

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第6142384号
(P6142384)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Z N A N

請求項の数 9 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2016-179574 (P2016-179574)	(73) 特許権者	304058240
(22) 出願日	平成28年9月14日 (2016.9.14)		株式会社グリーンペプタイド
審査請求日	平成28年10月13日 (2016.10.13)		福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオインキュベーションセンター402号
早期審査対象出願		(74) 代理人	100179431 弁理士 白形 由美子
		(72) 発明者	渡部 典子 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオインキュベーションセンター402号 株式会社グリーンペプタイド内
		(72) 発明者	山口 宗親 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオインキュベーションセンター402号 株式会社グリーンペプタイド内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体検査用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリビニルアルコール(PVA)を $6.67 \times 10^{-6} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有することを特徴とする免疫測定法における試料を希釈するために用いる検体希釈液。

【請求項2】

PVAを $1.67 \times 10^{-5} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有することを特徴とする請求項1記載の検体希釈液。

【請求項3】

抗ペプチド抗体測定に用いるものであることを特徴とする請求項1又は2記載の検体希釈液。 10

【請求項4】

前記試料が血漿、血清、又は血液であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の検体希釈液。

【請求項5】

PVAを $6.67 \times 10^{-6} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有する検体希釈液によって試料を希釈することを特徴とする免疫測定法。

【請求項6】

前記検体希釈液が、

PVAを $1.67 \times 10^{-5} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有 20

するものであることを特徴とする請求項 5 記載の免疫測定法。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 記載の免疫測定法が、
フローサイトメトリーを用いたマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイであることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 8】

抗ペプチド抗体を測定するものであることを特徴とする請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項記載の免疫測定法。

【請求項 9】

前記試料が血漿、血清、又は血液であることを特徴とする請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の免疫測定法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫測定用試薬に関する。特に、低濃度の検出対象を精度良く、かつ再現性良く測定可能な抗ペプチド抗体検査用の検体希釈液に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、がんの治療は手術、放射線療法、化学療法が主な治療法であり、これらから選択されている。さらに、近年はがん細胞の表面に発現しているレセプター分子を標的とした抗体医薬が開発され、臨床で盛んに使用されるようになってきている。しかしながら、これらの治療方法が有効でないがんや、治療初期には効果を有するものの、がんの進行を止めることができない場合もあり、新たな作用機序を有する治療方法として免疫療法の研究が行われてきた。

20

【0003】

免疫療法は、手術、放射線療法、化学療法に次ぐ「第 4 の治療法」として期待されている治療法である。免疫療法は、患者本人の免疫機構を賦活して治療を行う方法であり、ワクチン療法、免疫細胞療法、サイトカイン療法などがある。しかしながら、いずれの免疫療法も一長一短があり、いずれも広く用いられるにはいたっていない。

30

【0004】

上記免疫療法の中でもワクチン療法は、副作用が少なく、放射線療法、化学療法といった主な治療法と比較して作用機序が大きく異なる。そのため、これらの治療法が功を奏さない患者であっても治療効果が得られる場合があることから注目されている治療法である。

【0005】

がんワクチンには、がんの予防を目的とするものと、治療を目的とするものとに大別される。がんの予防を目的とするものには、子宮頸がんの予防ワクチンがある。子宮頸がん予防ワクチンとしては、メルク社と GSK 社より開発されたワクチンがすでに承認を受けている。子宮頸がんを予防するワクチンは、子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルス 16 型と 18 型の感染を予防するものであり、がん自体に作用しその進行を止め、治療を行うものではない。

40

【0006】

これに対し、がん細胞で発現しているいわゆる「がん抗原」を患者に接種することにより、がんの進行を止めようというワクチン療法がある。がん細胞が発現する抗原がヒト白血球抗原 (HLA) 分子によって抗原提示細胞上に提示され、これを認識する細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) ががん細胞を傷害することによって、がんの進行を阻止する機構が存在する。がんペプチドワクチンは、がん抗原であるペプチドを投与することによって、免疫機構の中でも CTL を活性化させ、CTL によってがん細胞を殺傷させ、治療しようという方法である。

50

【0007】

国内外のがんペプチドワクチンの開発は、がん種ごとに特定した一つのペプチドのみを投与していた。しかし、進行がん患者では免疫能が低下しており、活性化CTL誘導にかなりの時間を要するため、免疫能を賦活している間に患者が死亡するケースもあり、期待する臨床効果が得られなかった。実際に、現在臨床試験が進められているがんワクチンであるMAGE-A3やEGFRvIII由来のペプチドワクチンは、患者のがん細胞で発現している抗原に由来するペプチド抗原を投与し、治療効果を期待するものである。しかしながら、各患者におけるがん細胞でのタンパク質発現は個人差があることから（非特許文献1）、患者によっては投与された抗原ががん細胞で発現していないこともあり、十分な効果が期待できない場合もある。実際に、このような免疫療法の奏功率は十分ではないとの報告も存在している（非特許文献2）。

10

【0008】

1990年代の初めよりペプチドワクチン療法の臨床研究を行っている久留米大学の伊東らのグループは、各患者のがん細胞がヘテロな集団であり、患者毎にがんに対する免疫反応を引き起こす抗原が異なることに着目し、患者毎に免疫応答が得られる最適なペプチドを複数投与するという、いわゆる「テーラーメイド型がんペプチドワクチン」の研究開発を進め、従来認められなかった優れた臨床効果を報告した（非特許文献3）。

【0009】

テーラーメイド型がんペプチドワクチンは、患者毎にHLAクラスI型が異なることから、多数の腫瘍抗原ペプチドに対する免疫能を確認し、各患者によって認識される最適なペプチドを選択して投与するというものである。

20

【0010】

治療法の概略について説明する。まず、がん患者から血液を採取し、HLAタイプと抗ペプチド抗体価を測定する。HLA型に適合しかつ抗体価の高い上位4種のペプチドを選択し投与する。さらに、定期的に投与したペプチドに対する患者の抗体価を検査し、免疫賦活の程度を確認するとともに、投与するペプチドを再選択するものである。（非特許文献4、特許文献1～3）。

【0011】

臨床研究の結果から、同一のHLA型であっても個々の患者によって免疫応答を誘導し得るペプチドが異なること、すなわち、患者毎にワクチンとして機能するペプチドに固有のパターンがあり、どのペプチドがワクチンとして有効に作用するかは個人差があることが明らかになってきた。したがって、患者毎に特異的免疫応答を誘導し得る複数のがんペプチドの中から、免疫応答が誘導できるペプチドを診断し、選択するステップが非常に重要となっている。最適なペプチドを選定するテーラーメイド型の治療を行うことにより、患者毎に特異的免疫応答を誘導する効率が高くなり、臨床効果が得られる可能性が高くなっている。現在のところ、31種類のペプチドを用いて臨床研究がさらに進められている。

30

【0012】

発明者らは、久留米大学のグループの研究成果を受けて臨床に適用するにあたり、より効果的な治療を行うための方法を探求している。すなわち患者に有効なペプチドセットを選択するために、非特異的反応が少なく、感度の高い免疫測定法を鋭意検討している。

40

【0013】

患者にワクチン療法を行う前の検査の段階で、ペプチドを選択するために採取された血液中に存在する抗ペプチド抗体価は、いずれのペプチドに対しても非常に低い値となっている。しかし、ワクチンとして機能し得る免疫応答の誘導が期待できるペプチドは、ワクチン療法を行う前であってもバックグラウンドよりわずかに抗体価が高くなっている。有効なワクチン療法のためにはワクチン投与前に抗体価を評価し、患者に特異的免疫応答を誘導し得るペプチドを選択することが重要であるから、バックグラウンドよりわずかに高い値の抗体価について、各ペプチド間で相互に比較し評価しなければならない。更に、次のクールに投与するペプチドは、再度、抗ペプチド抗体価が測定され、投与したペプチド

50

の効果を検討し見直しを行う。それにより臨床的効果が得られる可能性の高いペプチドが再度選択される。そのため、高い感度、特異度のみならず、一定期間をおいた後も再現性の高い測定結果が得られることが、最適なペプチドを選択していくうえで必要となっている。

【0014】

一般に、免疫測定によって抗体価を測定する場合には、免疫する前と免疫した後とを比較して特定の抗原に対する抗体価がどの程度増加したかを評価することが多い。一般に、免疫原を接種するとその抗体価は少なくとも10倍以上上昇する。しかし、ここでは、上述のように、バックグラウンド程度の低い値の抗体価について、相互に比較し評価しなければならないことから、通常の免疫測定と比較すると、感度、特異度ともにより高い精度が求められる。また、ワクチン投与後にも継続的に患者の経過観察を行う必要があるため、再現性の高さも求められる。

10

【0015】

本発明者らは、鋭意検討のすえ、種々の試薬のうち検体希釈液の組成が感度、特異度の点で重要であることを見出した。特に、検体希釈液の組成の中でも水溶性高分子の種類と濃度が感度、特異度に強く影響することを見出し、本発明を完成した。

【0016】

免疫測定に使用する検体希釈液については、今までも種々の検討がなされてきた。従来から、免疫測定系に含まれる水溶性高分子として、ポリビリルアルコール（以下、PVAと記載することもある。）、ポリビニルピロリドン（以下、PVPと記載することもある。）、ポリエチレングリコールなどが使用されてきた。

20

【0017】

Roddaらは、免疫測定の際のブロッキング剤として、0.5% (w/v) PVAが、通常用いられているブロッキング剤に比べて、著しく非特異的結合を抑制することを示している（非特許文献5）。また、Studentsovらは、PVA-50（分子量50,000のPVA）とPVP-360（分子量360,000のPVP）を添加すると、ELISAの感度と特異度が上がることを報告している。特に、PVA-50をブロッキング溶液に添加することにより非特異的結合を減少させることを報告している。さらに、PVA-50は、0.5%で使用するとブロッキング効果が最大であり、PVP-360は、0.8%が至適濃度であることが記載されている（非特許文献6）。

30

【0018】

本発明者らのグループは、ワクチン投与前の患者の抗体価の測定をマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイによって行っている。マルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイは、感度よく測定できるだけでなく、複数のペプチドに対する抗体価を1つのウェルで同時に測定することができるため、少量の患者検体で測定が可能であり、検査に要する時間も短縮できる。

【0019】

マルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイによって測定する系においても、PVAとPVPを添加することが検討され開示されている（非特許文献7、8）。非特許文献7には、ヒト血漿中に含まれる抗体が直接ビーズに結合することによって非特異的結合が増加することが記載されている。さらに、非特異的結合を抑制するためには、PVA、PVPとSuper ChemiBlock（登録商標）が有効であることが記載されている。非特許文献7に開示されている方法によれば、PVAを0.5%、PVPを0.8%の濃度で含む検体希釈液によって血漿を希釈後、希釈した検体をブレインキュベーションして使用している。PVA、PVPの効果について検討した結果、PVA、PVPの効果は相加的であり、PVXとして両者を混合して用いればよいことが記載されている。非特許文献8には、0.5% PVAと0.8% PVPを検体希釈液へ添加することによって、非特異的結合が抑制されることが記載されている。抗原に暴露されていない検体においては、0.5% PVAと0.8% PVPを検体希釈液へ添加すると有意に非特異的結合を抑制することが示されている。

40

50

【 0 0 2 0 】

上述のようにこれまでに E L I S A、マルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイ、いずれの免疫測定の場合においても P V A、P V P を検体希釈液に添加することにより非特異的結合を抑制するという効果が示されている。また、その濃度は、P V A は 0 . 5 %、P V P は 0 . 8 %、あるいは、両者を併せ P V X として同等の濃度、すなわち 1 . 3 % 添加するというものであった。

【 0 0 2 1 】

本発明者らも、検体希釈液の組成について検討を重ねたが、先行技術に開示されている濃度で P V A、P V P を用いると、タンパク質では良好な結果が得られるものの、ペプチドを用いた場合には満足いく感度、非特異的結合の抑制を得ることができなかった。上述のようにテラーメイド型ワクチン療法の場合には、ワクチン未感作の状態では抗原提示細胞上に提示されているペプチドに対する非常に低い値の抗体価を測定する必要がある。したがって、従来技術に比べて高い感度が必要だけでなく、ワクチン接種期間を通じ繰り返し測定するので、再現性良く測定できることが必要となる。そのため、先行技術に開示されている条件よりも高い感度、非特異的結合の抑制が要求されていると考えられる。

10

【 0 0 2 2 】

本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、ブロッキング剤として添加する化合物の中でも水溶性高分子である P V A を添加する濃度が非特異的結合を低下させ、感度を増加するために非常に重要であることを見出した。また、その濃度は先行技術に開示されている濃度よりもはるかに低い濃度であった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 2 3 】

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 1 9 8 2 号

【特許文献 2】国際公開第 2 0 0 5 / 1 2 3 1 2 2 号

【特許文献 3】国際公開第 0 3 / 0 2 5 5 6 9 号

【非特許文献】

【 0 0 2 4 】

【非特許文献 1】Homma, S. et al., *Oncol. Rep.* 2007, Vol.18(2), pp.343-346.

30

【非特許文献 2】Rosenberg, S.A. et al., *Nat. Medicine*, 2004, Vol.10(9), pp.909-915.

【非特許文献 3】Yajima, N. et al., *Clin. Cancer Res.* 2005, Vol.11, p.5900-5911.

【非特許文献 4】伊東 恭悟、外 4 名、西日本泌尿、2012年、第74巻、第107-117頁

【非特許文献 5】Rodda, D.J. & Yamazaki, H., *Immunol. Invest.*, 1994, Vol.23(6-7), pp.421-428.

【非特許文献 6】Studentsov, Y.Y. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2002, Vol.40(5), p.1755-1760.

【非特許文献 7】Waterboer, T. et al., *J. Immunol. Methods*, 2006, Vol.309, pp.200-204.

40

【非特許文献 8】Ondigo, B.N. et al., 2012, *Malaria J.*, 11:427.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 5 】

本発明の課題は、非常に低い抗体価の検体であっても精度良く検出し、かつ再現性良く検出することを課題とする。特に、ペプチドワクチンを投与する前のワクチン未感作の状態では、抗原提示細胞上に効率良く提示され得るペプチドを選択するための検査に用いる検体希釈液、及び免疫測定方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 6 】

50

本発明は、以下に示す検体希釈液、及び該検体希釈液を用いた免疫測定方法である。

(1) ポリビニルアルコール (PVA) を $6.67 \times 10^{-6} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有することを特徴とする免疫測定法における試料を希釈するために用いる検体希釈液。

(2) PVA を $1.67 \times 10^{-5} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有することを特徴とする(1)記載の検体希釈液。

(3) 抗ペプチド抗体測定に用いるものであることを特徴とする(1)又は(2)記載の検体希釈液。

(4) 前記試料が血漿、血清、又は血液であることを特徴とする(1)～(3)のいずれか1つ記載の検体希釈液。

10

(5) PVA を $6.67 \times 10^{-6} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有する検体希釈液によって試料を希釈することを特徴とする免疫測定法。

(6) 前記検体希釈液が、PVA を $1.67 \times 10^{-5} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-3} \% (w/v)$ 以下含有するものであることを特徴とする(5)記載の免疫測定法。

(7) (5)又は(6)記載の免疫測定法が、フローサイトメトリーを用いたマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイであることを特徴とする免疫測定法。

(8) 抗ペプチド抗体を測定するものであることを特徴とする(5)～(7)のいずれか1つ記載の免疫測定法。

(9) 前記試料が血漿、血清、又は血液であることを特徴とする(5)～(8)のいずれか1つ記載の免疫測定法。

20

【発明の効果】

【0027】

抗体価の低い試料であっても、高い感度と特異度で再現良く測定することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】抗体価の測定方法の概要を示す図。

【図2】ペプチド非固相ビーズを用いた非特異的結合に関するPVA濃度の検討。

【図3】ペプチド固相ビーズを用いた非特異的結合に関するPVA濃度の検討。

30

【図4】種々のペプチドビーズ、検体を用いた感度に関するPVA濃度の検討。

【図5】感度、特異度に関するPVA濃度の検討。

【図6】検体の希釈倍率の検討結果を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明の検体希釈液には、PVAの他に、非特異的結合を抑制するブロッキング剤として、一般に添加されている化合物を添加することができる。その場合には、マルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイ、あるいはELISAなどの免疫測定法において通常添加する濃度で加えればよい。添加し得るブロッキング剤としては、PVP、ポリエチレングリコール等の水溶性高分子、スキムミルク、ウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、ゼラチンなどのポリペプチド、Tween 20、Triton X-100などの界面活性剤を添加することが可能である。また、市販のブロッキング剤であるBlock Ace (登録商標)、Chemiblock (登録商標)などを添加してもよい。

40

【0030】

さらに、pH、及びイオン環境を適正に保つために、緩衝液を用いることが好ましい。用いる緩衝液としては、通常免疫アッセイで用いられているTBS、PBSなどを用いることができる。また、溶液の保存性を良くするために、0.05% (w/v) 程度のアジ化ナトリウムを添加してもよい。

【0031】

50

テーラーメイド型ワクチン治療において、抗体価を測定する際に用いる試料としては、血漿、血清試料を用いている。この治療法においては、治療前、治療中とペプチドに対する抗体価を測定する必要がある。試料を保存する場合には、凍結して保存しておけばよい。また、本発明を一般的な免疫測定に応用することも可能であるが、その場合には血液由来の試料だけではなく、どのような試料を用いてもよいことは言うまでもない。

【0032】

本発明は、ペプチドワクチンを接種する前の検査の際に用いる検体希釈液として開発されたが、感度よく、また、非特異的結合を抑制することができるので、これにとどまらず、ペプチドワクチン接種後の抗体価の検査や通常の検査などあらゆる免疫測定法で用いることができる。

10

【0033】

本発明では、抗体価の測定はフローサイトメトリーを用いたマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイによって行っているが、抗体価を測定することができればどのような免疫測定法を用いてもよい。このような免疫測定法としては、フローサイトメトリー、ELISA、RIAなどがある。

【0034】

本発明においては、PVAとして分子量30,000~70,000のものを使用しているが、より分子量の低いものも用いることができる。また、PVPを加える場合には、PVP360(分子量360,000のもの)を使用しているが、分子量40,000程度までの低分子のものを用いることができる。いずれの分子量のものを用いても、同等の濃度を使用することにより、高い感度と特異的結合を得ることができる。

20

【0035】

[抗体価の測定方法]

本発明では、多数のペプチドに対する抗体価を測定するためフローサイトメトリー法を原理としたマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイによって、抗体価を測定している。測定方法についてまず概説する(図1)。ここでは、蛍光フローサイトメトリーシステムであるLuminex(登録商標)システムを用いているが、どのような方法を用いて解析してもよい。

【0036】

まず、識別可能な複数種のビーズに、それぞれ別種のペプチドを固相化する。ビーズに着色された2種類の蛍光色素の組み合わせを検出することによってビーズを識別し、その表面に固相化したペプチドを特定することができる。このペプチド固相化ビーズに、患者から得た検体を本発明の検体希釈液で希釈し反応させる(図1、インキュベーション)。患者検体にペプチドを認識する抗体が含まれていれば、ペプチドと特異的に結合する。通常、希釈検体としては、患者血漿を検体希釈液で100倍希釈して用いているが、MFI(Median Fluorescence Intensity、中央値蛍光強度)に応じて適宜調整して測定することができる。

30

【0037】

次に、患者検体中に含まれるペプチド認識抗体に対して二次抗体を結合させる(図1、二次抗体、標識インキュベーション)。具体的には抗ヒトIgG抗体を二次抗体として用い、患者由来のペプチド認識抗体に結合させる。ここでは、二次抗体はビオチン化されたものを用い、蛍光標識されているストレプトアビジンを結合させることにより検出を行っている。ビーズ由来の蛍光から担体に結合しているペプチドを識別し、ストレプトアビジンを標識している蛍光から各ペプチドに対する患者検体の反応性を解析することができる。

40

【0038】

ここでは、二次抗体はビオチンを標識として用い、ビオチン-ストレプトアビジンの系により検出を行っているが、免疫測定法で使用されるどのようなアッセイ系を用いて検出してもよい。例えば、直接蛍光標識した二次抗体を使用してもよいし、二次抗体を認識する抗体を蛍光標識して用いても良い。また、蛍光標識は、担体である固相の検出波長と異

50

なるものであればどのようなものを用いてもよい。

【0039】

また、図1には示していないが、希釈検体と固相化担体とのインキュベーション等、各工程の後には、未結合の検体等を除去するために、洗浄液によって洗浄を行う。洗浄液は免疫測定法において、一般的に使用しているものを用いることができる。例えば、PBS、TBSといった生理的塩濃度に近い塩を含んだ緩衝液に、Tween 20、Triton X-100のような界面活性剤を0.01~0.1% (w/v) 程度含んだものを好ましく用いることができる。

【0040】

[PVA、PVP濃度の検討]

本発明者らは、希釈検体とペプチド固相化担体をインキュベーションする工程において、検体が固相に非特異的に結合することが測定の際にバックグラウンドを高め、感度を下げる要因であることを明らかにした。そこで、検体希釈液の組成の検討を行った。検体希釈液には水溶性高分子、界面活性剤、タンパク質を含んだブロッキング剤、緩衝液を組成として含んでいた。検討を行った結果、界面活性剤の種類や濃度、ブロッキング剤や緩衝液の種類によって、非特異的結合や感度が大きく変化することはなかった。しかしながら、水溶性高分子であるPVAの濃度が、非特異的結合と感度に、PVPの濃度が反応性の増強に影響することが明らかとなった。特に、PVA濃度が低濃度の抗体価測定において非常に重要であることが明らかとなった。以下、結果を示しながら、詳細に説明する。

【0041】

従来は、上述のように水溶性高分子としてPVAは0.5% (w/v)、PVPは0.8% (w/v)、あるいはPVXとして1.3% (w/v) の濃度で免疫測定を行うことによって、非特異的結合を抑制し、感度を増強することが報告されていた(非特許文献6~8)。発明者らの検討においても、タンパク質に対する抗体の測定では、このPVA濃度での有用性が示されていた。そこで、2.0% (w/v) Block Ace (DSファーマバイオメディカル社製)、0.05% (w/v) Tween 20 (MP Biomedicals社製) に0.5% (w/v) PVA、0.8% PVP (w/v) を含む検体希釈液を用いて免疫前の患者検体の解析を行ったが、感度が低く、測定値が安定しなかった。そこで、検体希釈液の組成として含まれる界面活性剤、ブロッキング剤、水溶性高分子の種類や濃度について検討した。その結果、水溶性高分子が測定系の感度、特異度に最も影響を与えることが明らかになったので検体希釈液中の水溶性高分子の組成を種々検討した。なお、特に断りのない限り、以下のPVA、PVPの濃度は% (w/v) で示している。

【0042】

PVPは、非特許文献6に記載されているように反応性を上げる効果があることがわかった。ここでは結果は示さないが、PBS、0.05% Tween 20、あるいは2.0% Block Ace、0.05% Tween 20にPVPを0、0.008、0.08、0.8%濃度で添加してマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイを行ったところ、どちらの系でも濃度依存的に反応の増強が見られた。一方、非特異反応の上昇も見られることから、PVPを添加する場合には、0.8%よりも低い濃度で添加するのが好ましい。また、十分に反応性を得ることができ反応の増強を必要としない試料であれば、PVPを添加しなくてもよい。

【0043】

測定系の感度と非特異的結合には、PVP以上にPVAの影響が大きいことが明らかになった。そこで、検体希釈液に含まれるPVAの濃度を順次希釈した検体希釈液を用い、水溶性高分子濃度の至適条件を求めた。

【0044】

まず、コントロールとして用いるペプチドを固相化していないビーズ(非固相ビーズ、図1のCtrl(コントロール)ビーズ)を用い非特異反応を抑制するPVAの濃度を検討した。0.5% PVAから、順次PVAを希釈した検体希釈液を調製した。PVA濃度の

10

20

30

40

50

み異なる検体希釈液で、市販のヒト精製 IgG (MP Biomedicals 社製)、健常人血漿 (検体 A、検体 B) を 100 倍希釈して用いた。市販のヒト精製 IgG、健常人血清、及び検体希釈液のみ (検体なし) でビーズをインキュベートし、二次抗体、標識と反応させ、蛍光測定を行った。

【0045】

図 2 に示すように、検体によって非固相ビーズに非特異的に結合する抗体の量は異なるものの、PVA 濃度が $6.67 \times 10^{-6} \%$ を境に急激に非特異的結合が増加することが明らかとなった。また、例えば検体 A のように、検体によっては $1.67 \times 10^{-5} \%$ の濃度から、非特異的結合が生じる検体も存在する。したがって、ビーズへの非特異的な結合を回避するためには、PVA 濃度は $6.67 \times 10^{-6} \%$ 以上であることが好ましく、 $1.67 \times 10^{-5} \%$ 以上であることがより好ましいと判断した。

10

【0046】

次に、ペプチドを固相化したビーズを用いて非特異的結合が生じる PVA 濃度の検討を行った。上記と同様に、ヒト精製 IgG を PVA 濃度の異なる検体希釈液で希釈し、測定を行った。図 3 の結果は、ペプチド - 11 (AYDFLYNYL; 配列番号 1) を用いて解析を行った結果であるが、他のペプチドで測定した場合も同様の結果であった。

【0047】

図 3 に示すように、PVA 濃度は $6.67 \times 10^{-6} \%$ よりも低い濃度では急激に非特異的結合が増加した。したがって、PVA 濃度は $6.67 \times 10^{-6} \%$ 以上の濃度で用いるべきだと結論付けた。 $6.67 \times 10^{-6} \%$ 濃度の PVA というのは、今まで先行技術文献で推奨されていた 0.5% PVA という濃度に比べ、 $1/100,000$ 以下の濃度であり、はるかに低い濃度である。

20

【0048】

次に、PVA 濃度の高い領域について、ペプチドを固相化したビーズとヒト血漿検体を用いて検討を行った。ペプチド固相化ビーズを用いた場合には、検体によって程度は異なるものの PVA が高濃度の場合に反応性の下がる場合があった。ペプチド - 10 (DYSA R W N E I; 配列番号 2) 固相化ビーズと健常人血漿 (検体 B)、ペプチド - 1 (DYV R E H K D N I; 配列番号 3) 固相化ビーズとヒト精製 IgG、ペプチド - 9 (R Y L T Q E T N K V; 配列番号 4) 固相化ビーズと健常人血漿 (検体 A) の解析結果を示す (図 4)。

30

【0049】

用いた検体とビーズの組合せによって、反応性の低下が見られる PVA の濃度は異なっていた。例えば、ペプチド - 10 固相化ビーズと検体 B の組合せ (図 4 上) では、 $3.13 \times 10^{-2} \%$ よりも高い PVA 濃度の領域では検体との反応性の低下が見られたのに対し、ペプチド - 1 固相化ビーズとヒト精製 IgG (図 4 中央) の組合せでは、 $2.50 \times 10^{-2} \%$ 、ペプチド - 9 固相化ビーズと検体 A (図 4 下) の場合には、 $6.25 \times 10^{-3} \%$ より高濃度の PVA を含む検体希釈液で希釈した場合に反応性の低下が観察された。また、反応性の低下が生じる PVA 濃度は検体とビーズの組合せによるが、いずれの場合でも PVA が 0.13% 以上の高濃度では測定毎の誤差、ばらつきが大きく再現性に乏しかった。

40

【0050】

患者検体やペプチドによって反応性は異なるものの、上記結果から検体希釈液に添加する PVA は高濃度領域では感度の点で種々の問題が生じることが明らかとなった。すなわち、PVA が 0.13% より高濃度では、測定誤差が大きくなることから好ましくない。また、検体とビーズの組合せによっては、 $6.25 \times 10^{-3} \%$ より高濃度で感度の低下が見られる場合があった。したがって、PVA 濃度は、0.13% 以下の濃度であることが好ましく、 $6.25 \times 10^{-3} \%$ 以下の濃度であることがより好ましい。

【0051】

【表 1】

PVA(%)	特異度 (バックグラウンド)	感度 (反応性)	備考
1	NT	×	感度低下、不安定さ
0.5	○	×	感度低下、不安定さ
0.25	○	×	感度低下、不安定さ
0.13	○	△	不安定さ
6.25E-02	○	△	
3.13E-02	○	△	
2.50E-02	○	△	
6.25E-03	○	○	
1.56E-03	○	○	
3.91E-04	○	○	
1.95E-04	○	○	
1.67E-04	○	○	
6.67E-05	○	○	
3.33E-05	○	○	
1.67E-05	○	○	
6.67E-06	△	○	
1.33E-06	×	○	バックグラウンド上昇
2.67E-07	×	○	バックグラウンド上昇
5.33E-08	×	○	バックグラウンド上昇
0	×	○	バックグラウンド上昇

10

20

【0052】

表 1 に種々の PVA 濃度を含む検体希釈液を用いた際の、特異度、感度の結果をまとめた。表中 ○ は良、× は不適、△ はやや不適を示し、NT は検査を行わなかったことを示す。不安定さは測定値がばらつき、再現性が低かったことを示す。検体希釈液に含有する PVA 濃度は特異度の観点からは、0.5% 以下であることが好ましく、 6.67×10^{-6} % 以上の濃度であることが好ましい。さらに、 1.67×10^{-5} % 以上の濃度であることがより好ましい。また、感度の面からは、0.13% 以下の PVA 濃度が好ましく、 6.25×10^{-3} 以下であることがより好ましい。

30

【0053】

次に、感度だけではなく特異度に対する PVA の効果を解析した。ペプチドワクチン接種前の血清を用い、競合阻害試験を行い、PVA 濃度による特異度、及び感度の解析を行った(図 5)。

40

【0054】

ペプチド - 9 固相化ビーズを用い、競合阻害なし(-)、ペプチド - 9 による競合阻害あり(+)の条件で、ワクチン接種前の 2 種の異なる検体(C)、(D)を用いて蛍光強度により解析を行った。競合阻害なしの実験条件は感度を、競合阻害ありの実験条件は特異度を示す。なお、蛍光強度は、ペプチドワクチン接種後には数万 FI を示すことから、どちらの試料も非常に低い値で測定し判定している。また、FI が 5 より小さい場合には陰性と判断し、5 以上の試料を陽性と判断している。

【0055】

まず、感度について検討すると、図 5 に示すように、PVA 濃度 0.5% と比較すると

50

PVA濃度が低い方が感度の増強が観察された。特に検体D(図5下)に示す試料では、PVA0.5%ではFIが検出限界以下であったが、 6.25×10^{-3} 、 3.33×10^{-5} %では蛍光強度が夫々6FI、10FIを示し、陽性と判断することができた。

【0056】

特異度について検討すると、検体C(図5上)に示す試料では、0.5、 6.25×10^{-3} 、 3.33×10^{-5} %PVA濃度での阻害率(%)が、夫々70、78、95%、検体D(図5下)に示す試料では、夫々N/A(算出不能)、100、80%であった。 6.25×10^{-3} 、 3.33×10^{-5} %PVA濃度での阻害率(%)はいずれの試料でも80%以上であり、特異度も十分に高いことが明らかである。ペプチドによる競合阻害試験による結果においても、PVAが 6.25×10^{-3} %以下の濃度であれば、特異度、感度ともに良好な結果が得られることが明らかとなった。

10

【0057】

上記検討結果から、特異度、感度の双方から好ましいPVA濃度は、 6.67×10^{-6} %以上、0.13%以下の濃度であり、さらに、再現性の観点を考えると、0.13%PVAでは測定値がばらつき再現性が乏しかったことから、 6.25×10^{-2} %以下の濃度であることが好ましい。さらに、 1.67×10^{-5} %以上、 6.25×10^{-3} %以下の濃度であれば、ペプチド、検体の組み合わせによらず特異度、感度ともに良好な結果が得られることからより好ましい。

【0058】

PVA単独だけではなく、PVP単独、PVX(PVAとPVPとの併用)についても同様に非特異的結合、感度について検討を行った。ここでは結果を示さないが、今まで報告されていた結果とは異なり、PVPは反応性を増強するもののあまり非特異的結合を抑制する効果はなく、PVAはバックグラウンドを下げ、反応性を増強させるという効果があることが明らかとなった。したがって、上記濃度範囲内のPVAを加えたうえで、感度の増強が必要な場合には適宜PVPを加えることがより好ましい。

20

【0059】

次に検体希釈倍率について検討を行った(図6)。上記と同様にしてペプチド固相化ビーズに検体を反応させ、蛍光強度の測定を行った。ペプチド-3(DYLRSLVLEDF; 配列番号5)固相化ビーズと健常人血漿である検体B、あるいは、ペプチド-5(NYSVRYRPGI; 配列番号6)固相化ビーズと健常人血漿である検体Eの組合せで検討を行った。用いた検体希釈液はPVAを 3.33×10^{-5} %含むものを用いている。検体希釈液によって、各検体を25、50、100、200倍に希釈し、蛍光強度を測定した。

30

【0060】

いずれの組合せでも、検体希釈倍率は50~200倍で直線性が認められた。また、25倍の希釈倍率では蛍光強度が下がる傾向にあり、反応性が低下していると考えられた。したがって、検体は直線性の認められる範囲、すなわち50~200倍で希釈することが好ましく、直線性の認められる中央付近である100~150倍に希釈することがより好ましい。検体によって測定値である蛍光強度が異なることから、上記範囲で測定誤差が少ないように検体を適宜検体希釈液によって希釈して用いればよい。

40

【0061】

また、本発明の方法ではPVAやPVPを従来に比べ低濃度で用いることから、マルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイにより測定した場合であっても、多くの検体を安定して測定することができる。PVA、PVPは高分子ポリマーであることから、高濃度では溶液に粘性を与える。そのため、従来の濃度でPVA、PVPを用いた場合には、微細な管を通して固相ビーズ上の蛍光強度を測定するマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイでは、多検体測定時には液詰まりや流速の低下が生じ、測定結果に影響を与えていた。本発明の濃度範囲で調整した検体希釈液を用いて測定することにより流速の低下等が生じることなく、安定して測定を行うことができた。

【産業上の利用可能性】

50

【0062】

本発明の検体希釈液を用いることによって、抗体価の低い検体であっても、特異度高く、感度良く、また再現性良く測定を行うことができる。

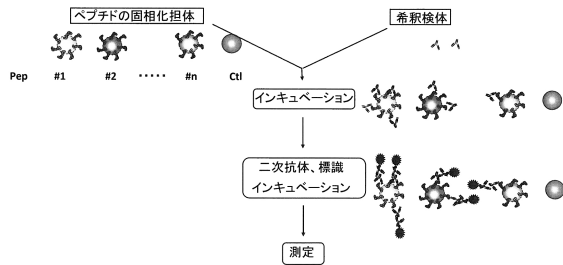
【要約】 (修正有)

【課題】抗体価の非常に低い検体であっても精度良く検出し、かつ再現良く検出することを課題とする。

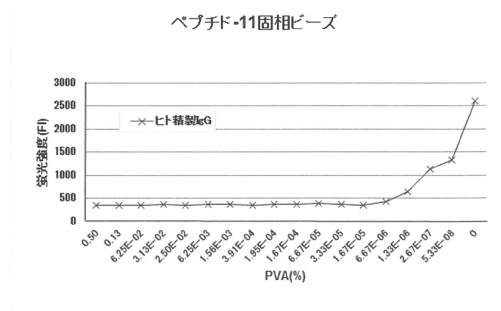
【解決手段】試料を希釈する検体希釈液にポリビニルアルコール(PVA)を $6.67 \times 10^{-6} \% (w/v)$ 以上 $6.25 \times 10^{-2} \% (w/v)$ 以下含有することにより、感度、特異度の高いアッセイ系を構築することができる。

【選択図】図3

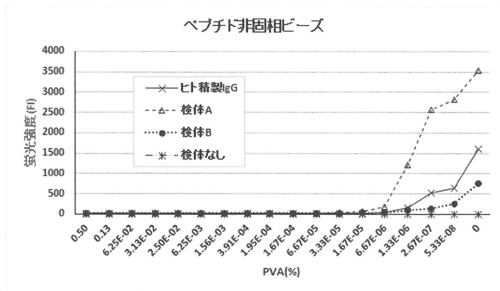
【図1】



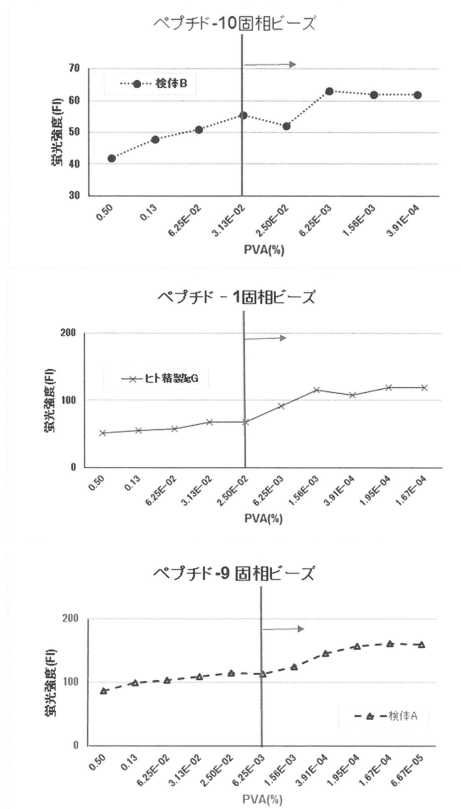
【図3】



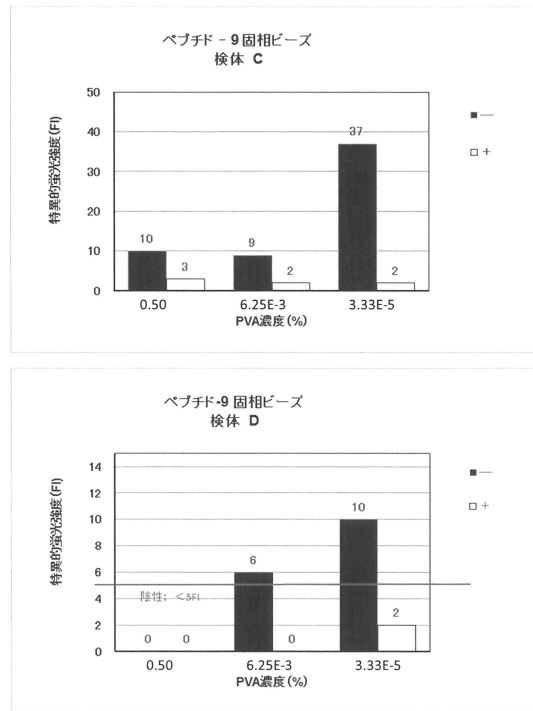
【図2】



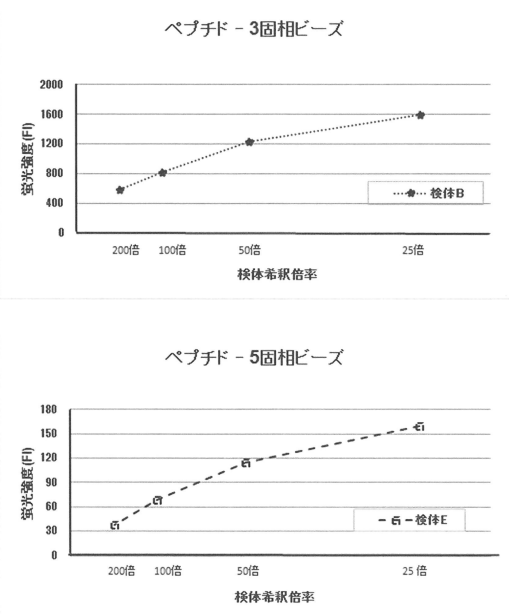
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

0006142384000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 山田 崇
福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオインキュベーションセンター402号 株式会社グ
リーンペプタイト内

審査官 渡邊 吉喜

(56)参考文献 特開平04-213058(JP,A)
特開2008-215894(JP,A)
特表2009-544013(JP,A)
特開平01-148962(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0224770(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	用于抗体测试的试剂		
公开(公告)号	JP6142384B1	公开(公告)日	2017-06-07
申请号	JP2016179574	申请日	2016-09-14
当前申请(专利权)人(译)	有限公司GreenPeptide		
[标]发明人	渡部典子 山口宗親 山田崇		
发明人	渡部 典子 山口 宗親 山田 崇		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N		
代理人(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2018044850A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：检测并准确检测具有非常低的抗体滴度的样本，具有高精度。的聚乙烯醇 (PVA) 和 6.67×10 在样品稀释缓冲液，试样的稀释 -6 % (W / V) 以上 6.25×10^{-2} % (w / v) 或更少，可以构建具有高灵敏度和特异性的测定系统。点域

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B1)	(11) 特許番号 特許第6142384号 (P6142384)
(45) 発行日 平成29年6月7日 (2017.6.7)	(24) 登録日 平成29年5月19日 (2017.5.19)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)	F I G01N 33/53 ZNA.N	
請求項の数 9 (全 15 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-179574 (P2016-179574)	(73) 特許権者 304058240 株式会社グリーンペプタイド 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡ハイオインキュベーションセンター402号	
(22) 出願日 平成28年9月14日 (2016.9.14)	(74) 代理人 100179431 弁理士 白形 由美子	
審査請求日 平成28年10月13日 (2016.10.13)	(72) 発明者 渡部 典子 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡ハイオインキュベーションセンター402号 株式会社グリーンペプタイド内	
早期審査対象出願	(72) 発明者 山口 宗親 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡ハイオインキュベーションセンター402号 株式会社グリーンペプタイド内	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】抗体検査用試薬		