

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5199067号
(P5199067)

(45) 発行日 平成25年5月15日(2013.5.15)

(24) 登録日 平成25年2月15日(2013.2.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 8 1 D

GO 1 N 33/577 (2006.01)

GO 1 N 33/577 B

GO 1 N 33/545 (2006.01)

GO 1 N 33/545 B

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

CO 7 K 16/18 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 8 7

請求項の数 11 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-508654 (P2008-508654)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月30日(2007.3.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/057100
 (87) 国際公開番号 W02007/114337
 (87) 国際公開日 平成19年10月11日(2007.10.11)
 審査請求日 平成22年3月4日(2010.3.4)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-100871 (P2006-100871)
 (32) 優先日 平成18年3月31日(2006.3.31)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-10816

微生物の受託番号 FERM BP-10815

(73) 特許権者 000226862
 日水製薬株式会社
 東京都台東区上野三丁目23番9号
 (74) 代理人 100099139
 弁理士 光来出 良彦
 (72) 発明者 松林 直
 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水
 製薬株式会社 研究所内
 (72) 発明者 照沼 育男
 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水
 製薬株式会社 研究所内
 (72) 発明者 高野 昭紀
 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水
 製薬株式会社 研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫凝集反応試薬キット及び抗原の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

認識するエピトープが異なる二種類の抗CDTモノクローナル抗体が該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を含む免疫凝集反応試薬キットであって、

該二種類の感作された担体粒子は、目的のCDT抗原を含む検体に対して同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の種類の抗CDTモノクローナル抗体が感作された担体粒子の反応順序を特定した場合、凝集反応が増大する性質を有し、

該二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されており、

該二種類の感作された担体粒子の一方は、ハイブリドーマNCDT503 (FERM BP-10816) の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、該二種類の感作された担体粒子の他方は、ハイブリドーマNCDT077 (FERM BP-10815) の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬とし、両試薬は組み合わせられていることを特徴とするCDTを測定するための免疫凝集反応試薬キット。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体が感作された担体粒子がラテックス粒子である請求項1記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項3】

前記担体粒子の粒径が0.05 μm以上1 μm未満である請求項1記載の免疫凝集反応

10

20

試薬キット。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の免疫凝集反応試薬キットに用いられるハイブリドーマ N C D T 0 7 7 (F E R M B P - 1 0 8 1 5) の産生する抗 C D T マウスモノクローナル抗体であって、次の P 1 - P 6 のペプチド領域に対して反応性を有しないか又は実質的に反応性を有しない抗 C D T マウスモノクローナル抗体。

P 1 : V L A E N Y N K S D N C E

P 2 : Q H L F G S N V T D C S G

P 3 : V V A R S M G G K E D L I W E L L

P 4 : I A K I M N G E A D A M S L

P 5 : Y E K Y L G E E Y V K A V

P 6 : S K L S M G S G L N L S E P N

【請求項 5】

請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の免疫凝集反応試薬キットを用意し、C D T を含むと疑われる検体に対して、前記最初に反応させる試薬を反応させた後、その反応液に前記次に反応させる試薬を反応させることにより凝集を生じさせ、反応液中の凝集の変化量を測定することを特徴とする C D T の測定方法。

【請求項 6】

自動分析装置又は用手法により行う請求項 5 記載の C D T の測定方法。

【請求項 7】

前記反応液の担体粒子濃度が 0 . 0 2 質量 % 以上 0 . 2 5 質量 % 以下である請求項 5 記載の C D T の測定方法

【請求項 8】

前記反応液の抗 C D T モノクローナル抗体濃度が 0 . 0 3 m g / m L 以上 0 . 0 9 m g / m L 以下である請求項 5 記載の C D T の測定方法。

【請求項 9】

前記反応液の p H が 6 . 8 以上 8 . 5 以下である請求項 5 記載の C D T の測定方法。

【請求項 10】

前記凝集の変化量は、吸光度の変化量である請求項 5 記載の C D T の測定方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の免疫凝集反応試薬キットに用いられる抗 C D T マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ N C D T 0 7 7 (F E R M B P - 1 0 8 1 5) 。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、認識するエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体を利用し、検体中の目的とする抗原を簡単な操作で、感度よく測定することのできる免疫凝集反応試薬キット、及び抗原の測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗原抗体反応を利用する免疫測定法は、各種内分泌疾患の臨床診断等において極めて重要であり、従来種々の免疫測定法が知られている。

【0003】

その中でも、抗体を感作させた担体からなる免疫凝集反応試薬を用いた検体中の抗原の測定方法として、被検物質中の抗原と該免疫凝集反応試薬を反応させ、この抗原 - 抗体反応により生成した凝集塊について、該試薬添加後の吸光度変化量として測定し、同様に操作した既知濃度の標準血清の吸光度変化量と比較して目的の抗原濃度を求める測定方法が知られている。

【0004】

抗体をラテックス等の担体に感作する場合、それぞれの抗体を別々の担体に感作し、こ

10

20

30

40

50

の感作したそれぞれの担体を適当な割合で混合し一つの免疫凝集反応試薬としていた（特許文献1：特公平3-40341号公報）。

【0005】

しかし、前記の混合した免疫凝集反応試薬では、抗原中においてエピトープの数が少ない場合や、抗原中に異なるエピトープが近接しているため立体障害等で抗体との反応効率が悪い場合は、十分量のラテックス凝集塊を生成せず、そのため目的とする吸光度が得られず再現性が悪く精度よく測定できない場合があった。

【0006】

このような場合、競合法の反応原理を利用し測定試薬を提供する場合があるが、競合法は一般的に測定範囲が狭く、低濃度側及び高濃度側での再現性が悪く精度よく測定する試薬として好ましくはない。

10

【0007】

一方、アルコール中毒患者を同定するための方法として、炭水化物（糖鎖）欠失トランスフェリン（略語：CDT）を測定する方法が注目されている。アジアロ、モノシアロ及びジシアロトランスフェリンは、炭水化物（糖鎖）欠失トランスフェリン（略語：CDT）と呼ばれている。CDTは、アルコール消費、特に慢性アルコール消費を検出およびモニターするための有効なマーカーであることが見出されている。

【0008】

CDTの免疫学的検査法としてWO96/26444（特許文献2）および Heil et al, Anaesthesist, 43, 447-453, (1994)（非特許文献1）等が報告されている。これらの手法では、希釈血清サンプルをアニオン性イオン交換樹脂に通し、正常なトランスフェリンイソ型を樹脂に保持させる一方、CDT分画の通過を可能にしている。この溶出液のCDT含量は、免疫比濁法（immunoturbidimetric assay）等によって測定される。その他、高速液体クロマト法によりCDTを定量する方法もWO95/04932（特許文献3）により知られている。

20

【0009】

前記アルコール中毒患者の従来の検査手法の全ては、イオン交換樹脂或いは高速液体クロマト法を適用する等比較的複雑な手順に基づくものであった。

【0010】

一方、Makhloufらは、CDTのみを直接測定するために、CDTに対するモノクローナル抗体の作製を試みた。彼らは、トランスフェリンの糖鎖が結合している413番目と611番目のアスパラギンを中心として前後6個のアミノ酸の合成ペプチドを免疫原として抗体を作製し、その抗体をCDT測定のための免疫測定法に応用することを考えた（WO93/06133：特許文献4）。

30

【0011】

これに対して、ER.Trimbleらは、Makhloufらの手法による、合成ペプチドを免疫原として作製したモノクローナル抗体はCDTには反応しなかったことからそのエピトープはトランスフェリン分子内に隠匿されており検出に応用できないと述べた（Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998)：非特許文献2）。

【0012】

40

一方、特開2004-051633（特許文献5）には、CDTと水溶液中で選択的に結合し、CDTを固相に結合させる必要がない抗体に関して記載されている。該抗体は、遺伝子組み換え手法により得たりコンビナント非糖化トランスフェリンを免疫原に使用し、或いは、酵素による脱糖化反応して非糖化トランスフェリンとしたものを免疫原として使用して、得た抗体である。即ち、人為的に作製したCDTを免疫原に使用して得られた抗体である。

【0013】

現在市販されているCDT測定試薬には、カラム法ではウサギポリクローナル抗体が使用されているため、CDTの測定には検体への鉄飽和とカラムによるCDTの分離が必要であり、操作が煩雑であった。また、高速液体クロマト法によるCDTの測定は1検体あ

50

たりに要する時間が長く、多検体処理には不向きであった。

【 0 0 1 4 】

近年、C D T（糖鎖欠損トランスフェリン）を測定するために、検体の前処理（検体の鉄飽和及びカラム分離）を必要としない試薬が提供されたが（非特許文献：D.Kraul et al, Clinical Chemistry, vol.51, No.6 96 B-149（2005）（2005 AACC Annual meeting 要旨集））、測定原理が競合法で、測定範囲が狭く、低濃度側及び高濃度側での再現性が悪く精度よく測定する試薬としては好ましくはない。

【 0 0 1 5 】

また、上記のC D T測定試薬は、専用試薬のため適用可能な分析装置が限られており、汎用の自動分析装置に適用し難い。

10

【 0 0 1 6 】

【特許文献1】特公平3 - 4 0 3 4 1号公報

【特許文献2】W O 9 6 / 2 6 4 4 4

【特許文献3】W O 9 5 / 0 4 9 3 2

【特許文献4】W O 9 3 / 0 6 1 3 3

【特許文献5】特開2 0 0 4 - 0 5 1 6 3 3

【非特許文献1】Heil et al, Anaesthesist, 43, 447-453, (1994)

【非特許文献2】Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998)

【非特許文献3】D.Kraul et al, Clinical Chemistry, vol.51, No.6 96 B-149（2005）（2005 AACC Annual meeting 要旨集）

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 7 】

本発明者らは、鋭意研究の結果、未変性で天然のC D Tを調製し、該C D Tの構造を認識するモノクローナル抗C D T抗体を複数種類取得した。しかしながら、前記従来の免疫凝集試薬による測定法を適用した場合には、凝集反応はうまく行われなことを確認した。即ち、それぞれのモノクローナル抗C D T抗体を別々の担体に感作し、この感作したそれぞれの担体を適当な割合で混合し一つの免疫凝集反応試薬として用いて、検体に対して免疫凝集反応を行わせても、凝集反応はうまく行われなかった。

【 0 0 1 8 】

30

そこで、本発明は、検体の前処理を必要とせず、経済的コストの低下につながる汎用の自動分析装置でも測定可能であり、測定精度の向上や測定範囲の拡大を目指した免疫凝集反応による抗原の測定方法と該測定方法に用いた免疫凝集反応試薬キットを提供することを課題とする。さらに本発明は、前記課題に加えて、検体中のC D Tに対して、効率のよい免疫凝集反応によりC D T量の測定を行うことができる免疫凝集反応試薬キット、該免疫凝集反応試薬キットに用いられるモノクローナル抗C D T抗体、該免疫凝集反応試薬キットを用いたC D Tの測定方法を提供することを課題とする。

【 0 0 1 9 】

また、免疫凝集反応試薬キットに用いられる抗体として、体液中のC D Tを前処理することなく測定できることが望ましく、そのためには天然のC D Tの構造を認識する抗体を取得する必要がある。

40

【 0 0 2 0 】

一方、上述したように糖鎖欠失部位の近傍の領域は、ER.Trimbleらの報告（非特許文献2）からも理解されるように、C D T分子内に隠匿されている可能性があり、トランスフェリン分子内のジスルフィド結合数の多さからも強固な立体構造を形成しており、糖鎖欠失部位の近傍のエピトープを認識する抗体の取得は困難であると想定される。

【 0 0 2 1 】

また、免疫抗原として人為的に作製したC D Tは、天然のC D Tとは大きく異なるという問題がある。例えば、前記特許文献4の遺伝子組換え体の場合、ジスルフィド結合を含むためタンパク質の立体構造が不完全になり易く、また、酵素による脱糖化物の場合、調

50

製の際に変性処理が必要である。さらに遺伝子組換え体と脱糖化物はアミノ酸の置換を生じるという問題がある。

【 0 0 2 2 】

また、体液中から天然の C D T を精製するための方法として、一般的には抗トランスフェリン抗体が結合したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーが使用される。この方法はカラム中の抗トランスフェリン抗体にトランスフェリンを結合させた後に、この抗原抗体複合体を酸性条件で変性させることにより C D T を含むトランスフェリンを溶出させて精製する方法である。しかしながら、該方法により得られる C D T は変性している可能性が高いので、免疫原としては好ましくない。

【 0 0 2 3 】

本発明はかかる問題点を鑑みて、体液中の C D T に対して反応しないような抗体を生ずる恐れのある、人為的に作製した C D T を免疫原に使用することなく、天然の C D T と選択的に結合し、しかも免疫凝集反応を利用した測定に適用できる抗 C D T 抗体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 4 】

前記した課題を解決するための本発明の免疫凝集反応試薬キットは、認識するエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体が該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を含む免疫凝集反応試薬であって、該二種類の感作された担体粒子は、目的の抗原を含む検体に対して同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の種類のモノクローナル抗体が感作された担体粒子の反応順序を特定した場合、凝集反応が増大する性質を有し、該二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されていることを特徴とする。

【 0 0 2 5 】

本発明の抗原の測定方法は、前記の免疫凝集反応試薬キットを用意し、抗原を含むと疑われる検体に対して、一方の種類の試薬を反応させた後、その反応液に他方の種類の試薬を反応させることにより、凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することの特徴とする。

【 0 0 2 6 】

本発明の免疫凝集反応試薬キットに使用されるモノクローナル抗体はマウス由来のものをを用いることができる。本発明のキットは動物種に関係なく、認識するエピトープの異なる二種類以上のモノクローナル抗体を用いることができる。

【 0 0 2 7 】

また、認識するエピトープが異なるモノクローナル抗体は、二種類以上でも使用することができ、一方の試薬に、二種類以上のモノクローナル抗体が感作された担体粒子、或いはエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体が、該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を混合されたものを使用し、他方の試薬にさらに別のエピトープのモノクローナル抗体が感作されてなる担体粒子を含むものを使用してもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の抗原の測定方法、特に好適な抗原は C D T である。C D T を測定する方法に用いられる特に好ましい免疫凝集試薬キットは、国際寄託当局である独立行政法人産業技術研究所 特許生物寄託センター（ I P O D 、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 ）に寄託したハイブリドーマ N C D T 5 0 3（受託日：平成 1 8 年 3 月 1 4 日、受託番号：F E R M P - 2 0 8 4 4）の産生する抗 C D T マウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、特許生物寄託センター（ I P O D 、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 ）に寄託したハイブリドーマ N C D T 0 7 7（受託日：平成 1 8 年 3 月 1 4 日、受託番号：F E R M P - 2 0 8 4 3）の産生する抗 C D T マウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬として組み合わせたキットである。

上記ハイブリドーマ N C D T 5 0 3 は、該国際寄託当局に平成 1 8 年 3 月 1 4 日に F E

10

20

30

40

50

RM P - 20844として原寄託され、該原寄託から平成19年4月16日にFERM BP - 10816としてブタペスト条約に基づく寄託へ移管された。

上記ハイブリドーマNCDT077は、該国際寄託当局に平成18年3月14日にFERM P - 20843として原寄託され、該原寄託から平成19年4月16日にFERM BP - 10815としてブタペスト条約に基づく寄託へ移管された。

【0029】

該キットを用いた抗原の測定方法は、CDTを含むと疑われる検体に対して、ハイブリドーマNCDT503（受託番号：FERM BP - 10816）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体1を感作した担体粒子を含む試薬を反応させた後、その反応液にハイブリドーマNCDT077（受託番号：FERM BP - 10815）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を反応させることにより、凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することを特徴とする。前記反応液中のpHが6.8以上8.5以下であることが好ましい。

10

【0030】

本発明の抗原の測定方法は、自動分析装置又は用手法の何れでも行うことができる。汎用の自動分析装置として、三試薬系の分析が可能な分析装置であれば本試薬キットの適用は可能である。例えば、日立製の自動分析装置の7070形や7170形等は三試薬系の分析が可能である。

【0031】

本発明の免疫凝集反応試薬キットを構成する試薬に好適に使用できる担体は、通常の免疫凝集反応試薬に用いられる不溶性担体微粒子であればいずれも使用可能であるが、例示すれば、ポリスチレン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル（メタ）アクリレート共重合体、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどのラテックス等の有機高分子物質の微粒子、物理吸着用やカルボキシル基を介した化学結合用といった処理加工を施したラテックス、あるいはシリカ、シリカ-アルミナ、アルミナの様な無機酸化物又は該無機酸化物等にシランカップリング処理等を施し、官能基を導入した無機粒子、金属コロイド粒子、ヒトO型血球、ヒツジ赤血球等の生物由来の粒子、リボソーム等が挙げられるが、これらに限定するものではない。なかでもラテックス粒子は人工担体であり、目的に応じて担体表面を化学的処理しやすいこと、また非特異反応が起こりにくいことなどの点から特に好ましく用いられる。そのなかで、種々の変性ラテックスや磁性ラテックス等も必要に応じて使用できる。

20

30

【0032】

上記担体の粒径も特に限定されるものではないが、抗原抗体反応後の凝集の起こり易さや凝集の判別のし易さ等の観点から平均粒径が0.05μm以上1μm未満、好ましくは、0.1μm以上0.5μm未満、最も好ましくは、0.1μm以上0.2μm未満である担体粒子を用いることが好適である。

【0033】

また担体の使用量は、抗体や抗原の種類によって適宜決定すればよいが、担持効率や操作性の観点から、測定時の溶液中の担体粒子濃度が0.02質量%以上0.25質量%以下、好ましくは0.02質量%以上0.17質量%以下、最も好ましくは0.04質量%以上0.13質量%以下であることが好適である。本発明で使用するモノクローナル抗体の濃度は0.03mg/mL以上0.09mg/mL以下、好ましくは0.03mg/mL以上0.07mg/mL以下、最も好ましくは0.05mg/mL以上0.07mg/mL以下とする。

40

【0034】

測定に用いる緩衝液は、Trisの他pH範囲が6.8から8.5である緩衝剤であれば用いることができ、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS等も

50

使用することができる。

【発明の効果】

【0035】

従来法である、認識するエピトープの種類異なる抗体を種類毎に別々の担体に感作し、この感作したそれぞれの担体を適当な割合で混合した免疫凝集反応試薬を用いて免疫凝集反応を行わせても、抗原中においてエピトープの数が少ない場合や、異なるエピトープが近接しているため立体障害等の原因で、十分量のラテックス凝集塊を生成せず、そのため目的とする吸光度が得られないような場合でも、本発明の二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されているキットを用い、抗原を含むと疑われる検体に対して、一方の種類の試薬を反応させた後、その反応液に他方の種類の試薬を反応させることにより凝集を生じることができ、大きな吸光度変化を得ることができるので検体中の抗原の測定が可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】陰イオン交換クロマトグラフィーによるC D T分画溶出プロファイルを示すグラフである。

【図2】図1の溶出プロファイルに示した各分画のSDS-PAGE及び等電点電気泳動の写真である。

【図3】抗トランスフェリンポリクローナル抗体と組み合わせたサンドイッチELISAによる相関性試験を示すグラフである。

20

【図4】イ) 2種のラテックス試薬を混合して用いた場合、ロ) 先にラテックス試薬1を反応させ、次いでラテックス試薬2を反応させた場合、ハ) 先にラテックス試薬2を反応させ、次いでラテックス試薬1を反応させた場合のC D T濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図5】ラテックスの粒径を変えた場合のC D T濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図6】反応液中のラテックス濃度を変えた場合のC D T濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図7】反応液中のモノクローナル抗体濃度を変えた場合のC D T濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

30

【図8】使用可能なpHの範囲についてC D T濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図9】精製C D T分画による120mg/dLまでの抗原過剰の測定結果についてC D T濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【実施例】

【0037】

次の実施例により本発明を更に詳細且つ具体的に説明する。但し、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

以下の実施例は、認識するエピトープが異なる二種類の抗C D Tマウスモノクローナル抗体を別々のラテックスにそれぞれ感作し、カラム等の検体の前処理が不要な汎用自動分析装置に適用可能な三試薬系のC D T測定試薬を構築して免疫測定を実施したものである。

40

【0038】

[実施例1]：未変性で天然のC D T分画の調製

C D T高値ヒト血清10mLに鉄飽和溶液(0.5M NaHCO₃ 250μLと10mM FeCl₃ 180μL)を加え、4で一時間インキュベート後、脱脂溶液(100g/L デキストラン硫酸 100μLと1M CaCl₂ 500μL)を加えた溶液の上清を回収した。さらにブルーセファロースカラム(Blue Sepharose 6 Fast Flow：商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いてアルブミンを除去し、次いで、Protein Gカラム(Hi Trap Protein G HP：商品名：GEヘルスケア

50

バイオサイエンス株式会社製)を用いてグロブリンを除去することにより、トランスフェリン以外のタンパク質を除去した後、陰イオン交換カラム(Mono Q HR 5/5:商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いて未変性のジシアロトランスフェリンとアシアロトランスフェリンを含むCDT分画を調製した。

【0039】

図1は陰イオン交換クロマトグラフィーによるCDT分画溶出プロファイルを示すグラフである。図1における矢印Aは波長280nmの吸光度曲線を示す。矢印Bは波長460nmの吸光度曲線を示す。図1の溶出プロファイルに示した各分画のSDS-PAGE(NuPAGE gel:商品名、インビトロジェン株式会社製)及び等電点電気泳動についての銀染色とウエスタンブロットの写真を図2に示す。図2に示すようにトランスフェリンの糖鎖の量に応じた5種のアイソフォームとしてテトラシアロ、トリシアロ、ジシアロ、モノシアロおよびアシアロトランスフェリンを未変性で高純度に調製することができたことがわかる。

10

【0040】

[実施例2]:ハイブリドーマの調製

前記実施例1で得られたジシアロトランスフェリンとアシアロトランスフェリンを含む分画をCDT抗原として用いた。該抗原を濃度0.5mg/mLの抗原溶液に調製した。該抗原溶液500μLにアジュバンド500μL(Titer Max Gold:商品名、Titer Max Co.製)を混和して乳化させ、5週齢のBALB/cマウスの皮下に免疫した。追加免疫として同様に調製したものを2週おきに3回繰り返した。その間免疫時に採血をして抗原に対する血中の抗体活性を測定した。最終免疫から14日後に100μLの抗原溶液を腹腔内に投与し、3日後、脾臓を摘出した。脾細胞はマウスミエローマ細胞(P3x63Ag8.653)とポリエチレングリコール4000(商品名、メルク社製)の存在下で2分間反応させることにより融合させた。融合後、HAT選択培地に懸濁して96ウェルの培養プレートに分注し、37のCO₂インキュベーターで培養し、ハイブリドーマを調製した。

20

【0041】

[実施例3]:CDT分画に対する抗体産生ハイブリドーマの選抜

前記実施例2で得られたハイブリドーマについて、本発明の抗体産生ハイブリドーマの選抜はサンドイッチELISAにより行った。96ウェルのマイクロプレートにPBSで10μg/mLに調製した抗マウス抗体を1ウェル当たりそれぞれ50μL加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%BSA-PBSでブロッキングを行いスクリーニング用のプレートとした。ハイブリドーマの増殖の認められたウェルの培養上清50μLをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05%Tween-PBS)で洗浄後、前記実施例1に記載したCDT分画を室温で1時間反応させ、同様に洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体50μLを加え、室温で1時間反応させた。なお、該アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体は、抗トランスフェリンポリクローナル抗体(株式会社シバヤギ製)にアルカリフォスファターゼ(ロシュ社製)を過ヨウ素酸法で結合させることにより調製したものを使用した。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、該CDT分画に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマNCDT077及びNCDT503を選抜した。

30

40

【0042】

[実施例4]:CDT分画に対する抗体産生ハイブリドーマのクローニング

前記実施例3で選抜した各ハイブリドーマを限界希釈法により、クローニングを二回実施し、樹立株を得た。得られたハイブリドーマNCDT077は特許生物寄託センター(IPOD)に寄託し(受託日:平成18年3月14日、受託番号:FERM P-20843(FERM BP-10815))、ハイブリドーマNCDT503は特許生物寄託センター(IPOD)に寄託した(受託日:平成18年3月14日、受託番号:FERM

50

P - 2 0 8 4 4 (F E R M B P - 1 0 8 1 6)) 。

【 0 0 4 3 】

〔 実施例 5 〕：抗体の調製

前記実施例 4 で得られた各樹立株について、C D T 分画に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、モノクローナル抗体の大量産生のためマウス腹腔内にて増殖させた。こうして得られたマウス腹水中のモノクローナル抗体は、プロテイン G カラム (G E 社製) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

【 0 0 4 4 】

〔 実施例 6 〕：抗体のサブクラスの決定

前記実施例 3 で得られたハイブリドーマ N C D T 0 7 7 の産生するモノクローナル抗 C D T 抗体のサブクラスは I s o s t r i p (登録商標、ロシュ社製) を使用して、I g G 2 a (κ) と決定した。同様にしてハイブリドーマ N C D T 5 0 3 の産生するモノクローナル抗 C D T 抗体のサブクラスは、I g G 1 (κ) と決定した。

【 0 0 4 5 】

〔 実施例 7 〕：サンドイッチ E L I S A を用いた抗体の特異性の確認

前記実施例 5 で調製したモノクローナル抗体 (ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体) についてサンドイッチ E L I S A を用いて、前記実施例 1 で調製したトランスフェリンアイソフォームに対する特異性の確認を行った。96 ウェルのマイクロプレートに P B S で 1 0 μ g / m L に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 5 0 μ L 加え、4 で一昼夜反応させた。その後 P B S で 1 回洗浄し、0 . 5 % B S A - P B S でブロッキングを行った。その後、前記実施例 1 で調製したトランスフェリンアイソフォーム 5 0 μ L をウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液 (0 . 0 5 % T w e e n - P B S) で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体 (前記実施例 3 で調製したものと同一) 5 0 μ L を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性を K i n d - K i n g 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 4 9 0 n m の吸光度を測定し、トランスフェリンアイソフォームに対する反応の強さを比較することで抗体の特異性を確認した。その結果を下記の表 1 に示す。

【 0 0 4 6 】

【 表 1 】

ハイブリドーマ (抗体) 番号	490nmのOD (吸光度)		
	アシアロ トランスフェリン (200ng/ml)	ジシアロ トランスフェリン (200ng/ml)	テトラシアロ トランスフェリン (200ng/ml)
NCDT077	2. 902	2. 889	0. 421
NCDT503	2. 124	1. 946	0. 034

【 0 0 4 7 】

表 1 に示すようにハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体は溶液中の天然の C D T 分画 (アシアロトランスフェリンとジシアロトランスフェリン) に特異的に反応したが、C D T 以外のトランスフェリンであるテトラシアロトランスフェリンに対して反応しなかった。

【 0 0 4 8 】

〔 実施例 8 〕：抗トランスフェリンポリクローナル抗体と組み合わせたサンドイッチ E L I S A を用いた相関性試験

前記実施例 5 で調製したモノクローナル抗体（ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体）を用い、サンドイッチ E L I S A 法で、健常者とアルコール中毒患者の血清合計 3 2 検体を測定した。対照試験としてバイオラッド社製の試薬を用いて測定した。該対照試験は、カラムを用いたトランスフェリン中の % C D T を測定する方法であり、カラムでの分離前の総トランスフェリンの量と、分離後の C D T の量を測定し、検体中の C D T 濃度と % C D T（総トランスフェリンに対する C D T の割合）を算出した。

【 0 0 4 9 】

前記サンドイッチ E L I S A による測定は 9 6 ウェルのマイクロプレートに P B S で 1 0 μ g / m L に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 5 0 μ L 加え、4 で一昼夜反応させた。その後 P B S で 1 回洗浄し、0 . 5 % B S A - P B S でブロッキングを行った。その後、健常者とアルコール中毒患者の各血清 5 0 μ L をウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液（0 . 0 5 % T w e e n - P B S）で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体（前記実施例 3 で調製したものと同じ）5 0 μ L を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性を K i n d - K i n g 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 4 9 0 n m の吸光度を測定し、対照試験測定値との相関性を確認した。その結果を図 3 に示す。

【 0 0 5 0 】

図 3 に示したように未変性で天然の C D T 分画を免疫原にして得られた、ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体は対照試験 C D T 濃度と良好な相関を示した。したがって、ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体は、検体中の C D T 濃度に応じて吸光度が相関しているため、吸光度の値を測定することにより、検体中の C D T 濃度を定量することができる。

【 0 0 5 1 】

[実施例 9] : 抗体の抗原認識部位の確認

前記実施例 5 で調製した各モノクローナル抗体（ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体）の反応性を次のようにして調べた。下記の P 1 - P 6 に示す 6 種類のアミノ酸配列のペプチドを E L I S A プレートに結合させた後、1 0 μ g / m L に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 5 0 μ L 加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液（0 . 0 5 % T w e e n - P B S）で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス I g G 抗体（Goat F(ab') Anti-Mouse Ig' s, Alkaline Phosphatase Conjugate AMI4405: 商品名、BIOSOURCE 社製）5 0 μ L を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性を K i n d - K i n g 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 4 9 0 n m の吸光度を測定した。

【 0 0 5 2 】

P 1 - P 6 のペプチド配列において下線部は、特許文献 3 又は特許文献 4 の抗体認識部位を示す。その結果を下記の表 2 に示す。

P 1	V L A E N Y N K S D N C E	（配列番号 1）
P 2	Q H L F G S N V T D C S G	（配列番号 2）
P 3	V V A R S M G G K E D L I W E L L	（配列番号 3）
P 4	I A K I M <u>N G E</u> A D A M S L	（配列番号 4）
P 5	Y E K Y L G E E Y V K A V	（配列番号 5）
P 6	S K <u>L S M G S G L N L S E</u> P N	（配列番号 6）

【 0 0 5 3 】

【表 2】

ハイブリドーマ (抗体) 番号	490nmのOD (吸光度)					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
NCDT077	0.026	0.024	0.023	0.013	0.018	0.015
NCDT503	0.024	0.027	0.027	0.017	0.020	0.019

10

【0054】

表 2 によれば、各モノクローナル抗体（ハイブリドーマ NCDT077 産生抗体及びハイブリドーマ NCDT503 産生抗体）は、P1 - P6（特許文献 3 又は特許文献 4 の抗体の認識部位を含むペプチド）に対して認識しないことがわかる。

【0055】

次に前記実施例 5 で調製した抗体の抗原認識部位を調べるために、最初に抗原タンパク質の一次構造への反応性について次のようにして確認した。即ち、CDT 抗原を ELISA プレート（イモビライザーアミノ：商品名、ヌンク社製）に共有結合させた後、4 M 尿素による変性、0.1 M DTT で還元処理を行ったウェルに 10 µg/mL に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 50 µL 加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液（0.05 % Tween - PBS）で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体（前記実施例 3 で調製したものと同一）50 µL を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性を Kind - King 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定し、タンパク質の一次構造を認識するかを確認した。その結果を下記の表 3 に示す。

20

【0056】

【表 3】

ハイブリドーマ (抗体) 番号	490nmのOD (吸光度)	
	未処理 CDT 抗原	尿素・還元処理 CDT 抗原
NCDT077	3.693	0.132
NCDT503	3.484	0.038

30

【0057】

表 3 に示すようにハイブリドーマ NCDT077 産生抗体及びハイブリドーマ NCDT503 産生抗体は、CDT 抗原を変性・還元処理した一次構造に対して反応しないことがわかる。また、これらの抗体は CDT 抗原の一次構造を認識しておらず、立体構造を認識していることがわかる。

40

【0058】

[実施例 10] 各モノクローナル抗体が認識するエピトープ相違の確認

前記実施例 5 で調製したモノクローナル抗体（ハイブリドーマ NCDT077 産生抗体及びハイブリドーマ NCDT503 産生抗体）の抗原認識部位の違いを調べるために、各抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA により確認した。最初に 96 ウェルのマイクロプレートに PBS で 10 µg/mL に調製した一方の抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 50 µL 加え、4 で一昼夜反応させた。その後 PBS で 1 回洗浄し、0.5 % BSA - PBS でブロッキングを行った。その後、50 倍に希釈したアルコール中毒者の血清 50 µ

50

Lをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05% Tween-PBS)で洗浄後、他方の抗体をビオチン標識したものを50 μ Lに加え、室温で1時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン50 μ Lを加え、室温で30分反応させ、洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmのODを測定した。その結果を表4に示す。

【0059】

【表4】

		固相化側抗体	
		NCDT 077	NCDT 503
検出側抗体	NCDT 077	0.069	1.504
	NCDT 503	1.882	0.152

10

20

【0060】

表4に示したモノクローナル抗体の組合せパターンによる反応結果によれば、同じモノクローナル抗体の組み合わせでは反応せず、異なるモノクローナル抗体の組み合わせでは反応がみられることが判る。

【0061】

[実施例11]:ラテックス試薬1、2の調製

粒径が0.13 μ mの10%ラテックス溶液100 μ Lを1.5mL遠心チューブに分注し、感作緩衝液825 μ Lを加えて希釈した後、10mg/mLに調整した抗CDTマウスモノクローナル抗体1(ハイブリドーマNCDT503産生抗体)を75 μ L添加して直ちに攪拌混合し、冷所で2時間転倒混和して感作を行った。感作の後ブロッキング緩衝液を100 μ L添加して2分間のソニケーションを行ってラテックスを分散させ、37で1時間反応させてブロッキングを行った。ブロッキング終了後、遠心して上清の未反応成分を除去し、沈渣に保存緩衝液1mLを加えてソニケーションを行ってラテックスを分散させ、700nmの吸光度が0.8Absとなるように希釈してラテックス試薬1を調製した。同様の操作で抗CDTマウスモノクローナル抗体2(ハイブリドーマNCDT077産生抗体)を感作させたラテックス試薬2を調製した。

30

【0062】

<感作緩衝液組成>

10mM TES pH7.5
150mM 塩化ナトリウム
0.095質量% アジ化ナトリウム

40

【0063】

<ブロッキング緩衝液組成>

10mM TES pH7.5
10% ウシ血清アルブミン
0.095質量% アジ化ナトリウム

【0064】

<保存緩衝液組成>

10mM Tris pH8.0

50

20 質量% グリセロール
 0.1 質量% ウシ血清アルブミン
 0.095 質量% アジ化ナトリウム

【実施例 12】：ラテックス試薬の反応性

測定には、第 1 試薬、第 2 試薬、第 3 試薬からなる試薬系による測定が可能な日立 7170 型自動分析装置を使用し、第 1 試薬として下記組成の緩衝液を用い、第 2 試薬、第 3 試薬として前記実施例 11 で調製したラテックス試薬 1、2 を下記のイ)ロ)ハ)の 3 種類の条件で使用して測定を行った。

【0065】

具体的な操作方法としては、自動分析装置の反応セルに検体 5 μ L が分注され、その後下記組成の第 1 試薬 100 μ L が分注され、さらに第 2 試薬 50 μ L が分注されて検体中の CDT と第 2 試薬のラテックス試薬が反応した。その後、下記組成の第 3 試薬 50 μ L が分注されると、CDT とラテックス試薬の凝集塊が成長するため吸光度が増加するので、第 3 試薬添加直後からの吸光度の変化量を測定した。

【0066】

下記のイ)の条件では第 2 試薬を用いずにラテックス試薬 1 および 2 を等量混合したものを第 3 試薬として 100 μ L 添加した。第 1 試薬および測定試料は共に共通で、出力は K-factor 法による吸光度で行った。測定結果を CDT 濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図 4 に示す。図 4 によれば、今回使用した抗体の組み合わせでは、下記のロ)の条件が最も感度良く測定できることが判る。

【0067】

<第 1 試薬組成>

10 mM TES pH 7.5
 150 mM 塩化ナトリウム
 0.095 % アジ化ナトリウム

【0068】

<測定試料>

ヒト血清からイオン交換カラムにより精製した CDT 分画を生理食塩水で希釈した 0、3、6、12 および 18 mg/dL の溶液。

<測定条件>

イ) 2 種のラテックス試薬を混合して用いた場合

検体量 5 μ L
 第 1 試薬 100 μ L
 第 2 試薬 0 μ L
 第 3 試薬 100 μ L ラテックス試薬 1 および 2 を等量混合したもの
 測定波長 主波長 570 nm、副波長 800 nm
 測光ポイント 19 - 34

【0069】

ロ) 先にラテックス試薬 1 を反応させ、次いでラテックス試薬 2 を反応させた場合

検体量 5 μ L
 第 1 試薬 100 μ L
 第 2 試薬 50 μ L ラテックス試薬 1
 第 3 試薬 50 μ L ラテックス試薬 2
 測定波長 主波長 570 nm、副波長 800 nm
 測光ポイント 19 - 34

【0070】

ハ) 先にラテックス試薬 2 を反応させ、次いでラテックス試薬 1 を反応させた場合

検体量 5 μ L
 第 1 試薬 100 μ L
 第 2 試薬 50 μ L ラテックス試薬 2

第3試薬 50 μ L ラテックス試薬1
測定波長 主波長570nm、副波長800nm
測光ポイント 19 - 34

【0071】

〔実施例13〕：使用可能なラテックスの粒径の範囲

前記実施例11と同様の感作方法で抗CDTマウスモノクローナル抗体2（ハイブリドーマNCDT077産生抗体）を粒径0.09 μ m、0.13 μ m、0.15 μ m、0.20 μ m、0.34 μ m、0.46 μ mのラテックスに感作することにより粒径の異なるラテックス試薬を調製した。試薬の希釈倍率は前記実施例11における粒径0.13 μ mの場合と同じ希釈倍率を他の粒径にも適用した。測定試料は生理食塩水で希釈した0、5、10、15、20、25、30、35、40mg/dLのCDT溶液とし、調製した粒径の異なるラテックス試薬を前記実施例12の口）の条件で測定した。測定結果をCDT濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図5に示す。図5によれば0.09 μ mから0.46 μ mの間の粒径はCDT濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、該粒径範囲で使用可能であることが判る。

10

【0072】

〔実施例14〕：使用可能なラテックス濃度の範囲

前記実施例11で調製したラテックス試薬2の濃度を变化させ、反応液中のラテックス濃度を0.01%、0.02%、0.04%、0.07%、0.13%、0.17%、0.25%、0.5%とした場合の吸光度を前記実施例12の口）の条件および前記実施例13の評価試料で測定した。測定結果をCDT濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図6に示す。図6は反応液中のラテックス濃度を変えた場合の感度を示すグラフである。図6によれば、吸反応液中のラテックス濃度が0.01%では測定に十分な感度が得られず、0.5%では吸光度が減少したが、0.02%から0.25%の間ではCDT濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、使用可能であることが判る。0.5%の吸光度の低下の理由は強い凝集のため主波長は0濃度で頭打ちし、副波長が濃度に応じて上昇するためと考えられる。

20

【0073】

〔実施例15〕：使用可能なモノクローナル抗体濃度の範囲

前記実施例11と同様の感作方法で抗CDTマウスモノクローナル抗体2（ハイブリドーマNCDT077産生抗体）の感作時濃度を变化させ、溶液中の抗体濃度として0.02mg/mL、0.03mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL、0.07mg/mL、0.08mg/mL、0.09mg/mLとした場合の吸光度を前記実施例12の口）の条件および前記実施例13の評価試料で測定した。測定結果をCDT濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図7に示す。図7によれば、反応液中の抗体濃度が0.02mg/mLでは測定に十分な感度が得られなかったが、0.03mg/mLから0.09mg/mLの間ではCDT濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、使用可能であることが判る。

30

【0074】

〔実施例16〕：使用可能なpHの範囲

前記実施例12で調製した第1試薬のほかにpHの異なる緩衝液を調製し、前記実施例12の口）の条件および前記実施例13の評価試料で反応液中のpHと吸光度を測定した。測定結果をCDT濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図8に示す。図8によれば、pH6.5以下ではブランク反応の異常が見られ、pH9.6では測定に十分な感度が得られなかったが、pH6.8からpH8.5の範囲ではCDT濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、該pH範囲で使用可能であることが判る。

40

【0075】

〔実施例17〕：測定試薬性能

前記実施例12の口）の条件で、20回連続測定した生理食塩水の吸光度を、5mg/dLのCDT溶液からCDT濃度に換算し、0濃度の平均値+3SDにより最小検出限界

50

を算出した結果を表 5 に、4 濃度の試料を 10 回測定した場合の同時再現性を表 6 に、精製 C D T 分画による 120 mg / d L までの抗原過剰の測定結果を C D T 濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図 9 にそれぞれ示す。この方法により算出された最小検出限界は、想定される健常人検体に含まれる C D T 濃度よりも十分に小さい数値であり、同時再現性、測定範囲等も測定試薬として十分な性能を有しているといえる。

【 0 0 7 6 】

【表 5】

No.	生 理 食 塩 水 測 定 値
1	0.0
2	-0.1
3	-0.4
4	0.0
5	0.4
6	0.2
7	-0.1
8	0.1
9	-0.2
10	-0.1
11	0.4
12	0.2
13	-0.2
14	-0.4
15	0.1
16	-0.5
17	-0.1
18	-0.1
19	0.2
20	-0.4
平均 値	-0.05
S D	0.25
平均 値 + 3 S D	0.715

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

【表 6】

No.	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
1	1.6	6.3	15.6	27.6
2	1.5	6.5	15.8	27.9
3	1.9	6.1	15.6	27.9
4	1.6	6.2	15.6	27.6
5	1.6	6.2	15.8	27.8
6	1.7	6.1	15.3	27.8
7	1.6	6.2	15.4	27.6
8	1.5	6.3	15.0	27.8
10	1.5	6.1	15.1	27.9
平均値	1.6	6.22	15.48	27.75
S D	0.125	0.123	0.274	0.135
C V	7.8%	2.0%	1.8%	0.5%

10

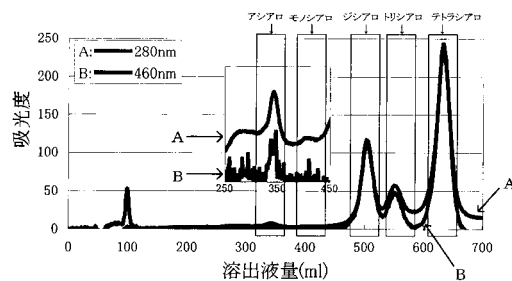
【産業上の利用可能性】

【0078】

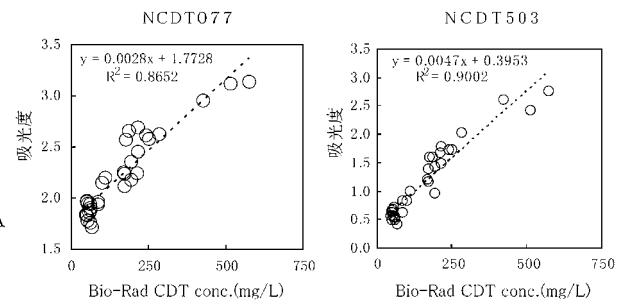
20

本発明によりエピトープが近接し立体障害等で抗体との反応効率が悪い場合でも、目的物を効率的に測定することができる。同時に特異的な反応が行われるため、検体の前処理を必要としない簡便で高感度な免疫測定法に利用できる。本発明の測定方法は、CDTの測定に特に適している。

【図 1】

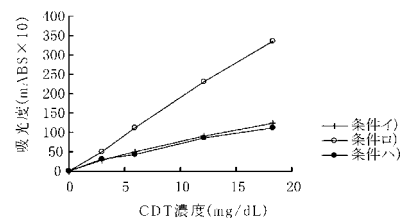
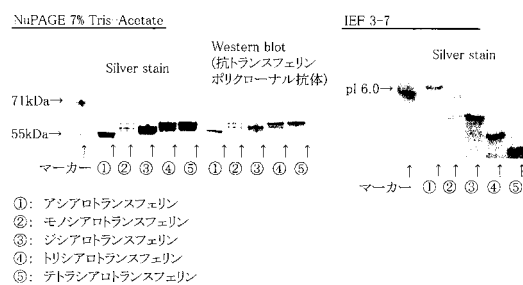


【図 3】

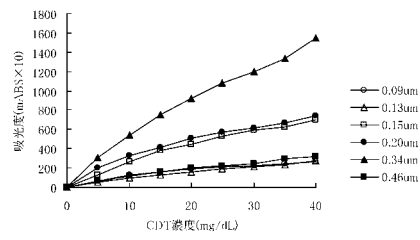


【図 4】

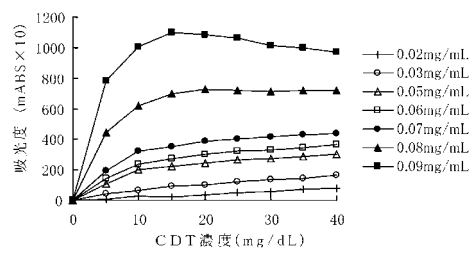
【図 2】



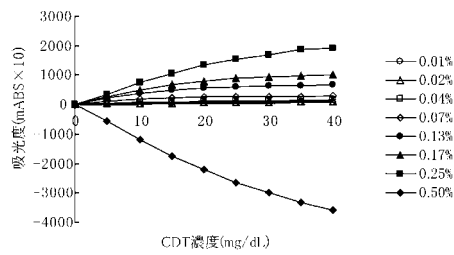
【図 5】



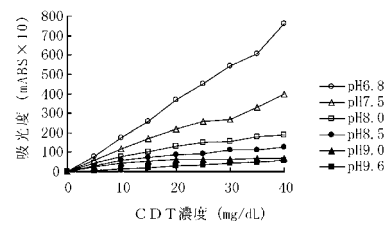
【図 7】



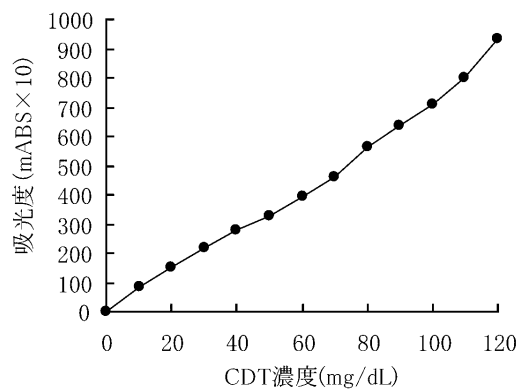
【図 6】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

0005199067000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 0 7 K 16/18
C 1 2 P 21/08

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平 1 0 - 0 2 6 6 2 1 (J P , A)
特開 2 0 0 5 - 3 2 6 1 5 0 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 2 / 0 7 9 7 8 2 (W O , A 1)
金沢医科大学雑誌 , 2 0 0 4 年 , VOL.29 , NO.3 , , P.139-146

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-33/98
C07K 16/18
C12N 5/00
C12P 21/08

专利名称(译)	免疫凝集试剂盒和抗原测定方法		
公开(公告)号	JP5199067B2	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	JP2008508654	申请日	2007-03-30
申请(专利权)人(译)	日水制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	日水制药有限公司		
[标]发明人	松林直 照沼育男 高野昭紀		
发明人	松林 直 照沼 育男 高野 昭紀		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/545 G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/577.B G01N33/545.B G01N33/53.D G01N33/543.587 C07K16/18 C12P21/08		
优先权	2006100871 2006-03-31 JP		
其他公开文献	JPWO2007114337A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种方法，当表位数量少或不同表位接近且由于空间位阻等导致抗体反应效率差时，不需要对样品进行预处理即可直接有效地测量样品中的抗原。将具有不同待识别表位的两种单克隆抗体致敏以逐一分离乳胶，并且在样品和一种单克隆抗体致敏乳胶试剂反应后，在反应溶液中检测到另一种单克隆抗体通过使生产胶乳试剂反应，可以在没有样品预处理的情况下直接且有效且灵敏地测量抗原。

ハイブリドーマ (抗体)番号	490nmのOD (吸光度)		
	アシアロ トランスフェリン (200ng/ml)	ジシアロ トランスフェリン (200ng/ml)	テトラシアロ トランスフェリン (200ng/ml)
NCDT077	2.902	2.889	0.421
NCDT503	2.124	1.946	0.034