

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-26161
(P2008-26161A)

(43) 公開日 平成20年2月7日(2008.2.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	
CO 7 K 17/08 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
	CO 7 K 17/08	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2006-199374 (P2006-199374)	(71) 出願人	000003182
(22) 出願日	平成18年7月21日 (2006.7.21)		株式会社トクヤマ 山口県周南市御影町1番1号
		(71) 出願人	391003576
			株式会社トクヤマデンタル 東京都台東区台東1丁目38番9号
		(72) 発明者	宇梶 文緒
			東京都台東区台東1丁目38番9号 株式 会社トクヤマデンタル内
		Fターム(参考)	4H045 AA30 BA62 CA11 DA75 EA50 FA81

(54) 【発明の名称】 固定化抗体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 抗原を免疫学的方法により測定するに際して使用する固定化抗体の製造方法であって、非特異的反応を増幅することなく、測定感度を高めることが可能な固定化抗体の製造方法を提供する。

【解決手段】 アジ化物イオンの共存下に抗体と固定化用担体を接触させることで固定化抗体を調製する。好ましくは、さらにブロッキング剤を共存させた状態で接触させる。得られた固定化抗体を免疫学的測定法に使用することで、測定対象の抗原を、感度良く、且つ正確に測定することが可能になる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原を免疫学的方法により測定するに際して使用する固定化抗体の製造方法であって、アジ化物イオンの共存下に、測定対象の抗原に対する抗体と固定化用担体を接触させることを特徴とする、固定化抗体の製造方法。

【請求項 2】

抗原が亜硝酸抽出法により微生物から抽出された糖鎖抗原であることを特徴とする請求項 1 記載の固定化抗体の製造方法。

【請求項 3】

微生物が、ストレプトコッカス・ミュータンスである請求項 2 記載の固定化抗体の製造方法。

10

【請求項 4】

抗体と固定化用担体を接触させるに際して、アジ化物イオンに加えてブロッキング剤を共存させることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の固定化抗体の製造方法。

【請求項 5】

抗体と固定化用担体を接触させるに際して、アジ化物イオンに加えて、親水性高分子化合物またはアミノ酸からなるブロッキング剤、およびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを共存させることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の固定化抗体の製造方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学的測定法に使用する固定化抗体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

医学検査や食品検査、または環境測定において微生物検査は重要な検査項目となっている。

【0003】

口腔内には多種多様な微生物が存在しており、これらの微生物の中に感染症を引き起こす微生物が存在する場合があることが知られている。例えば、齲蝕、歯周病の発生には齲蝕関連菌や歯周病関連菌が強く関与していることが知られている。近年、従来の感染症とは関係ないと思われていた疾患、例えば、心臓病、胃潰瘍、癌等の発症にも口腔内に存在する微生物が関与している場合があることが明らかとなり、口腔内の微生物検査は歯科領域のみならず、医科領域においても重要になっている。

30

【0004】

被検体液中の微生物の測定は、従来培養法によって実施されており、結果が判明するまで長時間かかるという問題があったが、免疫学的測定方法が開発され検査時間が大幅に短縮された。免疫学的測定方法は微生物が有する特異的な抗原に対する抗体を利用して該微生物を高感度に検出するという方法である（非特許文献 1）。

40

【0005】

微生物から抗原を抽出し調製した抗原抽出液を免疫学的方法で測定することで、検出感度を更に高めることが可能である。その理由として、1) 抗原が可溶化され低分子となるので、抗原抗体反応が進行しやすくなる、2) エピトープが露出する、等のことが考えられている。微生物抗原の抽出方法としては、界面活性剤処理、酵素処理、熱処理等多様な方法が実用化されているが、糖鎖抗原の抽出方法に適した方法として亜硝酸抽出法（非特許文献 2）が知られている。該方法は、特に、A 群レンサ球菌、口腔内レンサ球菌等ストレプトコッカス属に属する微生物の糖鎖抗原の抽出に有効である。該方法は亜硝酸水溶液を糖鎖に反応させ、糖鎖を切断し菌体から遊離させるという方法であり、一般的な亜硝酸抽出法は、亜硝酸塩水溶液（多くの場合は亜硝酸ナトリウム）と酸溶液（酢酸、塩酸

50

、硝酸等)を混合することで亜硝酸を発生させ、微生物と亜硝酸を十分な時間反応させることにより実施される。

【0006】

上記のようにして調製した糖鎖抗原抽出液中の糖鎖抗原量の測定に使用される免疫学的方法は、通常、抗体を不溶性の固定化用担体に固定化して得られる固定化抗体を使用して、抗原を検出する方法がとられる。固定化抗体は、一般的に、抗体が緩衝液等の水溶液に溶解している抗体溶液と固定化用担体を一定時間接触させることにより、抗体を該固定化用担体に結合させることにより製造される。被検体液中の抗原量の測定時に、抗原以外の物質の固定化用担体への非特異的な吸着が生じると、測定時のバックグラウンドが上昇するために正確な測定ができなくなるので、抗体を固定化用担体に結合させた後、さらにウシ血清アルブミン(以下BSAと略す場合がある)、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク等のタンパク質でブロッキングすることが一般的に実施されている。

10

【0007】

しかし、抗体を固定化した担体を上述したようにタンパク質でブロッキングしても、非特異的反応が完全に除去できない、または、非特異的反応の除去はできるが、測定の感度が低下してしまうという問題があり、従来タンパク質によるブロッキングでは、満足できる結果が得られない場合があった。このような場合には、タンパク質の代わりにアラニン、バリン等の非極性アミノ酸で凝集反応粒子(固定化抗体)をブロッキングする方法が提案されている(特許文献1)。該方法を採用することで、血清中の抗トレポネマ・パリダム抗体量の測定、大便懸濁液中のヘモグロビン量の測定、血清中の抗成人T細胞白血病ウイルス抗体量の測定に際し、タンパク質によるブロッキング法に比べて、感度を低下させることなく非特異的反応を抑制できることが開示されている(特許文献1)。

20

【0008】

しかしながら、実際に口腔から唾液、歯垢等の被検体液を採取し、該被検体液中に存在する微生物から抽出した抗原を測定する場合、感度が不足する場合があった。このような場合には、測定時に、具体的には、抗原と固定化抗体を接触させるときに、抗原抗体反応を促進する物質を共存させることで高感度化を計るという方法が一般的に行われている(非特許文献3、特許文献2)、該方法は、特異的反応と同様に非特異的反応も増幅してしまうため、満足する結果が得られない場合があった。

30

【0009】

【非特許文献1】日本生化学会編集，新生物化学実験講座12 分子免疫学ⅠⅠⅠ 抗原・抗体・捕体，東京化学同人，1992年

【非特許文献2】武井勉，阪大歯学誌，35巻，93-109頁，1990年

【非特許文献3】Clinical Chemistry 20:1071-6, 1974

【特許文献1】特開平5-288750号広報

【特許文献2】特開平1-63865号広報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0010】

本発明は上記事情に鑑みなされたものであり、抗原を免疫学的方法により測定するに際して使用する固定化抗体の製造方法であって、測定感度を高めることが可能な固定化抗体の製造方法を提供することを目的とする。さらには、別の目的として、このように測定感度を高めても、非特異的反応が増幅しない固定化抗体の製造方法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】

【0011】

本発明者等は上記課題を解決するために、鋭意検討してきた。その結果、固定化用担体に抗体を接触させる際に、アジ化物イオンを共存させて調製した固定化抗体を使用すると、上記の課題が解決できることを見だし、本発明を完成するに至った。

50

【0012】

即ち、本発明は抗原を免疫学的方法により測定するに際して使用する固定化抗体の製造方法であって、アジ化物イオンの共存下に、測定対象の抗原に対する抗体と固定化用担体を接触させることを特徴とする、固定化抗体の製造方法である。

【発明の効果】

【0013】

本発明の固定化抗体の製造方法により、特異的反応を高感度に検出できる固定化抗体を製造することが可能になった。さらに、このように、特異的反応に対して高い感度を有しながら、非特異的反応も高度に抑制できる固定化抗体も製造することが可能になった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の固定化抗体製造方法では、アジ化物イオンの共存下に、測定対象の抗原に対する抗体と固定化用担体を接触させる。

【0015】

本発明におけるアジ化物イオンとは、化学式 N_3^- で表されるイオンを指す。

【0016】

本発明で使用できる上記抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、そして、該抗体の部分分解物 (Fab、Fab'、Fab'2等)、および該抗体の活性フラグメント (抗体の抗原認識部位) が存在する部分構造等も含まれる。抗体のグロブリンクラスは限定されず、現在知られているどのようなグロブリンクラスのものも含まれる。

【0017】

固定化用担体としては、形状は、例えば、膜、粒子、プレート、試験管等の従来公知のものが特に制限なく使用できる。材質は、例えば、ニトロセルロース、PVDF、ラテックス、ゼラチン、金属コロイド、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート等の従来公知のものが何ら制限なく使用できる。

【0018】

本発明では、抗体と固定化用担体を接触させ、抗体を固定化用担体へ結合させる反応をアジ化物イオンの共存下で行う。これにより得られた固定化抗体は測定対象の抗原を、感度良く、且つ正確に測定することが可能になる。その理由は定かではないが、アジ化物イオンの作用により抗体の固定化用担体への結合が促進されると推察される。実施例で詳細に説明するが、固定化抗体を製造する場合にアジ化物イオンが共存すると、アジ化物イオンが共存しない場合に比べ、固定化用担体と接触させるときの抗体濃度を低くしても十分な感度を得られる。

【0019】

本発明で使用するアジ化物イオンの好適な濃度を例示すると、5 mM ~ 80 mM であるが、15 mM ~ 50 mM が特に好適である。後述するが、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン共存下に抗体と固定化用担体を接触させると、感度、特異性共に満足する結果が得られる場合がある。この場合のアジ化物イオンの好適を例示すると、5 mM ~ 80 mM であるが、30 mM ~ 50 mM が特に好適である。

【0020】

アジ化物イオンとしては、例えば、アジ化水素、またはアジ化物塩等の水溶液を使用することができる。アジ化物塩の具体例を示すと、アジ化ナトリウム、アジ化カリウム、アジ化リチウム、アジ化セシウム、アジ化ルビジウム、アジ化銀、アジ化金、アジ化バリウム、アジ化鉄、アジ化カルシウム、アジ化ストロンチウム、アジ化ヒドラジン、アジ化アンモニウム等が挙げられ、このうち入手の容易性や取り扱い易さ等からアジ化ナトリウム、アジ化カリウム、アジ化リチウム等のアルカリ金属塩が好ましく、アジ化ナトリウムが最も好ましい。

【0021】

抗体と固定化用担体を接触させる方法は、例えば、抗体が溶解した液体 (抗体溶液) に、アジ化ナトリウム等のアジ化物塩を上記の好適な濃度になるように添加し、固定化用担

10

20

30

40

50

体と一定時間接触させることにより実施できる。固定化抗体製造時の溶液のpHは一定の範囲内に（例えば、pH 4～9）保つことが好ましく、この目的のために、緩衝液中で抗体と固定化用担体を接触させることが好ましい。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、GOODの緩衝液、炭酸緩衝液等が使用できる。具体的な抗体と固定化用担体を接触させる方法として、例えば、抗体及びアジ化ナトリウムを含む抗体溶液（抗体濃度0.001～5mg/ml）を調製し、該抗体溶液と固定化用担体を4～56にて、2分以上接触させる、という方法を示すことができる。

【0022】

抗体と固定化用担体を接触させる際に、抗体の保存安定性等の観点から、上記の緩衝成分、アジ化物イオン以外にも、界面活性剤、糖類、塩を混在させることもできる。界面活性剤としては、例えば、トリトンX-100、ツイーン20等が、糖類としては、例えば、グルコース、スクロース等が、塩としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等が、それぞれ好適に利用できる。

10

【0023】

免疫学的測定法に使用する固定化抗体は、一般的に、非特異的反応を抑制するためにブロッキング処理が施される。抗体を固定化用担体に結合させて固定化抗体を製造するが、通常、固定化用担体表面の一部に抗体を結合させれば十分な感度が得られる。一般的な条件で製造された固定化抗体は、固定化用担体表面に抗体が結合してはいるものの、固定化用担体表面の全てが抗体で覆われている訳ではないので、この状態の固定化用担体を測定に使用すると、固定化用担体上の抗体が結合していない部分に、被検体中に含まれる抗原以外の物質が結合し、非特異的反応を引き起こす場合がある。このようなことを防止するため、ブロッキング剤で抗体が結合していない固定化用担体部分をマスクし、抗原以外の物質の吸着を防ぐということが一般的に行われている（ブロッキング処理）。

20

【0024】

本発明の方法により固定化抗体を製造する場合も、抗原以外の物質の結合を防止するために、アジ化物イオンの共存下に固定化用担体と抗体を接触させるに際して、ブロッキング剤を共存させることが好適である。本発明者によって、固定化抗体を製造する場合にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（以下トリスと略す場合がある）存在下に固定化用担体と抗体を接触させると、感度を下げることなく非特異的反応だけを低下させることができることを見出されている（特願2005-373838号）。該トリスの効果は、本発明の固定化抗体の製造方法においても認められ、抗体と固定化用担体を接触させるに際し、アジ化物イオンとブロッキング剤に加えてトリスを共存させることにより製造した固定化抗体を使用することで、非特異的反応を抑制し、測定対象の抗原を感度良く測定することも可能である。

30

【0025】

本発明においてブロッキング剤は公知のものが何ら制限なく使用できる。例えば、アルブミン、カゼイン等のタンパク質、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン等の親水性高分子化合物；グリシン、アラニン、ロイシン等のアミノ酸などが好適に利用できる。

【0026】

上記のように作製した固定化抗体は、リン酸緩衝液等により1回以上洗浄することが好ましい。

40

【0027】

このようにして製造した固定化抗体を使用して免疫学的測定法により測定対象の抗原を測定する。抗体が産生される物質であれば（即ちその物質が抗原となりうるのであれば）本発明の方法によって製造された固定化抗体を使用して高感度に測定することができる。好適な例として、口腔内に存在する微生物を示すことができるが、この場合は、微生物より亜硝酸抽出法によって糖鎖抗原を抽出し、該抽出糖鎖抗原量を測定することによって実施するという方法が特に好ましい。

【0028】

50

口腔内に存在する微生物を例示すると、細菌、リケッチア属 (*Rickettsia*)、クラミジア属 (*Chlamydia*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*) および単細胞真核生物などが挙げられる。これら微生物を含む被検体液を例示すると、微生物の培養液、微生物の懸濁液、食品およびその懸濁液、咽頭ぬぐい液、唾液、血漿、血清、尿等の体液、或いは歯垢の懸濁液等が挙げられる。口腔内に存在する微生物を測定するためには、唾液、歯垢、またはその混合物を含んでなる被検体液中を使用することが特に好適である。

【0029】

唾液、歯垢またはその混合物を含んでなる被検体液中に含まれる感染症を引き起こす微生物を例示すると、齶蝕関連菌、歯周病関連菌、上気道感染起因菌、日和見感染菌等が挙げられる。それぞれについて具体例を表示すると、齶蝕関連菌としては、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*) 等のミュータンスレンサ球菌に属する細菌、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) に属する細菌、アクチノミセス属 (*Actinomyces*) に属する細菌が、歯周病関連菌としては、ポルフィロモナス・ジンジパリス (*Porphyromonas gingivalis*)、アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、バクテロイデス・フォルシザス (*Bacteroides forsythus*)、トレポネマ・デンチコラ (*Treponema denticola*)、プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*)、プレボテラ・ニグレッセンス (*Prevotella nigrescens*) 等が、上気道感染起因菌としては、A群レンサ球菌 (*Group A Streptococcus*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*) 等が、日和見感染菌としては、カンジダ菌 (*Candida sp.*) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等が挙げられる。このうち齶蝕関連菌において本発明の効果は高く発揮され、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) が最も好ましい。

10

20

30

【0030】

亜硝酸抽出法は公知の方法に従って実施すればよく、例えば、亜硝酸塩水溶液と酸水溶液を混合することで亜硝酸を発生させ、該亜硝酸水溶液中に糖鎖抗原を抽出するという方法により実施できる。亜硝酸塩水溶液としては、例えば、0.2 ~ 8 Mの亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム等が、酸水溶液としては、0.5 ~ 4 Mの酢酸、硝酸、塩酸、クエン酸等が使用できる。亜硝酸抽出法の具体的な方法として、微生物を含む懸濁液を遠心分離して上清を廃棄し、沈殿に上記のような亜硝酸塩水溶液と酸水溶液を、それぞれ0.05 ~ 0.5 ml 添加し、15 ~ 50 で1 ~ 10分放置することで反応を行わせる、という方法を例示できる。

【0031】

または、上記の亜硝酸塩水溶液と酸水溶液を予め混合して、0.2 ~ 4 Mの亜硝酸塩と0.5 ~ 4 Mの酸が含まれる亜硝酸水溶液を調製し、該亜硝酸水溶液を微生物を含む沈殿に0.01 ~ 1 ml 添加し、15 ~ 50 で1 ~ 10分放置することで亜硝酸抽出を実施することもできる。

40

【0032】

反応後の糖鎖抗原抽出液は、強酸性であり、そのままでは免疫学的測定法に使用できないので、例えば1 ~ 3 M水酸化ナトリウム、0.5 ~ 2 Mトリス、0.5 ~ 1 M炭酸水素ナトリウム等の塩基性水溶液を添加し抽出液のpHを7.0 ~ 8.5に調整するのが好ましい。

【0033】

このようにして製造した糖鎖抗原抽出液中の糖鎖抗原を測定する免疫学的測定法の具体

50

的手法は、免疫凝集法、光学免疫測定方法、標識免疫測定方法、およびこれらの組合わせ等の従来公知の方法が制限無く採用出来る。

【0034】

以下、これら免疫学的測定方法について説明する。

【0035】

[免疫凝集法]

該方法は、抗原抗体反応に基づく不溶性担体の凝集反応を利用して、糖鎖抗原抽出液中の抗原を検出、定量する方法である。半定量的方法としてはラテックス凝集法、マイクロタイター法等が、定量的測定方法としてはラテックス定量法等がある。

【0036】

例えば、ラテックス凝集法を利用して糖鎖抗原抽出液中の抗原量を免疫学的に測定する場合には、ラテックスビーズに微生物の糖鎖抗原と結合する抗体（以下単に抗体ともいう）を固定化した抗体感作粒子からなる測定試薬を作製後、該測定試薬と糖鎖抗原抽出液を混合し、抗原抗体反応後における感作粒子の凝集の度合を、目視、或いは光学的測定方法等により検出することで測定することが出来る。

【0037】

[光学免疫測定方法]

該方法は、抗体と糖鎖抗原抽出液とを接触させて抗原抗体反応を行った場合に、抗原抗体反応の結果生じる凝集物の濁度の変化を検出する方法、又は抗体を固定化した薄層（以下、抗体層ともいう。）に糖鎖抗原抽出液を接触させ、抗原抗体反応の結果生じる抗体層の屈折率の変化を透過光や表面プラズモン波等の変化として検出する方法等、抗原抗体反応の有無を光学的に検出する方法のことである。

【0038】

[標識免疫測定方法]

該方法は、抗体に放射性物質、酵素、各種色素類、コロイド類、各種粒子等の各種標識物質を結合させて得た標識抗体を含む測定試薬と、糖鎖抗原抽出液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、糖鎖抗原抽出液中の抗原に結合した標識物質の量、すなわち標識物質に由来する放射活性、酵素活性、蛍光強度、着色等を測定することによって、糖鎖抗原抽出液中の抗原を検出、定量する方法である。

【0039】

該方法では、例えば抗体を固定化した不溶性担体（粒子、メンブレン、イムノプレート等）からなる測定試薬と糖鎖抗原抽出液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、抗体を標識物質で標識した標識抗体を含む別の測定試薬を接触させて更に抗原抗体反応を行った後に、標識物質の量を測定することによって、又は糖鎖抗原抽出液と標識物質で標識した糖鎖抗原とを混合し、抗体を固定化した不溶性担体からなる測定試薬に接触させて抗原抗体反応を行った後に、抗体に結合した標識物質の量を測定することによって糖鎖抗原抽出液中の抗原を検出、定量することができる。

【0040】

標識物質としては、放射性物質として放射性ヨード、放射性炭素等が、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ等が、各種色素類として、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミン等の蛍光色素類が、コロイドとして金コロイド、炭素コロイド等が、各種粒子としては着色ラテックス粒子等が使用出来る。なお、酵素標識を行う場合は、チオール基とマレイミド基、アミノ基とアルデヒド基等の共有結合により直接標識する、或いはビオチン-アビジン複合体を介し標識する方法が使用可能である。また、標識酵素としてアルカリホスファターゼ及びパーオキシダーゼを使用し、さらに前者の酵素の場合にはジオキセタン誘導体等の化学発光物質を、また後者の酵素の場合にはルミノール誘導体等の化学発光物質を酵素の基質として使用した場合には、該基質の発光を検出することも出来る。

【0041】

これら各種標識免疫測定方法における操作、手順等は一般に採用されているそれらと特

10

20

30

40

50

に異ならず、公知の非競合法や競合法、サンドイッチ法等に準じることが出来る。また、抗体と共に、上記の各標識物質で標識した二次抗体、プロテイン A 等の抗体に結合可能な物質を使用して糖鎖抗原の検出・定量に用いることもできる。

【0042】

該標識免疫測定方法では、用いる標識に応じて従来使用されている方法が特に限定無く使用できるが、中でも放射性物質を標識として使用する放射免疫測定方法、酵素を標識として使用する酵素免疫測定方法、色素、特に蛍光色素を標識として利用する蛍光免疫測定方法、酵素の基質としての化学発光物質を標識として利用する化学発光免疫測定方法等は定量性が高いので、高精度の定量測定を行なう場合にはこれら測定方法を採用するのが好適である。また、コロイドまたは各種粒子を標識として使用するフロースルー免疫測定方法、免疫クロマト法、並びにラテックス凝集法は、操作が簡便であるという特徴がある。

10

【実施例】

【0043】

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

【0044】

製造例 1 [ストレプトコッカス・ミュータンスに対する精製ポリクローナル抗体の作製]

(1) [菌体試料懸濁液の調製]

ブレインハートインフュージョン (以下「BHI」と略すこともある) (DIFCO社) 3.7g を 100ml の純水に溶解後、オートクレーブ処理し、BHI 液体培地を調製した。BHI 液体培地 2ml 中で *Ingbritt* (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 c) を 37℃、5 時間、嫌気条件下 ($N_2 : H_2 : CO_2 = 80 : 10 : 10$) で培養した後、培養液を 4000g、5 分遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。

20

【0045】

次いで、沈殿物を 5ml のリン酸生理食塩緩衝液 (pH 7.4) (以下 PBS と略すこともある) に懸濁し、同様の遠心分離をする操作を 3 回行い、沈殿物を洗浄した。その後得られた菌体沈殿物を PBS に懸濁し、 $A_{600} = 1.0$ に調整し *Ingbritt* 菌体試料懸濁液とした。なお、該菌体試料懸濁液を超音波処理後、適宜希釈した後に BHI 培地プレート上に添加し、生じたコロニー数を計数し菌体試料懸濁液の希釈倍率を乗じることで該菌体試料懸濁液の菌体濃度を求めたところ、約 1×10^9 個/ml であった。

30

【0046】

(2) [ストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清の作製]

免疫は以下のように実施した。即ち、第 1 週は 0.5ml の *Ingbritt* 菌体試料懸濁液を、5 日連続で 5 回ウサギに対し耳介静脈注射した。第 2 週は 1.0ml の該菌体試料懸濁液を、5 日連続で 5 回ウサギに対し耳介静脈注射した。第 3 週は 2.0ml の該菌体試料懸濁液を、5 日連続で 5 回ウサギに対し耳介静脈注射した。第 4 週は第 3 週と同様に免疫した。力価の上昇をスライドグラスを利用した菌体の凝集反応の程度により確認後、最終免疫より 1 週間後に、定法に従い採血しストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清を得た。

40

【0047】

(3) [ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の精製]

オートクレーブ処理した BHI 液体培地 1L 中で *Ingbritt* を 37℃、12 時間、嫌気条件下で培養した。培養液を 4000g、5 分遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を 100ml の PBS に懸濁させて、同様の遠心分離をする操作を 3 回行い、沈殿物を洗浄した。

【0048】

Ingbritt 菌体を洗浄した後、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し $A_{600} = 1.5$ に調整した。ここにプロナーゼ (和光純薬社) を 5mg/ml となる

50

ように添加し、37℃で1時間保温した。反応終了後、遠心分離し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を20mlのPBSに懸濁して、同様の遠心分離をする操作を3回行い、沈殿物を洗浄した。次いで20mlの0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)で3回洗浄し、更に20mlのPBSで3回洗浄し、プロテアーゼ処理菌体懸濁液(A₆₀₀ = 12.5)を調製した。

【0049】

次いで、該プロテアーゼ処理菌体懸濁液と(2)で調製した抗血清0.5mlとを混合し、4℃、60分反応させた。混合液を4000g、5分遠心分離し、菌体を回収した。この菌体を10mlのPBSに懸濁し、同様の遠心分離をする操作を3回行い洗浄した。

【0050】

次いで、0.5mlの0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)に菌体を懸濁し、吸着した抗体を溶出し、遠心分離により上清を回収し、1Mトリス-塩酸(pH9.0)を添加しpH7.4に調整した。同様の溶出操作を4回行い、各画分のタンパク質量を280nmの吸光度により測定した。

【0051】

次いで、あらかじめPBSで平衡化した1mlのプロテインA-セファロース(アマシヤムファルマシアバイオテク社)を充填したカラムに上記溶出液を添加し、5ml洗浄後、5mlの0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH3.0)にて溶出し、直ちに1Mトリス-塩酸(pH9.0)を添加しpH7.4に調整した。IgGの溶出画分は、A₂₈₀を測定することで確認した。IgG画分を回収し、0.01Mリン酸緩衝液に対して透析を行った(4日、3日)。

【0052】

以上により、抗血清(0.5ml)をプロテアーゼ処理菌体により精製したポリクローナル抗体を約1mg得た。

【0053】

実施例1 [アジ化物イオンとブロッキング剤を共存させて製造した抗体固定化ラテックス粒子によるストレプトコッカス・ミュータンスの測定]

(1) 抗体固定化ラテックス粒子の製造

製造例1で調製した抗ストレプトコッカス・ミュータンス抗体を使用し、アジ化物イオンとブロッキング剤として50mMアラニンを含む10mMリン酸緩衝液からなる抗体溶液(抗体濃度0.03mg/ml)を調製した。アジ化物イオンはアジ化ナトリウムを溶解することで調製した。抗体溶液中のアジ化物イオンの濃度を表1に示す。次いで、この抗体溶液(1ml)に0.5質量%のポリスチレンラテックス粒子(JSR社)1mlを加え、室温で1時間放置した。次いで、遠心分離により抗体の結合したラテックス粒子を単離し、0.05Mの塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸緩衝液(以下緩衝液Aとよぶ場合がある)で1回洗浄し、抗体固定化ラテックス粒子が0.5質量%となるように緩衝液Aで懸濁した。

(2) 被検体液の採取及び培養法による菌数の測定

被検者にガムを5分間噛ませることで刺激唾液を採取し、被検体液として使用した。被検体液を適宜希釈して、100μlをミチス・サリバリウス・バシトラシン(以下、「MSB」と表記することもある)固体培地上に添加し、37℃、嫌気条件下、24~48時間培養した。MSB培地上のストレプトコッカス・ミュータンスの識別は、コロニーの形態学的分類、および形態学的に識別不可能なコロニーに関しては、該コロニーを純粋培養後、ミュータンスレンサ球菌の血清型特異的な抗体を利用した免疫学的測定方法および、糖発酵試験等の生化学的方法によりストレプトコッカス・ミュータンスの同定を行い、ストレプトコッカス・ミュータンス数をCFU/mlとして測定した。

(3) ラテックス凝集法によるストレプトコッカス・ミュータンス数の測定

上記(2)で採取した被検体液(0.5ml)を10,000rpmで5分間遠心分離し、沈殿を0.5mlの0.1MNaOHに懸濁し、遠心分離により上清を除去した。次いで沈殿を0.5mlのPBSに懸濁し、遠心分離にて上清を除去した。PBSによる同

10

20

30

40

50

様の操作を再度実施した後、沈殿に20 μ lの2M 酢酸溶液と20 μ lの1M 亜硝酸ナトリウム塩水溶液を添加し良く混合後、室温で10分間放置した。90 μ lの0.05% Tween 20を含む1M トリス(pH未調製)を添加し、糖鎖抗原抽出液を調製した。糖鎖抗原液に等量の抗体固定化ラテックス懸濁液を添加、混合し、室温で30分放置後、ラテックス粒子の凝集を目視で観察した。結果を表1に示す。

【0054】

【表1】

検体 No.	ミュータンス菌数 ($\times 10^5$ CFU/ml)	アジ化物イオン濃度 (mM)	ラテックス凝集
1	11.3	0	+
1	11.3	10	++
1	11.3	15	+++
1	11.3	30	+++
1	11.3	50	+++
1	11.3	70	+++
2	<0.01	0	-
2	<0.01	10	-
2	<0.01	15	-
2	<0.01	30	-
2	<0.01	50	-
2	<0.01	70	+

+++：強い凝集、++：やや強い凝集、+：弱い凝集、-：凝集せず

【0055】

抗体と固定化用担体を接触させる際にアジ化物イオンを共存させると、非特異的反応を増加させることなく感度を上げることが分かった。アジ化物イオンを10mM加えた場合に増感効果が認められ、15mMでその効果は飽和した。70mMになると、弱い非特異的反応が認められるようになった。これらの結果から、アジ化物イオン濃度は10mM~70mMの範囲では好適に使用でき、特に、15mM~50mMでその効果が最大になることが分かった。

【0056】

比較例1 [アジ化物イオン非存在下で製造した抗体固定化ラテックス粒子によるストレプトコッカス・ミュータンスの測定]

製造例1で調製した抗ストレプトコッカス・ミュータンス抗体を使用し、50mMアラニンを含む10mMリン酸緩衝液からなる抗体溶液(抗体濃度0.03~0.1mg/ml)を調製した。これ以降は、実施例1と同様の方法により抗体固定化ラテックス粒子を調製し、刺激唾液中(検体1、検体2)のストレプトコッカス・ミュータンス数を測定した(表2、表3)。

【0057】

10

20

30

40

【表 2】

検体1 (1.13×10^6 CFU/ml) 測定結果

抗体濃度 (mg/ml)	アジ化物イオン濃度 (mM)	ラテックス凝集
0.03	50	+++
0.05	0	++
0.1	0	+++

+++ : 強い凝集、++ : やや強い凝集、+ : 弱い凝集、- : 凝集せず

10

【0058】

【表 3】

検体2 (1×10^3 CFU/ml未満) 測定結果

抗体濃度 (mg/ml)	アジ化物イオン濃度 (mM)	ラテックス凝集
0.03	50	-
0.05	0	-
0.1	0	-

+++ : 強い凝集、++ : やや強い凝集、+ : 弱い凝集、- : 凝集せず

20

【0059】

アジ化物イオンが存在すると、 0.03 mg/ml の抗体濃度でも十分な感度を得られるが、アジ化物イオンが存在しない場合に同程度の感度を得るためには、 0.1 mg/ml の抗体濃度にする必要があった。

【0060】

実施例 2 [トリス共存下で製造した抗体固定化ラテックス粒子によるストレプトコッカス・ミュータンスの測定]

10 mM トリス、 10 mM グリシン、アジ化物イオンを含む 10 mM リン酸緩衝液からなる抗体溶液 (抗体濃度 0.03 mg/ml) を使用した以外は、実施例 1 と同様の方法により、抗体固定化ラテックス粒子を製造し、刺激唾液中のストレプトコッカス・ミュータンス菌数を測定した。結果を表 4 に示す。

【0061】

30

【表 4】

検体 No.	ミュータンス菌数 ($\times 10^5$ CFU/ml)	アジ化物イオン濃度 (mM)	ラテックス凝集
1	11.3	0	-
1	11.3	10	+
1	11.3	15	++
1	11.3	30	+++
1	11.3	50	+++
1	11.3	70	+++
2	<0.01	0	-
2	<0.01	10	-
2	<0.01	15	-
2	<0.01	30	-
2	<0.01	50	-
2	<0.01	70	+

+++：強い凝集、++：やや強い凝集、+：弱い凝集、-：凝集せず

【0062】

トリスが共存する場合は、10 mMのアジ化物イオンを添加した場合に効果が認められ、30 mMでその効果は飽和した。30 mM～50 mMが最も効果的であった。

【0063】

実施例3 [トリス共存下、または非存在下で製造した抗体固定化ラテックス粒子によるストレプトコッカス・ミュータンスの測定]

30 mMアジ化物イオン、10 mMグリシンを含む10 mMリン酸緩衝液からなる抗体溶液（抗体濃度0.03 mg/ml）、または、30 mMアジ化物イオン、10 mMグリシンに加えて10 mMトリスを含む10 mMリン酸緩衝液からなる抗体溶液（抗体濃度0.03 mg/ml）を使用し、実施例1と同様の方法により、抗体固定化ラテックス粒子を製造し、亜硝酸抽出により刺激唾液から糖鎖抗原を抽出し、ストレプトコッカス・ミュータンス菌数を測定した。結果を表5に示す。

【0064】

10

20

30

【表 5】

検体 No.	ミュータンス菌数 ($\times 10^5$ CFU/ml)	ラテックス凝集 (トリス共存)	ラテックス凝集 (トリス非共存)
1	11.3	+++	+++
2	<0.01	-	-
3	1.3	+	++
4	<0.01	-	+
5	10	+++	+++
6	4.6	++	++
7	5.5	++	+++
8	16.2	+++	+++
9	0.1	-	+
10	<0.01	-	-

+++：強い凝集、++：やや強い凝集、+：弱い凝集、-：凝集せず

【0065】

固定化抗体製造時にトリスが共存しない場合、非特異的反応が検出される場合があった

。

10

20

专利名称(译)	制备固定化抗体的方法		
公开(公告)号	JP2008026161A	公开(公告)日	2008-02-07
申请号	JP2006199374	申请日	2006-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社徳山齿科		
申请(专利权)人(译)	徳山公司 株式会社トクヤマデンタル		
[标]发明人	宇梶文緒		
发明人	宇梶 文緒		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C07K17/08		
FI分类号	G01N33/543.525.W G01N33/53.S G01N33/543.525.U C07K17/08		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA62 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA81		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种固定化抗体的制备方法，该方法能够在不扩增非特异性反应的情况下提高测量灵敏度，涉及通过免疫学方法测定抗原时使用的固定化抗体的制备方法。解决方案：通过使抗体与载体接触以在叠氮离子共存下固定化来制备固定化抗体，优选在除了阻断剂共存的状态下制备。通过使用获得的固定化抗体借助于免疫学测量方法，可以以优异的灵敏度准确地测量作为测量对象的抗原。 Ž

検体 No.	ミュータンス菌数 ($\times 10^6$ CFU/ml)	アジ化物イオン濃度 (mM)	ラテックス凝集
1	11.3	0	+
1	11.3	10	++
1	11.3	15	+++
1	11.3	30	+++
1	11.3	50	+++
1	11.3	70	+++
2	<0.01	0	-
2	<0.01	10	-
2	<0.01	15	-
2	<0.01	30	-
2	<0.01	50	-
2	<0.01	70	+

+++：強い凝集、++：やや強い凝集、+：弱い凝集、-：凝集せず