずれのプロトコールをも使用することができ、そのようなプロトコールの最適化も当業者にとって容易であろう。

【0041】

免疫動物としては、ヒツジ、ウサギ、サル等も用いられ得るが、モルモットを用いるのが特に有利である。

【0042】

当該免疫動物からの抗血清は、例えば、アジュバントと共に抗原を免疫動物に皮下注射し、当該皮下投与を適当な間隔(例えば2週間)で所定の回数(例えば4回)繰り返し、最

10

20

30

40

50

終免疫後に全血を採集して、これを分離することで得ることができる。そのような方法は、例えば、「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.4章(発行元: John Wiley & Sons, Inc., New York)」等に記載されている。

【0043】

次いで、本願発明によれば、複数の免疫動物から得られた個々の抗血清は、その抗原に対する親和性と、モノクローナル抗体に似た反応性、すなわち、優先的に特定のエピトープを認識するという性質の2つの観点から分別され選択される。

【0044】

ここで、インスリンに対する親和性については、例えば、免疫測定用のマイクロプレートやビーズに固相化したインスリンとの反応の強さを測定することで容易に判定できる。

【0045】

次いで、エピトープの認識に関する特異性は以下の方法に準じて判定することが可能である。

【0046】

すなわち、インスリンを例にとれば、まず、インスリン分子上の1のエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体を免疫測定用のマイクロプレートやビーズに固相化(コート)する。次いで、そこに、一定濃度のインスリンと、濃度を変えたモルモット抗インスリン(ポリクローナル)抗体溶液またはモルモット抗インスリン血清を同時に加えて固相と反応させる。固相を洗浄後、モルモットIgGに特異的に反応する酵素標識抗体を加えて更に反応させ、次いで固相を再度洗浄後、酵素基質を加えて酵素反応を行わせる。

【0047】

コートされたマウスモノクローナル抗体と同一、或いはその近傍のエピトープを認識する抗体群が多く含まれるようなモルモットポリクローナル抗体溶液や抗血清は、該エピトープ或いはその近傍部位と結合し、それにより、コートされたモノクローナル抗体と当該エピトープとが更に結合するのを阻害する(エピトープの競合が起こる)。その結果、酵素標識抗体(抗モルモットIgG抗体)が固相化モノクローナル抗体と結合する量が減少し、酵素反応が弱くなる。

【0048】

一方、コートされたモノクローナル抗体の認識するエピトープとは別の、離れたところにあるエピトープを認識する抗体群が多く含まれるポリクローナル抗体溶液や抗血清は、コートされたモノクローナル抗体とインスリンが結合することを阻害しないために(エピトープが競合しないために)酵素反応が強くなる。従って、このような方法により、異なるエピトープを認識する抗体溶液や抗血清を分別することができるのである。

【0049】

上記ようにしてインスリンに対する親和性と、モノクローナル抗体とのエピトープの競合とを判別することにより、モノクローナル抗体より高い親和性を持ち、且つ、モノクローナル抗体と類似の反応性(特異性)を持つポリクローナル抗体を選び出すことができる。

【0050】

そして、このようにして選び出された複数の抗血清からIgG画分または特異(ポリクローナル)抗体を精製し、そのままキャプチャー側のポリクローナル抗体試薬として使用することができ、また、酵素標識すれば検出側のポリクローナル抗体試薬として用いることができる。

【0051】

そのような、IgG画分等の精製や酵素標識の方法は当業者にとって周知のいかなる方法も用いることができ、例えば、夫々、「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.7章(発行元: John Wiley & Sons, Inc., New York)」記載の方法や、「Immunofluorescence and Related Staining Techniques (Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam

10

20

30

40

50

、215～224頁(1978年)」、「化学と生物、第12巻、626～631頁(1974年)」、「Scand. J. Immunol., vol. 8 (Suppl. 7)、43～55頁(1978年)」記載の方法を利用することができる。

【0052】

酵素標識に用いる酵素にも特に制限はなく、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性フォスファターゼ等の酵素が有利に使用される。西洋ワサビペルオキシダーゼを使用する場合は、当該酵素の基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンがキットに含まれてよく、アルカリ性フォスファターゼを使用する場合は、基質としてp-ニトロフェニルリン酸がキットに含まれ得る。

【0053】

更に、本願発明のポリクローナル抗体試薬には、上記のようなIgG画分または特異抗体の他、特異抗体を酵素消化して得られるような、該抗体の反応性フラグメントを用いることもできる。特に、該フラグメントが、特異抗体をペプシンで消化して得られるF(ab')₂フラグメントである場合が有利である。当該F(ab')₂等の酵素消化フラグメントは、「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.7章(発行元: John Wiley & Sons, Inc., New York)」記載の方法に準じて容易に調製可能である。

【0054】

上記のように調製されたポリクローナル抗体試薬は、キャプチャー側と検出側でエピトープの競合が起こらないように組み合わせられて最終的に免疫測定キットとなるのである。

【0055】

本願発明のキットの測定対象としては蛋白質、ペプチド等があげられる。したがって、本願発明のキットは、例えば、インスリン、カルシトニン、C-ペプチド、レプチン、ベータ2-ミクログロブリン、レチノール結合タンパク、アルファ1-ミクログロブリン、アルファ-フェトプロテイン、癌胎児性抗原、トロポニン-I、クルカゴン様ペプチド、インスリン様ペプチド、腫瘍増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、血小板成長因子、上皮増殖因子等の測定に用いられ得るがこれに限定されない。特に、分子量が5000以下の蛋白質の測定に関し本願のキットは好適に用いられる。測定対象としての抗原がインスリン、とくにマウス、ラットやハムスター由来のインスリンである場合が一層好ましい。その場合、インスリンの超高感度測定系を作製することができる。

【0056】

以下に、本願発明を実施例により詳細に説明するが、本願発明は当該実施例により何等限定されるものではないことは言うまでもない。

【0057】

【実施例】

実施例 1

インスリンを10mM塩酸に対して2mg/mlの濃度で溶解した後、0.4Mの炭酸水素ナトリウムで2倍に希釈し、フロイントの完全アジュバントで水中油型エマルジョンを作製して、20匹のモルモットに一匹あたり皮下20箇所において0.05mlずつ注射し、免疫した。

【0058】

二週間の間隔をあけて4回の免疫を繰り返し、最終免疫後2週間目に全採血した。

【0059】

分離した抗血清を、インスリンを固相化した免疫測定用のマイクロプレートを用いてインスリンとの反応性を調べたところ、20匹から得られた個々の抗血清の全てが100万倍の希釈でも吸光度が1.0以上あり、インスリンに対する結合活性(親和性)は免疫測定に用いるには十分なものであった。

【0060】

実施例 2

実施例1で作製した抗血清に含まれる抗体群(ポリクローナル抗体)と抗インスリンモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体との間でエピトープの競合を調べた。

【 0 0 6 1 】

測定結果は表 1 に示す。

【 0 0 6 2 】

【表 1】

希釈倍率	抗血清1	抗血清2	抗血清3	抗血清4	抗血清5	抗血清6	抗血清7	抗血清8	抗血清9	抗血清10
×243000	1.135	0.231	1.206	0.985	0.242	0.371	0.979	0.325	0.317	0.25
×81000	2.184	0.605	2.276	2.133	0.611	0.892	1.951	0.75	0.79	0.553
×27000	2.554	1.39	2.704	2.665	1.33	1.742	2.561	1.497	1.645	1.249
×9000	2.647	2.18	2.559	2.566	2.223	2.418	2.383	1.945	2.157	1.832
×3000	2.528	1.996	1.515	1.775	1.956	1.908	1.516	1.553	1.657	1.335

10

希釈倍率	抗血清11	抗血清12	抗血清13	抗血清14	抗血清15	抗血清16	抗血清17	抗血清18	抗血清19	抗血清20
×243000	0.47	0.046	0.202	0.447	0.294	0.34	0.593	0.366	0.379	2.34
×81000	1.135	0.141	0.517	1.068	0.738	0.736	1.229	0.739	0.901	2.723
×27000	2.086	0.38	1.11	2.195	1.508	1.196	1.525	1.325	1.846	2.703
×9000	2.52	0.933	2.185	2.716	2.362	1.136	1.044	1.865	2.534	2.788
×3000	2.376	1.764	2.367	2.549	2.465	0.62	0.507	1.74	2.407	2.558

このデータより 16番と 17番の抗血清がコート抗体として用いたモノクローナル抗体とほぼ同じエピトープを、1番と 20番の抗血清がコートに用いたモノクローナル抗体と異なるエピトープを認識する抗体を多く含むことが明らかとなった。すなわち、16番及び 17番では、希釈倍率が低い（すなわち、濃度が高い）抗血清において吸光度の顕著な低下が観察され、これはコートしたモノクローナル抗体とのエピトープの競合によるものと考えられる。一方、1番及び 20番ではそのような吸光度の低下は観察されず、これはエピトープの競合がないことを示す。

20

【 0 0 6 3 】

実施例 3

実施例 2 において、インスリン分子上での認識するエピトープが異なることが明らかとなった抗血清 1番と 16番より、特異抗体（ポリクローナル抗体）をインスリン固相化カラ

30

ラムを通じて精製した。

【 0 0 6 4 】

96穴の免疫測定用のマイクロプレートを用い、1番より精製した特異抗体（ポリクローナル抗体）を $2 \mu\text{l} / \text{ml}$ の濃度で $100 \mu\text{l}$ づつウェルに分注し、室温で 2 時間静置してコートし、その後 20mM Tris-HCl , $\text{pH} 7.4 / 150 \text{mM NaCl}$ で溶解した $0.1\% \text{BSA}$ を $200 \mu\text{l}$ づつウェルに分注してブロッキングを行った。

【 0 0 6 5 】

16番より精製した特異抗体を 0.2M 炭酸水素ナトリウムに対して透析し、同重量の活性化ペルオキシダーゼと混合して酵素標識抗体を得た。

【 0 0 6 6 】

抗体固相化マイクロプレートに $95 \mu\text{l}$ のインスリン除去ラット血清を分注し、次いで $0 \text{pg} / \text{ml}$ から $5,000 \text{pg} / \text{ml}$ の標準インスリン希釈系列 $5 \mu\text{l}$ を分注し、室温で一時間反応させた。次いで、ウェルを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。

40

【 0 0 6 7 】

ウェルを洗浄後、 $100 \mu\text{l}$ の酵素基質液（TMB 溶液）を加えて 30 分間酵素反応を行い、1 規定の硫酸を加えて酵素反応を止めた後、 450nm の吸光度を測定した。

【 0 0 6 8 】

その結果を図 1 A 及び B に示す。

【 0 0 6 9 】

50

この結果より、本発明の測定試薬で100 μ lの試料を用いると1 pg/mlの濃度までインスリンが測定できることが示された。

【0070】

実施例4

実施例3で得られた特異抗体をペプシンで酵素消化してF(ab')₂を作製し、この1 mgと活性化ペルオキシダーゼ0.7 mgと混合し、酵素標識F(ab')₂を得た。

【0071】

この酵素標識F(ab')₂を実施例3で用いたペルオキシダーゼ標識抗体の代わりに用いてインスリンを測定した結果を図2に示す。

【0072】

この結果より100 μ lの試料を用いると上記実施例3よりも0 pg/mlの時の吸光度が下がり、より安定したデータが得られるようになった。

【0073】

実施例5

実施例3に示した方法でラット血清を試料としてインスリン濃度を測定した。

【0074】

同じラット血清の量を変えて測定した結果を図3に示す。

この結果より本発明の測定試薬を用いるとラットの血清量5 μ lから100 μ lまで良好な直線性が得られ、100 μ lの血清試料を用いてもインスリンが測定できることが示された(図1Bの標準曲線参照)。

【0075】

実施例6

実施例4と同様にマウス血清を試料としてインスリン濃度を測定した結果を図4に示す。

【0076】

この結果より本発明の測定試薬を用いるとマウスの血清量5 μ lから100 μ lまで良好な直線性が得られ、100 μ lの血清試料を用いてもインスリンが測定できることが示された。

【0077】

実施例7

実施例5と同様にマウス血清及びマウス全血を試料としてインスリン濃度を測定した結果を図5に示す。

【0078】

この結果より本発明の測定試薬を用いるとマウスの全血を用いてもインスリン濃度を測定することができることが示された。

【0079】

実施例8

実施例3の方法に準じて、ヒトインスリン標準用液100 μ lを用い、ヒトインスリンの測定も行った。その結果を図6に示す。

【0080】

この結果から、100 μ lのサンプル量においてもヒトインスリンを1 pg/mlの感度で測定可能なことが示された。

【0081】

【効果】

抗原分子上の異なるエピトープを優先的に認識するような2以上の高親和性抗体群(ポリクローナル抗体)を選択し、これらを組み合わせて使用するという本願発明の構成により、従来用いられてきた測定試薬より高感度な免疫測定キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1A】図1Aは、本願のキットによるラットインスリン(0~5 ng/ml)の測定結果を示す。

【図1B】図1Bは、本願のキットによるラットインスリン(0~20 ng/ml)の測

10

20

30

40

50

定結果を示す。

【図2】図2は、ポリクローナル抗体試薬としてF(a b')₂フラグメントを使用した場合の本願のキットによるラットインスリンの測定結果を示す。

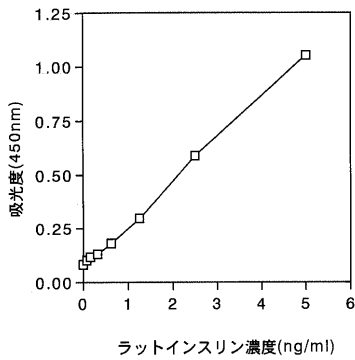
【図3】図3は、本願のキットによるラット血清中のインスリン濃度の測定結果を示す。

【図4】図4は、本願のキットによるマウス血清中のインスリン濃度の測定結果を示す。

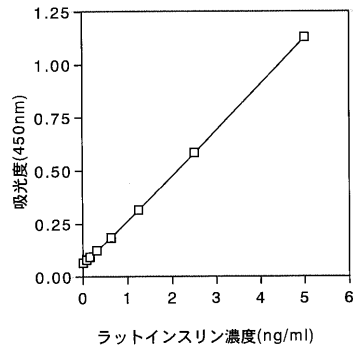
【図5】図5は、本願のキットによるマウス血清及びマウス全血中のインスリン濃度の測定結果を示す。

【図6】図6は、本願のキットによるヒトインスリンの測定結果(サンプル量100μl)を示す。

【図1A】

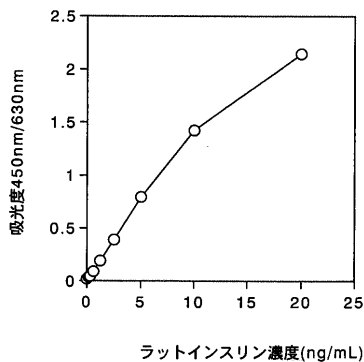


【図2】



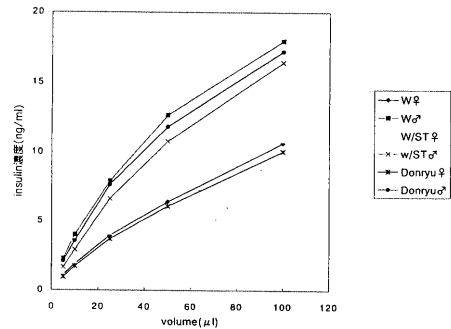
【図1B】

ラットインスリン標準曲線



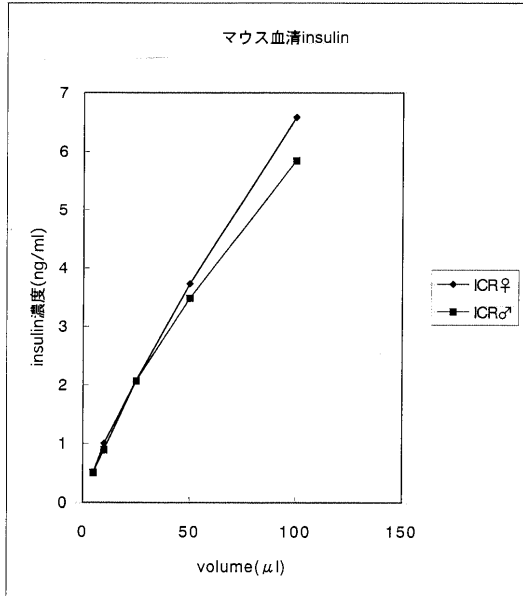
【図3】

ラットの血清insulin

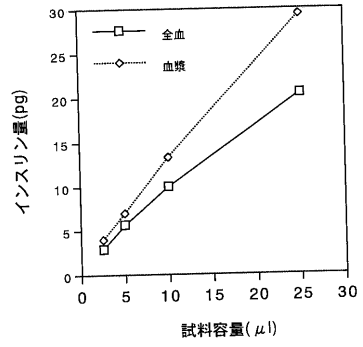


【 図 4 】

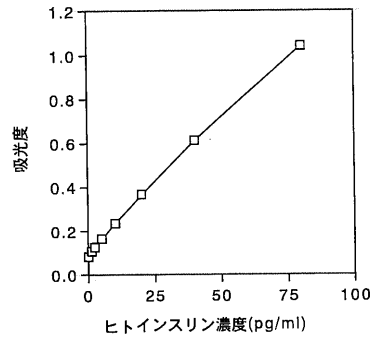
volume (μl)	insulin濃度 (ng/ml)	
	ICR♀	ICR♂
5	0.499	0.499
10	1.000	0.887
25	2.075	2.067
50	3.732	3.482
100	6.586	5.842



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 杉谷 政則
神奈川県横浜市鶴見区下末吉 2 丁目 1 番 1 号 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 豆越 慎一
神奈川県横浜市鶴見区下末吉 2 丁目 1 番 1 号 株式会社森永生科学研究所内

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特開平 1 0 - 1 6 0 7 3 5 (J P , A)
特表平 0 7 - 5 0 4 8 1 2 (J P , A)
特開平 0 7 - 2 6 0 7 8 6 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/48-98
CA/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	免疫试剂		
公开(公告)号	JP4590117B2	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	JP2001045316	申请日	2001-02-21
申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
[标]发明人	本庄勉 柴田治樹 杉谷政則 豆越慎一		
发明人	本庄 勉 柴田 治樹 杉谷 政則 豆越 慎一		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/53.B G01N33/543.515.D		
代理人(译)	Masarushin大崎		
其他公开文献	JP2002243740A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供免疫测定试剂和免疫测定试剂盒，与传统的免疫测定试剂相比，具有非常高的测量灵敏度。解决方案：选择具有高亲和力的两种或更多种抗体组（多克隆抗体），其能够优先识别具有等于或大于抗原分子的大小的不同表位，并且提供具有高于常规使用的测定试剂的灵敏度的免疫测定试剂盒。通过组合使用所选择的多克隆抗体。

稀释倍率	抗血清11	抗血清12	抗血清13	抗血清14	抗血清15	抗血清16	抗血清17	抗血清18	抗血清19	抗血清20
X243000	0.47	0.046	0.202	0.447	0.294	0.34	0.593	0.366	0.379	2.34
X81000	1.135	0.141	0.517	1.068	0.738	0.736	1.229	0.739	0.901	2.723
X27000	2.086	0.38	1.11	2.195	1.508	1.196	1.525	1.325	1.846	2.703
X9000	2.52	0.933	2.185	2.716	2.362	1.136	1.044	1.865	2.534	2.788
X3000	2.376	1.764	2.367	2.549	2.465	0.62	0.507	1.74	2.407	2.558