

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4346402号  
(P4346402)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日(2009.7.24)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 D  
**GO 1 N 33/577 (2006.01)** GO 1 N 33/577 B

請求項の数 10 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2003-347351 (P2003-347351)                  (22) 出願日 平成15年10月6日(2003.10.6)                  (65) 公開番号 特開2005-114480 (P2005-114480A)                  (43) 公開日 平成17年4月28日(2005.4.28)                  審査請求日 平成18年8月23日(2006.8.23)</p>	<p>(73) 特許権者 591258484                  株式会社エイアンドティー                  神奈川県藤沢市遠藤2023番地1                  (74) 代理人 100080609                  弁理士 大島 正孝                  (72) 発明者 岩本 久彦                  神奈川県藤沢市遠藤2023番地1 株式                  会社エイアンドティー内                  (72) 発明者 川野 充康                  神奈川県藤沢市遠藤2023番地1 株式                  会社エイアンドティー内                  審査官 赤坂 祐樹</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-ANPの免疫学的測定法および測定試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

N-ANP(N-末端pro-ANP)のN-末端の1~30番目の30個のアミノ酸残基を認識する第1モノクロナール抗体およびN-ANPのN-末端の65~84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体を用いることを特徴とするN-ANPの免疫学的測定法。

【請求項2】

第1モノクロナール抗体が標識されており且つ該標識がビオチンでありそして標識第2モノクロナール抗体の標識が酵素、蛍光物質、発光物質またはラジオアイソトープである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(i) N-ANPの存在する可能性のあるヒト血清に、N-ANPのN-末端の1~30番目の30個のアミノ酸残基を認識する標識第1モノクロナール抗体を加えて混合し、

(ii) 得られた血清混合物を、上記標識第1モノクロナール抗体の当該標識物質に対する抗体またはアビジンを固定した固体に接触せしめ、

(iii) 工程(ii)の接触後の固体を、N-ANPのN-末端の65~84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体と接触せしめ、次いで

(iv) 工程(iii)の接触後の固体について上記標識第2モノクロナール抗体の当該標識

について測定する、ことを特徴とする、ヒト血清中のN-ANPの免疫学的測定法。

## 【請求項 4】

( i ) N - A N P の存在する可能性のあるヒト血清に、N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する標識第 1 モノクロナール抗体および N - A N P の N - 末端の 6 5 ~ 8 4 番目の 2 0 個のアミノ酸残基を認識する標識第 2 モノクロナール抗体を逐次的にあるいは一緒に加えて混合し、

( ii ) 得られた血清混合物を、上記標識第 1 モノクロナール抗体の当該標識物質に対する抗体またはアビジンを固定した固体に接触せしめ、次いで

( iii ) 工程 ( ii ) の接触後の固体について上記標識第 2 モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とする、ヒト血清中の N - A N P の免疫学的測定法。

10

## 【請求項 5】

( i ) N - A N P の存在する可能性のあるヒト血清を、N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する第 1 モノクロナール抗体が N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固定された固体に接触せしめ、

( ii ) 工程 ( i ) の接触後の固体を、N - A N P の N - 末端の 6 5 ~ 8 4 番目の 2 0 個のアミノ酸残基を認識する標識第 2 モノクロナール抗体と接触せしめ、次いで

( iii ) 工程 ( ii ) の接触後の固体について上記標識第 2 モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とするヒト血清中の N - A N P の免疫学的測定法。

20

## 【請求項 6】

( i ) N - A N P の存在する可能性のあるヒト血清に、N - A N P の N - 末端の 6 5 ~ 8 4 番目の 2 0 個のアミノ酸残基を認識する標識第 2 モノクロナール抗体を加えて混合し、

( ii ) 得られた血清混合物を、N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する第 1 モノクロナール抗体が N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固定された固体に接触せしめ、次いで

( iii ) 工程 ( ii ) の接触後の固体について上記標識第 2 モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とする、ヒト血清中の N - A N P 免疫学的測定法。

30

## 【請求項 7】

N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する第 1 モノクロナール抗体および N - A N P の N - 末端の 6 5 ~ 8 4 番目の 2 0 個のアミノ酸残基を認識する標識第 2 モノクロナール抗体との組合せからなる、N - A N P の免疫学的測定試薬。

## 【請求項 8】

第 1 モノクロナール抗体が標識されており且つ該標識がビオチンである請求項 7 に記載の試薬。

## 【請求項 9】

標識第 2 モノクロナール抗体の標識が酵素、蛍光物質、発光物質またはラジオアイソトープである請求項 7 に記載の試薬。

## 【請求項 10】

第 1 モノクロナール抗体が N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固体に固定されている請求項 7 に記載の試薬。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は N - A N P の免疫学的測定法および測定試薬に関する。さらに詳しくは、N - A N P の特定の位置のアミノ酸残基を認識する異なる 2 種のモノクロナール抗体を用いる、N - A N P の免疫学的測定方法および測定試薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

50

心房性Na利尿ポリペプチド(ANP)は、主として心房で合成・貯蔵され血中に分泌されるホルモンで、Na利尿、血管拡張、レニン・アルドステロン分泌抑制、循環血漿量減少など多彩な生理作用を介して生体の体液バランスならびに血圧調節に関与すると考えられている。その分泌は心房圧による心房筋の伸展により刺激されることから、ANPが高値を呈する場合、心房負荷や循環血漿量増加をきたす病態例えばうっ血性心不全、発作性心房性不整脈・心房細動、急性心筋梗塞、腎不全、S I A D H、本態性高血圧、原発性アルドステロン症、C u s h i n g 症候群、B a r t t e r 症候群の存在が示唆される。

【0003】

血漿のANP濃度は各種心疾患および腎疾患で重症度に平行して高値を示す。実際、心不全患者の心内圧とANP濃度は極めてよく相関することが知られている。また、慢性腎不全患者における透析実施に伴うANP濃度の低下は除水量を反映し、至適体重(dry weight)の設定に際して一つの指標となる。

10

【0004】

特許文献1には、-ANP(pro-ANP)のN-末端の1~25番目の25のアミノ酸残基からなる部分を認識する、ハイブリドーマKY-ANP-III(FERM B P - 1 8 8 7)により産生されるモノクロナール抗体およびそれを用いる、-ANPの免疫学的測定法が開示されている。

【0005】

また、非特許文献1には、N-ANPの1~30番目のアミノ酸残基を認識するモノクロナール抗体とN-ANPの79~98番目のアミノ酸残基を認識するモノクロナール抗体とを用いて、サンドイッチ法によりN-ANPを免疫学的に測定する方法が開示されている。

20

【0006】

しかしながら、上記方法ではN-ANPを再現性よく測定することができずまた測定濃度範囲も狭いことが問題であった。

【特許文献1】特許第2561513号公報

【非特許文献1】U p s a l a J o u r n a l o f M e d i c a l S c i e n c e 1 0 2 9 9 - 1 0 8 ( 1 9 9 7 )

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0007】

本発明の目的は、N-ANPの新たな免疫学的方法を提供することにある。

【0008】

本発明の他の目的は、N-ANPの測定濃度範囲が広く、測定値の再現性が高くしかも測定感度が向上した、N-ANPの免疫学的測定法を提供することにある。

【0009】

本発明のさらに他の目的は、N-ANPの新たな免疫学的測定試薬を提供することにある。

【0010】

本発明のさらに他の目的および利点は以下の説明から明らかになる。

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第1に、N-ANP(N-末端pro-ANP)のN-末端の1~30番目の30個のアミノ酸残基を認識する第1モノクロナール抗体およびN-ANPのN-末端の65~84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体を用いることを特徴とするN-ANPの免疫学的測定法(以下、第1測定法ということがある)によって達成される。

【0012】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第2に、(i)N-ANPの存在する可能性のあるヒト血清に、N-ANPのN-末端の1~30番目の30個のアミノ酸残

50

基を認識する標識第1モノクロナール抗体を加えて混合し、

(ii) 得られた血清混合物を、上記標識第1モノクロナール抗体の当該標識物質に対する抗体またはアビジンを固定した固体に接触せしめ、

(iii) 工程(ii)の接触後の固体を、N-ANPのN-末端の65～84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体と接触せしめ、次いで

(iv) 工程(iii)の接触後の固体について上記標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とする、ヒト血清中のN-ANPの免疫学的測定法(以下、第2測定法ということがある)によって達成される。

【0013】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第3に、(i) N-ANPの存在する可能性のあるヒト血清に、N-ANPのN-末端の1～30番目の30個のアミノ酸残基を認識する標識第1モノクロナール抗体およびN-ANPのN-末端の65～84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体を逐次的にあるいは一緒に加えて混合し、

(ii) 得られた血清混合物を、上記標識第1モノクロナール抗体の当該標識物質に対する抗体またはアビジンを固定した固体に接触せしめ、次いで

(iii) 工程(ii)の接触後の固体について上記標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とする、ヒト血清中のN-ANPの免疫学的測定法(以下、第3測定法ということがある)によって達成される。

【0014】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第4に、(i) N-ANPの存在する可能性のあるヒト血清を、N-ANPのN-末端の1～30番目の30個のアミノ酸残基を認識する第1モノクロナール抗体がN-ANPのN-末端の1～30番目の30個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固定された固体に接触せしめ、

(ii) 工程(i)の接触後の固体を、N-ANPのN-末端の65～84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体と接触せしめ、次いで

(iii) 工程(ii)の接触後の固体について上記標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とするヒト血清中のN-ANPの免疫学的測定法(以下、第4測定法ということがある)によって達成される。

【0015】

また、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第5に、(i) N-ANPの存在する可能性のあるヒト血清に、N-ANPのN-末端の65～84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体を加えて混合し、

(ii) 得られた血清混合物を、N-ANPのN-末端の1～30番目の30個のアミノ酸残基を認識する第1モノクロナール抗体がN-ANPのN-末端の1～30番目の30個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固定された固体に接触せしめ、次いで

(iii) 工程(ii)の接触後の固体について上記標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定する、

ことを特徴とする、ヒト血清中のN-ANP免疫学的測定法(以下、第5測定法ということがある)によって達成される。

【0016】

さらに、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、最後に、N-ANPのN-末端の1～30番目の30個のアミノ酸残基を認識する第1モノクロナール抗体およびN-ANPのN-末端の65～84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体との組合せからなる、N-ANPの免疫学的測定試薬によって達成される。

【発明の効果】

【0017】

10

20

30

40

50

本発明のN - ANP測定試薬は、高感度で測定範囲も広く、さらに、測定再現性も良好である。加えて、本発明の測定方法において測定結果を得るための総所要時間を、例えば約12分で終了することができ、迅速なN - ANP測定が可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明について詳述する。

【0019】

本発明のN - ANP (N - 末端pro - ANP) の免疫学的測定法 (第1測定法) は、N - ANPのN - 末端の1 ~ 30番目の30個のアミノ酸残基を認識する第1モノクロナール抗体およびN - ANPのN - 末端の65 ~ 84番目の20個のアミノ酸残基を認識する標識第2モノクロナール抗体を用いて行われる。

10

【0020】

これらの第1モノクロナール抗体および第2モノクロナール抗体は例えばMedix Biochemica社から市販されており、容易に入手可能である。第1モノクロナール抗体は標識されていてもされていなくてもよい。第1モノクロナール抗体の標識物質は、好ましくはビオチンである。該標識物質に対する抗体との免疫学的反応を利用して第1モノクロナール抗体を固体に固定化することができる。また、第2モノクロナール抗体の標識は例えば酵素、蛍光物質、発光物質あるいはアイソトープであることができる。N - ANPと免疫学的反応をした第2モノクロナール抗体の標識を測定することにより、N - ANPの存在を定性的にあるいは定量的に検出することができる。第1モノクロナール抗体および第2モノクロナール抗体への標識付けはそれ自体公知の方法により行うことができる。例えば標識酵素としては、アルカリ性ホスファターゼ、 $\alpha$  - D - ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなど、特に西洋わさびペルオキシダーゼが好ましく用いられる。また、架橋剤としては、N, N' - o - フェニレンジマレイミド、4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N - スクシンイミドエステル、6 - マレイミドヘキサン酸・N - スクシンイミドエステル、3 - (2 - ポリジルジチオ) プロピオン酸・N - スクシンイミドエステル、4, 4' - ジチオジピリジン、その他公知の架橋剤が用いられる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて、既知の方法に従って行うことができる。

20

【0021】

本発明の第2測定法は、上記のとおり、工程(i) ~ (iv)からなる。工程(i)において、N - ANPの存在する可能性のあるヒト血清に標識第1モノクロナール抗体を加えて混合する。標識第1モノクロナール抗体はリン酸緩衝液で希釈して例えば0.5 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の水溶液に調製して用いられる。この水溶液には牛血清アルブミンあるいはカゼイン、およびマウス血清をそれぞれ例えば0.1 ~ 5%および0.5 ~ 20%で含有させるのが好ましい。工程(i)で得られた血清混合物中にはN - ANPと標識第1モノクロナール抗体との免疫学的反応生成物が形成される。工程(ii)ではこの血清混合物を、標識第1モノクロナール抗体の当該標識物質例えばビオチンに対する抗体またはアビジンを固定した固体に接触させる。

30

【0022】

抗体を固定化する固相としては、通常の免疫測定法に使用される市販の抗原抗体反応用担体、例えば、ガラスまたは合成樹脂製の粒状物(ビーズ)あるいは球状物(ボール)、カップ、チューブ、プレートなどを用いることができる。これらの担体に抗体を吸着せしめる。吸着は通常リン酸バッファー中、pH6 ~ 10、好ましくは中性付近で室温下一夜放置することにより行う。抗体を吸着した担体は、アジ化ナトリウムなどの防腐剤の存在下、冷所に保存する。アビジンの固定化も同様にして行うことができる。上記接触に際しては、上記固定化固体を予めリン酸緩衝液等で湿潤せしめておくことが好ましく、接触は例えば1秒 ~ 60分間で十分である。工程(ii)の接触後の固体の表面には、固定化された抗体すなわち標識第1モノクロナール抗体の当該標識物質に対する抗体あるいはアビジンと、N - ANPと標識第1モノクロナール抗体との免疫学的反応生成物との間に、当

40

50

該標識物質を介して結合が生成し、該免疫学的生成物が固定される。

【0023】

工程(iii)では、工程(ii)の接触後の上記固体を標識第2モノクロナール抗体と接触せしめる。標識第2モノクロナール抗体は、リン酸緩衝液で希釈して例えば0.1~5 μg/mlの濃度の水溶液に調製して用いられる。この水溶液には牛血清アルブミンあるいはカゼイン、およびマウス血清をそれぞれ例えば0.1~5%および0.5~20%で含有させるのが好ましい。

【0024】

標識第2モノクロナール抗体は、工程(ii)で固定化されたN-ANPを免疫学的に反応する。

10

【0025】

従って、工程(iv)において、工程(iii)の接触後の固体について標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定することにより、N-ANPの存在が定性的にあるいは定量的に検出することができる。標識の測定は標識の違いによってそれぞれそれ自体公知の方法により実施することができる。

【0026】

本発明の第3測定法は、前記のとおり、工程(i)~(iii)からなる。工程(i)において、N-ANPの存在する可能性のあるヒト血清に標識第1モノクロナール抗体および標識第2モノクロナール抗体を逐次的にあるいは一緒にを加えて混合する。標識第1モノクロナール抗体と標識第2モノクロナール抗体は、N-ANPと、それぞれが認識する

20

【0027】

アミノ酸残基の部位で免疫学的に反応してN-ANPと結合する。工程(ii)では、工程(i)で得られた血清混合物を、標識第1モノクロナール抗体の当該標識物質に対する抗体またはアビジンを固定した固体に接触せしめる。この工程(ii)において、第1測定法の工程(iii)において生成される同じ生成物が生成されることが理解されよう。

【0028】

次いで、工程(iii)では、工程(ii)の接触後の固体について標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定が行われる。

【0029】

本発明の第4測定法は、前記のとおり、工程(i)~(iii)からなる。

30

【0030】

工程(i)においてN-ANPの存在する可能性のあるヒト血清を、第1モノクロナール抗体がN-ANPのN-末端の1~30番目の30個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固定された固体に接触せしめる。工程(i)で用いられる第1モノクロナール抗体が固定化された固体は、第1モノクロナール抗体が認識するアミノ酸残基の部位で固体に固定化されたものではなく、第1モノクロナール抗体が認識するアミノ酸残基の部位とは異なる他の部位で固体に固定化されたものである。このような固定化は、第2測定法の工程(ii)において説明した固定化と同様にして行うことができる。固定化された第1モノクロナール抗体は、そのため、工程(i)においてN-ANPと免疫学的に反応する

40

【0031】

工程(ii)において、工程(i)の接触後の固体を標識第2モノクロナール抗体と接触せしめる。工程(ii)において、工程(i)において上記の如く固定化されたN-ANPに対し標識第2モノクロナール抗体が免疫学的に反応して固定化される。

【0032】

次いで工程(iii)では、工程(ii)の接触後の固体について標識第2モノクロナール抗体の当該標識について測定が行われる。

【0033】

本発明の第4測定法は、前記のとおり、工程(i)~(iii)からなる。

50

## 【 0 0 3 4 】

工程 ( i ) において、N - A N P の存在する可能性のあるヒト血清に標識第 2 モノクロナール抗体を加えて混合する。工程 ( i ) で得られた血清混合物中には N - A N P と標識第 2 モノクロナール抗体との免疫学的反応生成物が形成される。工程 ( ii ) では、工程 ( i ) で得られた血清混合物を、第 1 モノクロナール抗体が N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固定された固体に接触せしめる。工程 ( ii ) で用いられる第 1 モノクロナール抗体が固定化されたこの固体は、第 3 測定法の工程 ( i ) で用いられる第 1 モノクロナール抗体が固定化された固体と同じものである。工程 ( ii ) において、固定化された第 1 モノクロナール抗体が工程 ( i ) において形成された免疫学的反応生成物の N - A N P と第 1 モノクロナール抗体を認識するアミノ酸残基の部位で免疫学的に反応して固定化する。

10

## 【 0 0 3 5 】

次いで、工程 ( iii ) では、工程 ( ii ) の接触後の固体について標識第 2 モノクロナール抗体の当該標識について測定が行われる。

## 【 0 0 3 6 】

本発明によれば、本発明の上記測定法の説明から理解されるように、N - A N P の有用な免疫学的測定試薬として、N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する第 1 モノクロナール抗体および N - A N P の N - 末端の 6 5 ~ 8 4 番目の 2 0 個のアミノ酸残基を認識する標識第 2 モノクロナール抗体との組合せが提供される。この試薬において、例えば第 1 モノクロナール抗体は標識されており且つ該標識がビオチンであることができ、標識第 2 モノクロナール抗体の標識は酵素、蛍光物質、発光物質またはラジオアイソトープであることができる。

20

## 【 0 0 3 7 】

また、N - A N P の測定に用いられるときには、上記第 1 モノクロナール抗体は N - A N P の N - 末端の 1 ~ 3 0 番目の 3 0 個のアミノ酸残基を認識する部位以外の部位で固体に固定されることができる。

## 【実施例】

## 【 0 0 3 8 】

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。

30

## 【 0 0 3 9 】

## 実施例 1

( 1 ) N - A N P の 1 - 3 0 番目のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体 ( 第 1 モノクローナル抗体 ) のビオチン化

第 1 モノクローナル抗体 ( M e d i x B i o c h e m i c a 社製 ) のビオチン化は以下の手順で行なった。

## 【 0 0 4 0 】

第 1 モノクローナル抗体を 2 m g / m L となるように 1 0 m M の H E P E S 緩衝液 ( p H 8 . 5 ) を用いて希釈して総量 2 5 0 μ L の第 1 モノクローナル抗体溶液を調製した。該溶液にビオチン化試薬 ( 5 0 m M B i o t i n - A C <sub>5</sub> - O S u 、 同仁化学 ( 株 ) 製 ) を 3 0 μ L 添加して混合後、2 5 にて 4 時間インキュベーションした。その後、0 . 1 5 M の N a C l を含む 1 0 m M のリン酸緩衝液 ( p H 7 . 4 ) ( 以下、「P B S」と表記することもある ) で平衡化した P D - 1 0 カラム ( アマシャムファルマシア製 ) に、上記反応液 2 5 0 μ L に 2 . 2 5 m L の P B S を加えた溶液をアプライした。続いて、3 . 5 m L の P B S をアプライし、カラムから出てくる溶液をビオチン化第 1 モノクローナル抗体として回収した。

40

## 【 0 0 4 1 】

( 2 ) N - A N P の 6 5 - 8 4 番目のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体 ( 第 2 モノクローナル抗体 ) のペルオキシダーゼ標識

第 2 モノクローナル抗体 ( M e d i x B i o c h e m i c a 社製 ) のペルオキシダー

50

ゼ標識は以下の手順で行なった。

【0042】

5 mg のペルオキシダーゼ (RZ > 3.0、東洋紡績社製) を 1.2 mL の水に溶解し、0.1 M の過ヨウ素酸ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 0.3 mL 添加して、25 °C で 20 分静置した。その後、該反応液を 10 mM の酢酸ナトリウム / 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に対して 4 倍で一晩透析し、活性化ペルオキシダーゼ溶液を得た。次に、10 mg / mL の第 2 モノクローナル抗体を含む 20 mM の炭酸緩衝液 (pH 9.5) 0.5 mL を調製し、該抗体溶液と上記活性化ペルオキシダーゼ溶液を混合し、25 °C で 2 時間攪拌した。得られた反応液に 4 mg / mL の水素化ホウ素ナトリウム水溶液を 0.1 mL 加えて 4 倍で 2 時間静置した後、PBS に対して一晩透析してペルオキシダーゼ標識第 2 モノクローナル抗体を得た。

10

【0043】

(3) 第 1 試薬の調製

(1) で調製したビオチン化第 1 モノクローナル抗体の濃度が 5 µg / mL となるように、また牛血清アルブミン (BSA) 濃度、およびマウス血清濃度がそれぞれ 1%、10% となるように PBS に添加して第 1 水溶液とした。

【0044】

(4) 第 2 試薬の調製

(2) で調製したペルオキシダーゼ標識第 2 モノクローナル抗体の濃度が 1 µg / mL となるように、またマウス血清濃度、および牛血清アルブミン (BSA) 濃度がそれぞれ 10%、1% となるように PBS に添加して第 2 試薬とした。

20

【0045】

(5) 被検体溶液の測定

リコンビナント N - ANP (Medix Biochemica 社製) を含むか若しくは含まない PBS を被検体溶液として以下の測定に使用した。また、以下の測定は市販の酵素免疫測定装置 MI 01 ((株)エイアンドティー製) を用いて行なった。

【0046】

被検体溶液 30 µL と第 1 試薬 30 µL を混合して 40 °C で 5 分間インキュベーション後、該反応液の 50 µL を 1% カゼインを含む PBS で浸潤させた抗ビオチン抗体固相化カップ ((株)エイアンドティー製) に滴下した。次いで、(4) で調製した第 2 試薬を 20 µL 滴下した。40 °C で 2 分間該カップをインキュベーション後、80 µL の 0.05% Tween 20 を含む PBS で 2 回洗浄した。これに 0.05% の 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) と 0.01% の過酸化水素から成る TMBZ 溶液 (エイアンドティー製) を 30 µL 滴下し、波長 670 nm における単位時間あたりのレーザー光反射強度の変化量 (以下、「K/S」と表記する) を測定した。

30

【0047】

上記測定を 3 回行った結果を表 1 に示した。表 1 より、N - ANP 濃度が 0 pmol / L のときの「平均 K/S + 2 × 標準偏差」が、30 pmol / L のときの「平均 K/S - 2 × 標準偏差」と重ならないことから、測定下限は 30 pmol / L であった。また、N - ANP 濃度が 20, 000 pmol / L までは、N - ANP 濃度に対して K/S 値がほぼ直線的に増加していることから、少なくとも 20, 000 pmol / L までは測定できることが確認できた。さらに、前記非特許文献 1 に報告されている測定再現性 (10% 程度) よりも良好であった (本試薬の測定再現性は 2.5 - 7.5%)。

40

【0048】

【表 1】

N-ANP濃度 (pmol/L)	ΔK/S					
	1回目	2回目	3回目	平均	2X標準偏差	再現性(CV)(%)
0	0.02153	0.02037	0.02219	0.02136	0.0018	4.31
30	0.03197	0.02878	0.03216	0.03097	0.0038	6.13
40	0.03994	0.04257	0.04113	0.04121	0.0026	3.20
50	0.05284	0.04887	0.05188	0.05120	0.0041	4.05
500	0.34775	0.34298	0.35990	0.35021	0.0174	2.49
1000	0.77152	0.88006	0.88321	0.84493	0.1272	7.53
5000	2.40642	2.26878	2.25160	2.30893	0.1697	3.68
10000	4.73285	4.93442	4.53741	4.73489	0.3970	4.19
20000	9.55374	9.39862	9.13996	9.36411	0.4181	2.23
40000	11.37496	12.85929	10.99891	11.74439	1.9673	8.38

10

【0049】

実施例 2

実施例 1 において、「(5)被検体溶液の測定」以外はすべて実施例 1 と同様の方法で行った。被検体溶液の測定は以下の条件、方法にて行った。

20

【0050】

測定は、リコンビナント N - ANP (Medix Biochemica 社製) を含むか若しくは含まない PBS を被検体溶液として、MI01 (株) エイアンドティー製) を使用して行なった。

【0051】

被検体溶液 50 μL と第 1 試薬 5 μL、第 2 試薬 5 μL を混合して 40 で 5 分間インキュベーション後、該反応液の 50 μL を 1% カゼインを含む PBS で浸潤させた抗ピオチン抗体固相化カップ (株) エイアンドティー製) に滴下した。次いで、80 μL の 0.05% Tween 20 を含む PBS で 2 回洗浄した。これに 0.05% の 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMBZ) と 0.01% の過酸化水素から成る TMBZ 溶液 (エイアンドティー製) を 30 μL 滴下し、K/S を測定した。

30

【0052】

上記測定を 3 回行った結果を表 2 に示した。表 2 に示すように、実施例 1 に記したような 2 step 法のみならず、1 step 法でも 2 step 法と同等の感度、濃度域、測定再現性を有することが確認できた。

【0053】

【表 2】

N-ANP濃度 (pmol/L)	ΔK/S					
	1回目	2回目	3回目	平均	2X標準偏差	再現性(CV)(%)
0	0.01522	0.01367	0.01638	0.01509	0.0027	9.01
30	0.03546	0.03887	0.03421	0.03618	0.0048	6.67
40	0.04939	0.04792	0.05024	0.04918	0.0023	2.39
50	0.06130	0.05799	0.06201	0.06043	0.0043	3.55
500	0.64357	0.59432	0.63959	0.62583	0.0547	4.37
1000	1.31561	1.28109	1.25300	1.28323	0.0627	2.44
5000	4.89126	4.79022	4.59671	4.75940	0.2993	3.14
10000	9.02942	9.30145	8.86210	9.06432	0.4435	2.45
20000	15.51511	15.18545	15.21601	15.30552	0.3643	1.19
40000	15.31025	15.86451	15.84820	15.67432	0.6308	2.01

10

## 【0054】

## 実施例 3

(1) N-ANPの1-30番目のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体(第1モノクローナル抗体)の固定化

20

第1モノクローナル抗体を0.1mg/mLとなるようにPBSを用いて希釈し、反応カップ(株)エイアンドティー製)1個当たり25μLずつ滴下した。これを室温で風乾し、第1モノクローナル抗体固相化カップを作製した。

## 【0055】

(2) N-ANPの65-84番目のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体(第2モノクローナル抗体)のペルオキシダーゼ標識

実施例1と同様の方法で、第2モノクローナル抗体をペルオキシダーゼ標識した。

## 【0056】

## (3) 第2試薬の調製

(2)で調製したペルオキシダーゼ標識第2モノクローナル抗体の濃度が1μg/mLとなるように、またマウス血清濃度、および牛血清アルブミン(BSA)濃度がそれぞれ10%、1%となるようにPBSに添加して第2試薬とした。

30

## 【0057】

## (4) 被検体溶液の測定

リコンビナントN-ANP(Medix Biochemica社製)を含むか若しくは含まないPBSを被検体溶液として、実施例1と同様、MI01(エイアンドティー製)を使用して測定を行なった。

## 【0058】

被検体溶液30μLを1%カゼインを含むPBSで浸潤させた第1モノクローナル抗体固相化カップ(上記(1)で作製したもの)に滴下した。次いで、(3)で調製した第2試薬を20μL滴下した。40℃で2分間インキュベーション後、80μLの0.05% Tween 20を含むPBSで2回洗浄した。これに0.05%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)と0.01%の過酸化水素から成るTMBZ溶液(株)エイアンドティー製)を30μL滴下し、K/Sを測定した。

40

## 【0059】

上記測定を3回行った結果を表3に示した。表3に示すように、実施例1と同等の感度、測定域を持ったN-ANP測定試薬が作製できた。また、測定再現性も実施例1と同等であった。

## 【0060】

【表 3】

N-ANP濃度 (pmol/L)	ΔK/S					
	1回目	2回目	3回目	平均	2X標準偏差	再現性(CV)(%)
0	0.00984	0.01169	0.01059	0.01071	0.0019	8.69
30	0.02414	0.02121	0.02260	0.02265	0.0029	6.47
40	0.03486	0.03094	0.03262	0.03281	0.0039	5.99
50	0.04054	0.03995	0.04201	0.04083	0.0021	2.60
500	0.30186	0.33261	0.30815	0.31421	0.0325	5.17
1000	0.61561	0.66480	0.68082	0.65374	0.0680	5.20
5000	2.81010	2.59411	2.68089	2.69503	0.2174	4.03
10000	4.61481	4.34604	4.28647	4.41577	0.3499	3.96
20000	8.91091	9.24945	8.73392	8.96476	0.5239	2.92
40000	9.81497	10.82652	10.65549	10.43233	1.0829	5.19

10

【0061】

比較例 1

実施例 1 において、N - ANP の 65 - 84 番目のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体（第 2 モノクローナル抗体）を N - ANP の 79 - 98 番目のアミノ酸を認識するモノクローナル抗体に変えたこと以外はすべて実施例 1 と同様の方法で行った。

20

【0062】

上記測定を 3 回行った結果を表 4 に示した。表 4 に示すように、N - ANP 濃度が 50 pmol/L においても 0 pmol/L との差がなく、また、5,000 pmol/L 以上は測定値（K/S）が殆ど同じであることから、測定範囲は 100 - 5,000 pmol/L であった。測定再現性も 6.5 - 13.3% であり、実施例 1 よりも悪かった。

【0063】

【表 4】

N-ANP濃度 (pmol/L)	ΔK/S					
	1回目	2回目	3回目	平均	2X標準偏差	再現性(CV)(%)
0	0.03711	0.03315	0.03104	0.03377	0.0062	9.13
50	0.03720	0.03995	0.03242	0.03652	0.0076	10.43
100	0.07513	0.08613	0.09211	0.08446	0.0172	10.20
500	0.37495	0.44130	0.47406	0.43010	0.1010	11.74
1000	0.81034	0.86150	0.75608	0.80931	0.1054	6.51
5000	3.80861	3.40513	2.91505	3.37626	0.8950	13.25
10000	4.20860	3.40088	3.03556	3.54835	1.2005	16.92

30

40

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平08-226919(JP,A)  
特開平10-170517(JP,A)  
特開平02-016997(JP,A)  
特開平06-160383(JP,A)  
特開2001-174460(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53  
G01N 33/577

专利名称(译)	N-ANP的免疫学测量方法和测量试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP4346402B2</a>	公开(公告)日	2009-10-21
申请号	JP2003347351	申请日	2003-10-06
申请(专利权)人(译)	株式会社エイアンドティー		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社エイアンドティー		
[标]发明人	岩本久彦 川野充康		
发明人	岩本 久彦 川野 充康		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B		
代理人(译)	大岛正孝		
其他公开文献	JP2005114480A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：为N-ANP提供免疫学测量方法，在N-ANP上具有宽的测量温度范围，具有高测量值的可重复性，并且还提高了测量灵敏度。  
 ŽSOLUTION：N-ANP通过使用第一个单克隆抗体进行免疫测定，用于识别第一个至第30个，即N-ANP的N末端的30个氨基酸残基和用于识别第65个至第84个的识别第二个单克隆抗体，也就是说，N-ANP的N-末端上有20个氨基酸残基。Ž

N-ANP濃度 (pmol/L)	ΔK/S					
	1回目	2回目	3回目	平均	2x標準偏差	再現性(CV)(%)
0	0.02153	0.02037	0.02219	0.02136	0.0018	4.31
30	0.03197	0.02878	0.03216	0.03097	0.0038	6.13
40	0.03994	0.04257	0.04113	0.04121	0.0026	3.20
50	0.05284	0.04887	0.05188	0.05120	0.0041	4.05
500	0.34775	0.34298	0.35990	0.35021	0.0174	2.49
1000	0.77152	0.88006	0.88321	0.84493	0.1272	7.53
5000	2.40642	2.26878	2.25160	2.30893	0.1697	3.68
10000	4.73285	4.93442	4.53741	4.73489	0.3970	4.19
20000	9.55374	9.39862	9.13996	9.36411	0.4181	2.23
40000	11.37496	12.85929	10.99891	11.74439	1.9673	8.38