

(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2008-203195

(P2008-203195A)

(43) 公開日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S	
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577		
GO 1 N 33/545	(2006.01)	GO 1 N 33/545	A	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2007-42428 (P2007-42428)	(71) 出願人	503360115
(22) 出願日	平成19年2月22日 (2007.2.22)		独立行政法人科学技術振興機構
			埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(71) 出願人	505127721
			公立大学法人大阪府立大学
			大阪府堺市中央区学園町1-1
		(71) 出願人	000162847
			ステラケミファ株式会社
			大阪府大阪市中央区淡路町3丁目6番3号
			NMプラザ御堂筋
		(74) 代理人	100105717
			弁理士 尾崎 雄三
		(74) 代理人	100104422
			弁理士 梶崎 弘一
		最終頁に続く	

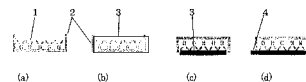
(54) 【発明の名称】 BSHの免疫測定用キットおよびBSHの測定方法

(57) 【要約】

【課題】 体液中のBSHを、高感度でかつ簡便に測定すること。

【解決手段】 体液中のBSHの測定方法であって、1) 採取した体液を体液用希釈液にて希釈し、得られた希釈試料液をBSHのハプテンと識別機能を有する物質との結合体の存在下において、抗BSHモノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化してなる抗体固定部材に接触させる工程、および2) 前記接触させることによって形成され得る体液中のBSHと抗BSHモノクローナル抗体またはそのフラグメントとの免疫複合体量を検出する工程、を含む測定方法およびこの方法を実施する為のキットを提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化してなる抗体固定部材、体液用希釈液、および B S H のハプテンと識別機能を有する物質との結合体を含む、免疫測定用キット。

【請求項 2】

さらに、既知量の B S H 標準品を含む、請求項 1 記載の免疫測定用キット。

【請求項 3】

前記担体が、ウェルプレートである、請求項 1 または 2 記載の免疫測定用キット。

【請求項 4】

前記体液用希釈液が、血液用の 1 次希釈液と 2 次希釈液との組合せである、請求項 1 から 3 までのいずれかに記載の免疫測定用キット。

10

【請求項 5】

体液中の B S H の測定方法であって、

1) 採取した体液を体液用希釈液にて希釈し、得られた希釈試料液を B S H のハプテンと識別機能を有する物質との結合体の存在下において、抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化してなる抗体固定部材に接触させる工程、

2) 前記接触させることによって形成され得る体液中の B S H と抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントとの免疫複合体量を検出する工程、を含む、B S H の測定方法。

20

【請求項 6】

前記担体が、ウェルプレートである、請求項 5 記載の体液中の B S H の測定方法。

【請求項 7】

前記体液が血液であり、前記体液用希釈液が血液用の 1 次希釈液と 2 次希釈液との組合せである、請求項 5 または 6 記載の体液中の B S H の測定方法。

【請求項 8】

前記免疫複合体量を検出する工程が、前記採取した体液から得られた希釈試料液における識別標識量と、既知量の B S H 標準品における識別標識量とを比較する工程を含む、請求項 5 から 7 までのいずれかに記載の体液中の B S H の測定方法。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、メルカプトウンデカハイドロドデカボレート (B S H ; ポロカブテイト) のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを用いた、免疫測定方法および免疫測定用キットに関する。より詳細には、本発明は、特にホウ素中性子捕捉療法 (B N C T) に用いられる中性子捕捉療法剤を血液などの体液から検出、定量するのに有用な B S H の免疫測定用キットおよび B S H の測定方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

近年、放射性アイソトープを利用した新しい癌の治療方法として、ホウ素中性子捕捉療法 (B N C T) が注目を集めている。ホウ素中性子捕捉療法は、ホウ素 10 同位体 (10 B) を含むホウ素化合物をガン細胞に取り込ませ、低エネルギーの中性子線 (たとえば熱中性子) を照射して、細胞内で起こる核反応により局所的にガン細胞を破壊する治療方法である。この治療方法では、10 B を含むホウ素化合物をガン組織の細胞に選択的に蓄積させることが、治療効果を高める上で重要であるため、ガン細胞に選択的に取り込まれるホウ素化合物が開発されている。

40

【0003】

これまでに、B N C T に用いる薬剤として基本骨格にホウ素原子またはホウ素原子団を導入したホウ素含有化合物が合成されている。実際の臨床で用いられている薬剤としては、p - ポロノフェニルアラニン (B P A) やメルカプトウンデカハイドロドデカボレート

50

(B S H) がある。このうち、B S H はナトリウム塩の形で主に脳腫瘍の治療に用いられ、その有用性が確認されている（たとえば、非特許文献 1 ～ 8 参照）。

【 0 0 0 4 】

治療の有効性を高める為には、このような B N C T に伴う B S H の生体内挙動、特に細胞表層や細胞のミクロ分布について正確に把握し、患部への B S H の蓄積を確認して、タイミングよく中性子線を照射させることが望ましい。

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】I . M . W y z l i c ă , T e t r a h e d r o n L e t t . , 1 9 9 2 , 3 3 , 7 4 8 9 - 7 4 9 0 ,

【非特許文献 2】W . T j a r k , J . O r g a n o m e t . C h e m . , 2 0 0 0 , 6 1 4 - 6 1 5 , 3 7 - 4 7 ,

【非特許文献 3】K . I m a m u r a ă , B u l l . C h e m . S o c . J p n . , 1 9 9 7 , 7 0 . 3 1 0 3 - 3 1 1 0 .

【非特許文献 4】A . S . A l - M a d h o r n ă , J . M e d . C h e m . , 2 0 0 2 , 4 5 , 4 0 1 8 - 4 0 2 8 ,

【非特許文献 5】F . C o m p o s t e l l a ă , R e s . D e v e l o p . N e u t r o n C a p t u r e T h e r . , 2 0 0 2 , 8 1 - 8 4 ,

【非特許文献 6】S . B K a h l ă , P r o g r e s s i n N e u t r o n C a p t u r e T h e r a p y f o r C a n c e r , P l e n u m P r e s s , N e w Y o r k 1 9 9 2 , 2 2 3 ,

【非特許文献 7】J . C a i ă , J . M e d . C h e m . , 1 9 9 7 , 4 0 , 3 8 8 7 - 3 8 9 6 ,

【非特許文献 8】H . L i m ă , R e s . D e v e l o p . N e u t r o n C a p t u r e T h e r . , 2 0 0 2 , 3 7 - 4 2

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

しかしながら、B N C T に伴う B S H の生体内挙動、特に細胞表層や細胞のミクロ分布についての詳細は未だ明らかとはなっておらず、B S H の生体内挙動を簡便かつ迅速に定性、定量できる方法の開発が強く望まれている。治療用に併用される B P A と区別して検出することが困難という問題もある。B S H の検出、定量方法として、免疫学的測定方法が期待されているが、B S H のような低分子無機化合物は、分子量・体積が小さいことや、イオン化し易いといった理由のため抗原性が低く、B S H を高感度で検出するモノクローナル抗体を用いた測定方法や測定キットはこれまで得られていない。

【 0 0 0 7 】

そこで、本発明の目的は、B S H を高感度かつ高選択的に認識するモノクローナル抗体またはそのフラグメントを用いた高感度かつ定量性に優れた B S H の測定用キットおよび免疫学的測定方法を提供することにある。

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、体液中に含まれる B S H の簡易かつ迅速な測定において、特に競合的な免疫測定原理を利用した操作性に優れた B S H の測定法及びそのキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、以下に示す B S H の測定方法および測定キットにより上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化してなる抗体固定部材、体液用希釈液、および B S H のハプテンと識別機能を有する物質との結合体とを含む、免疫測定用キットを提供する。

【 0 0 1 1 】

上記免疫測定用キットは、既知量の B S H 標準品を含み得る。

【 0 0 1 2 】

上記担体は、ウェルプレートであり得る。

【 0 0 1 3 】

上記体液用希釈液は、血液用の1次希釈液と2次希釈液との組合せであってもよい。

【 0 0 1 4 】

本発明は、さらに、体液中の B S H の測定方法を提供する。この方法は、1) 採取した体液を、体液用希釈液にて希釈し、B S H のハプテンと識別機能を有する物質との結合体の存在下において、抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化してなる抗体固定部材に接触させる工程、および2) 前記接触させることによって形成され得る体液中の B S H と抗 B S H モノクローナル抗体との免疫複合体量を検出する工程、を含む。

10

【 0 0 1 5 】

上記担体は、ウェルプレートであり得る。

上記体液は、血液であり、上記体液用希釈液は、血液用の1次希釈液と2次希釈液との組合せであり得る。

【 0 0 1 6 】

上記免疫複合体量を検出する工程は、前記採取した体液から得られた液における識別標識量と、既知量の B S H 標準品における識別標識量とを比較する工程を含み得る。

20

【 発明の効果 】

【 0 0 1 7 】

以上のように、本発明を適用することによって、血液などの体液中に含まれる B S H に対して選択性が高く、B P A (ボロノフェニルアラニン) と区別して検出することも可能で、複雑な工程を要さない操作性に優れた簡易な B S H の測定キットまたは免疫測定方法を提供することができる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 8 】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

【 0 0 1 9 】

抗原抗体反応を利用した免疫測定法は、一般に特定の物質に対して高い選択性を有し、高感度測定が可能であり、かつ操作が容易な測定法である。本発明は免疫測定法の特長を活かしながら、血液などの体液中に含まれる B S H の測定においてキットの形状や反応に関与する抗体の固定化手段、試料液の調製手段、反応物質同士の接触手段および操作手段を選定し、試料および測定対象物に最適な操作が可能な簡便性を有する測定キットの構成または測定方法を可能にしたものである。

30

【 0 0 2 0 】

本発明においては、予め抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化した抗体固定部材、体液用希釈液、および反応に寄与する B S H のハプテンと識別機能を有する物質との結合体 (以下、「識別結合体」ともいう) を安定な条件で準備することによって、操作性・安定性に優れた簡便な測定キットを構成することおよび測定方法を行うことが可能となった。具体的には、測定対象物である体液を体液用希釈液にて希釈後、調製したサンプルを、例えば、識別結合体と抗 B S H モノクローナル抗体またはそのフラグメントを担体に固定化した抗体固定部材 (以下単に「抗体固定部材」ともいう) を封入した反応容器に投入して反応させることができる。あるいは、抗体固定部材がウェルプレートあるいはシャーレなどである場合には、抗体固定部材内で、希釈試料液、および識別結合体を反応させることもできる。次に、このように B S H と識別結合体との間における競合的な抗原抗体反応を迅速かつ確実にを行った結果得られた反応物を、抗体と結合した識別結合体に由来する発色反応として検出するように、試料中の B S H 濃度に依存した変化を例えば光学的に検出することによって、B S H の濃度を求めることができる。以上

40

50

のように、予め希釈液や識別結合体を入れた反応系中で、反応、測定など、全ての操作を行う特徴を有している。

【0021】

ここで「光学的に検出する」とは、抗原抗体反応に伴う変化を、反応自体によって生じる発色や蛍光あるいは発色剤や蛍光剤を添加することによって生じる発色や蛍光、または濁度などの、光学的変化として取り出し、吸光光度計などによって検出することをいう。

【0022】

免疫測定法において、識別結合体が測定対象となるBSHと競合反応を形成するには、BSHに近い分子構造を有しかつ抗体のエピトープを有する物質を識別結合体とすることが好ましい。本発明においては、識別結合体をBSHの誘導体と識別機能を有する物質の結合体とすることによって、この条件を満たすことができ選択性の高い測定が可能となる。また、抗体については、高感度および高選択性からモノクローナル抗体が好ましく用いられるが、モノクローナル抗体の変換部分であるFabフラグメントやF(ab')₂フラグメントなどのように抗原結合性を有する抗体の一部も好ましく用いられ得る。本発明においては、これらを組み合わせることによって、非常に選択性が高く高感度な免疫測定法を用いたBSHの測定キットを提供することが可能になった。ここで、「識別機能を有する物質」とは、抗原-抗体反応の結果を直接的あるいは間接的に識別可能にする物質あるいは担体物質をいい、具体的には酵素や蛍光タンパク質のような生体物質、低分子の蛍光物質、金コロイド、カララテックスビーズなどの担体が挙げられる。

10

20

【0023】

本発明で、「体液」という時は、血液やリンパ液、血管の外の細胞間を満たす組織液、および漿膜腔液、胸水、腹水、心嚢液、脳脊髄液、関節液、眼房水などの体腔内の体腔液が含まれる。さらに、唾液や尿なども含まれる。本発明においては、特に血液が検査対象として好ましく用いられ得る。

【0024】

本発明の「担体」は、限定はされないが、ウェルプレート、ビーズ、あるいは棒状加工体などを指す。ポリエチレン・ポリスチレンなどのたんぱく質が吸着しやすい樹脂を材質として使用しているものであれば、特に形態は限定されない。溶液との接触が容易で、かつ表面積の大きな担体が好ましい。

30

【0025】

本発明で用いられる、体液用希釈液は、体液の種類に応じて選択することが可能である。限定はされないが、特に本発明において好ましく用いられる血液を検査対象とするときには、血液を希釈するのに好ましい、リン酸緩衝液（リン酸 + リン酸ナトリウム）、やリン酸緩衝食塩水などを希釈用に用意する。その他、例えば酢酸緩衝液（酢酸 + 酢酸ナトリウム）、クエン酸緩衝液（クエン酸 + クエン酸ナトリウム）、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液などが挙げられる。

40

【0026】

本発明においては、体液用希釈液は、1次希釈液と2次希釈液との組合せであり得る。体液が血液の場合、溶血用の1次希釈液と混合用の2次希釈液との組合せが好ましく用いられる。溶血用の1次希釈液としては、リン酸緩衝液が好ましく用いられ、2次希釈液としては、リン酸緩衝生理食塩水が好ましく用いられる。希釈率として、全体として10～500倍程度が好ましく、例えば、第1希釈液で体液をある程度の倍率で希釈し、使用直前にさらに第2希釈液で希釈することなどが可能である。このような組合せは、体液中に含まれるタンパク質の変性を防ぎながら、検査直前には、検出に耐え得るタンパク質濃度とするのに有用である。

40

【0027】

本発明に係る測定キットまたは方法においては、抗原抗体反応後の結果を色量変化などとして例えば光学的変化として検出することから、試料液中のBSHの濃度に対する基準を明確にすることが好ましい。そこで、血液などの体液中に含まれ得るBSHの量はだいたい把握することができる為、既知量のBSH標準品を準備し、同じ実験条件で標準曲線

50

を作成して、反応容器との色量変化を比較することによって、バックグラウンドや周囲温度などの影響を排除した測定を行うことが可能となる。つまり、測定条件を共通にした基準との比較を行うことによって、簡易かつ精度の高い免疫測定法を用いたB S Hの測定キットまたは方法を提供することが可能となる。

【0028】

本発明においては、抗原抗体反応後の結果を色量変化などの目視的あるいは光学的变化で検出することは、抗体を固定化する担体の種類などに応じて、種々の態様で行い得る。例えば、抗体固定部材がウェルプレートである場合は、反応をウェルプレート内で行った後、反応結果をそのままウェルプレートに対する光学的分析で検知することが可能である。この目的の為にプレートリーダーなどが好ましく用いられ得る。あるいは、抗体を固定化する担体がビーズあるいは他の樹脂加工物などの場合は、反応容器中にて反応させた結果は、別の容器に移し替えて光学的分析で検知することも可能である。

10

【0029】

<本発明にかかる測定キットの基本構成および測定方法>

本発明にかかる免疫測定法を用いたB S Hの測定キットは、(1)採取した体液を希釈する為の体液用希釈液、(2)識別結合体、および(3)抗B S H抗体またはそのフラグメントを固定化した抗体固定部材を含み、かつ競合的な抗原抗体反応を行わせることを特徴とする。

【0030】

上記測定キットの測定方法は、通常の免疫測定法の中でも、公知の例えば酵素免疫測定法、金コロイド法等(Meth. Enzymol., 92, 147-523 (1983), Antibodies Vol.II IRL Press Oxford (1989))を適用することができる。

20

【0031】

以下、酵素免疫測定法の中でも抗体固相タイプのE L I S A (E n z y m e - L i n k e d I m m u n o s o r b e n t A s s a y) を適用した場合を例に、測定キットの基本構成を説明するが、本発明はこれに限定されない。また、説明するそれぞれの材料等は、E L I S A を適用した測定キットに限らず、他の標識を使用した場合の測定キット、あるいはE L I S A または他の標識を使用した場合の測定方法にも共通して使用可能である。ここで、測定対象としては、ヒトの血液を挙げることができる。

【0032】

30

(1) 体液用希釈液

体液用希釈液は、測定対象の血液などの体液の前処理に用いられ、例えば、溶血用の1次希釈液と混合用の2次希釈液との組合せであり、溶血用の1次希釈液としては、リン酸緩衝液が用いられ、2次希釈液としては、リン酸緩衝生理食塩水が用いられる。希釈率として、10~500倍程度が好ましく、例えば、第1希釈液で体液を20倍希釈し、使用直前にさらに第2希釈液で10倍希釈することなどが可能である。

【0033】

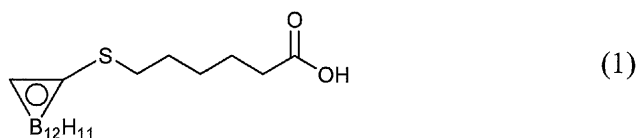
(2) 識別結合体の調製

B S H と競合的な抗原抗体反応を行う識別結合体としては、B S H もしくはその誘導体に、酵素を結合したものをを用いる為、誘導体としては、酵素との結合基を有するものを用いるとよい。使用可能な酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、βガラクトシダーゼ等が挙げられるが、公知のものであれば特に制限はない。誘導体と酵素の結合は、酵素が失活しない条件なら特に制限なくいかなる方法で行ってもよい。以下、B S H の誘導体の構造について具体的に説明する。

40

本発明のB S H の誘導体は下記式(1)の構造を有する。

【化 1】



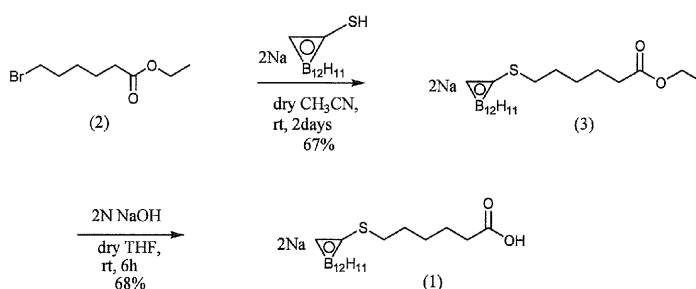
この化合物は、6 - S - ウンデカハイドロドデカボリルヘキサン酸であり、B S H ハブテンとして好適に使用される。前記式 (1) において、カルボキシル基が後述する高分子化合物と共有結合することにより、複合体 (結合体) を形成する。

10

【 0 0 3 4 】

前記 B S H ハブテンの製造は、公知の合成方法により行なうことができ、特に限定されるものではないが、たとえば下記反応式：

【化 2】



20

で示す方法は、各工程において高収率で化合物を得ることから好適に用いられる。前記反応式において、式 (2) 、 B S H 等の原料化合物はいずれも入手が容易な化合物である。

【 0 0 3 5 】

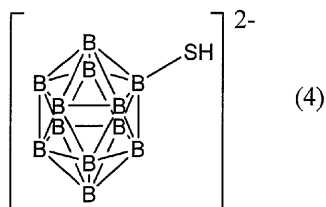
また、前記各工程における詳細な合成方法は、実施例 1 に記載している。

【 0 0 3 6 】

前記メルカプトウンデカハイドロドデカボレート (B S H) は、ホウ素、水素およびイオウ原子から成る 20 面体のホウ素クラスター構造をとる。B S H は無機低分子化合物であるにもかかわらず、体積はベンゼン環より大きく、3つのホウ素原子が2つの電子を共有するいわゆるスリーセンターボンド構造を取り、電子が局在化した特異な構造をしている。本発明において、B S H は下記式 (4) 、

30

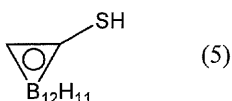
【化 3】



40

または下記式 (5)

【化 4】



50

で表される。

【0037】

(3) 抗体を担体に固定化した固定部材の作製

(3-1) 抗体の調製

例えば式(1)で表されるBSHのハプテン化合物を、牛血清アルブミン(BSA)、ウサギ血清アルブミン(RSA)、オボアルブミン(OVA)、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)、チログロブリン(TG)、免疫グロブリン等の高分子化合物(タンパク質)との複合体を形成させた後、抗原として用いる。

【0038】

複合体の形成方法は、公知の方法により行うことができ、特に限定されるものではない。例えば、混合酸無水物法または活性エステル法等によって、BSHのハプテン化合物のカルボキシ基と前記高分子化合物の官能基とを反応させて、複合体を形成することができる。

10

【0039】

本発明で用いられる抗体は、前記複合体を常法にしたがってウサギ、ヤギ、マウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを培養することにより得ることができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

20

【0040】

抗体の調製は、限外ろ過、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの濃縮・精製法を適宜組み合わせで行うことができる。

【0041】

また、上記抗体として、より具体的には、たとえば、以下に示すような、本発明の実施例で得られたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域におけるヌクレオチド配列から発現される抗体フラグメント、または、本発明の実施例で得られたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を有する抗体フラグメントをあげることができる。また、これらのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は本発明の効果を奏する限り、配列の一部が欠損、付加、修飾、置換、変異している配列を有するものも含まれる。さらに、その場合、これらの配列の一部が欠損、付加、修飾、置換、変異している配列と上記配列との相同性が70%以上であることが好ましく、80%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましく、95%以上であることが特に好ましい。

30

【0042】

重鎖の配列

【化 5】

(5' -) CTCGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGCGCTCCC
AGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTTCACT
GAGCACTTCTGGTATGGGTGTTGGCTGGTTTCGTCAGCCT
TCAACAAAGGGTCTAGAGTGGCTGGCAGACATTTGGTGGA
ATGACAATAAATACTATAATCCATCCCTGAAGAGCCGGCT
CACAATCTCCAAGGATACCTCCAAAAACCAGGTATTCCTC
AAGATCGCCAGTGTGGACACTATAGATACTGCCACTTACT
ACTGTTCTCTAAGAAATAGTGCCGAAAAGACAAACACCTG
GGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACG
ACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTG
CCCAAACCTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAA
GGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCT
GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCC
TGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGT
CCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAAC
GTTGCCCAACCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAA
TTGTGCCCAGGGATTGTACTAGT

10

20

【0043】

軽鎖の配列

【化 6】

(5' -) GAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCA
CATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCGCTCAAG
TACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACTATGTCAATTGGGTC
CAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTG
GTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCTGCCAGATTCTC
AGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACA
GGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGGTC
TATGGTACAGCAACCATTGGGTGTTTCGGTGGAGGAACCAA
ACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTC
ACCCTGTTTCCACCTTCCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACA
AGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGATTTCTACCCAGG
TGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTC
ACTCAGGGTATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCA
ACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTGACCCTGACAGC
AAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTC
ACTCATGAAGGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTG
CTGAGTGTTCCCTAATTCTAGA

30

40

【0044】

重鎖のアミノ酸配列

【化 7】

(N-) LESGPGILQRSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVWFR
 QPSTKGLEWLADIWWNDNKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQV
 FLKIASVDTIDTATYYCSLRNSAEKTNTWGGGTTTLTVSSA
 KTTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW
 NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVT
 CNVAHPASSTKVDDKIVPRDCTS

【0045】

10

軽鎖のアミノ酸配列

【化 8】

(N-) ELVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYVN
 WVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALT
 ITGAQTEDEAIYFCGLWYSNHWFVGGGTKLTVLGQPKSSP
 SVTLFPSSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGT
 PVTQGMETTQPSKQSNKNYMASSYLTLTARAWERHSSSYSC
 QVTHEGHTVEKSLSRAECS

20

(3-2) 担体および抗体固定部材

担体は、溶液との接触が容易で、かつ表面積の大きな抗体固定化部分を有する、ウェルプレートやビーズが好ましく用いられる。ウェルプレートを用いた場合には、その後の分析までウェルプレート内で行うことができる為、特に好ましい。

【0046】

(3-3) 抗体の固定部材への固定化

抗体の固定化は、例えば抗体を含む緩衝液を封止部材上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗体の濃度は、通常 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ から $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度である。緩衝液としては、特に制限無く公知のものを使用することができる。

【0047】

30

(3-4) 担体表面のブロッキング

試料中の夾雑物質が担体表面へ非特異的吸着し反応に影響することを防止するため、抗体が固定化されていない表面部分は抗体や識別結合体と反応性の無いタンパク質等によりブロッキングすることが好ましい。ブロッキング剤としては、牛血清アルブミン(BSA)もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース等を使用することができる。ブロッキングは、過剰濃度のブロッキング剤溶液へ抗体固定化担体を接触させ、例えば、約4時間で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液に制限はなく、例えば生理的塩濃度の塩化ナトリウムを含んだ緩衝液を使用することができる。

【0048】

40

(3-5) ブロッキングした固定部材の安定化

抗体を固定化し、ブロッキングした固定部材は、乾燥によって安定化できる。乾燥は低温下で行うほうがよく、真空凍結乾燥、減圧乾燥、風乾などいずれの乾燥方法でもよい。

【0049】

抗体固定部材は、具体的には、図1に例示するように、抗体またはそのフラグメントをプレート内に固定し(図1a)、ブロッキングした後(図1b)、乾燥させた構成(図1c)を挙げることができる。特に、乾燥後、シールなどで封をすることにより(図1d)、使用直前まで、抗体固定部材を安定な状態に保つことも可能である。

【0050】

(4) 抗原抗体反応

50

体液用希釈液で適度な濃度に調製した試料を、抗原抗体反応に供する。具体的には、図 1 に例示するようなウェルプレートに、識別結合体および希釈試料液を加えることによって抗原抗体反応を開始する。また、他に図 1 に例示するようなウェルプレートに、B S H 標準品と識別結合体をいれた反応系を用意することにより、正確に試料中の B S H 濃度を調べることができる。抗原抗体反応は、反応温度 4 ~ 37、また反応時間 5 分 ~ 2 時間程度で反応させるのがよい。

【0051】

(5) 検出

次に、反応の結果、測定対象物中の B S H 濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出する。これは、例えば担体がウェルプレートであれば、そのままプレートリーダーで分析することにより、より迅速で簡単に行うことができる。その他の場合でも、反応に用いた容器をそのまま光学的に分析することで、反応の結果を検出できる。

10

【0052】

より具体的には、例えば、反応終了後は、精製水、緩衝液などでウェルプレートあるいは反応に用いた容器を洗浄後、固定化した抗体と結合した識別結合体の酵素によって発色する基質溶液を反応容器に加える。発色基質としては、公知の基質であれば特に制限はなく、酵素、例えば、ペルオキシダーゼの場合は、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンを用い、吸光度を測定するとよい。基質溶液を加えた後に生じる発色量の変化を検出することによって、B S H の濃度を判定する。o - フェニレンジアミンなどの他の発色基質を使用することもできる。アルカリホスファターゼを使用する場合には、例えば p - ニトロフェニルリン酸を発色基質として測定する方法が挙げられる。いずれの発色方法においても、既知濃度の B S H を添加した反応液の吸光度と濃度の関係により作成した検量線を用いて、試料液中の B S H 濃度を定量することができる。

20

【0053】

酵素免疫測定法以外にも、識別結合体の識別マーカーをカラーラテックスや金コロイドに置き換えた免疫測定法によって、B S H を測定することができる。これらの識別結合体は、B S H もしくはその誘導体にアルブミンなどのタンパク質を結合させ、このタンパク質との結合体をカラーラテックスや金コロイド表面へ公知の方法を用いて固相させることによって調製する。調製した識別結合体は、上記の E L I S A で適用した例と同様に、抗体を固定化した固定部材との間で抗原抗体反応させることによって B S H を測定することができる。これらの免疫測定法の場合は、その後の発色操作は必要なく、抗原抗体反応中に固定部材の表面上の固定化抗体にカラーラテックスや金コロイドが結合し呈色する。この呈色の度合いを目視判定することによって、B S H 濃度を測定することができる。

30

【0054】

以下に、測定キット及び測定方法の具体例を実施例の態様で示すが、本発明はこれに限定されない。

【実施例 1】

【0055】

抗原の調製

下記実施例において、化合物の分析および分離精製には以下の機種や試薬を用いて行った。

40

・ N M R スペクトル：日本電子 J M T C - 4 0 0 / 5 4 / S S 4 0 0 M H z (日本電子社製)。特に明記しない限り、内部標準として T M S を用いた。また、下記ケミカルシフトは δ 値で示した。

・ カラムクロマトグラフィー用シリカゲル：B W - 2 0 0 (富士シリシア社製)。

【0056】

(a) B S H - ヘキサノ酸エチルエステルの合成

B S H (101 mg、0.46 mmol) をアセトニトリル (10 mL) に溶解させた後、室温で攪拌しながらプロモヘキサノ酸エチルエステル (0.2 mL、1.12 mmol) をゆっくり滴下し、室温で 2 日間攪拌した。その後、減圧濃縮によりアセトニトリル

50

を除去し、濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール = 9 : 1）により精製し、黄色の油状物（101 mg、収率 67.4 %）を得た。

・ T L C : R f = 0.58（クロロホルム：メタノール = 3 : 1）

・ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ (ppm) : 0.60-2.10 (m)、1.08 (t, 3H, J=7.08Hz)、1.34-1.42 (m, 2H)、1.52-1.59 (m, 2H)、1.63-1.70 (m, 2H)、2.19 (t, 2H, J=7.32Hz)、2.77 (m, 2H)、3.95 (q, 2H, J=7.08Hz)。

【0057】

(b) BSH - ヘキサンの合成

上記(a)で得た化合物（113.7 mg、0.31 mmol）をメタノール（2.0 mL）に溶解させ、2 N 水酸化ナトリウム（0.63 mL）を滴下し室温で6時間撹拌した。反応液を酢酸エチルを用いて洗浄後、1 N 塩酸を pH 3 になるまで加え、酢酸エチルで抽出した。その後、水および飽和食塩水で洗浄し硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮により酢酸エチルを除去し、濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール = 4 : 1）により精製し、黄色の油状物（69.9 mg、収率 67.4 %）を得た。

・ T L C : R f = 0.30（クロロホルム：メタノール = 2 : 1）

・ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ (ppm) : 0.60-2.10 (m)、1.30-1.37 (m, 2H)、1.45-1.53 (m, 2H)、1.63-1.73 (m, 2H)、2.20 (t, 2H, J=7.32Hz)、2.85 (m, 2H)。

【0058】

(c) BSH - ヘキサン酸 - BSA 複合体（BSA を用いた免疫原）の合成

セントチューブにウシ血清アルブミン（11 mg、164 nmol）および pH 9.4 のホウ酸塩緩衝液（四ホウ素酸ナトリウム 50 mmol、塩化ナトリウム 15.4 mmol、アジ化ナトリウム 0.3 mmol / 純水 100 mL）を 760 μL 加え、4 で一晩撹拌した後、DMF（40 μL ）を加えた（I 液）。

【0059】

別のセントチューブに上記(b)で得た化合物（6.0 mg、18 μmol ）、N - ヒドロキシコハク酸イミド（1.5 mg、13.3 μmol ）、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（2.5 mg、13.3 μmol ）、DMF（200 μL ）を加え、室温で一晩撹拌した（II 液）。

【0060】

I 液に II 液を室温で滴下（10 μL / 5 分）し、室温下で 2.5 時間撹拌後、4 で一晩撹拌した。これを 10 % イソプロパノール - リン酸緩衝液で約 60 時間（緩衝液を 6 回換える）透析し、BSH - ヘキサン酸 - BSA 複合体（結合体）を得た。これを ICP 分析によりホウ素濃度を測定した後、1.5 mL のエッペンチューブに移して、4 で保存した。

【0061】

(d) BSH - ヘキサン酸 - KLH 複合体（KLH を用いた免疫原）の合成

免疫原として、KLH と本発明 BSH ハプテンとの結合体を、上記(c)と同様にして作製した。

【実施例 2】

【0062】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

(a) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 1 で合成した BSH ハプテン - KLH 結合体をリン酸緩衝液 pH 7.4 (PBS) (NaCl 137 mM、NaH₂PO₄ · 12H₂O 8.10 mM、KCl 2.68 mM、KH₂PO₄ 1.47 mM) で 500 μg / mL になるように希釈した。この抗原溶液 2 mL を 40 にて 10 分間加温した RIBI アジュバントシステム (RIBI / MPL (登録商標) + TDM Emulsion, R-700) と混合し、2 ~ 3 分間ボルテックスし、十分に混合した。

【0063】

これを5匹のB a l b / cマウス(8週齢、オス)に皮下注射により免疫した(50 μ g / dose)。これを2週間ごとに行い、2回目の免疫以降は各免疫から、1週間後に採血(眼窩採血)を行った。採血した血液は1.5 mLチューブに集め、37 で1時間インキュベートした後、4 にて一晚静置した。

【0064】

(b)細胞融合

(b-1)DMEM培地の調製

ダルベッコ改変イーグル培地(IWAKI DME / LOW、Lot. 99562013)1パック、硫酸ゲンタマイシン(ゲンタマイシン642 μ g / mg、SIGMA Lot. 105H0457)78.4 mg、炭酸水素ナトリウム(関東化学、Lot 302 F1378)2.2 gにMilliQを加えて1 Lにした後、0.22 μ mフィルター(MILLIPORE MILLEX (登録商標) - GV、0.22 μ m フィルター SLGV01352)で滅菌して、DMEM培地を調製した。

10

【0065】

(b-2)HAT培地およびHT培地の調製

HAT supplement (SIGMA、Lot # 61K8934)一瓶に10 mLの滅菌したMilliQを加え、瓶内の試薬を完全に溶かした。この溶液をDMEM培地(15% FCS)の1/50量加えて混合し、HAT培地とした。HT supplement (SIGMA、Lot # 32K8928)一瓶に10 mLの滅菌したMilliQを加え、瓶内の試薬を完全に溶かし、この溶液をDMEM培地(15% FCS)の1/50量加えて混合し、HT培地とした。

20

【0066】

(b-3)50%PEG培地の調製

20 gのPEG 6000 (PEG 6000 (M.W. 7300 - 9000)、ナカラ イテスク、Lot M8H2950)を20 mLのDMEM培地に加え、ホットスターラーで2時間攪拌して完全に溶かした。その後、40 mLにメスアップし、クリーンベンチで0.20 μ mフィルターを用いて滅菌した。その後、1.8 mLずつ分注して凍結し、使用直前に溶解し、200 μ LのDMSO (SIGMA、Lot # 42K2401)を加えて、50%PEG (10%DMSO)溶液を作製した。

30

【0067】

(b-4)ACK lysis緩衝液の調製

MilliQ 90 mLに塩化アンモニウム802.3 mg、炭酸水素カリウム10.01 mg、EDTA 3.72 mgを加えpH 7.2 ~ 7.4に調整し、100 mLにメスアップした。これをメディウム瓶に入れ、121 で20分間オートクレーブし、滅菌して、ACK lysis緩衝液(0.15 M塩化アンモニウム、1.0 mM炭酸水素カリウム、0.1 mM EDTA、pH 7.2 ~ 7.4)とした。

【0068】

(c)脾臓細胞の調製

抗体価が飽和に達したマウスに最終免疫(尾静脈注射)を行い、3日後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓を氷上のDMEMの入ったシャーレに入れ、クリーンベンチ内に入れた。摘出した脾臓の不要な部分を除き、新しいDMEM培地の入った5 mLシャーレに入れた。2本のピンセットを用いて、脾臓細胞をこそぎだし、セルストレーナー(FALCO - N2350、70 μ mナイロン)でろ過して不要なものを取り除き、通過した細胞をガラス製の遠心管に集め、1000 rpmで10分間遠心した。

40

【0069】

上清を捨て、5 mLのACK lysis緩衝液を加えピペッティングにより均一に混合し、室温で5分間静置し、脾臓細胞を洗浄除去した(赤血球の除去)。ここに20 mLのDMEM培地を加え、1000 rpmで10分間遠心し、上清を除去した。さらに20 mLのDMEM培地を加え、ピペッティングにより細胞を洗浄し、1000 rpmで10分間遠心した。上清を除去し、DMEM培地を10 mL加え、ピペッティングにより混合

50

した後、血球計算盤 (E r m a T o k y o 4 0 6 2) を用いて、細胞数をカウントした。

【 0 0 7 0 】

(d) ミエローマ細胞の調製

ミエローマ細胞 (P 3 X 6 3 A g 8 U . 1) を細胞融合を行う日程にあわせて培養し、使用直前に細胞をガラス製の遠心管に集め 1 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心した。上清を除去し、D M E M 培地を 1 0 m L 加え、ピペッティングにより混合した後、血球計算盤 (E r m a T o k y o 4 0 6 2) を用いて、細胞数をカウントした。

【 0 0 7 1 】

(e) 細胞融合

脾臓細胞：ミエローマ細胞が 1 0 : 3 になるようにミエローマ細胞懸濁液の量を調整し、脾臓細胞懸濁液の遠心管に入れ、ピペッティングによって混合した。これを 1 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心し上清を除去した後、パストールピペットを用いて完全に上清を除去した。

【 0 0 7 2 】

その後、遠心管をたたいて、細胞を遠心管の壁に広げた。遠心管を手で暖め、回しながら、1 m L の 5 0 % P E G (1 0 % D M S O) 溶液を 1 分以上かけて、徐々に加えた。遠心管を 1 分間暖めながらまわし、同様の方法で、2 m L の D M E M 培地を 2 分以上かけて加え、さらに 8 m L の D M E M 培地を 5 分以上かけて加えた。

【 0 0 7 3 】

その後、1 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心し、上清を捨て、さらに 1 0 m L の D M E M 培地を加えて細胞を洗浄し、1 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心した。上清を除去し、D M E M (1 5 % F C S) 培地を細胞密度が 2×10^5 個 / m L になるように調整し、9 6 穴プレートに 1 0 0 μ L ずつ分注し、3 7 で一晩静置した。

【 0 0 7 4 】

(f) H A T 選択

9 6 穴プレートに分注した細胞に、2 倍程度の H A T 培地を 1 0 0 μ L ずつ分注し、3 7 で 1 週間放置した。その後、1 0 0 μ L の H A T 培地を加えた。その後、陽性のウェルのハイブリドーマ細胞を 2 4 穴プレートに移し換え、H T 培地を用いて全量を 1 m L にした。3 日後、2 次スクリーニングを行い、陽性であったウェルを限界希釈法によってクローニングした。

【 0 0 7 5 】

(g) 限界希釈法を用いたクローニング

2 次スクリーニングで陽性であったウェルのハイブリドーマ細胞の細胞数を血球計算盤 (E r m a T o k y o 4 0 6 2) を用いてカウントして、濃度を求め、クローニング用の培地 (D M E M (1 5 % F C S) 培地 2 0 m L 、B r i c l o n e 1 m L) を用いて、段階希釈することにより 1 0 個 / m L 、5 個 / m L に調整した。9 6 穴プレートに 1 0 0 μ L ずつ分注し、1 ウェルあたり細胞が 1 個または 0 . 5 個とした。

【 0 0 7 6 】

これを 3 7 で 1 週間静置し、その後各ウェルに 1 0 0 μ L ずつクローニング用の培地を加え、さらに 3 7 で 1 週間静置した。陽性であったウェルの細胞を 4 8 穴プレートに移し、同様に 2 回目のクローニングを行い、最終的に単一のハイブリドーマ細胞を得た。

本発明では、前記方法によりハイブリドーマを作製し、B S F - 2 等の複数のハイブリドーマ株を樹立した。このうち、H y b r i d o m a B S F - 2 について、受領番号 A B P - 1 0 6 8 9 の下、2 0 0 6 年 1 0 月 2 日に独立行政法人 産業技術総合研究所、特許生物寄託センター (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6 、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号) に国際寄託されている。また、B S F - 2 について、受領番号 F E R M A P - 2 0 8 0 5 の下、2 0 0 6 年 2 月 2 2 日に独立行政法人 産業技術総合研究所、特許生物寄託センター (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6 、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号) に国内寄託されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

(h) 無血清培地からの抗体の精製

無血清培地で培養したハイブリドーマ細胞 B S F - 2 培養液を 1 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心し、細胞上清に対し、6 0 % 硫酸アンモニウム濃度になるように硫酸アンモニウムを加え、抗体タンパクを沈殿させた。これを 4 で 2 時間攪拌し、さらに一晚放置した。その後、4 、1 3 5 0 0 r p m で 2 0 分遠心し、結合バッファーに溶解させ、結合バッファーで透析した。

【 0 0 7 8 】

透析後、8 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心して、上清を 0 . 4 5 μ m でフィルターろ過してサンプルとした。カラムに 5 m L の超純水を流速 1 滴 / 秒 (1 ~ 2 m L / 分) で送液後、3 ~ 5 m L の結合バッファーを流速 1 滴 / 秒 (1 ~ 2 m L / 分) で送液し、カラムの平衡化を行った。その後、調製したサンプルを 1 滴 / 2 秒 (1 ~ 2 m L / 分) で送液し、抗体をカラムに吸着させた。

10

【 0 0 7 9 】

非吸着成分を 3 ~ 5 m L の結合バッファー (2 0 m M リン酸ナトリウム、0 . 8 M 硫酸アンモニウム、p H 7 . 5) を流速 1 滴 / 秒で送液することにより除去した後、5 m L 溶出バッファー (2 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 5) を 1 滴 / 秒 (1 ~ 2 m L / 分) で送液して抗体を溶出させた。溶出液を 0 . 5 m L ずつ回収した。

【 0 0 8 0 】

全てのフラクションの吸光度 (O D = 2 8 0 n m) を測定し、抗体タンパクを含んでいるフラクションをブラッドフォード法により、抗体タンパク濃度を測定した。その後、S D S - P A G E でモノクローナル抗体の純度を確認した。また、得られたモノクローナル抗体のヌクレオチド配列の一部およびアミノ酸配列の一部は上述したとおりである。得られたモノクローナル抗体のタイプは I g G で、詳細には、I g G 1 λ であった。

20

【 実施例 3 】

【 0 0 8 1 】

抗体を固定化したプレートの作成

P B S 溶液 (リン酸緩衝液 p H 7 . 4) を用いて 4 μ g / m L に調製したモノクローナル抗体 (ハイブリドーマ株 (B S F - 2 から調製) 溶液を 1 0 0 μ L ずつ 9 6 穴 E L I S A 用プレートに分注し、3 7 で 1 時間静置することでプレートに抗体を固定化した。反応後、P B S - T w e e n 溶液 (リン酸緩衝液 (p H 7 . 4) 、0 . 0 5 % T w e e n 2 0) で洗浄し、非特異的吸着を防ぐためにプレートに、1 ウェルあたりブロッキング溶液 (リン酸緩衝液 (p H 7 . 4) 、1 % B S A) を 2 0 0 μ l 加え、シールで密閉して、3 7 にて 2 時間反応させ、ブロッキングを行った。

30

【 0 0 8 2 】

プレートの液を捨て、キムタオルにたたきつけて液をきり、3 7 にて 2 時間静置し、プレートを下向きにして、乾燥させた。シールを密閉して冷蔵した。こうして得られた乾燥プレートは、少なくとも 4 ヶ月間、冷蔵保存では劣化しないことが確認された。以下の実施例ではこうして得られた抗体固定ウェルプレートを用いた。

【 実施例 4 】

40

【 0 0 8 3 】

E L I S A を応用した B S H 測定キットは、具体的には、以下の表 1 に例示するような試薬構成からなる。この測定キットを用いて、まず、B S H の標準検量線を得た。

【表 1】

構成	試薬構成の詳細
標識結合体	凍結乾燥した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合 BSH 誘導体 100 μ g/mL に調製。
抗体固定ウェルプレート	抗 BSH 抗体を固相化し、ブロッキング後乾燥
体液希釈液	(1 次希釈液) 25 mM リン酸緩衝液 100 mL に Tween 20 を 50 mg 加え、pH 7.5 に調整 (2 次希釈液) 0.05% Tween 20 を含む 25 mM リン酸緩衝液に標識結合体溶液を 10 μ L 添加し、pH 7.2 に調整。コントロール血液の 1 次希釈液 (10 倍) を 1/20 量加えて調製。

10

【0084】

(1) 標準液の調製

PBS 溶液 (0.5 μ g/mL) にて、100 μ g/mL の BSH 標準液を調製し、これを 1 次希釈液と 2 次希釈液とで段階的に希釈して、0、2、5、10、25、50、100、200、400、800、1000、2000 ng/mL の標準希釈列を調製した。

20

【0085】

(2) 抗原抗体反応

抗体固定プレートのシールをはがし、プレートウォッシャー (BIO-RAD イムノウォッシャー) で洗浄し、識別結合体と各標準液を混合し、室温で 30 分間抗原抗体反応を行った。

【0086】

(3) 色量変化の検出

プレートをプレートウォッシャー (BIO-RAD イムノウォッシャー) で洗浄し、固定化抗体と結合しなかった識別結合体を除去した。洗浄液の残液を十分に除去した後、発色試薬である、HRP 標識した競合剤 (HRP 結合 BSH - ヘキサン酸) の PBS 溶液 (0.5 μ g/mL) をプレートに 200 μ L ずつ分注し、シールで密閉する。これを遮光して室温で 10 分静置し、基質液 (20 mL のクエン酸リン酸緩衝液 (10 mM pH 5.2) に 8 mg の ODP を加え、H₂O₂ 4 μ L 添加して調製) 反応停止液 (1 N の H₂SO₄) を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD / Model 550) を用いて 490 nm における吸光度を測定した。その結果を図 2 に示す。X 軸は BSH 濃度を、Y 軸は吸光度を表す。図 2 に示したように、ハイブリドーマ株 BSF-2 から調製したモノクローナル抗体を用いて BSH を特異的に 50 ng/mL から 500 ng/mL までほぼ直線的な標準曲線で測定できることが判った。

30

【実施例 5】

40

【0087】

次に、血液中の BSH を測定するための測定キット及び測定方法の具体例を挙げる。各 BSH 測定キットは、表 1 に例示するような試薬構成からなる。この測定キットを用いて、血液中の BSH の測定を行った。

【0088】

(1) 試料液の調製

まず、採取した血液をそのまま (全血) 検査に供した。抗凝固剤として、EDTA・2Na を 2 mg 試験管に入れ、これに採血直後の血液を 2 mL 加え、上下に転倒させて撹拌した。この血液に BSH を加えて、100 μ g/mL の BSH 溶液を調製した。1 次希釈液を用いて、ピペットでこの希釈液をよく混合した後、別のチューブに一部を取り出すや

50

り方で元の血液を20倍希釈した。次に、第2希釈液を入れたチューブに先の1次希釈試料液を加え、10倍に希釈することで、200倍希釈の分析用試料を作成した。このサンプルをさらに血液を含む希釈液にて倍々希釈して様々なBSHの濃度を様々に変えて試料を調製した。

【0089】

(2) 抗原抗体反応

試料液を、識別結合体の存在下において、抗体固定化ウェルプレートに100μlずつ分注し、室温にて30分間抗原抗体反応を行った。

【0090】

(3) 色量変化の検出

プレートをプレートウォッシャーで洗浄し、固定化抗体と結合しなかった識別結合体を除去した。洗浄液の残液を十分に除去した後、発色試薬をプレートに加え、各10分間発色反応させた後、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD/Model 550)を用いて490nmにおける吸光度を測定した。

その結果、図3に示すように、血液試料について、希釈液に血液を加えた場合には、良好な直線が得られた(図3(1))。一方、希釈液に緩衝液のみを使用した場合には、直線性に影響がでている(図3(2))。このことから、標準液調製の際には、血液を加えることが望ましいことがわかった。図3において、横軸は希釈率を縦軸はBSH濃度(ng/mL)を表している。

【実施例6】

【0091】

次に、実施例4の表1に例示するような試薬構成の測定キットを用いて、血液中のBSHの測定値と理論値との比較を行った。

【0092】

(1) 試料液の調製

実施例5と同様の方法で、BSHの測定の理論値が、500、250、100、50ng/mLになるように、血液の分析用試料を用意した。さらに、同じBSH濃度で、2次希釈液にBPAを存在させることで調製したBPA混在試料を用意した。

【0093】

(2) 抗原抗体反応

試料液を、識別結合体の存在下において、抗体固定化ウェルプレートに100μlずつ分注し、室温にて30分間抗原抗体反応を行った。

【0094】

(3) 色量変化の検出

プレートをプレートウォッシャーで洗浄し、固定化抗体と結合しなかった識別結合体を除去した。洗浄液の残液を十分に除去した後、発色試薬をプレートに加え、各10分間発色反応させた後、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD/Model 550)を用いて490nmにおける吸光度を測定した。

その結果、表2に示すように、高濃度のBSHの場合ほど、良好な分析結果が得られた。

【表2】

BSH濃度 μg/mL	測定時 理論値 ng/mL	測定値						添加回収率 (%)	CV(%)
100	500	525	500	423	518	471	85 ~ 105	9	
50	250	271	255	277	274	277	102 ~ 111	3	
20	100	121	112	83	111	109	83 ~ 121	13	
10	50	51	49	30	51	48	60 ~ 102	19	

10

20

30

40

50

一方、表 3 に示すように、B P A の存在下においても、同様に良好な分析結果が得られた。

【表 3】

BSH 濃度	理論値	BPA 添加	無添加
100 μ g/mL	500	467	471
50	250	263	277
20	100	108	109
10	50	47	48

10

以上、E L I S A による B S H の体液濃度を検出する測定キットについて、具体的な構成例を基に説明を行ったが、本発明はこれらの例に限定されるものでないことはいうまでもない。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1】本発明に係る測定キットおよび測定方法に用いられる抗体固定部材の具体例を示す説明図。

【0096】

【図 2】本発明に係る測定キットで B S H を測定した標準曲線。

20

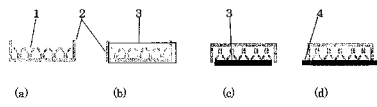
【図 3】本発明に係る測定キットで B S H を測定した結果を示すグラフ。

【符号の説明】

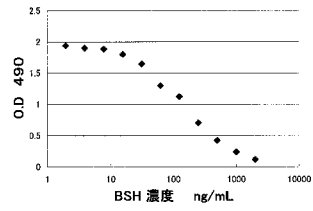
【0097】

- 1 抗 B S H モノクローナル抗体
- 2 ウェルプレート
- 3 ブロッキング剤
- 4 シール

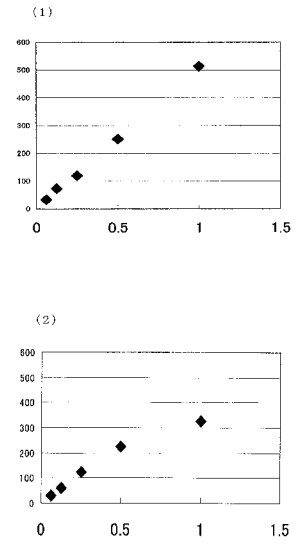
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

2008203195000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100104101

弁理士 谷口 俊彦

(72)発明者 切畑 光統

大阪府堺市中央区学園前 1 - 1

(72)発明者 浅野 智之

大阪府堺市北区長曽根町 1 3 0 - 4 2 - 2 0 2

(72)発明者 上原 幸樹

大阪府堺市北区長曽根町 1 3 0 - 4 2 - 2 0 2

专利名称(译)	bsh免疫分析试剂盒和bsh测定方法		
公开(公告)号	JP2008203195A	公开(公告)日	2008-09-04
申请号	JP2007042428	申请日	2007-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 公立大学法人大阪府立大学 斯泰拉化工公司		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 公立大学法人大阪府立大学 斯特拉CHEMIFA有限公司		
[标]发明人	切畑光統 浅野智之 上原幸樹		
发明人	切畑 光統 浅野 智之 上原 幸樹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/94		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/577 G01N33/545.A		
代理人(译)	尾崎雄三 Kajisaki浩一 谷口俊彦		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：轻松测量体液中的BSH。 解决方案：这是一种测量体液中BSH的方法，该方法包括：1) 用体液稀释剂稀释收集的体液，并将获得的稀释后的样品溶液与BSH的半抗原和具有识别功能的物质结合。 使抗BSH单克隆抗体或其片段与固定在载体上的固定有抗体的成员接触的步骤，以及2) 体液中的BSH和可以通过接触形成的抗BSH单克隆抗体或其片段。 以及用于执行此方法的工具包。 [选型图]图1

