

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4896022号
(P4896022)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

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

請求項の数 7 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-528145 (P2007-528145)	(73) 特許権者	506137147
(86) (22) 出願日	平成18年4月17日 (2006.4.17)		エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/308079		ジメント株式会社
(87) 国際公開番号	W02006/112445		東京都文京区小石川四丁目6番10号
(87) 国際公開日	平成18年10月26日 (2006.10.26)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成21年2月9日 (2009.2.9)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	特願2005-118192 (P2005-118192)	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成17年4月15日 (2005.4.15)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(72) 発明者	青山 宗夫
			日本国茨城県つくば市東光台5丁目1番地
			3 エーザイ株式会社 筑波研究所内
		審査官	加々美 一恵
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チトクロム c の免疫化学的測定方法及び測定キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定する方法であって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うことを特徴とする方法。

【請求項 2】

酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

体液が血液である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定するキットであって、少なくとも、
(1) チトクロム c と反応する抗体及び (2) 酸性領域で反応させる緩衝液を含む、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うための測定キット。

10

【請求項 5】

酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である請求項 4 に記載の測定キット。

【請求項 6】

チトクロム c と反応する抗体が、固相化した抗体及び / 又は標識した抗体である、請求項 4 又は 5 に記載の測定キット。

【請求項 7】

体液が血液である請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載の測定キット。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、体液、特に血中のチトクロム c を正確に測定する免疫化学的方法、及び測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

チトクロム c は古くは電子伝達系の蛋白質として、また、近年ではアポトーシス関連蛋白質として研究され、細胞内のチトクロム c 濃度や血中のチトクロム c 濃度を免疫化学的に測定する方法が知られている（非特許文献 1）。また、血中のチトクロム c 濃度が体内で起こっているアポトーシスの指標となることが知られ（非特許文献 2、特許文献 1、2）、多くの疾患の診断薬としての用途が期待されている。

10

【0003】

従来のチトクロム c 測定法や測定キットを用いて体液、特に血中のチトクロム c を測定する場合、その測定値がチトクロム c 量を反映し、体内で起こっているアポトーシスを検査する上で支障が無いことは確認されていた。しかしこれまで、測定値が正確に体液中のチトクロム c 量を反映しているか否かは検証されておらず、体液中のチトクロム c の測定値を正確に求められる測定方法及び測定キットが求められていた。

【特許文献 1】WO 01/35093

【特許文献 2】特開2003-028860

【非特許文献 1】Andrea Renz, et al. Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and markers cell death in vivo, BLOOD, 98(5)1542-1548, 2001

20

【非特許文献 2】Z.BEN-ARI, et al. Circulating soluble cytochromec in liver disease as marker of apoptosis, Journal of Internal Medicine, 254,168-175,2003

【発明の開示】

【0004】

本発明の課題は、体液、特に血中のチトクロム c を正確に測定する免疫化学的方法、及び測定キットを提供することにある。

【0005】

本発明者らは従来のサンドイッチ法で、血清に既知量のチトクロム c を添加し、その測定値を測定する添加回収試験を行ったところ、添加量の多寡を反映した測定値が得られることが判明したものの、添加量を正確に反映した測定値を得ることができなかった。

30

【0006】

種々の測定条件について検討した結果、チトクロム c と抗チトクロム c 抗体を反応させる際の緩衝液の pH を酸性領域にすることにより、血清中チトクロム c の正確な測定値を得ることができることを見出して、発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち本発明は、以下に関する。

[1] 体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定する方法であって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うことを特徴とする方法。

40

[2] 酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である [1] に記載の方法。

[3] 体液が血液である [1] 又は [2] に記載の方法。

[4] 体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定するキットであって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うための測定キット。

[5] 酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である [4] に記載の測定キット。

[6] 少なくとも、

(1) チトクロム c と反応する抗体及び

(2) 酸性領域で反応させる緩衝液

を含む、[4] 又は [5] に記載の測定キット。

[7] チトクロム c と反応する抗体が、固相化した抗体及び / 又は標識した抗体である

50

、 [6] に記載の測定キット。

[8] 体液が血液である [4] ~ [7] のいずれか一項に記載の測定キット。

【 0 0 0 8 】

更に本発明者らは、質量解析を用いたプロテオーム技術により、正確なチトクロム c の定量を妨げるヒト血清中の妨害物質が、 1 酸性糖蛋白質 (1-acid glycoprotein)、 1 アンチトリプシン等の酸性度の高い蛋白質であることを明らかにした。

【 0 0 0 9 】

本発明は、血清中の酸性度の高い蛋白質がチトクロム c と抗体との結合に影響を与えること、その影響が酸性領域でチトクロム c と抗体を反応させることで無くなることを明らかにしたものであり、酸性度の高い蛋白質が、チトクロム c と抗体との反応に影響を与え 10
ることを抑制するその他の方法、例えば反応液の塩濃度を調整する等の方法も、本発明に含まれるものである。

【 0 0 1 0 】

本発明により、体液中、特に血中のチトクロム c を正確に測定する免疫化学的測定法が確立され、チトクロム c 測定値の信頼性が高まる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 ヒト血清をゲルろ過に付して得られた各フラクションのチトクロム c 測定に対する妨害活性を示す。

【 図 2 】 妨害物質が含まれるフラクションの二次元電気泳動の結果を示す (電気泳動写真 20
) 。スポットには、同定された蛋白質の名称を付記している。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】

本発明の主題は、体液中、特に血中のチトクロム c の量を測定する免疫化学的測定方法において、酸性領域で抗チトクロム c 抗体とチトクロム c を反応させ、抗チトクロム c 抗体とチトクロム c の結合に影響を与える体液中の妨害物質の影響を減弱させて、正確なチトクロム c の測定値が得られるようにする方法にある。

【 0 0 1 3 】

従って本明細書でいう酸性領域とは、抗体とチトクロム c の結合に影響を与える体液中の妨害物質の影響が減弱する pH 領域である。pH を低下させることにより妨害物質の影響を 30
減弱させることができるが、同時に抗体とチトクロム c の結合も弱くなるため、本発明の免疫化学的測定における pH は、下記 1 及び 2 を満たす pH に決められる。

【 0 0 1 4 】

1 . 緩衝液中で 10 ng/mL、好ましくは 1 ng/mL のチトクロム c が定量可能な測定感度が得られる。
2 . 体液存在下での添加回収試験における回収率が 70% 以上、好ましくは 80% 以上、更に好ましくは 90% 以上得られる。

【 0 0 1 5 】

抗体とチトクロム c の結合に及ぼす pH の効果は用いる抗体により異なるため、当該免疫化学的測定方法に用いる pH は、抗体毎に最適な pH を決めることができる。好ましくは pH 7 40
以下、更に好ましくは pH 3 ~ pH 6、更に好ましくは pH 3.5 ~ pH 5、更に好ましくは pH 3.5 ~ pH 4.5 である。

【 0 0 1 6 】

以下に、本発明の免疫化学的測定における pH を決める方法を具体的に示すが、pH を決める方法は、これに限定されるものではない。

【 0 0 1 7 】

1 . 測定感度への pH の影響

必要により BSA 等の適当な蛋白質、NaCl 等の適当な塩類、必要により適当な界面活性剤他を含む pH 3 ~ pH 7.5 の緩衝液に、チトクロム c を 1 ~ 1000 ng/mL に希釈する。

【 0 0 1 8 】

当該免疫化学的な測定法が２ステップサンドイッチ法の場合、希釈したチトクロム c と固相化した抗チトクロム c 抗体を反応させ、洗浄後、標識した抗チトクロム c 抗体を加えて標識物質に対応した活性、放射性標識であれば放射活性、酵素標識であれば酵素活性により標識物質を検出する。

【 0 0 1 9 】

また、当該免疫化学的な測定法が１ステップサンドイッチ法の場合、希釈したチトクロム c と固相化した抗チトクロム c 抗体、標識した抗チトクロム c 抗体を加えて反応させ、標識物質に対応した活性、放射性標識であれば放射活性、酵素標識であれば酵素活性により標識物質を検出する。

【 0 0 2 0 】

10 ng/mL、好ましくは1 ng/mLのチトクロム c を含む検体から得られるシグナルが、チトクロム c を含まない緩衝液のみの検体のシグナルと比較して十分に強ければ、当該pHは免疫化学的測定法に用いる緩衝液のpHの候補として挙げられる。

【 0 0 2 1 】

2 . 添加回収へのpHの影響

免疫化学的測定法に用いる検体に対応した体液、例えば血清中のチトクロム c を測定するのであれば血清に、既知量のチトクロム c を添加する。チトクロム c を添加した血清、及び添加しなかった血清中のチトクロム c 量を、当該免疫化学的な方法により測定し、理論値に対する測定値の比率を回収率とする。

【 0 0 2 2 】

回収率は、添加したチトクロム c 量を A、チトクロム c 未添加血清中のチトクロム c 測定値を B、チトクロム c 添加血清中のチトクロム c 測定値を C として、

- (1). 測定値 (C) / 理論値 (A と B の加重平均)、
 - (2). チトクロム c 添加による測定値の上昇値 (C - B) / 添加量 (A)、
- の何れでも計算できる。

【 0 0 2 3 】

回収率が70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の場合、当該pHは免疫化学的測定法に用いる緩衝液のpHの候補として挙げられる。

【 0 0 2 4 】

当該免疫化学的な方法に用いる緩衝液のpHは 1 . 測定感度へのpHの影響、 2 . 添加回収へのpHの影響を勘案して決定する。

【 0 0 2 5 】

また本発明の、免疫化学的なチトクロム c の測定に当たり、酸性領域の緩衝液を用いる方法は、固相化した抗体と検体中のチトクロム c とを反応させる第 1 反応のみならず、第 1 反応で妨害物質が除去しきれなかった時に、第 2 反応 (チトクロム c と標識抗体を反応させる工程) に用いても有効である。

本発明の方法は、第 1 反応で酸性領域の緩衝液を用いる方法に限られるものではない。

【 0 0 2 6 】

血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液は、上記 1 . 測定感度へのpHの影響、 2 . 添加回収へのpHの影響を勘案して決定される。緩衝液の種類は、酸性条件に調整し得る緩衝液であれば特に制限されないが、例えばこはく酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液などが挙げられる。

【 0 0 2 7 】

本発明の方法は、上述のように、酸性領域で抗チトクロム c 抗体とチトクロム c を反応させる他は、通常の、体液中のチトクロム c の量を測定する免疫学的方法と同様でよい。

【 0 0 2 8 】

ここで免疫化学的方法とは、チトクロム c に対する抗体を用いて、チトクロム c を定量する方法である。免疫化学的方法としては、チトクロム c を標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体コートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法等、様々な方法があるが、チトクロム c に対する抗体を用いた方法であれば、本発明の方法に含

10

20

30

40

50

まれる。抗チトクロム c 抗体は、チトクロム c を検出できるものであれば特に制限はなく、IgG、IgG F(ab')₂フラグメントやFabフラグメントでもよく、モノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また抗体は固相化されたものでも、標識されたものでもよい。標識には、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ビオチン標識等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。抗体の作製法及び標識法は、例えば続生化学実験講座5免疫生化学研究法(社団法人日本生化学会編 株式会社東京化学同人発行)または新生化学実験講座12分子免疫学III(社団法人日本生化学会編株式会社東京化学同人発行)に記載されている。

【0029】

本明細書中において体液としては、生体より採取された血液・血漿・血清・脳脊髄液・臍帯血・尿・羊水・気管支肺洗浄液等が挙げられるが、このうち血液が好ましい。

10

【0030】

本発明の方法では、通常には、酸性領域で抗チトクロム c 抗体と試料中のチトクロム c を反応させた後に、反応したチトクロム c の検出を行う。検出は、好ましくは洗浄を行った後、標識された2次抗体を反応させ、標識に応じた検出法により、検出する方法が挙げられる。例えば、ビオチン標識された2次抗体を用いる場合は、さらに、アビジン標識されたペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素を反応させた後、該酵素の基質を用いて発光又は発色により検出することができる。また、酵素標識された2次抗体、蛍光標識された2次抗体、ルテニウム標識された2次抗体などを用いてもよい。

【0031】

20

チトクロム c を測定する免疫化学的方法の例としては、例えば下記の参考例に記載した方法で調製したルテニウム錯体標識抗チトクロム c 抗体を用いる方法が挙げられる。

【0032】

さらに本発明は、体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定するキットに関する。本発明のキットは、抗チトクロム c 抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うための測定キットである。例えば、キット付属の使用説明書に、酸性条件でチトクロム c と抗チトクロム c 抗体の反応を行う旨が記載されたキットが挙げられる。また、酸性に調整した反应用緩衝液を含むキットでもよい。本発明のキットは抗チトクロム c 抗体の他に、2次抗体、チトクロム c 標準液、希釈液、洗浄液、検出用の基質などを含むものでもよい。

30

【0033】

通常には、本発明のキットは、体液、特に血液中のチトクロム c をチトクロム c に対する抗体を用いて定量するための試薬(チトクロム c 測定試薬)を含む。チトクロム c 測定試薬の一例として、サンドイッチ法によりチトクロム c を測定する測定試薬は、例えば1).抗チトクロム c 抗体コートカップ、あるいは抗チトクロム c 抗体コートビーズ、2).標識抗チトクロム c 抗体を含み、好ましくは更に3).既知濃度のチトクロム c 標準液、4).希釈液、5).洗浄液を含有する試薬である。更に酵素標識であれば、6).発色基質、7).反応停止液が含まれてもよい。

【0034】

本発明の測定キットは、血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液を含むことが好ましい。

40

【0035】

本発明の測定キットに含まれる緩衝液は、そのまま反応に用いることができる緩衝液であっても、希釈して用いる緩衝液であっても許される。また、適当な量の酸性あるいはアルカリ性の溶液を加えて本発明に適した酸性領域のpHとなるように調整されたもの、あるいはその様な指示書を含むものでもよい。

【実施例】**【0036】**

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

【0037】

50

【参考例 1】抗チトクロム c IgG の精製

ラットチトクロム c (シグマ社製) をウサギに免疫し、チトクロム c に対する抗血清を得た。その抗血清に最終濃度 2 M になるように硫酸アンモニウムを添加し、室温 (20-30) で 5 時間攪拌した。攪拌した溶液を 10000 回転で 30 分遠心し上清を捨て、沈殿物に 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2 を加え溶解後、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2 にて透析した。

【0038】

透析した溶液を、ウシチトクロム c (シグマ社) を結合した CNBr-Sepharose 4B (GEヘルスケアバイオサイエンス社) カラムに流し、0.15M NaCl を含む 0.01M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 でカラムを洗浄後、0.1 M 塩酸グアニジンで IgG を溶出した。溶出された IgG を 0.15 M NaCl を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で透析し抗チトクロム c IgG 精製物とした。

10

【0039】

【参考例 2】抗チトクロム c IgG F(ab')₂ ポリクローナル抗体の調製

精製した抗チトクロム c IgG を 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 4.2 で透析し、ペプシン (シグマ社) を蛋白質濃度比で 20:1 の割合になるように加え、37 °C で 16 時間反応させた。1 N NaOH を加え pH を 7.5 に調整し、0.15 M NaCl を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化した Sepharose 6B (GEヘルスケアバイオサイエンス社) カラムに流しゲル濾過を行った。フラクションの第一ピークを集め、濃縮し、抗チトクロム c IgG F(ab')₂ ポリクローナル抗体とした。

【0040】

【参考例 3】抗チトクロム c モノクローナル抗体の作製

ヒトチトクロム c (R&D Systems社) 110 µg/100 µL と 65 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 に溶解した 2 mg/mL オブアルブミン 55 µL を混合して、そこへ 65 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 で希釈した 1 mM グルタルアルデヒド 42 µL を加え、室温で 2 時間攪拌した。次に、0.15 M NaCl で 4 週間透析し、等量の FCA と アジュバント を作製し、BALB/C マウス腹腔に 0.1 mL 免疫した。2 週間おきに合計 3 回同様に免疫した。3 回目の免疫の 2 週間後、マウスに生理食塩水に溶解したヒトチトクロム c 50 µg/100 µL を尾静脈より静注した。3 日後マウスから脾臓を摘出して、常法に従い、脾臓リンパ球をポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞 P3X63 Ag8U.1 と細胞融合した。ヒトチトクロム c を抗原としてスクリーニングを行い、ヒトチトクロム c に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (clone : 3G7 および 27G9) を樹立した。

20

30

【0041】

樹立したハイブリドーマをエスロン SF-B 培地 (三光純薬社) で培養して増殖させ、BALB/C マウス腹腔に接種した。1 週間後、腹水を採取した。採取した腹水からプロテイン A を用いて IgG を精製し、抗チトクロム c 抗体 (3G7 抗体 および 27G9 抗体) を得た。

【0042】

【参考例 4】抗チトクロム c 抗体固相化ビーズの作製

抗チトクロム c モノクローナル抗体 (clone : 2B5F8 (R&D Systems社) または clone : 6H2.B4 (Becton Dickinson社)) を、0.15M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) で透析し、OD 280 nm が 0.56 になるよう 0.15M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) で希釈した。希釈した抗体 1.67 mL を、あらかじめ磁石を用いて 0.15M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 3 mL で 3 回洗浄したビーズ (Dynabeads^R M-450 Epoxy, Dynal社) 3.36 mL 分と混合し、室温で 17 時間攪拌した。次にビーズをブロッキングバッファー (50 mM Tris・HCl, 1% BSA, 0.15 M NaCl, 0.1% NaN₃, pH 7.5) 3 mL で懸濁し、室温で 7 時間攪拌してビーズをブロッキングした。ブロッキングされたビーズを使用時に濃度を調整して測定に用いた。

40

【0043】

【参考例 5】ルテニウム錯体標識抗チトクロム c 抗体の作製

参考例 3 で作製した抗チトクロム c モノクローナル抗体 (3G7 抗体 または 27G9 抗体) あるいは参考例 2 で作製した抗チトクロム c IgG F(ab')₂ ポリクローナル抗体を PBS で透析し、抗体濃度を 0.5 mg/mL から 2 mg/mL の範囲に調製する。抗体 1 mL に、ジメチルスルホキ

50

シドに10mg/mL濃度で溶解したルテニウム錯体 (ruthenium(II) tris(bipyridyl) - N-hydroxysuccinimide, IGEN Corp. USA) を12.2 μ L加え室温で30分攪拌した。次に2 M グリシンを50 μ L加え、室温で10分攪拌した。それを、PBS-3 (10 mMリン酸カリウム, 0.15M NaCl, 0.05% NaN₃, pH 6.0) であらかじめ平衡化したSephadex G-25 (GEヘルスケアバイオサイエンス社) カラム (1.5 cm x 30 cm) にアプライしてPBS-3で溶出し、1 mLでフラクション分取した。各フラクションのOD 280 nmを測定し、第1ピークのフラクションを集めルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体とした。抗体濃度をMicro BCA protein Assay kit (PIERCE社) を用いて測定した。

【 0 0 4 4 】

[参考例 6] ヒトチトクロムc標準抗原の調製

チトクロムc標準抗原は、ヒトチトクロムc (R&D Systems社) を5% BSA, 0.15 M NaCl, 0.1% NaN₃を含む0.15 Mリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.4で1000 ng/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mLに希釈して作製した。

10

【 0 0 4 5 】

[実施例 1] ヒト血清中のチトクロムc測定値に対するpHの影響

緩衝液に30、100、500、1000 ng/mLとなるように希釈したヒトチトクロムc (抗原1、抗原2、抗原3、抗原4)、血清1、血清2及び血清3の20 μ Lを、酸性検体希釈液 (0.15M NaCl, 15mM EDTA, 5% N102 (日本油脂社製)、0.1% NaN₃を含む0.1 Mクエン酸リン酸緩衝液pH 4.0)、または中性検体希釈液 (0.15M NaCl, 15mM EDTA, 5% N102 (日本油脂社製)、0.1% NaN₃を含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液pH 7.5) 200 μ Lに加えた。

20

【 0 0 4 6 】

以下の測定は、電気化学発光酵素免疫測定機ピコルミ^R 8 2 2 0 (三光純薬社) を用いて行った。

【 0 0 4 7 】

1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01 容量% Tween 20, 0.1% NaN₃を含む0.15 M PBS, pH 7.5でビーズ濃度1mg/mLに調整した抗チトクロムc抗体固相化ビーズ25 μ Lを加えて9分反応させ、ピコルミ^R BF洗浄液 (三光純薬社) 350 μ Lで2回洗浄後、1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01 容量% Tween 20, 0.1% NaN₃を含む0.15 M PBS, pH 7.5で0.5 - 1 μ g/mL濃度に調整したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体200 μ Lを加えて9分反応させた。ピコルミ^R BF洗浄液350 μ Lで2回洗浄後、ピコルミ^R発光電解液 (三光純薬社) を300 μ L加えて発光カウント値を計測した。

30

【 0 0 4 8 】

横軸にヒトチトクロムc標準抗原濃度、縦軸にヒトチトクロムc標準抗原のカウント値をプロットして標準曲線を描き、その標準曲線を基に、抗原1、抗原2、抗原3、抗原4、血清1、血清2及び血清3の発光カウント値からそれぞれに含まれるチトクロムc量を算出した。

【 0 0 4 9 】

次いで、抗原と抗原、あるいは抗原と血清をそれぞれ10 μ Lずつ混合し、同様に酸性検体希釈液あるいは中性検体希釈液200 μ Lを加えて、電気化学発光酵素免疫測定法にてチトクロムc量を算出して、その実測値と理論値を比較して回収率を求めた。ビーズに抗チトクロムcモノクローナル抗体6H2.B4抗体を固相化し、ルテニウム錯体標識抗体として抗チトクロムc IgG F(ab')₂ポリクローナル抗体を用いた結果を表1に、ビーズに2B5F8モノクローナル抗体を固相化し、ルテニウム錯体標識抗体として27G9モノクローナル抗体を用いた結果を表2に示す。

40

【 0 0 5 0 】

どちらの抗体系を用いた場合においても、抗原のみの場合はpHにかかわらず100%に近い回収率を示すのに対し、血清が加わるとpH 7.5では回収率が2-20%近くまで低下し、pH 4にすることで回収率が100%に回復することが明らかとなった。

【 0 0 5 1 】

また、どちらの組合せの抗体を用いた場合でも、pH 4の緩衝液中での測定感度が、1 ng

50

/mL以上であることが確認され、この条件が感度・回収率の両方を満たすものであることが示された。

【 0 0 5 2 】

【 表 1 】

表 1

6H2B4-Poly抗体
pH 7.5

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	28.8	抗原1 抗原2	73.4	75.7	97.0%
抗原2	122.5	抗原3 抗原4	748.9	717.7	104.3%
抗原3	623.5	抗原2 血清3	13.6	68.1	20.0%
抗原4	811.9	抗原1 血清2	4.0	16.7	24.0%
血清1	2.6	抗原4 血清1	113.5	407.3	27.9%
血清2	4.5				
血清3	13.6				

10

6H2B4-Poly抗体
pH 4

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	29.6	抗原1 抗原2	68.0	71.7	94.8%
抗原2	113.8	抗原3 抗原4	750.1	733.9	102.2%
抗原3	616.8	抗原2 血清3	111.9	110.0	101.8%
抗原4	850.9	抗原1 血清2	35.0	38.1	91.9%
血清1	29.0	抗原4 血清1	535.0	440.0	121.6%
血清2	46.6				
血清3	106.1				

20

【 表 2 】

表 2

2B5F8-27G9抗体
pH 7.5

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	30.2	抗原1 抗原2	80.2	76.8	104.5%
抗原2	123.3	抗原3 抗原4	761.5	715.1	106.5%
抗原3	587.7	抗原2 血清3	2.2	62.8	3.5%
抗原4	842.5	抗原1 血清2	0.3	15.4	1.9%
血清1	0.3	抗原4 血清1	35.9	421.4	8.5%
血清2	0.6				
血清3	2.3				

30

2B5F8-27G9抗体
pH 4

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	29.2	抗原1 抗原2	81.8	75.7	108.1%
抗原2	122.1	抗原3 抗原4	761.4	728.5	104.5%
抗原3	595.5	抗原2 血清3	101.7	93.8	108.5%
抗原4	861.5	抗原1 血清2	32.6	29.6	110.3%
血清1	19.1	抗原4 血清1	468.7	440.3	106.5%
血清2	29.9				
血清3	65.4				

40

【 0 0 5 3 】

50

【実施例2】こはく酸緩衝液を用いたヒト血清中のチトクロムc測定

クエン酸リン酸緩衝液に代えてこはく酸緩衝液を用いてヒト血清中のチトクロムcの測定を行った。

【0054】

検体希釈液(0.1M こはく酸, 0.15M NaCl, 2% リピジュアBL802(日本油脂社), 2% リピジュアBL405(日本油脂社), 15mM EDTA・2Na, 0.1% NaN₃, pH4.0) 200 μLに、緩衝液(0.05M Tris・HCl, pH7.8, 5% BSA, 0.15M NaCl, 0.1% NaN₃)で5、10、100、1000、3000 ng/mLとなるように希釈したヒトチトクロムc(抗原1、抗原2、抗原3、抗原4、抗原5)、血清1、血清2、血清3及び血清4の20 μLを加えた。

【0055】

以下の測定は、電気化学発光酵素免疫測定機ピコルミ^R8220(三光純薬社)を用いて行った。

【0056】

1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% トレハロース, 0.01 v/v % Tween20, 10-mM EDTA・2Na, 25 μg/mLマウスIgG, 0.1% NaN₃を含む0.05 M Tris・HCl, pH7.5, でビーズ濃度1mg/mLに調整した抗チトクロムc抗体固相化ビーズ25 μLを加えて9分反応させ、ピコルミ^R BF洗浄液(三光純薬社) 350 μLで2回洗浄後、1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% トレハロース, 0.01 v/v % Tween20, 0.3% NaN₃を含む0.05M Tris・HCl, pH7.5で濃度1 μg/mLに調整したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体200 μLを加えて9分反応させた。ピコルミ^R BF洗浄液 350 μLで2回洗浄後、ピコルミ^R発光電解液(三光純薬社)を300 μL加えて発光カウント値を計測した。

【0057】

横軸にヒトチトクロムc標準抗原濃度、縦軸にヒトチトクロムc標準抗原のカウント値をプロットして標準曲線を描き、その標準曲線を基に、抗原1、抗原2、抗原3、抗原4、抗原5、血清1、血清2、血清3及び血清4の発光カウント値からそれぞれに含まれるチトクロムc量を算出した。

【0058】

ビーズに抗チトクロムcモノクローナル抗体2B5F8抗体を固相化し、ルテニウム錯体標識抗体として抗チトクロム27G9モノクローナル抗体あるいは6H2.B4モノクローナル抗体を用いた結果を表3に示す。この試薬を用いた場合においても、回収率が100%を示し、測定感度が、1 ng/mL以上であることが確認され、この条件も感度・回収率の両方を満たすものであることが示された。

【0059】

10

20

30

【表3】

表3

2B5F8-27G9抗体

チトクロムc定量値 (ng/mL)	抗原の組み合わせ		実測値	理論値	回収率
	(A)	(B)	(C)	(D) = ((A)+(B))/2	(C)/(D)
抗原1 5.0	抗原1	血清1	14.7	13.5	109.3%
抗原2 10.2	抗原2	血清1	16.5	16.1	102.8%
抗原3 97.1	抗原2	血清2	46.3	43.4	106.8%
抗原4 1033.2	抗原3	血清2	86.6	86.8	99.8%
抗原5 2927.1	抗原3	血清3	331.6	304.5	108.9%
血清1 21.9	抗原4	血清3	740.5	772.6	95.9%
血清2 76.5	抗原4	血清4	1205.4	1243.1	97.0%
血清3 511.9	抗原5	血清4	2195.7	2190.0	100.3%
血清4 1452.9					

10

2B5F8-6H2. B4抗体

チトクロムc定量値 (ng/mL)	抗原の組み合わせ		実測値	理論値	回収率
	(A)	(B)	(C)	(D) = ((A)+(B))/2	(C)/(D)
抗原1 4.6	抗原1	血清1	12.1	12.4	98.0%
抗原2 9.2	抗原2	血清1	14.3	14.7	97.6%
抗原3 108.3	抗原2	血清2	44.9	42.8	104.9%
抗原4 1090.0	抗原3	血清2	91.8	92.4	99.4%
抗原5 2859.8	抗原3	血清3	370.3	324.7	114.1%
血清1 20.1	抗原4	血清3	794.4	815.5	97.4%
血清2 76.4	抗原4	血清4	1339.8	1276.7	104.9%
血清3 541.0	抗原5	血清4	2072.1	2161.6	95.9%
血清4 1463.4					

20

30

【0060】

[実施例3] チトクロムcの正確な測定を妨げるヒト血清中の妨害物質の同定

(1) ヒト血清のゲルろ過

ヒト血清2mLを、PBSを溶出液としてSephacryl S-200 (GEヘルスケアバイオサイエンス社) カラムゲルクロマトグラフィー (サイズ 2.5cm × 120cm) によりゲルろ過し、1フラクション約7 mLで分取した。各フラクション0.5 mLに、ヒトチトクロムc (R&D Systems社) を10 µg/mLの濃度に精製水で溶解したものを50 µL加えて混合し、その50 µLを反応溶液 (0.15 M PBS, 15 mM EDTA, 1% BSA, 0.1% NaN₃, pH 7.5) 50 µLで希釈した。これを、電気化学発光免疫自動測定機ピコルミ^R8220 (三光純薬社) を用い、参考例で作製した抗チトクロムc抗体(2B5F8)結合ビーズ、1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01容量% Tween20, 0.1% NaN₃を含む0.15M PBS, pH7.5で2 µg/mLに希釈した参考例で作製したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体(3G7)、ピコルミ^R発光電解液 (三光純薬社)、ピコルミ^R BF洗浄液 (三光純薬社)、ピコルミ^Rセルクリーナー液 (三光純薬社)、ピコルミ^Rノズルリンス液 (三光純薬社) をセットし、抗チトクロムc抗体結合ビーズ分注量25 µL、ルテニウム標識抗チトクロムc抗体分注量100 µL、ピコルミ^R発光電解液分注量300 µL、1ステップ、反応時間26分の条件で測定した。

40

【0061】

50

その結果、フラクションNo.41付近で発光カウント値が減少した。したがって、フラクションNo.41にチトクロムcと抗チトクロムc抗体との反応を阻害する妨害物質が含まれていることがわかった(図1)。

【0062】

(2) 妨害物質が含まれるフラクションの2次元電気泳動と質量分析による同定

Hiroyuki Katayama et al., Optimization of in-gel protein digestion system in combination with thin-gel separation and negative staining in 96-well plate format: Rapid Commun. in Mass Spectrom. 2003; 17: 1071-1078に記載されている方法を参考にして、妨害物質が含まれるフラクションを2次元電気泳動で分離し、各スポットを質量分析により同定した(プロテオーム技術)。

10

【0063】

ゲルろ過フラクションNo.41の0.5 mLをSwell Gel[®]Blue Albumin Removal kit (PIERCE社)を用いて、アルブミン除去処理した。次に、2次元電気泳動を行うため、膨潤バッファ(8 M 尿素, 2%CHAPS, 0.5% IPG Buffer, プロモフェノールブルー, 0.6% ジチオスレイトール)0.44 mLとアルブミン除去したゲルろ過フラクション0.11 mLを混合し、そこへ等電点電気泳動用ゲルImmobilize Dry Strip pH3-10, 18cm (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を浸し、室温で一晩放置し、ゲルを膨潤させた。ゲルをCoolPhoreStar IPG-IEF Type-P (アナテック社)にセットし、PowerPhoreStar Pro (アナテック社)で500V2h, 700V1h, 1000V1h, 1500V1h, 2000V1h, 2500V1h, 3000V1h, 3500V10h~の電圧をかけて、電気泳動を行った。泳動したゲルをSDS処理バッファ(50 mM Tris・HCl, pH 6.8, 6 M 尿素, 0.25% ジチオスレイトール, 2% SDS, 0.0025%プロモフェノールブルー, 30容量% グリセロール)に浸して室温で10min攪拌し、次に、還元アルキル化処理バッファ(50 mM Tris・HCl, pH 6.8, 6 M 尿素, 2%SDS, 0.0025%プロモフェノールブルー, 30容量% グリセロール, 4.5%ヨードアセトアミド)に浸して室温で10 min攪拌した後、2Dクイックゲル(アナテック社)にセットし、電気泳動した。泳動したゲルをCoomasie Brilliant blueで染色して、スポットをカッターで切り出した。

20

【0064】

切り出したゲルをカッターで細かく碎き、チューブに入れ50 mM NH₄HCO₃:アセトニトリル=1:1を100 μL注入し、室温で60分攪拌した。50 mM NH₄HCO₃:アセトニトリル=1:1を入れ替え、さらに室温で40分攪拌しCoomasie Brilliantblueを脱色した。

30

【0065】

洗浄液(50% メタノール、10% 酢酸、40% 精製水)100 μLで置換し、4 で保存一時保存した。洗浄液を除去し、50 mM NH₄HCO₃:アセトニトリル=1:1を用いて100 μL/tubeで3回洗浄した。次に、100 mM NH₄HCO₃を100 μL/tube入れて、室温で5分間攪拌した。液を除去し、DTT 2.5 mg/mLを含む100 mM NH₄HCO₃を100 μL/tube入れて、15分間攪拌した。液を除去し、アクリルアミド45 mg/mLを含む100 mM NH₄HCO₃を100 μL/tube入れ15分間攪拌した。液を除去し、メタノール:酢酸:精製水=5:1:4を500 μL/tube入れ、室温で16時間攪拌した。液を入れ替えてさらに室温で30分間攪拌した。液を除去し、50 mM NH₄HCO₃を500 μL/tube入れ、室温で10分間攪拌した。液を除去し、アセトニトリル500 μL/tube入れ、室温で5分間攪拌した。

40

【0066】

チューブのふたを開け、減圧遠心乾燥機(トミー精工社、Speed vac)にセットし、乾固するまで減圧乾燥させた。次に、0.2% n-オクチルグルコシド(シグマ社)液:50 mM NH₄HCO₃=1:1液45 μLに200 μg/mLトリプシンを5 μL加えた液を2.5 μLとり、乾燥させたゲルに加え、室温で5分間反応させた。そこへ50 mM NH₄HCO₃:0.2% n-オクチルグルコシド液=1:1を8 μL加え、37 で16時間放置した。そこへ、0.1% TFAを含む50% アセトニトリルを40 μL加え、10分間超音波水槽にかけた。液を別なチューブに移し、残ったゲルに、0.1% TFAを含む75%アセトニトリルを40 μL入れ、超音波水槽で10分間処理した。液を取り出し、先に別チューブに移しておいた液と合わせた。次に、凍結真空乾燥機で液を乾燥させた。

50

【 0 0 6 7 】

乾燥させたサンプルに0.1% TFAを含む5%アセトニトリルを50 μ L入れ、攪拌してサンプルを溶解した。C18逆相クロマトグラフィー用ゲルを詰め、あらかじめメタノール200 μ Lと50 μ Lで2回洗浄したカラムに、溶解したサンプルを全量アプライした。2000 rpm、5分遠心し、アプライしたサンプルを完全に流した。次に、カラムに0.1% TFAを含む5%アセトニトリルを50 μ L入れ、2000 rpm、5分遠心し洗浄した。この洗浄を3回行った。次に、0.1% TFAを含む95%アセトニトリルを25 μ L入れ、2000 rpm、5分遠心しサンプルを溶出した。溶出された液を37 に放置し、液を乾燥させた。

【 0 0 6 8 】

0.1% TFAを含む5%アセトニトリルをチューブに入れてサンプルを溶解し、LC-MASS分析装置（サーモエレクトロン社、LCQ）を用いて、質量解析を行い、二次元電気泳動において得られたスポットを同定した。結果を図2に示した。

10

【 0 0 6 9 】

(3) 同定された蛋白質のチトクロムc測定に対する影響

同定された蛋白質のうち、アルブミンを除く市販されていて入手可能なものについて、蛋白質をチトクロムcの測定系に添加して、チトクロムc測定を行い、妨害活性があるか調べた。

【 0 0 7 0 】

- 1). ヒトトランスフェリン(Biogenesis社)6.5 mgを精製水0.65 mLで溶解し10 mg/mLのトランスフェリン溶液を調製した。
- 2). ヒト α 1酸性糖蛋白質 (Athens Research&Technology社) 1 mgを0.5 mLのPBS-1で溶解し、 α 1酸性糖蛋白質溶液とした。
- 3). ヒト α 1アンチトリプシン (CALBIOCHEM社) 1 mgを0.33 mLの精製水で溶解し、 α 1アンチトリプシン溶液とした。
- 4). ヒトトランスチレチン(プレアルブミン) (Sigma社) 1 mgを0.3 mLの0.15 M NaClを含む50mM リン酸緩衝液pH 7.5で溶解しトランスチレチン溶液とした。
- 5). ヒトビタミンD結合蛋白質(Gc-グロブリン)(CALBIOCHEM社)1 mgを0.5 mLの精製水で溶解し、ビタミンD結合蛋白質溶液とした。

20

【 0 0 7 1 】

反応用溶液 (0.15M PBS, 15 mM EDTA, 1% BSA, 0.1% NaN_3 , pH 7.5) 100 μ Lに、同定された蛋白質の溶液を0または10 μ L、ヒトチトクロムc (10 μ g/mL) を1 μ L添加した。これを、電気化学発光免疫自動測定機ピコルミ^R8220 (三光純薬社) を用い、参考例で作製した抗チトクロムc抗体(2B5F8)結合ビーズ、ルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体(27G9)、ピコルミ^R発光電解液 (三光純薬社)、ピコルミ^RBF洗浄液 (三光純薬社)、ピコルミ^Rセルクリーナー液 (三光純薬社)、ピコルミ^Rノズルリンス液 (三光純薬社) をセットし、抗チトクロムc抗体結合ビーズ分注量25 μ L、ルテニウム標識抗チトクロムc抗体分注量100 μ L、ピコルミ^R発光電解液分注量300 μ L、1ステップ、反応時間26分の条件で測定した。その結果、 α 1酸性糖蛋白質および α 1アンチトリプシンに添加回収率の低下が認められ、妨害活性を有することがわかった (表4)。

30

【 0 0 7 2 】

40

【表4】

表4

同定された蛋白質	添加回収率 (対照に対する%)
トランスフェリン	99%
$\alpha 1$ 酸性糖蛋白質	40%
$\alpha 1$ アンチトリプシン	58%
トランスチレチン	100%
ビタミンD結合蛋白質	93%

10

【0073】

(4) 同定された妨害物質の酸性領域でのチトクロムc測定に対する影響

反応条件を以下に示す酸性条件、または、中性条件で、測定方法に従って測定した。

1) 酸性条件

- ・酸性反应用溶液(0.05 M クエン酸, 1% BSA, 0.15 M NaCl, 15 mM EDTA, pH 4.0)
- ・ルテニウム希釈液(0.05 M クエン酸, 1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% スクロース, 0.01% Tween20, pH 4.0)

20

2) 中性条件

- ・中性反应用溶液(0.15 M PBS, 15 mM EDTA, 1% BSA, 0.1% NaN_3 , pH7.5)
- ・ルテニウム希釈液(0.15 M PBS, 1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01% Tween20, 0.1% NaN_3 , pH 7.5)

【0074】

3) 測定方法

反应用溶液100 μL に、妨害活性の認められた蛋白質の溶液である $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質液(2 mg/mL)または $\alpha 1$ アンチトリプシン液(3mg/mL) 10 μL 、及び、ヒトチトクロムc(R&D Systems社)を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に精製水で溶解したもの1 μL を加えて混合した。これを、電気化学発光免疫自動測定機ピコルミ^R8220(三光純薬社)を用い、参考例で作製した抗チトクロムc抗体(2B5F8)結合ビーズ、ルテニウム希釈液で希釈した参考例で作製したルテニウム標識抗チトクロムc抗体(3G7)、ピコルミ^R発光電解液(三光純薬社)、ピコルミ^RBF洗浄液(三光純薬社)、ピコルミ^Rセルクリーナー液(三光純薬社)、ピコルミ^Rノズルリンス液(三光純薬社)をセットし、抗チトクロムc抗体結合ビーズ分注量25 μL 、ルテニウム標識抗チトクロムc抗体分注量100 μL 、ピコルミ^R発光電解液分注量300 μL 、1ステップ、反応時間26分の条件で測定した。

30

【0075】

その結果、表5に示すとおり、ヒト血清中での測定と同様に抗原抗体反応時のpHを下げることで妨害活性を回避できることが明らかとなった。

40

【0076】

妨害活性を有する物質は共に酸性度の高い蛋白質であり、これら酸性度の高い蛋白質が塩基性の強いチトクロムcと相互作用することにより、チトクロムcの測定に影響を与えていたと考えられる。酸性領域で測定することによりチトクロムcと妨害物質の相互作用は弱くなることから、酸性領域では正確な定量が可能となったものと考えられる。従って、実施例で試験した以外の抗体に関しても、酸性領域とすることでチトクロムcの正確な測定が可能となるものと考えられる。

【0077】

50

【表 5】

表 5

	添加回収率	
	pH4.0	pH7.5
対照	100.0%	100.0%
α 1酸性糖蛋白質	99.8%	66.7%
α 1アンチトリプシン	99.2%	74.0%

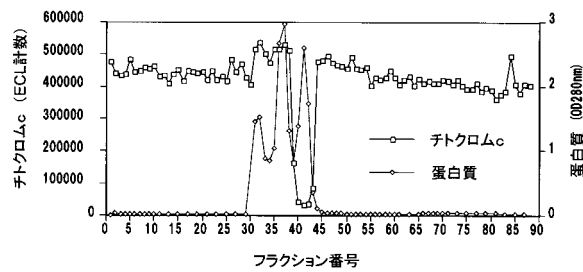
10

【産業上の利用の可能性】

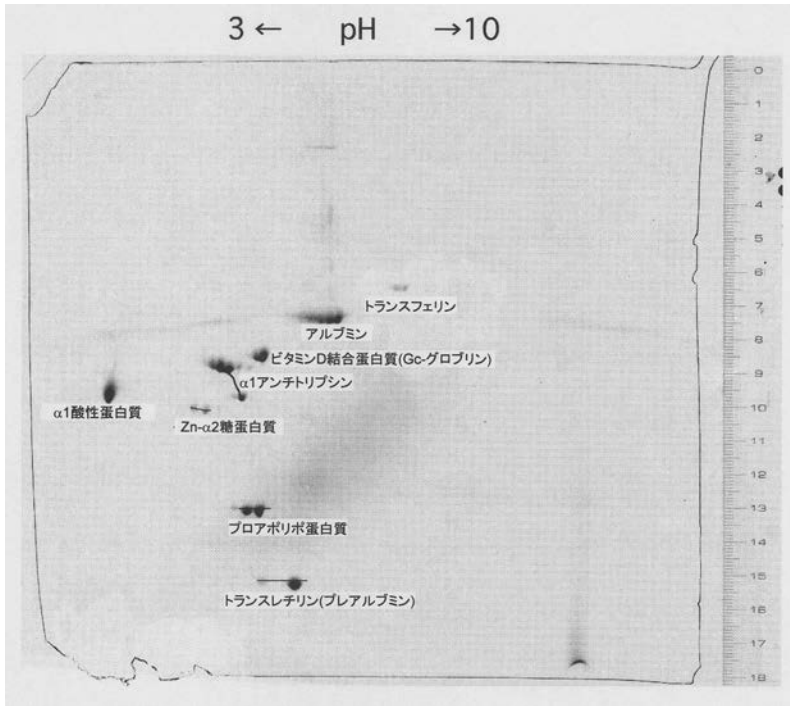
【0078】

体液中のチトクロムcが体内で起こっているアポトーシスの指標となることが知られ、多くの疾患の診断薬として有効であることが明らかとなっている。本願の酸性領域の緩衝液を用いるチトクロムcの免疫化学的測定法により、より正確なチトクロムc量の測定が可能となり、本方法の診断薬への応用が期待される。

【図 1】



【図2】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平03 - 257367 (JP, A)
特開2003 - 028860 (JP, A)
国際公開第2001 / 035093 (WO, A1)
国際公開第98 / 002579 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	细胞色素c的免疫化学测量方法和测量试剂盒		
公开(公告)号	JP4896022B2	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	JP2007528145	申请日	2006-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	青山宗夫		
发明人	青山 宗夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/573 G01N33/5735 G01N2800/04 Y10S435/97 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/531.B		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	2005118192 2005-04-15 JP		
其他公开文献	JPWO2006112445A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于精确测量体液，特别是血液中细胞色素c的量的免疫化学方法，以及用于测量的试剂盒。通过使抗体与细胞色素c在酸性范围的缓冲溶液中反应，可以准确地测量细胞色素c的量而不受任何干扰底物的影响。

2B5F8-27G9抗体 pH 4

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	29.2	抗原2	81.8	75.7	108.1%
抗原2	122.1	抗原3 抗原4	761.4	728.5	104.5%
抗原3	595.5	抗原2 血清3	101.7	93.8	108.5%
抗原4	861.5	抗原1 血清2	32.6	29.6	110.3%
血清1	19.1	抗原4 血清1	468.7	440.3	106.5%
血清2	29.9				
血清3	65.4				