

(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2011-90004

(P2011-90004A)

(43) 公開日 平成23年5月6日(2011.5.6)

(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 8 1 E	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 C	
	GO 1 N 33/53 S	

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2010-271682 (P2010-271682)	(71) 出願人	000252300 和光純薬工業株式会社
(22) 出願日	平成22年12月6日 (2010.12.6)		大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(62) 分割の表示	特願2006-513682 (P2006-513682) の分割	(72) 発明者	角田 恭一 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社臨床検査薬研究所内
原出願日	平成17年5月10日 (2005.5.10)		
(31) 優先権主張番号	特願2004-149940 (P2004-149940)	(72) 発明者	藤尾 一功 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社臨床検査薬研究所内
(32) 優先日	平成16年5月20日 (2004.5.20)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	小島 伸三 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社臨床検査薬研究所内

(54) 【発明の名称】 免疫凝集法用ヒアルロン酸測定試薬キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】担体の沈降が少なく、その保存安定性に優れ、且つ従来の試薬と同等に高精度な、担体を用いたヒアルロン酸測定キットの提供。

【解決手段】ヒアルロン酸バインディングプロテイン(以下、HABPと略記する場合がある)に対するモノクローナル抗体を予めラテックス粒子に感作させ、そこへHABPとヒアルロン酸との複合体を反応させることにより、ヒアルロン酸量に対応したラテックス粒子凝集反応を効率よく惹起させ得ること。更に、HABPに対するモノクローナル抗体を感作させたラテックス粒子と、ヒアルロン酸バインディングプロテインを別々の試薬として保存することにより、保存安定性に優れたヒアルロン酸測定用試薬となることを見出した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒアルロン酸バインディングプロテインを含んでなる試薬と、抗ヒアルロン酸バインディングプロテイン抗体を担持させたラテックス粒子を含んでなる試薬とからなる、免疫凝集法用ヒアルロン酸測定試薬キット。

【請求項 2】

ラテックス粒子の粒径が、 $0.05 \sim 0.3 \mu\text{m}$ である請求項 1 記載の試薬キット。

【請求項 3】

ヒアルロン酸バインディングプロテインが、プロテオグリカン、リンクプロテイン及びヒアルロネクチンよりなる群から選ばれるものである請求項 1 又は 2 に記載の試薬キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は保存安定性に優れ、高精度な免疫凝集法用ヒアルロン酸測定試薬キットに関する発明である。

【背景技術】

【0002】

ヒアルロン酸は、主として動物の関節液や眼球ガラス体液、臍帯、真皮表層などの結合組織等に含まれるものである。その血中濃度は、リウマチ、癌、肝臓疾患時に上昇することが知られ、これら疾患に対する診断に有用なものとされており、種々の測定方法が現在開発されている。

20

【0003】

一方、免疫学的測定方法において、ラテックス粒子を用いた測定方法は、その簡便さや汎用装置への対応が容易なことから、広く使用されるようになってきている。ヒアルロン酸測定用試薬として、ラテックス粒子を用いた測定法は、例えば特許第3424504号特許公報等に記載されている。該公報には、ヒアルロン酸結合タンパク質（ヒアルロン酸バインディングプロテイン）を担体粒子に担持させ、試料中のヒアルロン酸と反応させて反応混合物を生成させ、それを検出することによりヒアルロン酸を測定する方法が記載されており、実施例では、平均粒径 368 nm のラテックス粒子を用いて実験がなされている。しかしながら、平均粒径が 300 nm ($0.3 \mu\text{m}$) 以上のラテックス粒子は沈降し易いため、通常、試薬として用いる場合には振とう等によりラテックス粒子を分散させた後に使用する必要があった。そのため、沈降が起きにくく使用前に振とうするといった煩雑な操作が不要な、ラテックス粒子等の担体を用いたヒアルロン酸測定用試薬の開発が望まれていた。

30

【0004】

【特許文献 1】特許第3424504号特許公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記状況に鑑み、本発明は、担体の沈降が少なく、その保存安定性に優れ、且つ従来の試薬と同等に高精度な、ラテックス粒子を用いた免疫凝集法用ヒアルロン酸測定試薬キットの提供を課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、ラテックス粒子を用いたヒアルロン酸測定試薬をより安定に保存できるようにするため、沈降しにくいラテックス粒子（平均粒径 $0.3 \mu\text{m}$ 以下）にヒアルロン酸バインディングプロテイン（以下、HABPと略記する場合がある）を化学結合又は物理的吸着により担持させることを試みたが、効率よく担持させることが難しく、高精度な測定はできなかった。そこで、更に鋭意研究を重ねた結果、HABPに対するモノクローナル抗体を予めラテックス粒子に感作させ、そこへHABPとヒアルロン酸との複合体を反応させることにより、ヒアルロン酸量に対応したラテックス粒子凝集反応を効率よく惹起させ得るこ

50

とを見出した。更に、HABPに対するモノクローナル抗体を感作させたラテックス粒子と、ヒアルロン酸バインディングプロテインを別々の試薬として保存し、且つ上記の如く予めヒアルロン酸とHABPとを反応させて複合体を形成させて、該複合体とHABPに対する抗体を感作させたラテックス粒子とを反応させるように操作することにより、保存安定性に優れたヒアルロン酸測定用試薬となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

即ち、本発明は、

「ヒアルロン酸バインディングプロテインを含んでなる試薬と、抗ヒアルロン酸バインディングプロテイン抗体を担持させたラテックス粒子を含んでなる試薬とからなる、免疫凝集法用ヒアルロン酸測定試薬キット」に関する。

10

【発明の効果】

【0008】

本発明の試薬キットは、担体の沈降が少なく、保存安定性に優れたものであり、また、該キットを用いれば、従来試薬と同等に高精度なヒアルロン酸の測定が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明に係るヒアルロン酸バインディングプロテイン(HABP)としては、プロテオグリカン、リンクプロテイン、ヒアルロネクチン等のヒアルロン酸と結合する性質を有する蛋白質中のヒアルロン酸結合部を含むものであれば特に限定されず、上記蛋白質それ自体であっても、上記蛋白質中のヒアルロン酸結合部を含む部分蛋白質又はその部分蛋白質を含む物質であっても、上記蛋白質中のヒアルロン酸結合部の遺伝子を切り出しそれを他の蛋白質に組み込んだ遺伝子組み換え蛋白質等であってもよい。

20

【0010】

本発明に係る抗HABP抗体としては、HABPに対する抗体であればポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも何れでもよいが、単一エピトープのアフィニティー精製をしたポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体が好ましく、効率よくヒアルロン酸と結合できるモノクローナル抗体が特に好ましい。中でもペプシン、パパイン等の酵素を用いて適宜消化し、Fab、Fab'、(Fab')²等として用いることが好ましい。抗HABP抗体としてポリクローナル抗体を用いる場合、該抗体は、常法、例えば「免疫学実験入門、第2刷、松橋直ら、(株)学会出版センター、1981」等に記載の方法に準じて馬、牛、羊、兎、山羊、ラット、マウス等の動物にHA結合性蛋白を免疫して調製され、また、抗HABP抗体としてモノクローナル抗体を用いる場合、該抗体は、常法、即ちケラーとミルスタイン(G.Kohler and C.milstein;nature,256,495,1975)により確立された細胞融合法に従い、例えばマウスの腫瘍ラインからの細胞と、HA結合性蛋白で予め免疫されたマウスの脾細胞とを融合させて得られるハイブリドーマ等により産生される。

30

【0011】

本発明に係る担体としては、通常の免疫学的測定法で用いられる担体であれば何れも使用可能であるが、例えば、赤血球、バクテリア、細胞片等の天然有機高分子物質、リボソーム、高分子ミセル等の分子会合体、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー等の合成高分子化合物、多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、活性炭、金属酸化物等の無機物質等を材料として調製されたものが好ましいものとして挙げられる。また、これら担体は、チューブ、ビーズ、ディスク状片、微粒子、ラテックス粒子等多種多様の形態で使用し得る。中でも、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易いこと、また非特異反応が起こりにくいこと等の点から特に好ましい。その材質は特に限定されないが、例えばポリスチレンラテックス粒子等のスチレン系ラテックス粒子、アクリル酸系ラテックス粒子等が好ましいものとして挙げられる。

40

【0012】

尚、これらラテックス粒子のうち、乳化剤を用いない乳化重合によって得られるポリス

50

チレンラテックス粒子等は、表面の疎水性が強いため、タンパク質或いはペプチドをスムーズに吸着し、且つ表面の負電荷同士の反発に基づき、乳化剤なしでも溶液中で安定に分散するという性質を有しているため、特に好ましい。また、種々の変性ラテックス粒子（例えば、上記ポリスチレン中にカルボキシル基を導入したカルボン酸変性ラテックス粒子）、磁性ラテックス粒子（磁性粒子を内包させたラテックス粒子）等も使用できる。

【0013】

また、本発明に於いて用いられるラテックス粒子としては、市販のものが使用できるが、ラテックス粒子の平均粒径が小さいもの、即ち、単位重量あたりの表面積が大きいものが、抗体を効率良く担持させることができ且つ保存時の安定性（水溶液中での分散性）も良好であるため好ましいものとして用いられる。より具体的には、通常0.05～0.3 μm、好ましくは0.1～0.25 μmの平均粒径のものが好ましい。このような平均粒径の小さいものを用いることにより、ラテックス粒子の沈降を抑えることができ、また、抗HABP抗体をラテックス粒子に効率よく担持させることが可能となる。即ち、このような抗HABP抗体担持ラテックス粒子を用いることにより測定用試薬の安定性を向上させ、精度の高い測定が可能となる。

10

【0014】

本発明に係る担体に本発明に係る抗HABP抗体を担持させる方法は、抗HABP抗体と担体とを接触させることによってなされればよく、特に限定されない。通常この分野で利用される自体公知の担持方法は全て挙げられ、例えば、抗HABP抗体を担体に物理的に吸着させて抗HABP抗体を担体に担持させる、所謂物理的吸着法〔特公平5-41946号公報、スミロン
テクニカルレポート、SUMILON ELISAシリーズ 1 ELISA測定法の紹介、住友ベークライト（株）発行、スミロン テクニカルレポート、SUMILON ELISAシリーズ 2 ELISA製品の固相表面、住友ベークライト（株）発行等〕が、代表的なものとして挙げられる。該方法は、通常、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート等の合成高分子化合物、活性炭、例えば多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、金属酸化物、ヒドロキシアパタイト等の無機物質を担体として用いた場合に、好ましい方法として用いられる。なかでも、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニール等を、例えばチューブ、ビーズ、ディスク片、微粒子、ラテックス粒子等の形態として用いた場合が、特に好ましい。

20

30

【0015】

例えばラテックス粒子に本発明に係る抗HABP抗体を担持させる場合を例にとると、本発明に係る抗HABP抗体を通常0.05～2 mg/ml、好ましくは0.1～1 mg/ml含む緩衝液等の溶媒中にラテックス粒子を通常0.1～10% (w/v)、好ましくは0.2～5% (w/v)となるように添加、懸濁させ、通常5～30 で通常2～3時間反応させた後、この分野で行われる後処理、例えば遠心分離、例えば牛血清アルブミン（BSA）等の適当なタンパク質を含有する溶液を用いるブロッキング処理等の処理を行うことにより担持させることができる。尚、この分野で用いられる化学結合を用いる方法を用いても抗HABP抗体を担体に担持させることができる。

【0016】

本発明のヒアルロン酸の測定方法は、試料中のヒアルロン酸と本発明に係るHABPを接触させてヒアルロン酸/HABP複合体を形成させ、次いで該複合体と、本発明に係る抗HABP抗体を担持させた担体とを反応させ、該反応により生じた凝集物による光学的变化を測定し、該測定値からヒアルロン酸量を算出することによりなされる。

40

【0017】

尚、ここでいう光学的变化の測定とは、免疫凝集の結果生じる光学的变化を測定することであり、具体的には、逆受身凝集反応法、免疫比ろう法、免疫比濁法等の免疫凝集法が挙げられる。これら測定方法は、自体公知の方法に準じて行えばよいが、例えば、逆受身凝集反応法を用いる場合には、「東京化学同人 続生化学実験講座5 免疫生化学研究法 p.36-37」、「金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p.844-845」等に、例えば、免疫比ろう法を用いる場合には「金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p.

50

851-853等」等に、免疫比濁法を用いる場合には、「金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p.853-854」等に記載の方法に準じて行えばよい。

【0018】

本発明の測定方法を、例えば担体としてラテックス粒子を用いた免疫比濁法を例にとりて、より具体的に以下に説明する。即ち、ヒアルロン酸を含む試料（より具体的には、例えば血液、血漿、血清、関節液、助膜液、リンパ液、骨髓液等の体液や尿等）と上記の如きHABPを含む試薬とを接触混合させてヒアルロン酸/HABP複合体を形成させる。次いで、例えば上記の如き抗HABP抗体を例えば平均粒径0.05~0.3 μm 、好ましくは0.1~0.25 μm のラテックス粒子に担持(感作)させたものからなる試薬と、上記複合体とを反応させ、その結果生じた凝集の度合いを例えば吸光度を用いて測定し、予め求めてあ

10

った標準品の検量線からその濃度を求めることによって試料中のヒアルロン量を定量する。尚、吸光度の測定波長は、通常340~1000nm、好ましくは500~900nmで測定すればよい。また、凝集の度合いは、吸光度に限定されるものではなく、自体公知の方法であればいずれでもよく、例えばネフェロメトリー、カウンティングイムノアッセイ等の方法により値を測定してもよい。また、ヒアルロン酸/HABP複合体と、抗HABP抗体をラテックス粒子等の担体に担持させたもの（以下、抗HABP抗体担持担体と略記する場合があります）からなる試薬を反応させる際、適当な凝集促進剤を添加してもよい。尚、このような凝集促進剤の具体例については、本発明の試薬キットの項で説明する。

20

本発明の測定方法に於ける、HABP反応時のHABPの使用濃度としては、ヒアルロン酸の検量限界をどの程度に設定するかによって変動はあるが、通常設定された検量限界濃度に相当するヒアルロン酸全てと結合し得る濃度以上、好ましくはその5倍濃度以上、より好ましくは10倍濃度以上である。尚、この際の上限としては測定に影響を与えない量であれば特に限定はされないが、経済的な量を考慮すると、通常その5万倍以下、好ましくはその1万倍以下である。具体的には、通常0.1~1000 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは0.5~1000 $\mu\text{g/ml}$ 、より好ましくは0.5~100 $\mu\text{g/ml}$ である。例えば、血清中のヒアルロン酸濃度を測定する場合、その検量限界は通常10~1000ng/mlであるので、HABP反応時のHABPの使用濃度は、この検量限界に基づいて上記範囲内で適宜設定すればよい。

30

また、該反応時のpHとしては、複合体が形成されるのを妨げない範囲であれば特に限定はされず、通常5~10、好ましくは6~8の範囲が挙げられ、反応時の温度も複合体が形成されるのを妨げない範囲であれば特に限定されず、通常5~40の範囲が挙げられる。

また、その反応時間は、用いられるHABP並びにpH及び温度等の反応条件により異なるので、各々に応じて数秒間乃至数時間適宜反応させればよい。

【0019】

本発明の測定方法に於ける、抗HABP抗体担持担体とヒアルロン酸/HABP複合体を反応させる際の抗HABP抗体担持担体の使用濃度としては、上記で用いられるHABPの濃度により異なるが、抗HABP抗体の担持量が0.01~0.1mg/mgのラテックス粒子を用いる場合には、通常0.2~25mg/ml、好ましくは0.5~12mg/mlであり、該濃度範囲内であれば、試料中のヒアルロン酸を精度よく測定することができる。尚、抗HABP抗体担持担体とヒアルロン酸/HABP複合体を反応させる際の反応条件及び反応時間は、上記のHABP反応時のそれに準じて行われればよい。

40

【0020】

本発明のヒアルロン酸測定用試薬キットとしては、HABPを含んでなる試薬と、抗HABP抗体担持担体を含んでなる試薬とからなるものが挙げられる。尚、該試薬キットは、標準物質を含んでいてもよく、該標準物質としては、通常この分野で用いられているもので、例えばヒアルロン酸カリウム（鶏冠由来：和光純薬工業（株）製）、ヒアルロン酸ナトリウム（ストレプトコッカス属由来：和光純薬工業（株）製）等が挙げられる。

【0021】

本発明のヒアルロン酸測定用試薬キットに於けるHABPを含んでなる試薬は、上記の如きHABPを含む試薬であればよく、適当な緩衝液中にHABPを溶解させたものである。この目的に使用される緩衝剤としては、例えばトリス緩衝剤、リン酸緩衝剤、ペロナール緩衝剤、

50

ホウ酸緩衝剤、グッド緩衝剤等通常免疫学的測定法において用いられている緩衝剤は全て挙げられ、その濃度としては通常5 ~ 300 mM、好ましくは10 ~ 150 mMであり、そのpHは、通常5 ~ 10、好ましくは6 ~ 8の範囲から適宜選択される。

【0022】

上記HABPを含んでなる試薬中のHABPの濃度としては、用いられるHABPの種類により異なるが、反応時の濃度が上記濃度となるように設定されればよく、通常0.1 ~ 500 µg/ml好ましくは0.5 ~ 100 µg/mlの範囲になるように適宜選択される。

【0023】

本発明のヒアルロン酸測定用試薬キットに於ける抗HABP抗体担持担体を含んでなる試薬は、上記抗HABP抗体担持担体を含むものであればよく、適当な緩衝液中に抗HABP抗体担持担体を懸濁させたもの若しくはこれを凍結乾燥したものである。この目的に用いられる緩衝剤としては、本発明に係る抗HABP抗体がHABPに結合するのを妨げる性質を有さないものであればよく、上記HABPを含んでなる試薬で用いられる緩衝剤と同じものが挙げられ、そのpH及び濃度も同様に上記の値に準じて設定すればよい。

10

【0024】

また、抗HABP抗体担持担体を含んでなる試薬は、緩衝液等の溶液に懸濁させた懸濁液の形態で測定に供される場合が多いが、このような懸濁液を調製するために用いられる緩衝液としては、通常この分野で使用されるものであれば特に限定されないが、通常pH5.0 ~ 10.0、好ましくはpH6.5 ~ 8.5の中性付近に緩衝作用を有するもの、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等が好ましい。尚、使用する不溶性微粒子の性質によっては、懸濁液の状態では放置しておくとしやすくなるものもあるが、このような場合には、弱アルカリ性のグリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液等を使用して懸濁液を調製する方が保存安定性の面から好ましい。また、これらの緩衝液の緩衝剤濃度としては、通常10 ~ 500mM、好ましくは10 ~ 300mMの範囲から適宜選択される。尚、該試薬には、通常この分野で使用されている、例えば、糖類、タンパク質、界面活性剤等の安定化剤、NaCl等の塩類、防腐剤等を、通常この分野で使用される範囲内で添加してもよい。

20

【0025】

上記のような緩衝液に、本発明に係る抗HABP抗体担持担体を懸濁させる場合、抗HABP抗体担持担体の濃度は、使用する担体及び抗HABP抗体の種類により異なるが、反応時の濃度が上記濃度となるように設定されればよく、通常1 ~ 100 mg/ml、好ましくは2 ~ 50 mg/mlの範囲になるように適宜選択される。

30

【0026】

更に、本発明に係る抗HABP抗体担持担体を含んでなる試薬中には、免疫反応促進剤(凝集反応促進剤)(例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等)が通常この分野で用いられる濃度範囲で共存していてもよく、これら凝集反応促進剤共存下であっても本発明の方法によれば、測定用試薬中の蛋白成分が、何らかの要因により変性されて非特異的濁りとなることを、抑制或いは低減することができる。また、上記試薬中には、特開2002-365296号公開公報記載の凝集促進剤として用いられるモノマーやポリマーを、凝集促進剤として含んでいてもよく、その濃度範囲は特開2002-365296号公開公報記載の値に準じて選択されればよい。尚、該モノマーやポリマーは、上記公開公報記載の方法に準じて調製されればよい。

40

【0027】

本発明のヒアルロン酸測定用試薬キットは、上記した如き本発明の測定法を実施するために用いられるものであり、その構成要素の好ましい態様、具体例は上で述べた通りである。

【0028】

本発明に係る試料としては、ヒアルロン酸を含む試料であればよいが、具体的には、例えば血液、血漿、血清、関節液、助膜液、リンパ液、骨髓液等の体液や尿等が挙げられ、中でも血清、尿等が好ましいものとして挙げられる。

【0029】

50

以下に実験例、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

【実施例 1】

【0030】

(1) 試液の調製

1. 第1試液 (HABP試液) の調製

100 μ g のヒアルロン酸バインディングプロテイン (ウシ鼻中隔軟骨より Laurent らの変法で精製されたもの (生化学工業 (株) 製)) を 10ml の 100mM HEPES 緩衝液 (0.1% BSA 及び 1% NaCl 含む、pH7.0) に溶解した。これを実施例第1試液とした。

10

2. 第2試液 (抗HABPモノクローナル抗体感作ラテックス粒子) の調製

2ml のポリカーボネート製遠心チューブに、精製水 800 μ l、ラテックス粒子溶液 100 μ l (積水化学 (株) 製 N200 : 10wt%、ラテックス粒径 220nm)、500mM ホウ酸緩衝液 (pH7.3) 100 μ l、50mM 抗HABPモノクローナル抗体 ASES 緩衝液 100 μ l (4.24mg/ml, pH6.5) を添加し、攪拌しながら室温で 100 分間インキュベートし、抗HABPモノクローナル抗体が担持されたラテックス粒子浮遊液を得た。尚、上記抗HABPモノクローナル抗体は常法により作製されたものを用いた。

次いで、抗HABPモノクローナル抗体が担持されたラテックス粒子浮遊液を 15000 rpm で 15 分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに 50mM ホウ酸緩衝液 (2.5% BSA 含む、pH7.3) 1ml を添加した後、氷冷しながら 1 分間超音波処理し、ペレットを再浮遊させた。次いで 15000 rpm で 15 分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに 50mM ホウ酸緩衝液 (2.5% BSA 含む、pH7.3) 1ml を添加した。その後、氷冷しながら 1 分間超音波処理してペレットを再浮遊させた。更に、攪拌しながら室温で 120 分間インキュベートし、ラテックス粒子表面上に抗体が担持されていない領域を BSA で被覆した。

20

次いで、15000 rpm で 15 分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに 50mM ホウ酸緩衝液 (0.5% BSA 含む、pH7.3) 1ml を添加した。その後、氷冷しながら 1 分間超音波処理してペレットを再浮遊させ、これを 50mM ホウ酸緩衝液 (0.5% BSA 含む、pH7.3) で 3.33 倍に希釈したものを、第2試液とした。

30

【0031】

(2) 標準ヒアルロン酸の測定

1. 標準ヒアルロン酸溶液の調製

ヒアルロン酸カリウム (和光純薬工業 (株) 製) を、10、100、1000 ng/ml とするように 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で希釈し、標準ヒアルロン酸溶液とした。

2. ヒアルロン酸の測定

1. で調製した標準ヒアルロン酸溶液中のヒアルロン酸量を、以下の測定条件で全自動測定装置システム (日本電子: BM-8 形) を用いて測定した。

試料 : 10 μ l

第1試液 : 90 μ l

第2試液 : 30 μ l

40

測定方法 : 2ポイントエンド法

主波長 : 571 nm

得られた結果を、表1に示した。尚、表中の値は、得られた吸光度からブランク値 (ヒアルロン酸濃度が0の時に得られた値) を減算し、10000倍にした値である。

【比較例 1】

【0032】

(1) 化学結合によるHABP感作ラテックス粒子の調製 1

2mL のポリカーボネート製遠心チューブに 50mM TAPS 緩衝液 (pH8.0) 900 μ l、カルボン酸ラテックス粒子溶液 (10wt%、カルボン酸ラテックス粒径 200nm、カルボン酸量 0.3 meq/g) 100 μ l、10mg/ml 水溶解性カルボジイミド (WSC、同

50

仁化学(株)製)水溶液50 μ lを添加した後、ラテックス粒子表面のカルボキシル基を活性化するために10分間静置した。その後、1.45mg/ml HABPのASES緩衝液(50mM、pH6.5)276 μ lを添加し、攪拌しながら室温で120分間インキュベートした。更に、2.5%BSAを含むホウ酸緩衝液(50mM、pH7.3)250 μ lを添加し、攪拌しながら室温で60分間インキュベートをした後、5 で終夜インキュベートした。次いで、反応液を18000rpmで20分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに50mMホウ酸緩衝液(0.5%BSA含む、pH7.3)1mlを添加した。その後、氷冷しながら1分間超音波処理してペレットを再浮遊させ、同様の操作を更に2回繰り返した。得られた溶液を第2試液(1)とした。

【0033】

(2)化学結合によるHABP感作ラテックス粒子の調製2

10wt%、210nm、カルボン酸量0.5meq/gのカルボン酸ラテックス粒子溶液を使用した以外は、比較例1と同じ方法でHABP感作ラテックス粒子を調製した。得られた溶液を第2試液(2)とした。

【0034】

(3)物理吸着によるHABP感作ラテックス粒子の調製

2mlのポリカーボネート製遠心チューブに、精製水524 μ l、ラテックス粒子溶液(積水化学N200:10wt%、ラテックス粒径220nm)100 μ l、500mMホウ酸緩衝液(pH7.3)100 μ l、1.45mg/ml HABP水溶液276 μ lを添加し、攪拌しながら室温で120分間インキュベートした。

次いで、反応液を15000rpmで15分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに50mMホウ酸緩衝液(2.5%BSA含む、pH7.3)1mlを添加した。その後、氷冷しながら1分間超音波処理し、ペレットを再浮遊させた。次いで15000rpmで15分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに50mMホウ酸緩衝液(2.5%BSA含む、pH7.3)1mlを添加した。更に、氷冷しながら1分間超音波処理してペレットを再浮遊させ、攪拌しながら室温で60分間インキュベートをした後、5

で終夜インキュベートした。次いで、15000rpmで15分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに50mMホウ酸緩衝液(0.5%BSA含む、pH7.3)1mlを添加した。

その後、氷冷しながら1分間超音波処理によりペレットを再浮遊させ、これを第2試液(3)とした。

【0035】

(4)抗HABPモノクローナル抗体を介したHABP感作ラテックス粒子の調製1

2mlのポリカーボネート製遠心チューブに実施例1で調製した抗HABPモノクローナル抗体感作ラテックス粒子溶液1ml、896 μ g/ml抗HABP水溶液33.5 μ lを添加し、攪拌しながら室温で120分間、5 で2日間インキュベートした。得られた溶液を15000rpmで15分間遠心分離した。その上清を除去し、容器底部のペレットに50mMホウ酸緩衝液(0.5%BSA含む、pH7.3)1mlを添加した。その後、氷冷しながら1分間超音波処理してペレットを再浮遊させ、これを第2試液(4)とした。

【0036】

(5)各ラテックス粒子溶液を使用したヒアルロン酸測定試薬の検量線比較

第1試液として100mMHEPES緩衝液(0.1%BSA、1%NaCl含む、pH7.0)を、第2試液として第2試液(1)~(4)を50mMホウ酸緩衝液(0.5%BSA含む、pH7.3)で3.33倍に希釈して用いた以外は実施例1(2)と同じ方法で、標準ヒアルロン酸溶液中のヒアルロン酸量を測定した。

【0037】

得られた結果を、実施例1の結果を併せて表1に示した。尚、表中の値は、得られた吸光度からブランク値(ヒアルロン酸濃度が0の時に得られた値)を減算し、10000倍にした値である。

【0038】

10

20

30

40

50

【表 1】

ヒアルロン酸濃度 (ng/ml)	実施例 第2試液	第2試液(1)	第2試液(2)	第2試液(3)	第2試液(4)
0	0	0	0	0	0
10	37	35	3	-5	39
100	195	12	-2	-5	165
1000	1586	3	2	-5	1579

【0039】

表1の結果から明らかなように、化学結合によりHABPを感作させたラテックス粒子を用いた場合（表1中の第2試液(1)～(2)）及び物理的吸着によりHABPを感作させたラテックス粒子を用いた場合（表1中の第2試液(3)）、ヒアルロン酸濃度によるラテックス粒子の凝集は見られず正確な測定はできなかった。また、予めHABPを抗HABPモノクローナル抗体が担持されたラテックス粒子に結合させたものを含む試液を第2試液とした場合（表1中の第2試液比較例(4)）と、HABPを含む試液を第1試液、抗HABPモノクローナル抗体が担持されたラテックス粒子を含む試液を第2試液とした場合（表1中の実施例第2試液）では、その測定結果に大きな違いは見られず、これらを用いることで精度の高いヒアルロン酸測定ができることが分かった。

【実験例1】

【0040】

試液の経時安定性比較

実施例1で用いた第1試液及び第2試液を30で1ヶ月間保存し、該試液を用いて実施例1(2)と同様にヒアルロン酸量を測定した。また、比較例1で用いた第1試液と比較例1の第2試液(4)を30で1ヶ月間保存し、該試液を用いて比較例1(5)と同様にヒアルロン酸量を測定した。

【0041】

得られた測定結果を表2に示した。尚、表中の吸光度欄の値は、得られた吸光度からブランク値（ヒアルロン酸濃度が0の時に得られた値）を減算し、10000倍にした値である。また、吸光度の保持率は、得られた吸光度を1ヶ月のインキュベート前に測定した吸光度で割った値を百分率で表した値である。

【0042】

【表2】

ヒアルロン酸濃度 (ng/ml)	実施例		第2試液(4)	
	吸光度	1ヶ月後の吸光度 保持率(%)	吸光度	1ヶ月後の吸光度 保持率(%)
0	0	0	0	0
100	116	80	0	0
1000	1293	95	164	10
5000	3529	90	449	10
10000	2850	85	529	12
平均	—	87	—	8

【0043】

表2の結果から明らかなように、第2試液(4)、即ちHABPを抗HABPモノクローナル抗体が担持されたラテックス粒子と結合したものを含む試液を第2試液とした場合、1ヶ月経過後の吸光度は、経過前の吸光度と比較して明らかに低下していることが分かった。一方、実施例1の試液、即ちHABPを含む試液を第1試液、抗HABPモノクローナル抗体が担持されたラテックス粒子を含む試液を第2試液とした場合、吸光度の保持率は80%以上であり、第2試液(4)を用いた場合の結果と比較すると試薬の安定性が高いことは明らかであった。即ち、本発明の試薬キットを用いれば、長期間保存した場合であっても精度の高いヒアルロン酸を測定できることが分かった。

专利名称(译)	用于免疫凝集方法的透明质酸测量试剂盒		
公开(公告)号	JP2011090004A	公开(公告)日	2011-05-06
申请号	JP2010271682	申请日	2010-12-06
申请(专利权)人(译)	和光纯薬工业株式会社		
[标]发明人	角田 恭一 藤尾 一功 小島 伸三		
发明人	角田 恭一 藤尾 一功 小島 伸三		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/82 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/543 G01N21/82 G01N2400/40		
FI分类号	G01N33/543.581.E G01N33/543.581.C G01N33/53.S		
优先权	2004149940 2004-05-20 JP		
其他公开文献	JP5273134B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种使用载体的透明质酸测量试剂盒，该试剂盒具有较少的载体沉淀，优异的贮存稳定性和与常规试剂一样的精确度。解决方案：用抗透明质酸结合蛋白的单克隆抗体（以下有时缩写为HABP）使乳胶抗体预敏化，并使HABP与透明质酸的复合物反应，从而增加透明质酸的量。可以有效地诱发相应的胶乳颗粒凝集反应。此外，发现通过将针对HABP的单克隆抗体和透明质酸结合蛋白敏化的乳胶颗粒作为单独的试剂存储，可以获得具有优异的存储稳定性的用于测量透明质酸的试剂。[选择图]无

【表 2】

ヒアルロン酸濃度 (ng/ml)	実施例		第2試液(4)	
	吸光度	1ヶ月後の吸光度保持率(%)	吸光度	1ヶ月後の吸光度保持率(%)
0	0	0	0	0
100	116	80	0	0
1000	1293	95	164	10
5000	3529	90	449	10
10000	2850	85	529	12
平均	—	87	—	8

【 0 0 4 3 】