

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265257号  
(P5265257)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>C 0 7 K</b>	<b>16/18</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	16/18	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00	1 0 2
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	C
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/53	X
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	21/08	

請求項の数 9 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2008-170284 (P2008-170284)  
 (22) 出願日 平成20年6月30日(2008.6.30)  
 (65) 公開番号 特開2010-6774 (P2010-6774A)  
 (43) 公開日 平成22年1月14日(2010.1.14)  
 審査請求日 平成23年6月20日(2011.6.20)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11132

(73) 特許権者 306037311  
 富士フイルム株式会社  
 東京都港区西麻布2丁目26番30号  
 (74) 代理人 110000109  
 特許業務法人特許事務所サイクス  
 (72) 発明者 升田 喜士  
 宮城県黒川郡大和町松坂平1-6 富士フ  
 イルム株式会社内  
 (72) 発明者 池田 森人  
 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地  
 富士フイルム株式会社内  
 (72) 発明者 川崎 和也  
 宮城県黒川郡大和町松坂平1-6 富士フ  
 イルム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 犬CRP及び人CRPを認識する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

受託番号 F E R M B P - 1 1 1 3 2 を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体、又は F a b ' フラグメント、F ( a b ' ) , フラグメント若しくは F a b フラグメントから選択されるその断片。

【請求項2】

受託番号 F E R M B P - 1 1 1 3 2 を有するハイブリドーマ。

【請求項3】

請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片を含む、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬。

【請求項4】

請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片で標識したラテックス試薬を含む、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬。

【請求項5】

酵素で標識した請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片を含む、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬。

【請求項6】

酵素が枯草菌 アミラーゼである、請求項5に記載の犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬。

【請求項7】

酵素で標識した請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその断片を含む、犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素。

【請求項 8】

酵素が枯草菌 アミラーゼである、請求項 7 に記載の犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素。

【請求項 9】

請求項 3 から 6 の何れかに記載の犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬、あるいは請求項 7 又は 8 に記載の犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素に、試料を接触させることを含む、試料中のCRPの測定方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、犬CRP及び人CRPを共通に認識するモノクローナル抗体、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、並びに上記モノクローナル抗体を用いた犬CRP及び人CRP測定用試薬および測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

C反応性蛋白(CRP)は、その産生量が炎症反応の強さに相関することが知られている蛋白質である。そのため、血清中のCRPの量を測定することによって、炎症反応の指標とすることができる。即ち、血清CRP値が高ければ、炎症が強いことが示される。

20

【0003】

特許文献 1 には、従来から公知のモノクローナル抗体産生技術を抗犬CRPモノクローナル抗体の作成に適用し、それにより得られた抗体を用いて公知のアフィニティークロマトグラフィー技術による抗原(犬CRP)の精製に適用したものであり、得られた抗体の特性は、犬CRPを捕捉できることで、犬CRPを定量する観点を持たない。また、この抗体は、人CRPを認識できるとの記述はない。

【0004】

非特許文献 1 には、人CRP測定用の免疫比濁法の検査キットに用いられている抗体がたまたま、犬CRPに対する反応性を有していることが記載されている。ここに使用されている抗体が、意図的に犬CRPとの反応性を考慮して調製されたものであることを示唆する記載や、この抗体がモノクローナル抗体であるとの記載はなく、安定的にこの抗体を作る方法も記載されていない。

30

【0005】

特許文献 2 には、人CRP測定用の乾式免疫分析要素が記載されているが、犬CRPとの反応の記載なく、実際に、犬の血清を測定しても定量性を示す結果は得られず、犬CRPの定量には使用できない。これは、特許文献 2 で使用されている抗体の特異性が人CRPに限定的で、犬CRPを実質的に認識しないためである。

【0006】

【非特許文献 1】Vet.clin.Pathol.2003,32:81-87

【特許文献 1】特開昭 62 - 210984 号公報

40

【特許文献 2】特許第 3151080 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従来公知の方法では、新規なモノクローナル抗体の作成において、免疫後に免疫動物から得た抗体産生細胞と無限増殖能を持つ細胞(ミエローマ細胞)との融合細胞(抗体産生ハイブリドーマ)の選別作業(スクリーニング)に最も多大な労力を必要とする。このようなスクリーニングの定法であるマイクロプレートを用いたELISA法では、抗体の特性の限られた情報、例えば、「スクリーニングに用いる抗原に反応するかしないか」しか反映していないし、「反応する」とされたものの相互の優劣はつけられない。特に重要な抗体

50

の特性である結合定数は、通常には、選別したハイブリドーマを更に培養・順化してクローンを樹立して、培養や動物への感作により精製した抗体を取得した後に始めて測定されることが多く、ハイブリドーマの選別時に高い結合性が保証されてはいない。

#### 【0008】

本発明においては、ハイブリドーマの選別時にハイブリドーマが産生する抗体のサブクラスや抗原特異性、結合定数に着目し選別することにより、犬CRPおよび人CRPを共通に認識する高アフィニティーの抗体を産生するハイブリドーマを的確に選別・取得することを試みた。そして、この方法で得られたハイブリドーマ由来の抗体を、種々の免疫分析原理に適用すれば、一つの分析用試薬で犬CRP/人CRPの両方を測定できる測定用試薬および測定方法を提供することができる。例えば、ラテックスにこの抗体を感作した試薬を作成すれば、犬CRPや人CRPを含む血清等と接触後に、ラテックスの凝集状態を濁度測定等の光学的方法で、それらに含まれる犬CRPや人CRPの濃度を定量することができる。

10

#### 【0009】

また、本発明に記載のハイブリドーマ由来の抗体を用いて、特許第3151080に記載の抗体フラグメントと枯草菌由来のアミラーゼとの複合体を作成し、同様の乾式分析要素(試薬)を作成すると、一つの試薬で犬のCRPと人のCRPの両方を定量出来る乾式免疫分析用試薬を作成することができる。又、この試薬を用いることで、上記のラテックス試薬と同様に、人の血清中の人CRP濃度と犬の血清中の犬CRP濃度の両方を測定することができ、2種類の試薬を別々に作成しなくてもよい。

#### 【0010】

即ち、本発明が解決しようとする課題は、犬CRPと人CRPの両方を認識するモノクローナル抗体、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、上記モノクローナル抗体を用いた犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬、上記モノクローナル抗体を用いた犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素、並びに上記モノクローナル抗体を用いたCRPの測定方法を提供することである。

20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、先ず、マウスやラット等の動物に免疫し、血清の免疫源に対する抗体価の上昇を確認した後、リンパ細胞や脾臓細胞を採取して、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作成した。そして、融合細胞を選択培地で培養し、増殖したハイブリドーマの培養上澄を用いてスクリーニングする際に、従来の定性的なスクリーニングに加えて、抗体の結合定数を敏感に反映する方法を用いてスクリーニングすることにより、有用な抗体を産生するハイブリドーマを確実に選別することに成功した。抗体の結合定数を反映する測定方法は、反応時の抗体及び抗原の濃度を目標とする結合定数の逆数と同程度が1~2桁程度上下の濃度、例えば、目標の結合定数が $10^9 M^{-1}$ の場合、各抗原を $10^{-10} M \sim 10^{-6} M$ 程度の、より好ましくは、 $10^{-9} M \sim 10^{-7} M$ 程度の各抗原蛋白質もしくは抗原誘導体を接触させることと、それに対して十分な感度を有する測定方法を組み合わせることにより達成される。また、選別されるハイブリドーマの産生する抗体の結合定数は、結合定数が既知の抗体の同条件でのシグナル強度との比較により推定することができる。このようにして得られた犬CRP/人CRP抗体産生ハイブリドーマ由来の抗体は、予測どおり両抗原に対して高いアフィニティーを有し、それを用いて、犬CRP/人CRP測定用の乾式分析要素を調製することができた。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

30

40

#### 【0012】

即ち、本発明によれば、犬CRPと人CRPを認識するモノクローナル抗体であって、犬CRPと人CRPに対する結合定数 $10^7 M^{-1} \sim 10^9 M^{-1}$ を有し、サブクラスがIgG1であるモノクローナル抗体又はその断片が提供される。

本発明によればさらに、受託番号FERM P-21571を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体又はその断片が提供される。

本発明によればさらに、受託番号FERM P-21571を有するハイブリドーマが

50

提供される。

【0013】

本発明によればさらに、上記した本発明のモノクローナル抗体又はその断片を含む、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬が提供される。

本発明によればさらに、上記した本発明のモノクローナル抗体又はその断片で標識したラテックス試薬を含む、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬が提供される。

本発明によればさらに、酵素で標識した上記した本発明のモノクローナル抗体又はその断片を含む、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬が提供される。

好ましくは、酵素は枯草菌 アミラーゼである。

【0014】

本発明によればさらに、酵素で標識した上記した本発明のモノクローナル抗体又はその断片を含む、犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素が提供される。

好ましくは、酵素は枯草菌 アミラーゼである。

【0015】

本発明によればさらに、上記した本発明の犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬、あるいは犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素に、試料を接触させることを含む、試料中のCRPの測定方法が提供される。

【発明の効果】

【0016】

これまで抗体産生ハイブリドーマの選別方法として広く用いられているマイクロプレート法では、微量に存在する培養上澄中の抗体を高効率に補足するためにマイクロプレートに固定される抗原量 (= 実質の抗原濃度) が大過剰に設計されており、結合定数が比較的小さい抗体をも捕捉してしまうために、抗体の結合定数の大小との関連が少なく、得られたハイブリドーマの産生する抗体が必ずしも目的に合ったものとは限らない。また、通常、クローニング後に取得したハイブリドーマを用いて、培養法やマウス腹水法で、ハイブリドーマの産生する抗体を作成して、精製後に始めて結合定数を測定するが、目的の結合定数に見合わなかった場合は、また最初からやり直す必要があった。

【0017】

これに対して、本発明では、ハイブリドーマの培養上澄中の抗体が多少低濃度でも目的とする抗原と反応することを確認できるスクリーニング方法を用いることにより、目的に見合った高い結合定数を持つ抗体を産生するハイブリドーマを的確に選別することに成功した。即ち、本発明のハイブリドーマは、犬CRP及び人CRPを定量する目的に有効で且つ必要な抗体の特性、例えば、抗体の種類 (アイソタイプ/サブクラス)、抗原特異性、結合定数の目標値等を設定して選別された抗体であって、犬CRP及び人CRPを共通に認識し、且つ、高アフィニティーの抗体を産生することができるハイブリドーマである。このハイブリドーマ由来の抗体を用いることにより、犬CRP及び人CRPを一つの試薬で測定できる免疫測定用試薬を作成することができる。上記の通り、必要な抗体の特性の評価と組み合わせることにより、的確に、実用性の高い抗体産生用ハイブリドーマを選別でき、工数の掛かるクローニングの数を少なくできる。また、この結果、有用な抗体を安く入手できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明についてさらに具体的に説明する。

本発明のモノクローナル抗体は、犬CRPと人CRPを認識するモノクローナル抗体であって、犬CRPと人CRPに対する結合定数  $10^7 M^{-1} \sim 10^9 M^{-1}$  を有し、サブクラスがIgG1であるモノクローナル抗体であり、好ましくは受託番号FERM P - 21571を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である。なお、本発明で言う抗体とは、抗体分子全体を意味するのみならず、その断片 (例えば、Fab、 $F(ab')_2$  又はFab'断片) をも意味する。

【0019】

モノクローナル抗体の取得は通常の方法で行うことができる。すなわち、抗原をアジュ

10

20

30

40

50

バンドとともに数回腹腔等に注射して、脾臓細胞を取り出しポリエチレングリコール等を用いてマウスミエローマ細胞と融合させる。そして、この融合細胞の中から抗体産生細胞をクローニングし、モノクローン細胞として増殖させる。増殖細胞をさらにマウス腹腔内注射することにより、モノクロナール抗体を含む腹水及び血清を得ることができる。より具体的には以下の通り行うことができる。

#### 【0020】

先ず、CRP（犬CRPなど）を抗原として、哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1~100 mgであり、アジュバントを用いるときは1~2000 µgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1~60日後、好ましくは1~14日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

10

#### 【0021】

細胞融合ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば P3X63-Ag.8.U1(P3U1)、NS-1などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

20

#### 【0022】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し(抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比5:1が好ましい)、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1000~6000ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

30

#### 【0023】

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に $3 \times 10^5$ 個/well程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

#### 【0024】

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法(ELISAなど)、放射性免疫測定法等によってスクリーニングすることができる。ここで、本発明においては、抗体の結合定数を敏感に反映する方法を用いてスクリーニングすることにより、有用な抗体を産生するハイブリドーマを確実に選別することができる。抗体の結合定数を反映する測定方法は、反応時の抗体及び抗原の濃度を目標とする結合定数の逆数と同程度か1~2桁程度上下の濃度、例えば、目標の結合定数が $10^9 M^{-1}$ の場合、各抗原を $10^{-10} M \sim 10^{-6} M$ 程度の、より好ましくは、 $10^{-9} M \sim 10^{-7} M$ 程度の各抗原蛋白質もしくは抗原誘導体を接触させることと、それに対して十分な感度を有する測定方法を組み合わせることにより行うことができる。

40

50

## 【 0 0 2 5 】

融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立することができる。

## 【 0 0 2 6 】

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度)で7~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

## 【 0 0 2 7 】

腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 $1 \times 10^7$ 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2週間後に腹水を採集する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー(プロテインA-アガロース等)などの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

## 【 0 0 2 8 】

抗体のサブクラスはIgG 1、IgG 2 a、IgG 2 b等が挙げられるが、本発明では、酵素-抗体複合体を調製する際に抗体の断片化効率の良いIgG 1である。得られたIgG 1は、活性化パインやペプシン等のプロテアーゼでFc部位を除去したF(ab')<sub>2</sub>として、さらにこれを還元してFab'フラグメントに誘導することができる。

## 【 0 0 2 9 】

好ましい態様では、モノクローナル抗体としてFab'フラグメントを使用する。インタクトな抗体(IgG)にはFab(抗原結合部位)とFc(補体結合部位)が存在する。インタクトな抗体を酵素と結合して酵素標識抗体を使用する場合、試料が血液試料であると、血液中の補体成分がFc部分に結合して立体障害の原因となり酵素活性を阻害することになる。また血液試料でない場合でも、Fc部分は反応容器の器壁や免疫反応層などを構成する多孔性部材の孔(ポア)や内部空隙の表面等に非特異的吸着をするため、酵素標識抗体の活性が見かけ上低くなり測定時のノイズの原因となる。これらのノイズを除去するためには、Fc部位を含まないFab'、F(ab')<sub>2</sub>或いはFabフラグメントを抗体として使用するの望ましい。この中では、酵素との結合の便宜から遊離SH基を有するFab'フラグメントを抗体と使用するの望ましい。

## 【 0 0 3 0 】

上記した本発明のモノクローナル抗体、上記モノクローナル抗体又はその断片で標識したラテックス試薬、並びに酵素(例えば、枯草菌アミラーゼなど)で標識した上記モノクローナル抗体又はその断片は、犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬として用いることができる。

## 【 0 0 3 1 】

標識として用いる酵素は、その後の酵素反応に使用する酵素基質との組合せを考慮して選ぶことができる。本発明では、酵素基質と反応する酵素に対する反応性を、酵素・抗体・抗原のマトリックス様構造形成による立体障害により抑制するものであるから、酵素と基質との組合せはこのような立体障害による影響が検出し易い系を選ぶ方が好ましい。すなわち、酵素基質としては比較的高分子量のものが感度の点で好ましい。例えば分子量約2万以上であり、好ましくは分子量約10万以上の基質を使用する。このような基質としては、酵素アミラーゼに対する基質として澱粉；酵素セルラーゼに対する基質セルロース；プロテアーゼに対するゼラチン、ヘモシアニン等の蛋白質；リパーゼに対する各種油脂類を挙げることができる。上記の酵素と基質の選択に関する報告は、特開昭60-108756、60-171461、60-171460に詳しく開示されている。この中では、澱粉を基質とするアミラーゼが好ましい。またこれらの基質は水不溶性の基質である方が、酵素・抗体・抗原のマトリックス様構造による立体障害が顕著に現れることになり、これらを使用することが特

10

20

30

40

50

に好ましい。

【0032】

アミラーゼとしては、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ等があり、検体中に実質的に含まれていないものがノイズ防止の観点から好ましい。アミラーゼの起源は動物（唾液、涙液等）、植物及び微生物と広範囲にわたる。従って、ヒトや動物などの体液、血液などを分析する場合には、これら高等動物由来のアミラーゼは使用しない方が好ましい。

【0033】

微生物や植物由来のアミラーゼには、コウジカビ(*Aspergillus*)、クモノスカビ(*Rhizopus*)、サッカロミセス酵母(*Saccharomyces*) 属等由来のグルコアミラーゼ；オオムギ麦芽、コムギ、ダイズ等由来の $\alpha$ -アミラーゼ；枯草菌(*Bacillus Subtilis*)、ストレプトミセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*)、シュードモナス・シュトゥツェリ(*Pseudomonas stutzeri*)、テルモアクチオミセス・ブルガリス(*Thermoactinomyces vulgaris*) 等由来の $\alpha$ -アミラーゼ等が挙げられる。この中では液化力が強くまた熱安定性に優れている枯草菌(*Bacillus Subtilis*) 由来の $\alpha$ -アミラーゼが最も好ましい。

10

【0034】

これらの酵素はいずれの検体中に存在する妨害因子で影響されないものが好ましく、また検体中には競合する同種の酵素がないことが好ましい。ただし、標識酵素と同種の酵素が検体中に含まれている場合には、この酵素阻害剤を用いてもよい。この酵素阻害剤は、検体中の酵素を阻害する程度が標識酵素の活性を阻害する程度より大きいものであればよい。酵素阻害剤は検体中の酵素を完全に失活させるが、標識酵素を全く阻害しないものが最も好ましい。しかし実用上は単に測定時においてブランク値を上昇させなければよく、測定後には酵素阻害剤が失活するなどして検体中の酵素活性が回復しても構わない。なお酵素阻害剤は、酵素標識抗体の酵素を阻害しないものであればよく、遊離状態の酵素を阻害することは構わない。この酵素阻害剤は、公知の酵素阻害剤から上記のような特異性を持つものを選んで用いればよい。或いは検体中の問題となる酵素に対する抗体を作って、これを酵素阻害剤として用いてもよい。

20

【0035】

酵素として $\alpha$ -アミラーゼを使用するときには、カルボキシメチル化澱粉、澱粉、アミロース、アミロペクチン等を基質として使用できる。特に水不溶性の澱粉等を使用すれば、酵素反応は基質粒子表面、すなわち固-液界面での反応となるため、抗体・抗原結合による立体障害の酵素活性に対する影響が大きく現れることになり、感度の面で好ましい。また水不溶性ダイ・スターチを使用して、酵素分解産物である可溶性アミロースについているダイ（色素）を検出するようにしてもよい。このような水不溶性青色澱粉ポリマーにはネオアミラーゼ（第一化学薬品製）等の市販のものを使用することができる。

30

【0036】

酵素と抗体との結合方法は、2つの物質の官能基（アミノ基、カルボキシル基、チオール基等）を利用して行うことができる。代表的な結合法としては、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、ピリジル・ジスルフィド法、マレイイミド-サクシイミド法等が挙げられる。結合方法はこれらの例に限られるものではなく、この他例えば「Method in Immunology and Immunochemistry」 Vol.1, (C.A.Williams, M.W.Chase, Academic Press, 1967年) あるいは石川、河井、宮井 編「酵素免疫測定法」（医学書院、1978年発行）等の成書に記載されている方法の中から適宜選択して利用することができる。これらの結合方法の中では、抗体ヒンジ部のチオール基と酵素のアミノ基を架橋させるマレイイミド-サクシイミド法が反応効率が良く、又抗体活性を保持できる点で優れている。

40

【0037】

マレイイミド-サクシイミド法では、例えば以下のようにして酵素とFab' とを結合させる。まずマレイイミド-サクシイミド試薬で酵素のアミノ基をマレイイミド化する。これをゲル濾過で精製した後、チオール基を有する抗体（Fab' ）との複合化に付する。この時、エピトープの異なる2種類以上の抗体（Fab' ）を併用しても良く、その場合にそれらの

50

抗体フラグメントは、一緒に結合反応に供される。この複合化反応は酵素 1 モルの対し、抗体 3 ~ 7 モルの範囲で行なうのが好ましい。抗体として Fab' (分子量約 5 万) を、酵素として  $\alpha$ -アミラーゼ (分子量約 5 万) を使用する場合には、全 Fab' 量に対して  $\alpha$ -アミラーゼ重量を 1/3 ~ 1/7 の範囲で結合反応を行うのが好ましい。この結合反応は通常 4 ~ 室温で進行する。

#### 【0038】

生成した酵素 - 抗体複合体 (酵素標識抗体) はゲル濾過で精製し、必要により凍結乾燥法等により乾燥する。酵素と各抗体との結合比は 1 : 1 に限らず、目的に応じて任意の比率とすることができる。通常酵素は多数のアミノ基を持っているので、導入されるマレイミド基も複数となり、酵素 1 分子に導入される抗体分子は複数となる。酵素 1 分子に抗体が少なくとも 1 分子結合している必要があるから、複合体中の酵素に対する抗体のモル比は 1 以上であることが必要であり、検出感度を確実に高めるためには、モル比 2 ~ 5 の範囲とすることが好ましい。抗体として Fab' (分子量約 5 万) を、酵素として  $\alpha$ -アミラーゼ (分子量約 5 万) を使用する場合には、複合体の分子量は 15 万ダルトン以上で、好ましくは 25 ~ 30 万ダルトンの物質が検出感度が高い点で好ましい。

#### 【0039】

次に、犬 CRP 及び人 CRP 測定方法 (湿式法) を説明する。まず、検体に含まれる抗原と酵素 - 抗体複合体との結合物を溶液中で接触させる。その際、溶液の温度は 20 ~ 45 程度、pH は通常約 4.0 ~ 約 8.5 の範囲内が適当である。pH を一定に保つために必要により、磷酸緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液を用いてもよい。抗原と酵素 - 抗体複合体との接触時間は十分に反応しう程度であればよく、例えば溶液の温度が 37 の場合には 20 ~ 30 分が適当である。その後、酵素基質を加え、酵素 - 抗体複合体の酵素活性を測定する。検体中に被検抗原が存在すれば酵素活性の抑制として検出することができる。予め既知量の被検抗原を含む溶液で検量線を描いておけば、検体中の被検抗原量を定量することができる。

#### 【0040】

なお、抗原と酵素 - 抗体複合体との反応のみを溶液系で行い、反応後の反応液を乾式分析するようにしてもよい。すなわち、標識酵素の酵素基質を含有する基質層を備える乾式分析要素を用意し、これに免疫反応後の反応液を点着することにより酵素活性を測定するようにしてもよい。その層構成は、次に説明する乾式分析要素の免疫反応層を除いたものを用いることができる。

#### 【0041】

次に、本発明のモノクローナル抗体を含む乾式分析要素を説明する。乾式分析要素の構成の具体例としては、特許第 3151080 号の図 1 及び図 2 と同様の構成を挙げることができる。

#### 【0042】

即ち、一例としては、光透過性支持体の上に検出層 (又は試薬層)、免疫反応層が積層されている。免疫反応層は、水浸透性層で構成され、本発明の酵素標識抗体と標識酵素の基質である非拡散性基質とを含有する。試薬層は、水浸透性層で構成され、免疫反応層から拡散・移行してきた酵素反応生成物 (拡散性物質) を検出する試薬組成物を含有する。酵素反応生成物が着色物質等のような直接検出できるものである場合には、検出層 (又は試薬層) には検出用試薬組成物を含有させる必要がなく、この場合には検出層 (又は試薬層) は検出層として機能する。

#### 【0043】

要素の点着供給された液体試料中の検体 (抗原) は、免疫反応層において酵素標識抗体と抗原抗体結合反応しマトリックス構造を作る。このため同じ反応免疫層に含有されている基質に対する酵素活性は抑制される。この結果試薬層 (又は検出層) で検出される酵素反応生成物の量から、検体中の抗原量を知ることができる。

#### 【0044】

また、別の例では、酵素標識抗体と酵素基質とは別の層に含有させてもよい。この場合には、試薬層 (又は検出層) の上に酵素基質を含有する水浸透性の基質層を配し、さらに

10

20

30

40

50

その上に酵素標識抗体を含有する免疫反応層を配する。この場合には、要素に点着供給された液体試料中の検体（抗原）は、免疫反応層において酵素標識抗体と抗原抗体結合反応しマトリックス構造を作り、実質的に不動になる。抗原と結合しなかった酵素標識抗体（或るいは層構造に捕捉されない程度に小さい構造のマトリックス構造のもの）は、次の基質層に移行する。

【 0 0 4 5 】

上記の何れの態様でも、要素に液体試料を点着するだけで、要素内で酵素免疫反応を進行させることができる。

【 0 0 4 6 】

また、本発明の乾式分析要素は、免疫反応層（または免疫反応層と基質層）、試薬層（又は検出層）の他、支持体、展開層、検出層、光遮蔽層、接着層、吸水層、下塗り層その他の層を含む多重層としてもよい。このような分析要素として、例えば特開昭49-53888号（対応米国特許 3,992,158）、特開昭51-40191号（対応米国特許 4,042,335）、及び特開昭55-164356号（対応米国特許 4,292,272）、特開昭61-4959（対応 E P C 公開特許016 6365A）の各明細書に開示されたものがある。

【 0 0 4 7 】

光透過性水不透過性支持体を用いる場合には、本発明の乾式免疫分析要素は、実用的に次のような構成を取り得る。ただし本発明の内容はこれに限定はされない。

- (1) 支持体上に試薬層、その上に免疫反応層を有するもの。
- (2) 支持体上に試薬層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (3) 支持体上に試薬層、接着層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (4) 支持体上に試薬層、接着層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (5) 支持体上に検出層、試薬層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (6) 支持体上に検出層、試薬層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (7) 支持体上に試薬層、光反射層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (8) 支持体上に試薬層、光反射層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (9) 支持体上に検出層、試薬層、光反射層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (10) 支持体上に検出層、試薬層、光反射層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (11) 支持体上に検出層、光反射層、試薬層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (12) 支持体上に検出層、光反射層、試薬層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (13) 支持体上に第2試薬層、光反射層、第1試薬層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (14) 支持体上に第2試薬層、光反射層、第1試薬層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (15) 支持体上に検出層、第2試薬層、光反射層、第1試薬層、免疫反応層をこの順に有するもの。
- (16) 支持体上に検出層、第2試薬層、光反射層、第1試薬層、基質層、免疫反応層をこの順に有するもの。

【 0 0 4 8 】

上記(1)ないし(12)において試薬層は異なる複数の層から成ってもよい。支持体と試薬層又は検出層との間には吸水層を設けてもよい。また各層の間には濾過層を設けてもよい。また基質層の上には展開層を設けてもよく、又は基質層に展開作用を持たせ展開層として機能させてもよい。なお、検体中に血球などの固形成分がある場合には、適当な濾過層を分析要素の最上層に設けてもよい。

【 0 0 4 9 】

免疫反応層、基質層は、水浸透性層で構成される。これらの層の水浸透性を確保するためには、多孔性媒体からなる多孔性層とするか、親水性ポリマーバインダーからなる層とするのが好ましい。

【 0 0 5 0 】

多孔性層は繊維質であってもよいし、非繊維質であってもよい。繊維質材料としては、例えば濾紙、不織布、織物布地（例えば平織布地）、編物布地、（例えばトリコット編物

10

20

30

40

50

布地)、ガラス繊維濾紙等を用いることができる。非繊維質材料としては、特開昭49-53888等に記載の酢酸セルロース等からなるメンブランフィルター、特開昭49-53888、特開昭55-90859(対応米国特許 4,258,001)、特開昭58-70163(対応米国特許 4,486,537)等に記載の無機物又は有機物微粒子からなる連続空隙含有粒状構造物層等のいずれでもよい。特開昭61-4959(対応欧州公開 EP 0166365A)、特開昭62-116258、特開昭62-138756(対応欧州公開 EP 0226465A)、特開昭62-138757(対応欧州公開 EP 0226465A)、特開昭62-138758(対応欧州公開 EP 0226465A)等に記載の部分接着された複数の多孔性層の積層物も好適である。

#### 【0051】

多孔性層は供給される液体の量にほぼ比例した面積に液体を展開する、いわゆる計量作用を有する展開層であってもよい。展開層としては、これらのうち織物布地、編物布地などが好ましい。織物布地などは特開昭57-66359号に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため、特開昭60-222770(対応: EP 0162301A)、特開昭63-219397(対応西独特許公開 DE 37 17 913A)、特開昭63-112999(対応: DE 37 17 913A)、特開昭62-182652(対応: DE 37 17 913A)に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有させてもよい。

10

#### 【0052】

基質を多孔性層に含有させる有用な方法として、例えば紙、布、高分子からなる多孔質膜等に基質を予め含浸又は塗布した後、支持体上に設けた他の水浸透性層、例えば試薬層の上に、特開昭55-164356号のような方法で接着させるのも有用な方法である。また別の方法として多孔質層を他の水浸透性層(例えば試薬層)に前記のような方法で接着させた後、基質を含む組成物を多孔質層に塗布してもよい。多孔質層への含浸又は塗布には公知の方法を利用できる。塗布には例えばディップ塗布、ドクター塗布、ホッパー塗布、カーテン塗布等を適宜選択して用いる。こうして作られる基質層の厚さは特に制限されないが、塗布層として設ける場合には、 $1\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ 程度、好ましくは $2\mu\text{m}\sim 30\mu\text{m}$ の範囲が適当である。ラミネートによる積層など、塗布以外の方法による場合、厚さは数十 $\mu\text{m}$ から数百 $\mu\text{m}$ の範囲で大きく変化し得る。

20

#### 【0053】

親水性ポリマーバインダーからなる水浸透性層で免疫反応層、基質層を構成する場合、使用できる親水性ポリマーとしては、例えば、以下のものがある。ゼラチン及びこれらの誘導体(例えばフタル化ゼラチン)、セルロース誘導体(例えばヒドロキシエチルセルロース)、アガロース、アルギン酸ナトリウム、アクリルアミド共重合体、メタアクリルアミド共重合体、アクリルアミド又はメタアクリルアミドと各種ビニル性モノマーとの共重合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリル酸と各種ビニル性モノマーとの共重合体などである。

30

#### 【0054】

親水性ポリマーバインダーで構成される基質層は、特公昭53-21677号(対応米国特許 3,992,158)、特開昭55-164356号(対応米国特許 4,292,272)、特開昭54-101398号(対応米国特許 4,132,528)、特開昭61-292063号(Chemical Abstracts, 106, 210567y)等の明細書に記載の方法に従って、基質その他の試薬組成物と親水性ポリマーを含む水溶液又は水分散液を支持体又は検出層等の他の層の上に塗布し乾燥することにより設けることができる。親水性ポリマーをバインダーとする基質層の乾燥時厚さは約 $2\mu\text{m}\sim 約50\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $4\mu\text{m}\sim 約30\mu\text{m}$ の範囲、被覆量では約 $2\text{g}/\text{m}^2\sim 約50\text{g}/\text{m}^2$ 、好ましくは約 $4\text{g}/\text{m}^2\sim 約30\text{g}/\text{m}^2$ の範囲である。

40

#### 【0055】

基質層には非拡散性基質の他に、塗布特性、拡散性化合物の拡散性、反応性、保存性等の諸性能の向上を目的として、酵素の活性化剤、補酵素、界面活性剤、pH緩衝剤組成物、微粉末、酸化防止剤、その他、有機物あるいは無機物からなる各種添加剤を加えることができる。基質層に含有させることができる緩衝剤の例としては、日本化学会編「化学便

50

覧 基礎編」(東京、丸善(株)、1966年発行)1312-1320 頁、R.M.C.Dawson et al編、「Data for Biochemical Research」第2版(Oxford at the Clarendon Press,1969 年発行)476-508 頁、「Biochemistry」5,467-477頁(1966年)、「Analytical Biochemistry」104,300-310 頁(1980年)に記載のpH緩衝剤系がある。pH緩衝剤の具体例としてトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)を含む緩衝剤；リン酸塩を含む緩衝剤；硼酸塩を含む緩衝剤；クエン酸又はクエン酸塩を含む緩衝剤；グリシンを含む緩衝剤；ピシン(Bicine)を含む緩衝剤；HEPES を含む緩衝剤；MES を含む緩衝剤などのグッド緩衝剤等がある。

【0056】

免疫反応層も上記基質層と同様に構成することができる。なお、1つの層又は隣接する2層に基質と酵素標識抗体とを実質的な乾燥状態又は実質的に水の非存在状態で含有させるには、酵素標識抗体をアルコール(例、エタノール)等の非水溶媒に溶解又は分散させて水浸透性層に含浸させればよい。

10

【0057】

試薬層は、免疫反応層(又は基質層)から拡散・移行してきた拡散性物質を検出する試薬組成物を含有する。必要に応じて試薬組成物の中には低分子化酵素が含有され、拡散性物質を低分子化して生じた低分子生成物を検出するための検出試薬組成物を含有する。試薬層は、水浸透性層で構成され、前記基質層の説明で述べた水浸透性層のうち、親水性ポリマーバインダーからなる連続層とするのが好ましい。用いる親水性ポリマーバインダーは基質層で生成される拡散性生成物や、試薬層内に含有する発色試薬などを考慮して決められる。

20

【0058】

免疫反応層(又は基質層)から拡散・移行してきた拡散性物質が直接検出可能なものである場合には試薬層には検出試薬組成物を含有させる必要はなく、試薬層は検出層として機能する。検出層とした場合も、前記基質層の説明で述べた水浸透性層のうち、親水性ポリマーバインダーからなる連続層とするのが好ましい。

【0059】

支持体としては光不透過性(不透明)、光半透過性(半透明)、光透過性(透明)のいずれのものも用いることができるが、一般的には光透過性で水不透過性の支持体が好ましい。光透過性水不透過性支持体の材料として好ましいものはポリエチレンテレフタレート、ポリスチレンである。親水性層を強固に接着させるため通常、下塗り層を設けるか、親水化処理を施す。

30

【0060】

本発明の乾式免疫分析要素は、特開平3-295466(対応EP0451848A)、同4-128655、同4-2765551と同様に、非拡散性基質から標識酵素によって分解された拡散性物質をさらに低分子化する低分子化酵素を試薬層に含有させることにより、感度の上昇を図ることができる。これらの組み合わせは、酵素が非拡散性基質に作用して拡散性物質を生成し、さらにこの拡散性生成物が、後記低分子化酵素によりさらに低分子の生成物を生じて容易に検出できるような組み合わせから選ぶことができる。

【0061】

40

すなわち抗体の標識酵素は、高分子からなる非拡散性基質を分解して、低分子化酵素によりさらに低分子の生成物を生じるような拡散性生成物を生成するものを選ぶ。非拡散性基質は、水性検体液に対して非拡散性(不溶性)でそれ自体は免疫反応層(又は基質層)から試薬層に拡散・移行しないものを選ぶ。さらに、低分子化酵素は、抗体の標識酵素により、非拡散性基質より生成した拡散性生成物を、さらに検出可能な低分子生成物にするものから選ぶ。以下具体的にこれらの例を説明する。

【0062】

このような酵素としては重合体からなる非拡散性基質から拡散性オリゴマーを生成するような分解酵素が好ましく、先に挙げた標識酵素のうち、例えば、糖質加水分解酵素が好ましい。このような糖質加水分解酵素として、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコ

50

アミラーゼ、リゾチーム等がある。

【0063】

前述の - アミラーゼ、 - アミラーゼ、グルコアミラーゼに対する基質の例として、カルボキシメチル化澱粉、澱粉がある。カルボキシメチル化澱粉、澱粉を非拡散性基質とする場合には、標識酵素として - アミラーゼ、低分子化酵素として後述するグルコアミラーゼ又は - グルコシダーゼを用いた組み合わせが可能である。

【0064】

この低分子化酵素は標識酵素と同じ種類の酵素であってもよい。この場合には標識酵素は分子内部から切断してオリゴマーを生成するエンド(endo)活性の酵素であり、低分子化酵素は分子の端から作用して単量体を生成するエクソ(exo) 活性を持つものとするのが好ましい。例えば、非拡散性基質が重合体(例えば澱粉)である場合に、標識酵素により生成される拡散性オリゴマー(例えばマルトース)を単量体(例えばグルコース)にまで分解できるものが用いられる。このような低分子化酵素の例として糖加水分解酵素、より具体的には、 - アミラーゼ、 - アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 - グルコシダーゼ等があげられる。非拡散性基質と標識酵素として、カルボキシメチルセルロースとセルラーゼを用いた場合には、低分子化酵素としてC1エンザイムを用いることができる。

【0065】

これらの標識酵素、非拡散性基質、低分子化酵素の組合せは、公知文献(例えば「酵素ハンドブック」(丸尾文治、田宮信雄監修、朝倉書店、1982年発行)、「生化学ハンドブック」(井村伸正、他編、丸善1984年発行)に記載された酵素、基質から選ぶことができる。

【0066】

試薬層において低分子化酵素により生成された低分子生成物は、公知の検出系試薬により光学的に検出することができる。前記低分子化酵素により最終的に生成したグルコースを検出する方法としては、例えば、グルコースをグルコースオキシダーゼ存在下に酸化し生成した過酸化水素を検出する方法(例えばAnn.Clin.Biochem., 6,24(1964)、J.Clin.Pathol., 22,246(1969)に記載のTrinder 試薬、特開昭49-50991号(対応米国特許3,886,045)、米国特許3,992,158号、特開昭55-164356号(対応米国特許4,292,272)等に記載のTrinder 試薬、特開昭53-26188号(対応米国特許4,089,747)、特開昭58-45557号等に記載のトリアリール置換イミダゾールロイコ色素を含む試薬、特開昭59-193352号(対応欧州特許公開 EP 0122641A)、特開昭60-224677号(対応米国特許4,665,023)等に記載のジアリール-モノアララルキル置換イミダゾールロイコ色素を含む試薬を用いる方法)、グルコースデヒドロゲナーゼとNADの存在下に生成するNADHを検出する方法、またヘキソキナーゼ存在下に生成するグルコース-6-リン酸を検出する方法等、公知の方法を用いることができる。これらの検出方法の中で、グルコースオキシダーゼ存在下にグルコースを酸化し生成した過酸化水素をペルオキシダーゼとロイコ色素を用いて検出する方法が、感度の点で最も望ましい。

【0067】

これらの検出試薬は分析要素の試薬層に低分子化酵素と一緒に含有させてもよいが、試薬層の下層に設けた別の層(例えば第2試薬層又は検出層等)に含有させてこの層で検出するようにしてもよい。なお、ロイコ色素を使用する場合には、水非混和性溶媒の溶液の親水性バインダー中への分散物とするのが生成した色素の安定性の上で好ましい。

【0068】

本発明の乾式免疫分析要素は前述の諸特許明細書に記載の公知の方法により調製することができる。本発明の分析要素は一辺約15mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-28331(対応米国特許4,169,751)、実開昭56-142454(対応米国特許4,387,990)、特開昭57-63452、実開昭58-32350、特表昭58-501144(対応国際公開:WO 83/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることが、製造、包装、輸送、保存、測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、または小片を開口のあるカード

10

20

30

40

50

に貼付または収めて用いることなどもできる。

【0069】

本発明の乾式分析要素は前述の諸特許明細書等に記載の操作と同様の操作により液体試料中の被検物である高分子抗原の定量分析ができる。例えば約5 $\mu$ L～約30 $\mu$ L、好ましくは8～15 $\mu$ Lの範囲の血漿、血清、尿などの水性液体試料液を基質層に点着する。点着した分析要素を約20～約45の範囲の一定温度で、好ましくは約30～約40の範囲内の一定温度で1～10分間インキュベーションする。要素内の発色又は変色を光透過性支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の高分子抗原の量を求めることができる。点着する液体試料の量、インキュベーション時間及び温度を一定にすることにより定量分析を高精度に実施できる。測定操作は特開昭60-125543、同60-220862、同61-294367などに記載の化学分析装置により極めて容易な操作で高精度の定量分析を実施できる。なお、目的や必要精度によっては、目視により発色の度合いを判定して、半定量的な測定を行なってもよい。分析要素内に、酵素標識抗体を含有させない場合には、要素に点着する前に水性試料液を酵素標識抗体を含む溶液と混和して、結合反応を十分行わせてから、基質層に点着すればよい。

10

【0070】

本発明はさらに、上記した本発明の犬CRP及び人CRP測定用免疫分析試薬、又は犬CRP及び人CRP測定用乾式分析要素に、試料を接触させることを含む、試料中のCRPの測定方法に関する。試料の種類は特に限定されないが、例えば、血液（全血、血漿、血清）、リンパ液、尿などがあり、好ましくは血液（全血、血漿、血清）であり、更に好ましくは血清、血漿であり、特に好ましくは血清である。

20

【0071】

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0072】

実施例1：抗体のサブクラスがIgG1で、犬CRPと人CRPに同等の反応性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(1) 抗体産生用融合細胞（ハイブリドーマ）の調製：

ビーグル犬の新鮮な血清からアフィニティークラムを用いて分離、精製した犬CRPを抗原として、マウス(BALBc)に免疫し、犬CRPおよび人CRPにたいする抗体価の上昇を確認後、脾細胞を採取してミエローム(P3U1)とPEG法で細胞融合させた。HAT培地による選択培養し、増殖したハイブリドーマを多数得た。

30

【0073】

(2) ハイブリドーマの選別(1)：抗原特異性の確認と抗体の種類及びサブクラスの確認

上記(1)で得たハイブリドーマの培養上澄について、犬CRP及び人CRPの2種の蛋白抗原をそれぞれ1 $\mu$ g/mLとなるようPBS(-)で希釈し固相を行い、2次抗体として抗マウスIgG HRP標識ヤギ抗体 (Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugated secondary antibody : No. AP308P フナコシ(株))を用いてマイクロプレートを用いたELISA法により、各抗原に対する反応性を確認し、犬CRP及び人CRPの2種の抗原の片方にのみ又は共通に反応する抗体を産生するハイブリドーマを数種選別できた。また、これらのハイブリドーマについて、培養上澄中の抗体のアイソタイプ及びサブクラスは、市販の同定キット試薬を用いて同定した。

40

【0074】

(3) ハイブリドーマの選別(2)：各抗原に対する結合定数の確認

犬・人CRPに対する反応性が確認された培養上澄の内、産生抗体がIgGであるものについて、Biacore社の装置 (Biacore3000) を用いて、その結合定数を測定した。センサーチップに抗マウスIgGのウサギIgGを固定化し、これと培養上澄とを一定条件で接触させ、培養上澄中のマウスIgGを固定する。次いで、目標とする結合定数 $10^9\text{M}^{-1}$ に対し、4 $\mu$ g/mL ( $3.5 \times 10^{-8}\text{M}$ ) の各抗原蛋白質を接触させる。培養上澄を接触させた時のシグナル増加 (抗体

50

シグナル：培養上澄中のIgG量に相当)を基準にして、抗原蛋白質を接触させた時のシグナル増加(抗原シグナル：抗体の抗原捕捉力に相当)の比を取ると培養上澄中の抗体の結合定数の序列が推定できる。培養上澄の測定結果を表1に示す。因みに、表1の最下段の抗体FH-01は、結合定数が $2 \times 10^8 M^{-1}$ の人CRPにのみ特異性を持つ抗体である。また、Kdの概算値を表2に示す。FH01の抗原/抗体シグナル比(以下シグナル比とする)0.738に対して、ハイブリドーマ16H4の培養上澄の抗体は、犬CRPに対してシグナル比0.887を示し、FH01同等以上の結合定数が期待される。また、16H4の抗体は、同じ条件下で人CRPに対しても、シグナル比0.234を示し、FH01よりは、若干弱い、充分な結合定数を持つと期待される。三種類のハイブリドーマ3A6、11C6、16H4を用いて、マウス腹水法で調製後、プロテインAカラムで精製した抗体での同条件下のシグナル比は、培養上澄と良く一致しており、培養上澄での結果が抗体選別に有効である事を示している。この方法により、犬CRPと人CRPに対して充分な結合定数 $10^7 M^{-1} \sim 10^9 M^{-1}$ を有し、且つ、サブクラスがIgG1である抗体産生ハイブリドーマとしてハイブリドーマ16H4を選別することができた。また、犬CRPのみと反応する抗体を産生するハイブリドーマとして6A3、11C6を得た。

【0075】

ハイブリドーマ16H4(寄託者が付した識別のための表示：MM44097-16H4F5)は、受託番号FERM P - 21571(受領番号FERM AP - 21571)として、2008年(平成20年)4月18日付けで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(日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6)に寄託されている。

【0076】

【表1】

表1：各種ハイブリドーマの培養上澄及び精製クローンの培養上澄のマイクロプレートELISA及びBiacore測定結果

		Biacore 測定 *3					
		ELISA 発色 OD*2		培養上澄		精製クローン抗体	
ハイブリドーマ名称	アイソタイプ/ サブクラス	犬 CRP	人 CRP	犬 CRP	人 CRP	犬 CRP	人 CRP
5B8	IgG2b	2.752	0.080	—	—	0	0
8B5	IgG2b	2.955	3.027	—	—	0	0
8G11 *1	IgG1	1.487	2.474	0	0.075	—	—
3A6	IgG1	0.111	0.091	0.368	0.027	0.555	0
11C6	IgG1	0.300	0.085	0.535	0	0.502	0
16H4	IgG1	0.706	1.633	0.887	0.234	0.882	0.230
FH01 *4	IgG1	—	—	—	—	0	0.738

\*1：クローニング時に脱落。

\*2：固定時の抗原濃度  $1 \mu g/mL$

\*3：抗原濃度  $4 \mu g/mL$ (約 $3.5 \times 10^{-8} M$ )

\*4：人CRPとの結合定数  $2 \times 10^8 M^{-1}$

【0077】

【表 2】

	50%結合の抗原濃度(M)		Kd (M <sup>-1</sup> )	
	犬 CRP	ヒト CRP	犬 CRP	ヒト CRP
FH01	—	5.76×10 <sup>-9</sup>	—	1.74×10 <sup>8</sup>
FH02	—	3.98×10 <sup>-9</sup>	—	2.51×10 <sup>8</sup>
16H4	4.57×10 <sup>-9</sup>	7.94×10 <sup>-8</sup>	2.19×10 <sup>8</sup>	1.26×10 <sup>7</sup>

FH02は、別の抗人CRPモノクローナル抗体である。

## 【0078】

実施例 2：モノクローナル抗体の調製：

ハイブリドーマ16H4をRPMI 1640 + 10 % FBSで融解し培養し、増殖させた細胞をマウス20匹にそれぞれ0.5 mL (5 × 10<sup>6</sup> cells/匹) 移植する。一定期間の後に、腹腔から腹水を採取して遠心分離後、上澄を以下に示すプロテイン A-アフィニティクロマト法で精製する。1.5 Mグリシン-NaOH (pH 8.9)-3 M NaClで平衡化したプロテイン A カラムに、同じ緩衝液で希釈した腹水の上澄を流しIgGを吸着させる。溶出バッファ (100 mM クエン酸バッファ、pH 3.0) で溶出し、直ちに、中和液 (2 M Tris - HCl、pH 9.0) を添加して pH 7.0~7.5に調整後、PBSに透析して精製抗体を得た。

## 【0079】

実施例 3：酵素標識抗体試薬の調製

特許第3151080号に記載の方法と同様の方法を用いて、枯草菌 アミラーゼと上記ハイブリドーマ16H4が産生した抗犬/人CRP・IgGFab'を調製した。

## 【0080】

実施例 4：犬/人CRP測定用分析要素の調製：

ゼラチン下塗りされている180 μmのポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液を、乾燥後の厚さが14 μmになるように塗布し乾燥した。

ゼラチン	14.1	g/m <sup>2</sup>
ペルオキシダーゼ	12.0	KU/m <sup>2</sup>
グルコースオキシダーゼ	6.0	KU/m <sup>2</sup>
グルコアミラーゼ	5.0	KU/m <sup>2</sup>
ロイコ色素	0.5	g/m <sup>2</sup>
界面活性剤	1.0	g/m <sup>2</sup>

## 【0081】

ここで、界面活性剤は、ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンニルフェニルエーテル (Surfactant 10G、オーリン社製) を、ロイコ色素は、2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-(4-ジメチルアミノフェニル)-5-フェネチルイミダゾール酢酸塩を用いた。

## 【0082】

次に上記フィルム上に下記組成の水溶液を乾燥後の厚さが10 μmになるように塗布し、乾燥した。

ゼラチン	10.2	g/m <sup>2</sup>
界面活性剤	0.5	g/m <sup>2</sup>

## 【0083】

次に上記フィルム上に下記組成のpH = 6.4に調整された水溶液を乾燥後の厚さが8 μmになるように塗布し、乾燥した。

ヒドロキシプロピルセルロース	4.7	g/m <sup>2</sup>
カルボキシメチルスターチ	3.5	g/m <sup>2</sup>
PIPES	0.9	g/m <sup>2</sup>

10

20

30

40

50

マンニトール 2.3 g/m<sup>2</sup>  
 界面活性剤 1.2 g/m<sup>2</sup>

【 0 0 8 4 】

次に上記フィルム上に約 6 0 g / m<sup>2</sup>の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、5 0 デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を 3 6 ゲージ編みしたトリコット編み物布地を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させた。

上記布地上に、エタノールを200g/m<sup>2</sup>となるように塗布し (= O C 1 塗布) 乾燥後、下記組成のエタノール溶液を各々の成分が下記の量となるように、そして乾燥後の厚さが5 μ mになるように、塗布し (= O C 2 塗布)、乾燥させ、一体型多層分析要素を作製した。

10

アミラーゼ標識抗 C 反応性蛋白マウス抗体 14.0 KU/m<sup>2</sup>  
 抗 C 反応性蛋白マウス第二抗体 6.2 mg/m<sup>2</sup>  
 ポリビニルピロリドン 5.6 g/m<sup>2</sup>  
 界面活性剤 0.2 g/m<sup>2</sup>

【 0 0 8 5 】

上記の一体型多層分析要素を12mm x 13mm四方のチップに切断し、スライド枠 (特開昭 5 7 - 6 3 4 5 2 号公報に記載) に収めて、本発明に従う C R P 分析用乾式スライドを作製した。

【 0 0 8 6 】

実施例 5 : 性能評価試験

20

下記組成 (\*) の希釈液と免疫比濁法にて検定されたCRP濃度0, 1.1, 3.0, 7.1, 11, 30, 71mg/d Lの人血清を希釈液にて21倍希釈した液を上記実施例で作製した C R P 分析用乾式スライドに10 μ L点着する。

【 0 0 8 7 】

その後、37 にて5分間インキュベートしながら、およそ10秒おきに650nmにおける反射濃度を富士ドライケム 5 0 0 0 (富士写真フィルム (株) 製) により測定した。そのときの3分 ~ 5分の反射濃度より1分あたりの反射濃度 ( O D r ) をもとめた。犬血清についても同様に実施した。結果を表 1 と図 1 に示す。

【 0 0 8 8 】

\*希釈液組成

30

MES \*1 5mg  
 カゼイン水溶液 \*2 100mg  
 アジ化ナトリウム 0.2mg  
 精製水 1.0ml

\*1 MES : 2 - ( N - モルホリノ ) エタン sulfon 酸モノハイドレート

\*2 例えば 商品名 : ブロックエース

【 0 0 8 9 】

	人血清	犬血清
CRP 0.0mg/dL (希釈液)	0.193	0.197
CRP 1.1mg/dL	0.167	0.141
CRP 3.0mg/dL	0.141	0.121
CRP 7.1mg/dL	0.127	0.116
CRP 11mg/dL	0.091	0.118
CRP 30mg/dL	0.081	0.113
CRP 71mg/dL	0.072	0.111

40

【 0 0 9 0 】

上記結果より、人血清については、CRP=71mg/dLまで、犬血清については、CRP=7.1mg/d Lまで濃度変化に対応して O D r (反射光学濃度) の変化が認められた。犬血清については、希釈倍率を更に高めることによりCRP高濃度まで検量線を作成することが可能である。

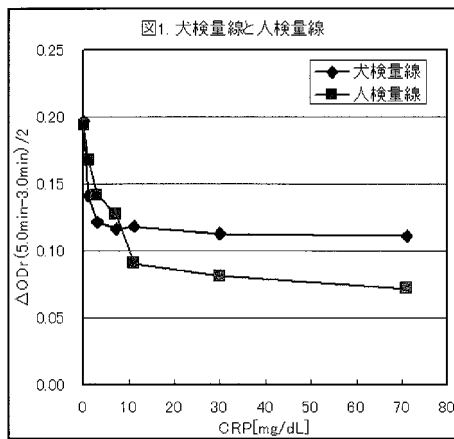
50

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】 図1は、本発明の抗体を用いて人血清及び犬血清におけるCRPを測定した結果を示す。

【図1】



---

フロントページの続き

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 特開昭62-210984(JP,A)  
特開平06-082452(JP,A)  
国際公開第2009/107170(WO,A1)  
特開2006-115716(JP,A)  
特開2002-040024(JP,A)  
特開2004-189665(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CPlus/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	识别狗CRP和人CRP的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5265257B2</a>	公开(公告)日	2013-08-14
申请号	JP2008170284	申请日	2008-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	升田喜士 池田森人 川崎和也		
发明人	升田 喜士 池田 森人 川崎 和也		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/68 G01N2333/4737		
FI分类号	C07K16/18 C12N5/00.102 C12N15/00.C G01N33/53.X C12P21/08 C12N5/00.B C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA03 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
其他公开文献	JP2010006774A5 JP2010006774A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：提供识别犬CRP和人CRP的单克隆抗体，一种产生单克隆抗体的杂交瘤，一种用于测量犬CRP和人CRP的免疫分析试剂，使用单克隆抗体，一种用于测量犬CRP和人类的干分析元件使用单克隆抗体的CRP和使用单克隆抗体测量CRP的方法。解决方案：单克隆抗体或其片段识别犬CRP和人CRP，并且对于犬CRP和人CRP具有10<sup>7</sup>M-7至10<sup>9</sup>M-1的偶联常数，并且其亚类是IgG1。

ハイブリド ーマ名称		アイソタイプ/ サブクラス		Biacore 測定 *3			
				抗原シグナル/抗体シグナル			
				ELISA 発色 OD*2		培養上澄	
犬 CRP	人 CRP	犬 CRP	人 CRP	犬 CRP	人 CRP		
5B8	IgG2b	2.752	0.080	—	—	0	0
8B5	IgG2b	2.955	3.027	—	—	0	0
8G11 *1	IgG1	1.487	2.474	0	0.075	—	—
3A6	IgG1	0.111	0.091	0.368	0.027	0.555	0
11C6	IgG1	0.300	0.085	0.535	0	0.502	0
16H4	IgG1	0.706	1.633	0.887	0.234	0.882	0.230
FH01 *4	IgG1	—	—	—	—	0	0.738