

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4442340号
(P4442340)

(45) 発行日 平成22年3月31日(2010.3.31)

(24) 登録日 平成22年1月22日(2010.1.22)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	Z
CO 7 K 16/44	(2006.01)	CO 7 K 16/44	
GO 1 N 30/00	(2006.01)	GO 1 N 30/00	A
BO 1 J 20/281	(2006.01)	GO 1 N 30/48	R
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 33/53	E

請求項の数 5 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-204271 (P2004-204271)
 (22) 出願日 平成16年7月12日(2004.7.12)
 (65) 公開番号 特開2006-29789 (P2006-29789A)
 (43) 公開日 平成18年2月2日(2006.2.2)
 審査請求日 平成19年6月20日(2007.6.20)

(73) 特許権者 000003300
 東ソー株式会社
 山口県周南市開成町4560番地
 (72) 発明者 山田 雅士
 神奈川県横浜市鶴見区岸谷1-26-3-402
 (72) 発明者 三澤 孝一
 神奈川県海老名市杉久保2158-1ロイヤル
 ハイイツ405
 (72) 発明者 本間 信幸
 神奈川県横浜市旭区中沢3-32-11
 (72) 発明者 松葉 隆雄
 神奈川県相模原市東林間1-6-18

審査官 海野 佳子

最終頁に続く

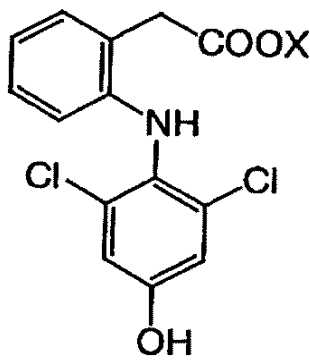
(54) 【発明の名称】 抗体、それを含有する吸着剤、および免疫測定試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 [I]

【化1】



で表されるジクロフェナク類の主要代謝物(式中、Xは水素又はアルカリ金属を示す)に特異的に反応することを特徴とする、抗体。

【請求項2】

請求項1に記載の抗体を含有することを特徴とする、ジクロフェナク類の主要代謝物の吸着剤。

【請求項3】

請求項 2 に記載の吸着剤を検体と接触させることを特徴とする、検体中のジクロフェナク類の主要代謝物の吸着方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の吸着剤を含有することを特徴とする、総トリヨードサイロニン及び/又は遊離型トリヨードサイロニンの免疫測定試薬。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の免疫測定試薬を用いることを特徴とする、総トリヨードサイロニン及び/又は遊離型トリヨードサイロニンの免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、薬剤の代謝物に特異的に反応する抗体、この抗体を含有する薬物代謝物の吸着剤、及びその用途等に関するものである。

【背景技術】

【0002】

患者検体を免疫測定試薬を用いて測定する際に、異常値を示した症例が確認されている。この異常値は、自己抗体、異好性抗体によるものが原因として多かった。

【0003】

近年、自己抗体、異好性抗体を保有しない患者検体において、薬剤を服用している際に異常値を示した症例が確認されており、特にジクロフェナク製剤を服用している患者検体において、総トリヨードサイロニンおよび/または遊離型トリヨードサイロニンの測定値が異常高値を示した症例が報告されている。この異常高値の原因は、抗トリヨードサイロニン抗体が検体中の薬剤と交差反応しているためと考えられ、そのため薬物と交差反応しない抗トリヨードサイロニン抗体を用いることにより、薬剤の影響を回避している(例えば、非特許文献 1 参照)。しかし、そのような交差反応性のない抗体の探索、測定系の再構築等が問題となっていた。

20

【0004】

【非特許文献 1】医学と薬学 第 44 巻 第 2 号 第 274 - 278 頁 2000 年 8 月

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0005】

異常値の対策に関しては前述のように様々な検討がなされている。しかしながら、薬物と交差反応性のない抗体の探索、測定系の再構築等が問題となり、他の方法により薬剤の影響を回避することが望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題に関し鋭意検討した結果、薬物の代謝物に特異的に反応する抗体を生産し、これを検体と接触させることにより、検体中に存在する薬物または薬物代謝物の影響を回避する方法を見出し、本発明を完成したものである。

【0007】

40

すなわち本発明は、薬物の代謝物に特異的に反応することを特徴とする抗体である。また本発明は、そのような抗体を含有することを特徴とする、薬物代謝物の吸着剤である。さらに本発明は、そのような吸着剤を検体と接触させることを特徴とする、検体中の薬物代謝物の吸着方法である。また本発明は、そのような吸着剤を含有することを特徴とする、免疫測定試薬である。さらに本発明は、そのような免疫測定試薬を用いることを特徴とする、免疫測定方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

本発明において「薬物」とは特に限定されるものではないが、例えばメフェナム酸類、塩酸ジラゼブ類、リン酸ジソピラミド類、センノシド・カルシウム類、アテノール類、イコサベント酸エチル類、チアマゾール類、ジクロフェナク類等があげられる。

50

【 0 0 0 9 】

このような薬物は生体内で代謝され、代謝物へと変化するが、本発明ではこの薬物代謝物に特異的に反応する抗体を用いる。ここでいう抗体とは特に限定はなく、例えば抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等があげられる。抗血清は、例えば薬物の代謝物をウシ血清アルブミン等のたん白質に標識し、常法に従い、これを動物に免疫して、その血清成分から得ることができる。ポリクローナル抗体は、例えば上述方法により得られた抗血清を精製する事により得ることができる。モノクローナル抗体は、例えば薬物の代謝物をウシ血清アルブミン等のたん白質に標識し、常法に従い、これを動物に免疫して、抗体生産能を持つ脾臓 B 細胞を選別し、動物のミエローマ細胞と融合してハイブリドーマ細胞を樹立し、さらにこれを動物の腹腔内に注入して得られる腹水から精製して得ることができる。または、細胞培養法等により得ることができる。

10

【 0 0 1 0 】

このような薬物代謝物と特異的に反応する抗体は、薬物代謝物の吸着剤として用いることができる。即ちそのような吸着剤を検体と接触させることにより、検体中の薬物代謝物は、それに特異的に反応する抗体と反応し、結果として検体中に残存する遊離の（即ち、抗体と反応していない）薬物代謝物を低減させることができる。このため、このように処理された検体を免疫測定に用いることにより、検体中に共存していた薬物代謝物の悪影響を低減させた免疫測定を行うことができる。

【 0 0 1 1 】

なお検体を吸着剤と接触させる処理は、免疫測定の前に行ってもよく、また免疫測定と同時に進めてもよいが、試薬等の簡略化のために同時に行うほうが好ましい。従って、吸着剤は免疫測定試薬中に含有されることが好ましく、そのような吸着剤を含有する免疫測定試薬を用いて免疫測定を行うことが好ましい。

20

【 0 0 1 2 】

免疫測定試薬としては、抗原抗体反応を利用したものであれば特に限定はなく、例えばサンドイッチ法、競合法、凝集法などにより測定するための試薬である。

【 0 0 1 3 】

検体としては特に限定はないが、例えば生体由来の試料として尿、血液、血清、血漿、その他体液、組織などがあげられる。

【 0 0 1 4 】

以上のような吸着剤及び免疫測定試薬は、特にジクロフェナク製剤を服用している患者検体の総トリヨードサイロニン及びノ又は遊離型トリヨードサイロニンの免疫測定において特に有用であるため、以下に詳しく説明する。

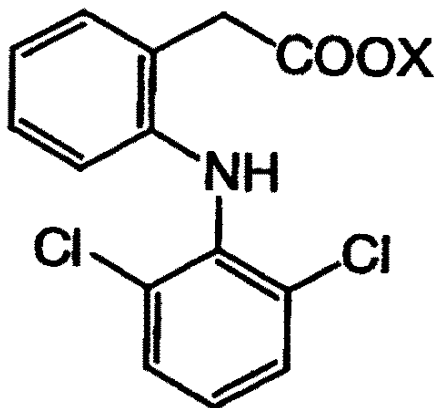
30

【 0 0 1 5 】

健常人血清に、式 [I I]

【 0 0 1 6 】

【 化 1 】



【 I I 】

40

50

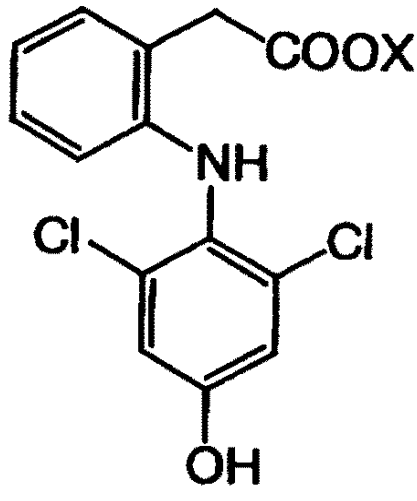
で表されるジクロフェナク類（式中、Xは水素又はアルカリ金属を示す）を添加して、免疫測定試薬により遊離型トリヨードサイロニン測定を行ったところ、異常高値は示さなかった（本発明において、「アルカリ金属」はリチウム、ナトリウム、カリウム等である）。

【0017】

しかし、健常人血清に式【I】

【0018】

【化2】



10

20

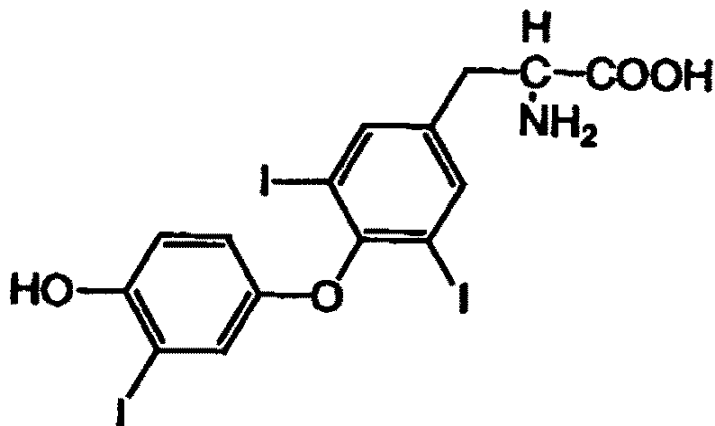
で表されるジクロフェナク製剤の主要代謝物（式中、Xは前記と同様を示す）を添加して、免疫測定試薬により遊離型トリヨードサイロニン測定を行ったところ、異常高値を示す結果となった。

【0019】

以上の結果より、遊離型トリヨードサイロニン測定において異常高値を示す原因は、ジクロフェナク類そのものではなく、ジクロフェナク類の主要代謝物が関与していると考えられる。また構造的にも式【III】

【0020】

【化3】



トリヨードサイロニン

【 III 】

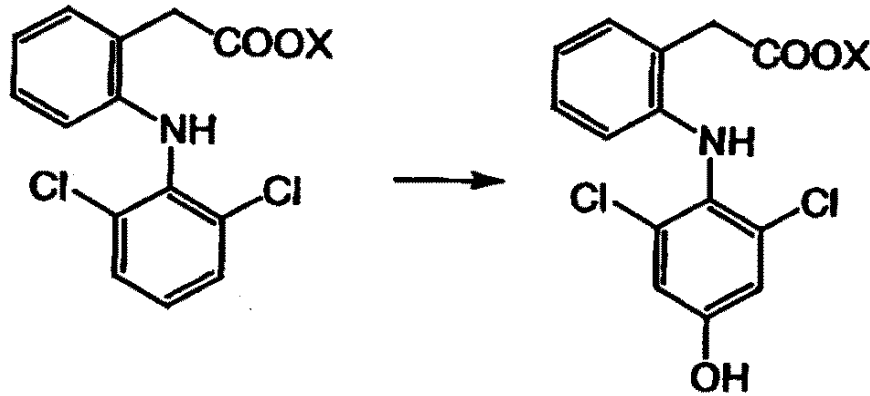
40

で表されるトリヨードサイロニンは、式【II】で表されるジクロフェナク類よりも、式【I】で表される主要代謝物に類似していることから、

【0021】

50

【化4】



ジクロフェナク製剤

主要代謝物

【I I】

【I】

10

免疫反応試薬に使用している抗トリヨードサイロニン抗体が、式【I】で表されるジクロフェナク類の主要代謝物へ交差反応することによるものと考えられる。

【0022】

20

この結果を確認するために、上述の方法により得られた抗体の中で、式【I】で表されるジクロフェナク類の主要代謝物に特異的に反応する抗体を含有させた遊離型トリヨードサイロニン測定用免疫反応試薬を作製し、そのような抗体を含有させなかった免疫反応試薬を用いた場合に異常高値を示す検体を測定したところ、異常高値が回避されていることを確認した。

【発明の効果】

【0023】

本発明による薬物代謝物に特異的に反応する抗体は、薬物代謝物の吸着剤とすることができ、その吸着剤を検体と接触させることにより、検体中の薬物代謝物を吸着させることができる。この吸着剤は免疫測定試薬に含有させることができ、そのような免疫測定試薬を用いることにより、異常値を示す恐れのない免疫測定を行うことができる。

30

【0024】

本発明は、特に薬物の代謝物が式【I】で表されるジクロフェナク類の主要代謝物であり、かつ総トリヨードサイロニン及び/又は遊離型トリヨードサイロニンの免疫測定を行う際に有用である。

【実施例】

【0025】

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。しかし本発明はこれら実施例にのみ限定されるものではない。

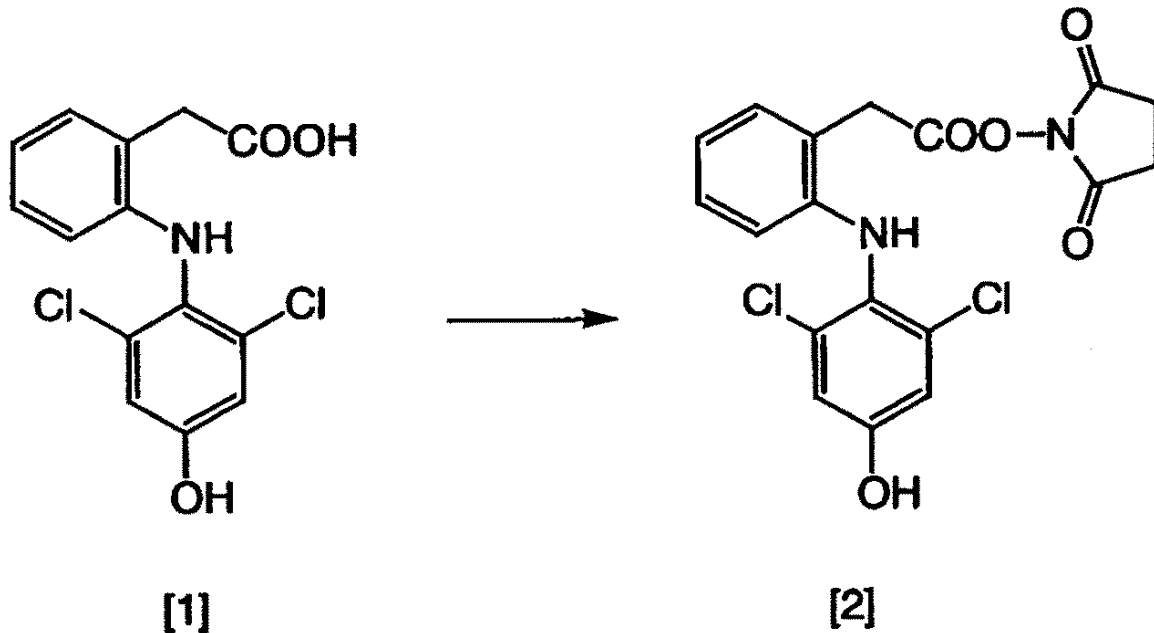
【0026】

40

(実施例1)

【0027】

【化5】



10

窒素雰囲気下、0 で [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸 (化合物 [1]) (190 mg , 0 . 609 mmol) の DMF (4 mL) 溶液に N - ヒドロキシスクシンイミド (105 mg , 0 . 912 mmol) 、 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (175 mg , 0 . 913 mmol) を投入した。4 で終夜攪拌した後、反応混合物を飽和食塩水溶液に投じ酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥し濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1) で溶離し、2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸スクシンイミジルエステル (化合物 [2]) (64 . 5 mg , 0 . 158 mmol , 25 . 9 %) を白色粉末として得た。

20

【0028】

(実施例 2)

ウシ血清アルブミン (BSA) 263 mg を 50 mM ほう酸緩衝液 (pH 9 . 0) に溶解し、これを透析チューブに 1 回に 5 L の緩衝液を用い、4 時間以上、3 回透析を行った。透析終了後、0 . 45 μm フィルターを装着したシリンジに BSA 溶液をとり、ろ過を行った。この時の体積は 24 . 4 mL 、濃度は 9 . 25 mg / mL であった。この溶液に 21 mL の 50 mM ほう酸緩衝液 (pH 9 . 0) を加え、濃度を 5 . 0 mg / mL とした。

30

この溶液を反応容器に移し 4 ± 1 に制御された恒温槽 15 分に浸漬した。これに 2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸スクシンイミジルエステルの N , N - ジメチルホルムアミド溶液 (濃度 : 314 mg / mL) を 0 . 45 mL 投入した。磁気攪拌子を用いて滴下終了後 30 ± 1 分静かに攪拌した後攪拌を止め、17 ± 1 時間恒温槽に放置した。反応終了後、反応溶液を透析チューブに移し、0 . 1 M リン酸 / NaCl 緩衝液 (pH 7 . 0) に対して 2 ~ 8 で透析を行った。1 回に 10 L のリン酸緩衝液を用い、5 時間以上、4 回透析を行った。透析終了後、0 . 22 μm フィルターを装着したシリンジに上で作製したウシ血清アルブミン標識 [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸をとり、ろ過を行った。この結果、32 . 5 mL のウシ血清アルブミン標識 [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸が得られ、その濃度は 6579 mA (ただし、1 A は吸光度 279 nm で 1 . 0) であった。

40

【0029】

(実施例 3)

50

実施例 2 にて得られたウシ血清アルブミン標識 [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸 1 m g をダルベコ - リン酸緩衝食塩水 2 m L に溶解し、この溶液に F C A 2 m L 添加して 0 にて混合した。得られたエマルジョンを家兔の腹腔内に注射した。約 2 週間後、ウシ血清アルブミン標識 [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸 0 . 5 m g をダルベコ - リン酸緩衝食塩水 1 m L に溶解し、この溶液に F I C A 1 m L 添加して 0 にて混合し、得られたエマルジョンを家兔の腹腔内に注射し、約 2 週間間隔でこの操作を 3 回繰り返した。その後に家兔の血液を採取し、血清成分を分離して目的とする抗血清を得た。

【 0 0 3 0 】

(実施例 4)

実施例 2 にて得られたウシ血清アルブミン標識 [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸 0 . 1 m g をダルベコ - リン酸緩衝食塩水 0 . 2 m L に溶解し、この溶液に F C A 0 . 2 m L 添加して 0 にて混合した。得られたエマルジョンをマウスの腹腔内に注射した。約 2 週間後、ウシ血清アルブミン標識 [2 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) フェニル] 酢酸 0 . 1 m g をダルベコ - リン酸緩衝食塩水 0 . 2 m L に溶解し、この溶液に F I C A 0 . 2 m L 添加して 0 にて混合し、得られたエマルジョンをマウスの腹腔内に注射し、約 2 週間間隔でこの操作を 3 回繰り返した。このマウスから脾臓 B 細胞を取り出し、ミエローマ細胞株とを P E G 法による細胞融合を行いハイブリドーマを得た。

【 0 0 3 1 】

(実施例 5)

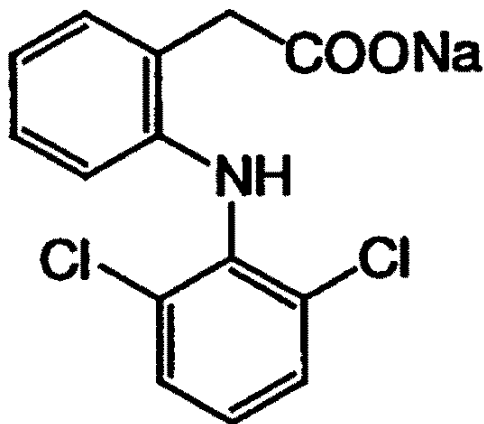
プリスタン 0 . 5 m L をマウスの腹腔内に注射した。約 4 週間後、実施例 4 にて得られたハイブリドーマを含む溶液 0 . 5 m L をマウスの腹腔内に注射した。約 2 週間後、腹水を採取した。この腹水採取は約 5 日間隔で 5 回採取した。この腹水をプロテイン G カラムにて精製することにより、目的とするモノクローナル抗体を得た。

【 0 0 3 2 】

(実施例 6)

【 0 0 3 3 】

【 化 6 】



ジクロフェナク類として [2 - (2 , 6 - ジクロロ - フェニルアミノ) フェニル] 酢酸ナトリウム塩をエタノールに溶解し、この溶液を健常人血清に 2 5 μ g / m L となる様に添加した。このサンプルを全自動酵素免疫測定装置 A I A - 2 1 (東ソー株式会社製) と酵素免疫測定試薬 E テスト「 T O S O H 」 I I (F T 3) (識別番号 : S T) (東ソー株式会社製) (式 [I] で表されるジクロフェナク類の主要代謝物に特異的に反応する抗体は含有していない) を用いて、遊離型トリヨードサイロニンの測定を行った。添加前の健常人血清の測定値は 2 . 8 7 p g / m L であり、添加後のサンプル測定値は 3 . 4 2 p g / m L であり、 1 . 1 9 倍の上昇で若干高値となったものの、正常値の範囲内であったた

10

20

30

40

50

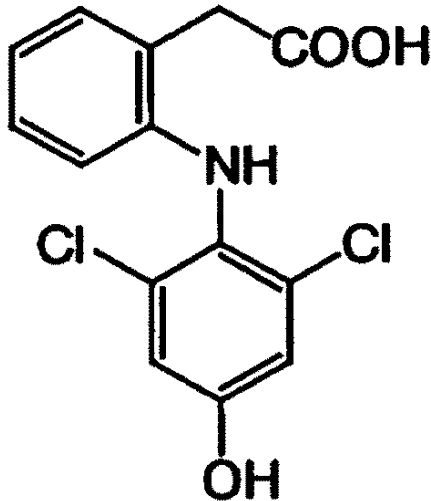
め、この[2-(2,6-ジクロロ-フェニルアミノ)フェニル]酢酸ナトリウム塩は測定値に影響を与えるものではないと判断された。

【0034】

(実施例7)

【0035】

【化7】



10

20

ジクロフェナク類の主要代謝物である[2-(2,6-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)フェニル]酢酸を0.1N水酸化ナトリウム溶液に溶解し、この溶液を健常人血清に10 μ g/mLとなる様に添加した。このサンプルを、実施例6と同様の装置及び酵素免疫測定試薬を用いて遊離型トリヨードサイロニンの測定を行った。[2-(2,6-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)フェニル]酢酸を添加する前の健常人血清の測定値は2.84pg/mLであり、添加後のサンプル測定値は6.85pg/mLであり、2.41倍の上昇となり、異常高値を確認した。特に添加量は実施例6の半分以下であるにもかかわらず、測定値は倍増し異常高値を示したため、この[2-(2,6-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)フェニル]酢酸は測定値に大きな影響を与えることが理解される。

30

【0036】

(実施例8)

健常者にボルタレン錠(ジクロフェナク製剤)25mgを2錠(計50mg)経口投与し、投与前、投与後1時間、2時間、4時間の血清サンプルを採取した。このサンプルを、実施例6と同様の装置及び酵素免疫測定試薬を用いて遊離型トリヨードサイロニンの測定を行った。投与前の健常人血清の測定値は2.54pg/mLであり、投与後1時間、2時間、4時間の血清のサンプル測定値はそれぞれ5.74pg/mL、9.90pg/mL、6.74pg/mLであり、それぞれ2.26倍、3.90倍、2.55倍の上昇となり、ボルタレンの投与による異常高値を確認した。

40

【0037】

(実施例9)

実施例3にて得られた抗血清10倍希釈品5 μ Lを添加した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬(抗血清を添加した以外は、実施例6で用いた酵素免疫測定試薬と同様の組成)を作製した。健常者にボルタレン錠(ジクロフェナク製剤)25mgを2錠(計50mg)経口投与し、投与後2時間の血清サンプルを採取した。このサンプルを、実施例6と同様の装置及び酵素免疫測定試薬、ならびに前述のように抗血清を添加して作製した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬を用いて、遊離型トリヨードサイロニンの測定を行った。実施例6と同様の酵素免疫測定試薬を用いたときの測定値は5.41pg/mLであり、抗血清を添加して作製した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬を用いた

50

ときの測定値は 2.49 pg/mL と $1/2$ 以下に下降し、抗血清を添加することによりジクロフェナク製剤の影響回避を確認した。

【0038】

(実施例10)

実施例5にて得られたモノクローナル抗体 $20 \mu\text{g}$ を添加した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬(モノクローナル抗体を添加した以外は、実施例6で用いた酵素免疫測定試薬と同様の組成)を作製した。健常者にボルタレン錠(ジクロフェナク製剤) 25 mg を2錠(計 50 mg)経口投与し、投与後2時間の血清サンプルを採取した。このサンプルを実施例6と同様の装置及び酵素免疫測定試薬、ならびに前述のようにモノクローナル抗体を添加して作製した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬を用いて、遊離型トリヨードサイロニンの測定を行った。実施例6と同様の酵素免疫測定試薬を用いたときの測定値は 7.79 pg/mL であり、モノクローナル抗体を添加して作製した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬を用いたときの測定値は 2.14 pg/mL と $1/3$ 以下に下降し、モノクローナル抗体の添加により、ジクロフェナク製剤の影響回避を確認した。

10

【0039】

(実施例11)

健常者にボルタレン錠(ジクロフェナク製剤) 25 mg を2錠(計 50 mg)経口投与し、投与後の遊離型トリヨードサイロニン測定値の経時変化を、実施例10と同様の方法にて検討した。結果を図1に示す。実施例6と同様の酵素免疫測定試薬を用いたときの測定値は、投与後3~5時間をピークとする遊離型トリヨードサイロニン値の顕著な上昇が認められた(図中、白丸)が、モノクローナル抗体を添加して作製した遊離型トリヨードサイロニン免疫測定試薬では測定値の上昇は認められなかった(図中、黒丸)。

20

【0040】

(実施例12)

ジクロフェナク製剤を投与されていない一般の検体について、実施例10と同様の装置及び2種の免疫測定試薬を用いて、遊離型トリヨードサイロニン測定を行った。その結果、2種の免疫測定試薬間には良好な相関性があることを確認した。結果を図2に示す。

【図面の簡単な説明】

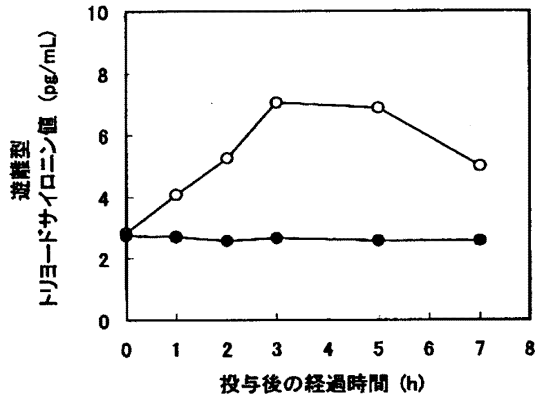
【0041】

【図1】実施例11で得られた、投与後の経過時間と遊離型トリヨードサイロニン値との関係を示す図である。

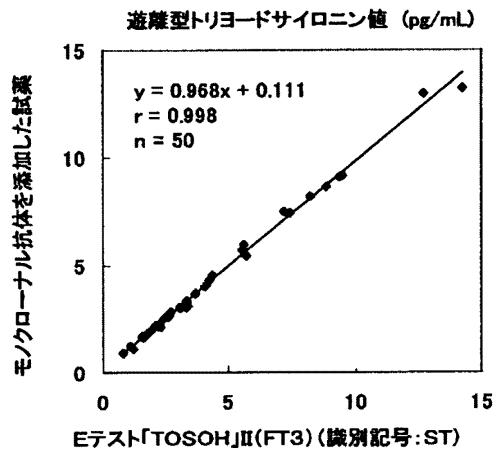
30

【図2】実施例12で得られた、2種の免疫測定試薬間の相関を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

(56) 参考文献 特開平 0 8 - 2 6 2 0 2 4 (J P , A)

青山昭 他, 甲状腺ホルモン値に与えるジクロフェナクナトリウムの影響, 臨床病理, 1990年 6月, 第38巻、第6号, 第688 - 692頁

KASONO K. et al., Cross-Reactive Mechanism for the False Elevation of Free Triiodothyronine in the Patients Treated with Diclofenac., Endocr. J., 2001年12月, Vol.48, No.6, P.717-722

青野悠久子 他, 薬剤の影響を受けたFT3の測定法の検討, 医学と薬学, 2000年 8月25日, Vol.44, No.2, P.274-278

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33 / 4 8 - 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

