

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4406555号
(P4406555)

(45) 発行日 平成22年1月27日 (2010. 1. 27)

(24) 登録日 平成21年11月13日 (2009. 11. 13)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 D

CO 7 K 16/18 (2006. 01)

CO 7 K 16/18

GO 1 N 33/577 (2006. 01)

GO 1 N 33/577 B

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 11 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2003-398654 (P2003-398654)
 (22) 出願日 平成15年11月28日 (2003. 11. 28)
 (65) 公開番号 特開2004-191371 (P2004-191371A)
 (43) 公開日 平成16年7月8日 (2004. 7. 8)
 審査請求日 平成18年9月8日 (2006. 9. 8)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-347423 (P2002-347423)
 (32) 優先日 平成14年11月29日 (2002. 11. 29)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 506137147
 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
 ジメント株式会社
 東京都文京区小石川四丁目6番10号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉
 (72) 発明者 片山 政彦
 茨城県つくば市大字上広岡527-51
 審査官 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エラスチン分解物の測定方法及び測定キットならびに大動脈解離症の検出方法及び検出キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1抗体と第2抗体とをエラスチン分解物に免疫学的に結合させることを含む、エラスチン分解物の免疫学的測定方法であって、第1抗体及び第2抗体は、それぞれ、ハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体、及び、ハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体からなる群から選ばれる抗体である (但し、第1抗体がハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である場合を除く) ことを特徴とする前記方法。

10

【請求項 2】

第1抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である請求項1記載の方法。

【請求項 3】

第1抗体がハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体である請求項1記載の方法。

【請求項 4】

第1抗体及び第2抗体が共にハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生され

20

るモノクローナル抗体である請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法により、循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて大動脈解離症を検出することを含む、大動脈解離症の検出方法。

【請求項 6】

第 1 抗体と第 2 抗体とを含む、エラスチン分解物の免疫学的測定キットであって、第 1 抗体及び第 2 抗体は、それぞれ、ハイブリドーマ HASG-30 (FERM BP-08489) により產生されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマ HASG-2 (FERM BP-08488) により產生されるモノクローナル抗体、及び、ハイブリドーマ HASG-61-1 (FERM BP-08490) により產生されるモノクローナル抗体からなる群から選ばれる抗体である（但し、第 1 抗体がハイブリドーマ HASG-30 (FERM BP-08489) により產生されるモノクローナル抗体であり、第 2 抗体がハイブリドーマ HASG-2 (FERM BP-08488) により產生されるモノクローナル抗体である場合を除く）ことを特徴とする前記キット。

10

【請求項 7】

第 1 抗体がハイブリドーマ HASG-61-1 (FERM BP-08490) により產生されるモノクローナル抗体であり、第 2 抗体がハイブリドーマ HASG-2 (FERM BP-08488) により產生されるモノクローナル抗体である請求項 6 記載のキット。

【請求項 8】

第 1 抗体がハイブリドーマ HASG-30 (FERM BP-08489) により產生されるモノクローナル抗体であり、第 2 抗体がハイブリドーマ HASG-61-1 (FERM BP-08490) により產生されるモノクローナル抗体である請求項 6 記載のキット。

20

【請求項 9】

第 1 抗体及び第 2 抗体が共にハイブリドーマ HASG-2 (FERM BP-08488) により產生されるモノクローナル抗体である請求項 6 記載のキット。

【請求項 10】

大動脈解離症の検出用である請求項 6 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 11】

ハイブリドーマ HASG-61-1 (FERM BP-08490) により產生されるモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、エラスチン分解物の測定方法及び測定キットならびに大動脈解離症の検出方法及び検出キットに関する。

【背景技術】

【0002】

大動脈解離症（大動脈瘤とも呼称される）は、急激な胸痛・腹痛を伴う疾患であって、大動脈血管の内膜の一部が裂けて、その内膜裂孔から内膜内に血液が流入して血管壁の解離を生じることにより発症する。発症部位の大部分は大動脈であるが、脈管の分枝におよぶこともある。発症要因としては、遺伝的な要因や、大動脈内膜の変成及び脆弱化に加え、大動脈の拡張や高血圧も指摘されている（非特許文献 1 参照）。この疾患は、患者側には事前の自覚的な症状もなく突然発症する急性期疾患であり、血管の破裂に至った場合は患者の致死率も大変高い。発症した場合は、迅速に病巣の解離部位を人工血管に置換する外科的処置をとるのが一般的である。また、胸部の大動脈解離症の場合は、解離発生時には激しい胸痛を伴うことがある。これは急性心筋梗塞症の初期症状と極めて類似している。急性心筋梗塞症は、例えば心電図検査や血液生化学検査等により診断することは比較的容易である。大動脈解離症は、これらの心電図検査や血液生化学検査等では病態を把握することができないとともに、発症した場合の致死率も非常に高いことから、治療法の選択の為にその鑑別診断が極めて重要となる（非特許文献 2 参照）。

40

【0003】

50

大動脈解離症の診断には、X線撮影検査、血管造影CT/MRI検査、経食道エコー検査などの既に確立された専用機器を用いる画像検査法により、患者の病巣部を直接目視するのが一般的である。それらの画像から、血管の解離部位の直径を読み取り数値化して診断する方法も行われている。また、上記の様な画像診断を定期的に複数回にわたって実施し、その解離部位の初診時からの年単位の拡大速度を計算し、数値化して統計データと比較して診断する方法も試みられている。

【0004】

しかし、これらの画像診断はいずれも特殊な装置とともに高度な医療技術を要するものであり、患者はその診断の際にも循環器専門医療機関にて受診する必要性にせまられることが多い。また、造影剤の投与等の患者への一定の身体的負担があるとともに、一人の患者の検査にもかなりの時間と費用を要するものである。さらに、これらの画像検査法は、検査自体が大がかりなものであることから、高血圧や動脈硬化症等の既往症がある患者や、既に大動脈解離を一度以上発症した患者の経過観察に使用されることが多く、既往症や自覚症状のない患者に実施される機会は少ない。また、突然の解離症発症患者のための緊急検査へも十分に備えることができない。そのため、緊急検査にも対応できるような簡便で短時間に正確に診断できる技術の確立が望まれている。

【0005】

最近、腹部大動脈解離症の患者において血中エラスチン分解物濃度と腹部大動脈解離症の進行との関連が報告されている（非特許文献3参照）。この報告においては、画像検査から算出した患者の大動脈瘤病巣部の年単位拡大速度（Annal expansion）や初診時の腹部大動脈瘤病巣部直径（Initial abdominal aortic aneurysms size）の数値と、血中エラスチン分解物濃度とがわずかな正の相関性を示したことが記載されている。さらに最近になって、尿中エラスチン分解物濃度と大動脈瘤診断との関連が報告されている（非特許文献4参照）。この報告には、尿中エラスチン分解物濃度が、正常人群と大動脈瘤患者群との間で統計的に相違することが記載されている。しかし、血液などの循環液中のエラスチン分解物と大動脈解離症の有無との関連を検討した報告はない。

【0006】

免疫学的測定方法によりヒト血中を循環しているエラスチン分解物量の測定が可能であることは示されている（非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8参照）。しかし、これらのエラスチン分解物の免疫学的測定方法は、エラスチン分解物をウサギ等の動物へ免疫することによって得られる抗血清由来のポリクローナル抗体を使用したものや、モノクローナル抗体を用いても競合法によるものであり、その測定の特異性や再現性などの性能面で改善の余地がある。

【非特許文献1】日本外科学会誌 97, 873-878 (1996)

【非特許文献2】総合臨床 48, 2151-2155 (1999)

【非特許文献3】Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 14, 12-16 (1997)

【非特許文献4】Biol. Pharm. Bull., 22, 854-857(1999)

【非特許文献5】Meth. Enzymol., 163, 656-673 (1988)

【非特許文献6】Clin. Physiol. Biochem., 8, 273-282 (1990)

【非特許文献7】J. Immunol. Methods, 164, 175-187 (1993)

【非特許文献8】Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 14, 12-16 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の第1の課題は、大動脈解離症の検出に有用な、簡便で精度良く被験者の循環液中のエラスチン分解物量の測定を行うための免疫学的測定方法及びそのためのキットを提供することである。

【0008】

本発明の第2の課題は、簡便で短時間に正確に検出できる大動脈解離症の検出方法及びそのための検出キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

本発明者らは、上記の問題点を解決するために、ヒト大動脈由来のエラスチン分解物に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を複数種類作製した。そして、それらのうちの特定の組み合わせの抗体を用いてヒト循環液中のエラスチン分解物を測定した場合に大動脈解離症の検出に有用な結果が得られることを見出し、本発明を完成した。

【0010】

本発明は、第1抗体と第2抗体とをエラスチン分解物に免疫学的に結合させることを含む、エラスチン分解物の免疫学的測定方法であって、第1抗体及び第2抗体は、それぞれ、ハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488)、及び、ハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490)、ならびに、それらのモノクローナル抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体からなる群から選ばれる抗体であることを特徴とする前記方法（以下、「本発明測定法」ともいう）を提供する。

10

【0011】

本発明測定法においては、第1抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、第1抗体がハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、または、第1抗体及び第2抗体が共にハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせを用いることが好ましい。

20

【0012】

本発明は、また、本発明測定法により、循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて大動脈解離症を検出することを含む、大動脈解離症の検出方法を提供する。

【0013】

さらに、本発明は、第1抗体と第2抗体とを含む、エラスチン分解物の免疫学的測定キットであって、第1抗体及び第2抗体は、それぞれ、ハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488)、及び、ハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490)、ならびに、それらのモノクローナル抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体からなる群から選ばれる抗体であることを特徴とする前記キット（以下、「本発明測定キット」ともいう）を提供する。

30

【0014】

本発明測定キットにおいては、第1抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、第1抗体がハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、または、第1抗体及び第2抗体が共にハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせを用いることが好ましい。

40

【0015】

本発明測定キットは、好ましくは、大動脈解離症の検出用である。

【0016】

さらに、また、本発明は、ハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体を提供する。

【発明の効果】**【0017】**

本発明によれば、血清などの循環液中のエラスチン分解物量を測定することにより、特

50

別な装置を用いることなく、迅速で簡便に、高い陽性率で大動脈解離症を検出することが可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

< 1 > 本発明測定法

本発明測定法は、第1抗体と第2抗体とをエラスチン分解物に免疫学的に結合させることを含む、エラスチン分解物の免疫学的測定方法であり、第1抗体及び第2抗体は、それぞれ、ハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488)、及び、ハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490)、ならびに、それらのモノクローナル抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体からなる群から選ばれる抗体であることを特徴とする。

10

【0019】

HASG-2及びHASG-30は、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに2001年5月18日に寄託され、受託番号FERM P-18335及びFERM P-18336が付与され、2003年9月18日に、ブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、それぞれ、FERM BP-08488及びFERM BP-08489の受託番号が付与されている。また、HASG-61-1は、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに2002年10月8日に寄託され、受託番号FERM P-19058が付与され、2003年9月18日に、ブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-08490の受託番号が付与されている。HASG-2により産生されるモノクローナル抗体、HASG-30により産生されるモノクローナル抗体、及び、HASG-61-1により産生されるモノクローナル抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体は、以下に挙げるような方法により選択することができる。

20

【0020】

同等の特異性及び親和性を持つ抗体は、例えば競合試験により選択することができる (Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) p.567)。具体的には、抗原物質であるヒト大動脈エラスチン分解物を適当な濃度で生理緩衝液に溶解し、マイクロプレート固相部に吸着させる。ブロッキング処理を行った後に、酵素標識したHASG-2、HASG-30又はHASG-61-1モノクローナル抗体とともに評価すべき抗体を同量で添加する。同様な特異性及び親和性を有する抗体は、酵素標識したHASG-2、HASG-30又はHASG-61-1モノクローナル抗体の反応を阻害する性能を確認することにより選択することができる。

30

【0021】

別法としては、例えばペプチドマッピング法により選択することができる。具体的には、抗原物質であるヒト大動脈エラスチン分解物を高速液体クロマトグラフィー装置等により、分子量や疎水性等の違いにより分離し、分離された様々なエラスチン抗原断片に対する結合をHASG-2、HASG-30及びHASG-61-1モノクローナル抗体と比較することにより、特異性及び親和性を評価するものである。HASG-2、HASG-30又はHASG-61-1モノクローナル抗体が反応する抗原断片に同等に反応する抗体はそれぞれ同等の特異性を有すると判断される。

40

【0022】

ヒト大動脈エラスチン分解物は、Biochem. J., 61, 11-21(1955)に記載の方法によって得られ得るものであり、市販品として入手することができる。

【0023】

使用される抗体としては、ヒト大動脈エラスチン分解物をマウスやラット、ハムスター等の齧歯類動物に免疫して作製されるモノクローナル抗体が好ましい。動物種は特に限定されるものではないが、一般的にBalb/Cマウスが最もよく用いられる。

【0024】

第1抗体及び第2抗体の組み合わせとしては、第1抗体がハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である。

50

SG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、及び、その他の組み合わせが挙げられる。第1抗体と第2抗体とは同一の抗体であってもよい。本発明測定法においては、第1抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、第1抗体がハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体であり、第2抗体がハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせ、または、第1抗体及び第2抗体が共にハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488) により産生されるモノクローナル抗体である組み合わせを用いることが好ましい。

【0025】

10

抗体は、所定の特性及び親和性を有する限り、Fab、Fab'、F(ab')₂などのフラグメントであってもよいし、また、標識化や固相化などにより修飾されていてもよい。

【0026】

本発明測定法は、特定の組み合わせの抗体を用いることの他は、二つの抗体を抗原に免疫学的に結合させる通常のサンドイッチ法と同様でよい。

【0027】

免疫学的測定方法には、その検出方法によって、放射性物質標識物を用いる方法、ラテックス凝集方法、蛍光標識物を用いる方法、電気化学発光を用いる方法、酵素を用いる方法などがあり、特に限定されるものではないが、本発明測定法は、安全で簡便なことから酵素免疫測定法 (ELISA) または電気化学免疫発光測定法であることが好ましい。

20

【0028】

ELISAにおいては、その測定方式としても様々な方法が知られているが、特に簡便で定量性が高い方法としてペルオキシダーゼを標識酵素として用いたサンドイッチ方式を用いることが好ましい。具体的には、第1抗体と第2抗体の一方を市販96ウエルマイクロプレートの底面などの固相に吸着させる。次に、固相への自然吸着を低減するためにミルクカゼインなどのブロッキングタンパク質を吸着させる。そこへあらかじめ濃度の明らかな標準ヒト大動脈エラスチン分解物溶液と被験生体試料を加えて一定時間静置する。試料中のエラスチン分解物抗原を固相上の抗体に免疫学的に結合させた後にプレートを洗浄し、今度はペルオキシダーゼなどの酵素標識した他方の抗体を適当な濃度で加える。一定時間まで静置して固相上の抗体とエラスチン分解物抗原と標識抗体の3者の複合体を固相上に形成させる。その後、固相を洗浄して、過酸化水素とABTS等の発色基質の混合溶液を添加し標識酵素による発色を得る。酵素反応を阻害剤を添加して停止させた後に、その発色の吸光度をプレートリーダー等の機器により測定する。被験液の吸光度と標準品の吸光度を検量線等を用いて比較することにより精度良く被験液中のエラスチン分解物量を知ることができる。

30

【0029】

電気化学発光免疫測定においては、その測定方式としても様々なものが知られているが、特に簡便で定量性が高いものとして第1抗体に、磁気ビーズに固相化した抗体、第2抗体に、化学発光性錯体好ましくはルテニウム錯体によって標識した抗体を用いたサンドイッチ方式が好ましい。この場合の第1抗体と第2抗体はエラスチン分解物に対して特異的に反応することが望ましく、第1抗体と第2抗体は同一のものであっても構わない。測定に際しては、抗エラスチン分解物抗体 (第1抗体) を市販磁気ビーズに固相化させる。固相化は共有結合により結合させても非共有結合により結合させても構わない。次に、他の分子の磁気ビーズへの非特異結合を低減するためにミルクカゼインなどのブロッキングタンパク質を吸着させる。そこへあらかじめ濃度の明らかなエラスチン分解物溶液、または被験生体試料を加えて一定時間攪拌する。試料中のエラスチン分解物抗原を抗体結合粒子表面に吸着させた後に粒子を洗浄し、今度は化学発光性錯体好ましくはルテニウム錯体にて標識した別の抗エラスチン分解物抗体 (第2抗体) を適当な濃度で加える。一定時間まで攪拌して第1抗体とエラスチン分解物抗原と第2抗体の3者の複合体を磁気ビーズ上に形成させる。その後、ビーズを洗浄して、専用の装置中の電極間にて電流を通し標識物で

40

50

ある錯体を発光させ、発光強度を計測する。この際にルテニウム標識物の量に対応して発光量が得られる。被験生体試料の発光量と標準品の発光量を検量線等を用いて比較することにより精度良く被験生体試料中のエラスチン分解物量を知ることができる。

【 0 0 3 0 】

本発明測定法により、大動脈解離症の患者は、極めて高い陽性率で高い血中エラスチン分解物濃度を示す。健常人ではほとんど高値を示す例はなく、大動脈解離症患者群ではほとんどにおいて血中濃度の上昇を検出し、従って本疾患の診断において本測定方法は有効である。

【 0 0 3 1 】

従って、本発明は、本発明測定法により、循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて大動脈解離症を検出することを含む、大動脈解離症の検出方法も提供する。

10

【 0 0 3 2 】

循環液とは、血清、血漿、髄液、腹水といった生体内を循環する体液又はその画分であり、医療機関等において通常採取されるものであれば特に限定されるものではないが、被験者からの血清などの血液に由来するものが特に好適である。

【 0 0 3 3 】

循環液中のエラスチン分解物の測定値に基づいて大動脈解離症を検出する方法としては、健常人の平均値を有意に超える測定値が得られた場合に、大動脈解離症である（又は大動脈解離症である可能性が高い）と判定する方法が挙げられる。

20

【 0 0 3 4 】

< 2 > 本発明測定キット

本発明測定キットは、第1抗体と第2抗体とを含む、エラスチン分解物の免疫学的測定キットであって、第1抗体及び第2抗体は、それぞれ、ハイブリドーマHASG-30 (FERM BP-08489) により産生されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488)、及び、ハイブリドーマHASG-61-1 (FERM BP-08490)、ならびに、それらのモノクローナル抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体からなる群から選ばれる抗体であることを特徴とする。

【 0 0 3 5 】

第1抗体及び第2抗体は、本発明測定方法に関して記載した通りである。

30

【 0 0 3 6 】

本発明測定キットにおいては、第1抗体及び第2抗体の一方が固相に固定され、及び、もう一方が酵素又は電気化学発光錯体により標識されていることが好ましい。

【 0 0 3 7 】

固相としては、二つの抗体を抗原に免疫学的に結合させる通常のサンドイッチ法に使用されるものが挙げられ、形状や材質は特に限定されない。具体的には、マイクロタイタープレート、ビーズなどが挙げられる。抗体の固相への固定は、通常の方法に従って行うことができる。

【 0 0 3 8 】

標識としては、二つの抗体を抗原に免疫学的に結合させる通常のサンドイッチ法に使用されるものが挙げられ、例えば、放射性物質、ラテックス、蛍光物質、化学発光物質、金属コロイド粒子、酵素などが挙げられる。本発明測定キットにおいては、標識は酵素又は電気化学発光錯体であることが好ましい。標識と抗体との結合は、通常の方法に従って行うことができる。

40

【 0 0 3 9 】

本発明測定キットにおける抗体は溶液とされたものでも、凍結乾燥されたものであってもよい。

【 0 0 4 0 】

本発明測定キットは、第1抗体及び第2抗体の他に、免疫学的測定法で通常に使用される試薬を含んでいてもよい。この様な試薬としては、標準抗原（ヒト大動脈エラスチン分

50

解物)液、基質溶液、検体希釈液、洗浄液などが挙げられる。

【0041】

本発明測定キットは、本発明測定法に従って使用することができる。本発明測定キットは、好ましくは、大動脈解離症の検出用である。

【0042】

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されるものではない。

【実施例1】

【0043】

抗ヒト大動脈エラスチン分解物モノクローナル抗体の作製及び血清中大動脈エラスチン分解物の酵素免疫測定法による測定

1) ヒト大動脈エラスチン分解物に対するモノクローナル抗体の作製

ヒト大動脈エラスチン分解物(エラスチン・プロダクツ社製)を、Balb/C雌マウス(6週齢)の腹腔内へ、一匹当たり0.1 mgの量でコンプリート・フロイント・アジュバント(ディフコ社製)とともに投与した。3週間後に同量のヒト大動脈エラスチン分解物をインコンプリート・フロイント・アジュバント(ディフコ社製)とともに腹腔内へ投与した。さらに3週間後に同マウスへヒト大動脈エラスチン分解物のみを一匹当たり0.1 mg投与した。最終の免疫感作が終了した3日後にマウスから脾臓を摘出した。以降の作業は無菌クリーンベンチ内で実施した。摘出した脾臓をメッシュで分散させ、あらかじめ培養しておいたSp2/0-Ag14マウスミエローマ細胞と混合し、50%ポリエチレングリコール1500(ロシュ・ダイアグノスティック社製)存在下で細胞融合した。融合したハイブリドーマ細胞は、96ウエルマイクロカルチャープレート数枚に分散させ、10%牛胎児血清とHAT試薬(シグマ・アルドリッチ社製)を含むRPMI1640液体培地(シグマ・アルドリッチ社製)中で1~2週間培養した。この間にモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマ細胞のみが生存し、融合しなかったミエローマ細胞やマウス脾臓細胞は死滅した。ヒト大動脈エラスチン分解物に対するモノクローナル抗体を産生する細胞の選択は抗原固相プレートによるELISAにより実施した。すなわち、ハイブリドーマ細胞のコロニーが十分に育った時点でその培養上清を採取し、免疫抗原を固相吸着した96ウエルマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)へ添加して、その上清中のモノクローナル抗体を免疫抗原と反応させた。その後、マウスIgGへ反応する2次抗体のペルオキシダーゼ標識物(ダコ・ジャパン社製)を適当な濃度で添加した。一定時間後にプレートを洗浄し、ABTS基質溶液(ロシュ・ダイアグノスティック社製)を加えた。その発色の有無により目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを複数株選択した。選択された株は、それぞれ数回のクローニングを施した。それぞれのモノクローナル抗体の大量製造は、常法に従いマウス腹水からプロテインA固定化セファロースゲル(ファルマシア社製)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。

【0044】

2) 血清中大動脈エラスチン分解物の酵素免疫測定法による測定

(1)項で作製されたモノクローナル抗体を精製IgGとして用意した。これらの内の2種の種々の組合せ(競合試験によりモノクローナル抗体が互いに競合しないことを確認した組合せ)について以下の測定を行った。第1のモノクローナル抗体を最終濃度0.01mg/mLとしてPBSに溶解して96ウエルマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウエルに0.1mLずつ添加した。含有するモノクローナル抗体を吸着させた後に溶液を捨てて、ブロッキングを目的として1%スキムミルクを含有するPBS溶液を各ウエルに0.2mLずつ添加した。1時間後にスキムミルク溶液を廃棄し、0.05%Tween-20(シグマ・アルドリッチ社製)を含むトリス緩衝生理食塩水(以降、Tween-TBSと略記する)にて洗浄した。洗浄したウエルに、あらかじめ濃度を設定した標準ヒト大動脈エラスチン分解物、または被験血清を添加した。この際に被験血清は1%スキムミルクを含有するPBS溶液にて10倍に希釈したのちに測定に供した。そのプレートをフィルムでカバーして1時間室温にて静置した後、溶液をすべて廃棄して、Tween-TBSにて3回洗浄した。その後、過ヨウ素酸法 [Antib

10

20

30

40

50

odies: a Laboratory Manual, by Ed. Harlow & D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press p.348 (1988)]によりペルオキシダーゼ（ロシュ・ダイアグノスティックス社）にて標識された第2のモノクローナル抗体を含む1%スキムミルク含有PBS溶液を各ウエルに0.1mLずつ添加した。その後、フィルムでカバーして室温にて1時間静置した。反応が終了した後に、プレート中の溶液をすべて廃棄し、Tween-TBSにて3回洗浄した。洗浄が終了した後に、過酸化水素含有TMBZ基質溶液（シグマ社製）を各ウエルに0.1mLずつ添加した。そのままプレートを静置して10分間発色させた。その後にプレートの各ウエルへ2N塩酸水溶液（和光純薬工業社製）を0.1mLずつ添加し、よく混和して反応を停止させた。反応停止後にマイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイス社製）にてプレート各ウエルの450nm波長における吸光度を測定し、発色の強さを数値化した。

10

【0045】

上記の測定系に関する検討により、3種のモノクローナル抗体が測定系の材料として使用しうることが判明した。これらの3種のモノクローナル抗体はHASG-2、HASG-30、HASG-61-1と命名された。HASG-2及びHASG-30は、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に2001年5月18日に寄託され、受託番号FERM P-18335及びFERM P-18336が付与され、2003年9月18日に、ブタベスト条約に基づく国際寄託に移管され、それぞれ、FERM BP-08488及びFERM BP-08489の受託番号が付与されている。HASG-61-1は、同特許生物寄託センターに2002年10月8日に寄託され、受託番号P-19058が付与され、2003年9月18日に、ブタベスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-08490の受託番号が付与されている。

【0046】

20

上記の酵素免疫測定系のうち、第1のモノクローナル抗体としてHASG-30が産生するモノクローナル抗体を使用し、第2のモノクローナル抗体としてHASG-2が産生するモノクローナル抗体を使用した測定系を測定系Aと呼称した。また、第1のモノクローナル抗体としてHASG-61-1が産生するモノクローナル抗体を使用し、第2のモノクローナル抗体としてHASG-2が産生するモノクローナル抗体を使用した測定系を測定系Bと呼称した。また、第1のモノクローナル抗体としてHASG-30が産生するモノクローナル抗体を使用し、第2のモノクローナル抗体としてHASG-61-1が産生するモノクローナル抗体を使用した測定系を測定系Cと呼称した。

【0047】

上記の3通りの測定系によって、同一の17例の大動脈解離症患者群血清及び7例のコントロール群（健常男子成人4例、良性疾患患者3例）血清中の抗原量を測定した。市販解析プログラムソフト（SOFTmax-J Ver.2.1 和光純薬工業社製）を用いて、標準ヒト大動脈エラスチン分解物溶液の抗原濃度と吸光度値から標準曲線を作製し（図1）、被験血清中の抗原濃度を算定した。結果を図2に示す。

30

測定系Aによる17例の大動脈解離症患者群及び7例のコントロール群の血清中の抗原量の平均値と標準偏差はそれぞれ 165.9 ± 96.5 ng/mLと 60.0 ± 10.4 ng/mLとなった。測定系Bによる17例の大動脈解離症患者群及び7例のコントロール群の血清中の抗原量の平均値と標準偏差はそれぞれ 173.4 ± 117.5 ng/mLと 40.0 ± 10.1 ng/mLとなった。測定系Cによる17例の大動脈解離症患者群及び7例のコントロール群の血清中の抗原量の平均値と標準偏差はそれぞれ 128.8 ± 91.5 ng/mLと 35.5 ± 7.6 ng/mLとなった。各測定系における正常値上限（カットオフ値）は、それぞれの測定系でのコントロール群の血清中濃度の平均値+標準偏差の2倍を目安として設定した。正常値上限は測定系Aでは80.8 ng/mL、測定系Bでは60.2 ng/mL、測定系Cでは50.7 ng/mLと設定された。それぞれの正常値上限設定値では、測定系A及び測定系Cでは17例中15例が陽性、測定系Bでは17例中16例が陽性となり、いずれの測定系においても約90%の対象疾患陽性率が得られた。

40

【実施例2】

【0048】

血清中大動脈エラスチン分解物の電気化学免疫発光測定法による測定

実施例1で得られた抗ヒト大動脈エラスチン分解物モノクローナル抗体 HASG-2を精製IgGとして用意し、最終濃度0.2 mg/mLとしてPBSにて希釈した。抗体溶液1 mLに対して、ダ

50

イナビーズM-450エポキシ（ダイナル社製）浮遊液0.25 mLを添加し、ポリプロピレン容器に密封して室温にて4時間静かに撈拌した。その後、4 条件下にて12時間程度静置して結合を安定化させた。その後、ビーズ表面の余分な結合部位をブロッキングすることを目的として、抗体結合ビーズに対して、1 %スキムミルク、0.1%アジ化ナトリウム、0.3mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）及び2 mM EDTAを含有するPBS溶液（以降SM/PBSと略記する）を2 mL添加した。そのまま12時間程度静置してブロッキングを安定化させた。その後、ビーズをPBSにて2回洗浄し、SM/PBS溶液にて20倍希釈して使用時まで4 条件下にて液状保存した。

【0049】

また、別途にHASG-2抗体精製品の最終濃度6 mg/mL溶液を調製した。その抗体溶液1 mLにルテニウム（アイジェン社製）約2 mgを添加し室温にて2時間静置した。その後0.2 M グリシン/PBS（pH 7.8）2 mLを添加して余分な反応部位をブロックした。このルテニウム標識抗体液をウルトロゲルAcA44ゲルクロマトグラフィーにかけて、0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBSにて溶出し、最初に溶出されてくる標識された抗体を分離した。この様に調製されたルテニウム標識HASG-2モノクローナル抗体は使用時までそのまま4 にて保存した。

【0050】

標準品としては、実施例1と同様にヒト大動脈エラスチン分解物（エラスチン・プロダクツ社製）を使用した。また、ルテニウム標識HASG-2抗体をSM/PBSにて100倍希釈した。生体試料の測定は電気化学免疫自動測定装置（ピコルム8220：三光純薬社製）にて専用反応溶液及び専用洗浄溶液等をセットして実施した。被験血清はSM/PBSにて10倍に希釈したのちに測定に供した。標準品及び被験血清希釈物それぞれを0.2 mL採取し専用反応管に添加し、専用反応管ラックにセットした。調製した抗体結合ビーズと標識抗体もそれぞれ専用容器に入れて自動測定装置にセットした。自動測定の工程は以下の通りである。まず、反応管に0.025 mLの抗体結合ビーズを加え、約3分間間欠的に撈拌しながら第1抗体との反応を行う。反応管内の液を吸引除去後、洗浄液で2回洗浄する。洗浄後、0.2 mLのルテニウム標識抗体液を加え、約6分間間欠的に撈拌しながら第2抗体との反応を行う。反応管内の液を吸引除去後、洗浄液で2回洗浄する。洗浄後、0.3 mLの発光電解液を加え発光量を測定する。同時測定した標準抗原より検量線を作製し、抗原濃度を算定した。

【0051】

SM/PBSのみの発光カウント数をブランク値として、標準ヒト大動脈エラスチン分解物溶液の抗原濃度と発光カウント数から標準曲線を作製し（図3）、被験血清中の抗原濃度を算定した。結果を図4に示す。本測定による16例の大動脈解離症患者及び13例の健常高齢男子成人の血清中の抗原量の平均値と標準偏差はそれぞれ 120.1 ± 101.1 ng/mLと 34.5 ± 8.5 ng/mLとなった。実施例1に記載した異なる2種類の抗ヒト大動脈エラスチン分解物モノクローナルを用いる酵素免疫測定系と同様に、電気化学免疫発光測定法による本測定系は高い陽性率で大動脈解離症を検出した。HASG-2抗体1種のみをビーズ固相抗体及び標識抗体として同時に使用する測定系においても、実施例1に記載した測定系と同様な測定性能が得られることが判明し、また、電気化学発光免疫測定法を用いることにより測定時間の大幅な短縮が達成されることも判明した。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】酵素免疫測定による被験検体中の大動脈エラスチン分解物濃度と吸光度との関係を示す標準曲線である。

【図2】酵素免疫測定による大動脈解離症患者群と健常高齢男子群の血清中大動脈エラスチン分解物濃度の分布を示す。モノクローナル抗体の組み合わせを測定系の下に括弧で示す。

【図3】電気化学発光免疫測定による被験検体中の大動脈エラスチン分解物濃度と発光カウント数との関係を示す標準曲線である。

【図4】電気化学発光免疫測定による大動脈解離症患者群と健常高齢男子群の血清中大動

10

20

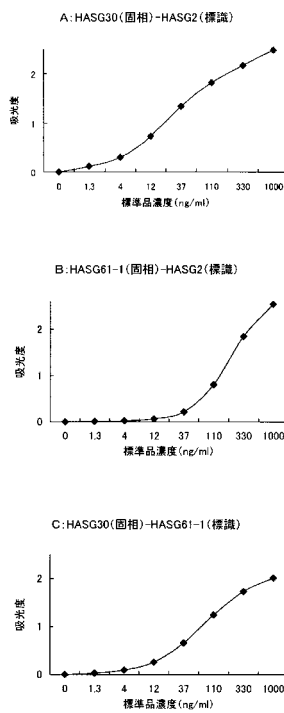
30

40

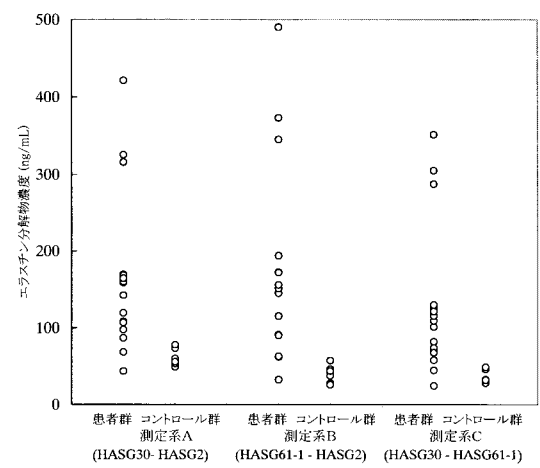
50

脈エラスチン分解物濃度の分布を示す。

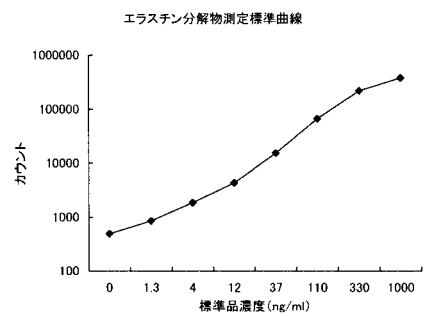
【図 1】



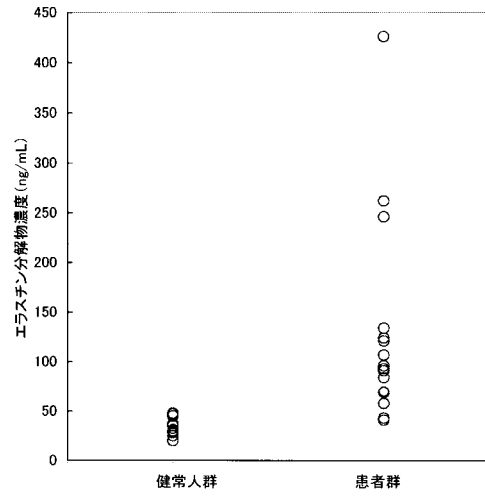
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 3 5 0 4 3 9 (J P , A)
国際公開第 0 1 / 0 0 6 2 6 2 (W O , A 1)
Eur J Vasc Endovasc Surg , 1 9 9 7 年 , Vol.14 , Page.12-16
Biol. Pharm. Bull. , 1 9 9 9 年 , Vol.22, No.8 , Page.854-857

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3
C 0 7 K 1 6 / 1 8
G 0 1 N 3 3 / 5 7 7
C 1 2 P 2 1 / 0 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)

专利名称(译)	用于弹性蛋白水解产物的方法和测定试剂盒以及用于主动脉夹层的方法和检测试剂盒		
公开(公告)号	JP4406555B2	公开(公告)日	2010-01-27
申请号	JP2003398654	申请日	2003-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	片山政彦		
发明人	片山 政彦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/577 C12P21/08		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/18 G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2002347423 2002-11-29 JP		
其他公开文献	JP2004191371A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫学测量方法，用于方便，准确地测量受试者循环液中弹性蛋白降解产物的量，这对于检测主动脉夹层是有用的。
 解决方案：该方法用于免疫测量弹性蛋白降解产物，包括将第一抗体和第二抗体免疫结合至弹性蛋白降解产物，其中第一抗体和第二抗体是杂交瘤HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的杂交瘤HASG-61-1 (FERM BP-08490) 及其单克隆抗体其中抗体选自对人体主动脉弹性蛋白水解产物具有特异性和亲和力的抗体，所述抗体对应于任何一种上述抗体。 .The

【図 3】

