

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/012944

発行日 平成21年12月17日(2009.12.17)

(43) 国際公開日 **平成20年1月31日(2008.1.31)**

(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 D
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545	B
	GO 1 N 33/543	5 8 1 C

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

出願番号	特願2008-526677 (P2008-526677)	(71) 出願人	390037327 積水メディカル株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/000785		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(22) 国際出願日	平成19年7月23日(2007.7.23)	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(11) 特許番号	特許第4176826号 (P4176826)		
(45) 特許公報発行日	平成20年11月5日(2008.11.5)	(72) 発明者	吉田 忠晃 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番1号 積水メディカル株式会社つくば研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2006-200558 (P2006-200558)	(72) 発明者	高橋 弘至 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番1号 積水メディカル株式会社つくば研究所内
(32) 優先日	平成18年7月24日(2006.7.24)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬

(57) 【要約】

試料中のリガンドを低濃度域から高濃度域まで高感度かつ広範囲に測定できると同時に、良好な測定再現性能を有する凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬の提供を課題とする。

リガンドを担持した不溶性担体粒子と遊離状の特異的レセプターに加え、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なる特異的レセプターを担持させた不溶性担体粒子を用いる凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二箇所以上のレセプター結合部位を有する測定対象リガンドを含む試料と、下記 (A) ~ (C)

(A) 予めりガンド又はリガンド様物質を担持した不溶性担体粒子

(B) 前記リガンドに特異的に反応する遊離状レセプター

(C) 前記リガンドに特異的に反応し、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターを担持した不溶性担体粒子

とを混合し、試料中の測定対象リガンド量に応じた粒子の凝集阻止反応を測定することを特徴とする凝集阻害測定法。

10

【請求項 2】

不溶性担体粒子がラテックス粒子である請求項 1 に記載の凝集阻害測定法。

【請求項 3】

レセプターが抗体又はそれらの機能性部位を含む断片であり、リガンドが抗原であり、レセプターとリガンドとの免疫反応に基づき、粒子の凝集阻止反応を測定する請求項 1 又は 2 に記載の凝集阻害測定法。

【請求項 4】

遊離状レセプター及び不溶性担体粒子に担持されたレセプターが、いずれもモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の凝集阻害測定法。

【請求項 5】

測定対象リガンドが、ヒトアルブミン、レセプターが、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の凝集阻害測定法。

20

【請求項 6】

レセプターを担持する不溶性担体粒子の平均粒子径が、リガンド又はリガンド様物質を担持する不溶性担体粒子の平均粒子径の $1/2 \sim 1/10$ である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の凝集阻害測定法。

【請求項 7】

下記 (A) ~ (C) を含み、試料中の測定対象リガンド量に応じた粒子の凝集阻止反応を測定することを特徴とする凝集阻害測定用試薬。

(A) 予めりガンド又はリガンド様物質を担持した不溶性担体粒子

(B) 前記リガンドに特異的に反応する遊離状レセプター

(C) 前記リガンドに特異的に反応し、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターを担持した不溶性担体粒子

30

【請求項 8】

不溶性担体粒子が、ラテックス粒子である請求項 7 に記載の凝集阻害測定用試薬。

【請求項 9】

レセプターが、抗体又はそれらの機能性部位を含む断片であり、リガンドが抗原であり、レセプターとリガンドとの免疫反応に基づき、粒子の凝集阻止反応を測定するための請求項 7 又は 8 に記載の凝集阻害測定用試薬。

【請求項 10】

遊離状レセプター及びリガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターが、いずれもモノクローナル抗体である請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の凝集阻害測定用試薬。

40

【請求項 11】

レセプターを担持する不溶性担体粒子の平均粒子径が、リガンド又はリガンド様物質を担持する不溶性担体粒子の平均粒子径の $1/2 \sim 1/10$ である請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の凝集阻害測定用試薬。

【請求項 12】

測定対象リガンドが、ヒトアルブミン、レセプターが、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体である請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の凝集阻害測定用試薬。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の測定対象となるリガンドを、(担体)粒子の凝集阻止反応を利用して測定する方法及びそれに用いる試薬に関する。特に、予めリガンドを担持した不溶性担体粒子、リガンド特異的な遊離状のレセプター、及びリガンド特異的なレセプターを担持した不溶性担体粒子による凝集の形成が、サンプル中のリガンドによって阻害される凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

不溶性担体粒子を利用して粒子の凝集又は凝集阻害を生起させ、リガンドを定性、定量する測定法は、簡易かつ高感度であることから、抗原抗体間の免疫反応や相補性塩基鎖間の結合反応などのリガンド-レセプター反応原理を利用した各種測定試薬が開発されている。

凝集法は、レセプターを感作した担体粒子が測定対象リガンドを介した架橋反応で凝集する度合いを測定する方法であり、微量物質の高感度測定の必要性を背景として、多くの測定項目について実用化されている。

一方、凝集阻害法は、予めリガンド又はリガンド様物質を感作した担体粒子とレセプターによる凝集が測定対象であるリガンドによって阻止される割合を測定する方法であり、凝集法では特殊なりガンドを除き2種類以上の特異的レセプターが必須であるのに対して、凝集阻害法は1種類の特異的レセプターがあれば測定系を構築できることが大きな特徴である。

さらに、免疫反応に関していえば、凝集阻害法には地帯現象(抗原過剰による見かけ上の反応低下現象)が起こらないという利点があるものの、現在までの適用は、ハプテンのような低分子リガンドすなわち2種類以上のレセプターが利用できないリガンドを測定対象としているケースがほとんどである。

【0003】

凝集阻害法の適用が限定されている理由として、凝集法と比較して測定濃度範囲の調整が難しいという点が挙げられる。凝集法においては、リガンド量に比例して凝集が進行するため、例えばラテックス免疫凝集法に関する特許文献1に示されるように、高濃度域の感度上昇を増強するだけで容易に測定範囲を拡大できる。

一方、リガンド量に比例して凝集阻止反応が進行する凝集阻害法の測定範囲に関しては、リガンド高濃度域の測定上限値は、基本的には初期凝集(リガンド量ゼロ時の凝集)の大きさに依存し、リガンド低濃度域の測定下限値は、凝集阻止反応の感受性に依存するため、二つの要因を複合的に考慮する必要がある。

【0004】

凝集阻害法の初期凝集を増強する方法として、例えば、特許文献2に記載の方法では、ハプテンの測定において非特異的な凝集促進物質を利用する方法が提示されている。本方法により高濃度域までリガンドの測定が可能となり測定上限値を拡張できるものの、リガンドとレセプター間の特異反応に関係のない凝集増強であるため凝集阻止反応に対する感受性が低下し、結果として低濃度域の検出能は著しく悪化する。

【0005】

また、特許文献3には単一のモノクローナル抗体感作担体と抗原感作担体を利用する凝集阻害法が示されている。本方法ではリガンドとレセプターをそれぞれ担持した担体粒子を利用して、光学的に感度の変化量を増強することで、凝集阻止反応に対する感受性を損なわずに低濃度域の検出能を向上している。しかしながら、該方法は抗原と抗体間の反応自体が増強されるわけではないため、測定範囲を拡張するような効果は認められない。同じく特許文献4に提案される抗原感作ラテックス、抗体及び抗体に特異的なレセプターを利用する凝集阻害法は、抗原と抗体、抗体とレセプターの特異反応のみで凝集を増強しているため、従来法と比較すると測定範囲の拡張が達成される。しかしながら実施例でレセ

10

20

30

40

50

プターとして示されているプロテインAは抗体(IgG)全般に反応性を有するため、IgGを含有する血清や血漿といった試料の測定には不向きであり、抗マウスIgGラットモノクローナル抗体に関しても、一般的に利用される素材ではないため入手が困難なケースも考えられる。また測定原理自体が抗原-抗体、抗体-レセプターという二相性の反応を介しているため、測定機器、方法によっては性能が不良となる可能性も考えられる。

【0006】

上記に示したように、初期凝集は強く、同時に凝集阻止反応への感受性も高いという相反する特性を兼ね備えた凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬は未だ確立されておらず、これまでの測定法では通常のリガンド、例えば2箇所以上のレセプター結合部位を有するようなりガンドを高感度かつ広範囲に再現性良く測定することは困難な状況にあった。 10

【特許文献1】特開2004-191332号公報

【特許文献2】特公平05-000665号公報

【特許文献3】特開昭59-173760号公報

【特許文献4】特開2001-337092号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、上記従来技術の問題点を解決するためのものであって、試料中のリガンドを低濃度域から高濃度域まで高感度かつ広範囲に測定できると同時に、良好な測定再現性能を有する凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬の提供を課題とする。 20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、凝集阻害測定法について鋭意検討を行ったところ、リガンドを担持した不溶性担体粒子と遊離状の特異的レセプターに加え、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なる特異的レセプターを担持させた不溶性担体粒子を用いることで、凝集阻止反応への感受性を保持したまま初期凝集を増強でき、リガンド低濃度域から高濃度域まで予想外に高感度かつ広範囲に測定でき、良好な測定再現性能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の構成を有する。

(1) 二箇所以上のレセプター結合部位を有する測定対象リガンドを含む試料と、下記 (30 A) ~ (C)、

(A) 予めりガンド又はリガンド様物質を担持した不溶性担体粒子

(B) 前記リガンドに特異的に反応する遊離状レセプター

(C) 前記リガンドに特異的に反応し、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターを担持した不溶性担体粒子

とを混合し、試料中の測定対象リガンド量に応じた粒子の凝集阻止反応を測定することを特徴とする凝集阻害測定法。

(2) 不溶性担体粒子がラテックス粒子である上記(1)に記載の凝集阻害測定法。

(3) レセプターが抗体又はそれらの機能性部位を含む断片であり、リガンドが抗原であり、レセプターとリガンドとの免疫反応に基づき、粒子の凝集阻止反応を測定する上記 (40 1) 又は(2)に記載の凝集阻害測定法。

(4) 遊離状レセプター及び不溶性担体粒子に担持されたレセプターが、いずれもモノクローナル抗体である上記(1)~(3)のいずれかに記載の凝集阻害測定法。

(5) 測定対象リガンドが、ヒトアルブミン、レセプターが、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体である上記(1)~(4)のいずれかに記載の凝集阻害測定法。

(6) レセプターを担持する不溶性担体粒子の平均粒子径が、リガンド又はリガンド様物質を担持する不溶性担体粒子の平均粒子径の $1/2 \sim 1/10$ である上記(1)~(5)のいずれかに記載の凝集阻害測定法。

(7) 下記(A)~(C)を含み、試料中の測定対象リガンド量に応じた粒子の凝集阻止反応を測定することを特徴とする凝集阻害測定用試薬。

- (A) 予めりガンド又はリガンド様物質を担持した不溶性担体粒子
 (B) 前記リガンドに特異的に反応する遊離状レセプター
 (C) 前記リガンドに特異的に反応し、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターを担持した不溶性担体粒子
 (8) 不溶性担体粒子が、ラテックス粒子である上記(7)に記載の凝集阻害測定用試薬

。(9) レセプターが、抗体又はそれらの機能性部位を含む断片であり、リガンドが抗原であり、レセプターとリガンドとの免疫反応に基づき、粒子の凝集阻止反応を測定するための上記(7)又は(8)に記載の凝集阻害測定用試薬。

(10) 遊離状レセプター及びリガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターが、いずれもモノクローナル抗体である上記(7)～(9)のいずれかに記載の凝集阻害測定用試薬。 10

(11) レセプターを担持する不溶性担体粒子の平均粒子径が、リガンド又はリガンド様物質を担持する不溶性担体粒子の平均粒子径の $1/2 \sim 1/10$ である上記(7)～(10)のいずれかに記載の凝集阻害測定用試薬。

(12) 測定対象リガンドが、ヒトアルブミン、レセプターが、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体である上記(7)～(11)のいずれかに記載の凝集阻害測定用試薬。

【発明の効果】

【0009】

本発明の凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬は、測定対象リガンドを低濃度域から高濃度域まで高感度かつ広範囲に測定できると同時に、良好な測定再現性能を有する。特に、免疫反応を利用する場合、地帯現象を発生しないという特徴から異常高値を呈する可能性のあるリガンド測定時には粒子凝集法よりも測定の信頼性が高い。また、本発明のレセプターにモノクローナル抗体を利用した場合には、リガンドが全長でなくてもエピトープが残存していれば凝集阻止反応が起こるため、断片化したリガンドも全長のリガンドと同様に測定できる可能性がある。 20

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(測定対象試料)

本発明の測定対象となるリガンドを含む試料としては、例えばヒト又は動物の血液、血清、血漿、培養上清、尿、髄液、唾液、汗、腹水、又は細胞あるいは組織の抽出液等が挙げられる。 30

【0011】

(リガンド)

本発明の測定対象となるリガンドとしては、二箇所以上のレセプター結合部位を有する物質であれば、いずれも対象とすることができる。具体的には、C反応性タンパク(CRP)、FDP、D-ダイマー、前立腺特異抗原(PSA)、ヘモグロビンA_{1c}、アルブミン、ペプシノーゲンI(PGI)、ペプシノーゲンII(PGII)、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、カテプシン等のタンパク質、その他、ペプチド、糖類、核酸、脂質、高分子薬剤などが挙げられる。理論的には二箇所以上のレセプター結合部位を有するリガンド(リガンドが抗原であれば二箇所以上のエピトープ(抗原決定基)を有するリガンド、例えば二種類以上のモノクローナル抗体を利用したサンドイッチ測定で検出可能なリガンド)は全て測定対象物質として適用可能である。 40

リガンド様物質とは、レセプターとの関係において前記リガンドと同等、同質の反応性(リガンドが抗原であれば抗原性)を有するものをいう。例えば、リガンド(抗原など)を分解して得られる断片、遺伝子操作で得られた組み替えリガンド、リガンド構造が類似した物質(リガンド類縁物質)等があげられる。

【0012】

(レセプター)

本発明で用いるレセプターとしては、測定対象であるリガンドに特異的に結合する物質を用いる。一般的にはウサギ、ヒツジ、ヤギ等に、測定対象のリガンドを免疫して得られる抗リガンドポリクローナル抗体や抗リガンドモノクローナル抗体を用いることができる。その中でも特異性の点からはモノクローナル抗体の使用が特に望ましい。用いる抗体は、常法に従い調製した抗体のフラグメントであってもよい。その他、リガンドの種類によってはレクチン、核酸塩基等も抗体と併用してあるいは単独でレセプターとして用いることができる。

【0013】

本発明で用いるレセプターの種類は、2種類以上であれば特に制限はなく、遊離状レセプターと担体に固定化されるレセプターとは異なるものを用いることを要する。すなわち、遊離状レセプターと担体固定化レセプターとは、リガンド上の結合部位が異なるレセプターであることを要する。すなわち、各レセプターがリガンドとの結合を相互に干渉しないような関係にあるレセプターであればよい。また、遊離状レセプター及び担体固定化レセプターはともにモノクローナル抗体であることが望ましい。本発明では、遊離状レセプターと固定化担体レセプターの両者を組み合わせて用いることにより、初期凝集を促進し、かつ、高濃度域での感度変化をも増大させることができ、測定可能な範囲を拡張することができる。レセプターの種類や含量、存在様式（遊離状態あるいは担体担持状態）はリガンドのレセプター結合部位の数や分析に必要な粒子の凝集度合い、目的とする測定範囲などを考慮して適宜選択することができる。

レセプターとしてモノクローナル抗体を用いる場合、それらの選定は、例えば次のような手順で行われる。

まず、測定対象リガンドを免疫源として調製したモノクローナル抗体とリガンドとの反応性をウエスタンブロット法やELISA法等で確認し、反応性が強い抗体を2種類以上選択する。さらに、選択されたこれらの抗体を組み合わせたときの反応性をサンドイッチELISA法で確認する。このとき、反応性が強ければそれだけ、感度が高く測定範囲を拡張できる可能性が高いため、モノクローナル抗体の組み合わせは、測定対象、要求性能に応じて適宜選択することが望ましい。このようにして得られたモノクローナル抗体の組み合わせを、一方を担体に固定化させた状態で、もう一方を担体に固定化しない遊離の状態、実際の測定系に供し、初期凝集、測定感度、測定範囲、リガンドと類似した構造を有する測定対象外の物質との交差反応性等を考慮していずれの組み合わせが適当か最終的な判断を行う。

【0014】

(担体粒子)

本発明で使用するリガンドあるいはレセプターを担持させる不溶性担体粒子は、特に限定されないが平均粒子径50～1000nmのラテックスが好ましい。ラテックスの材質としては、リガンドあるいはレセプターの担持に適したものなら良く、一般的に用いられるポリスチレンを主成分とするラテックスの他に、スチレン-ブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステル類ポリマーなどが挙げられる。また、金属コロイド、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することもできる。担体粒子に前記リガンド又はリガンド様物質及びレセプターを担持する方法としては、一般的に使用されている物理吸着法のほか化学結合法も採用できる。

【0015】

また、本発明で用いるリガンド及びレセプターをそれぞれ担持する担体粒子は、その材質が同一でも異なってもよい。また、それぞれの担体粒子の粒子径は分析方法や目的に適した粒子径を選択することができるが、本発明の効果を充分発揮するには、レセプターを担持する担体粒子の平均粒子径は、リガンドを担持する担体粒子の平均粒子径の1/2から1/10であることが好ましい。

【0016】

10

20

30

40

50

(緩衝液)

本発明における凝集反応は、緩衝液中で行われ、その緩衝液は、凝集反応が最適に行われる種類、濃度、pHが選択され、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、炭酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッドの緩衝液等を用いる事ができる。その緩衝液の緩衝剤の濃度は、5 mM～500 mM程度で用いられ、pHは中性域から塩基性域で用いられることが多く、通常7.0～9.5の範囲で用いられる。

【0017】

(凝集シグナルの測定方法)

凝集シグナルの測定は、通常凝集阻止反応測定に用いられる方法であればいずれでもよく、吸光度比による評価、粒子数測定、粒子サイズ測定（凝集すればサイズは大きくなる）、散乱光測定や吸収スペクトルの測定（凝集すれば増大もしくはシフトする）など当業者が用いる手段があげられる。さらに、光学的な検出を可能な範囲で電気化学的な検出によって置き換えることも可能である。

【0018】

凝集シグナルの測定は、前記の如く種々の方法があるが、ラテックス粒子と汎用の生化学分析装置を用いる方法が便利である。例えば、測定対象であるリガンドを含む試料に、遊離状のレセプターと別種のレセプターを担持したラテックス、リガンドを担持したラテックス等の不溶性担体粒子を含む試薬を加え、一定温度で一定時間加温し、この間の吸光度を測定し、吸光度の変化量を検出し、予め濃度の判っている標準液を試料とした場合の検量線から被検試料中のリガンドの濃度を算出することができる。ラテックス凝集阻害法では、通常500～900 nmの波長の吸光度が用いられ、反応時の吸光度の変化量を定量に用いるのが一般的である。本発明を利用した測定範囲は、測定対象とするリガンドの種類、レセプターのアビディティ、各レセプターの量比などを考慮して適宜所望の測定範囲に設定できる。例えば、測定対象が尿中アルブミンの場合、臨床検査での使用を考慮すると1 μg/mLから1 mg/mLの範囲が好適であり、後述する実施例のように、本発明により正確に測定することができる。

【0019】

本発明の凝集阻害測定用試薬は、(A) 予めリガンド又はリガンド様物質を担持した不溶性担体粒子、(B) 前記リガンドに特異的に反応する遊離状レセプター、(C) 前記リガンドに特異的に反応し、リガンド上の結合部位が前記遊離状レセプターとは異なるレセプターを担持した不溶性担体粒子を含み、(B)、(C)を含む第一試薬と(A)を含む第二試薬とに分けることが望ましい。

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0020】

凝集阻害測定法による微量アルブミンの測定

(1) レセプター（抗アルブミンモノクローナル抗体）の調製

精製ヒトアルブミン（シグマ社製）100 μgを1回の免疫に使用した。初回免疫は、アルブミンとフロインドの完全アジュバンドを等量混合して調製したエマルジョン200 μLを用い、これをBALB/cマウスの腹腔に注射して行った。追加免疫は、フロインドの不完全アジュバンドを使用して前記と同様に調製したエマルジョン200 μLを用い、2週間の間隔で3回、腹腔注射を繰り返した。

【0021】

マウス眼底静脈より採血した血液中の抗体価を、精製ヒトアルブミンを固相化したELISA法にて測定し、抗体価の高いマウスを選んで細胞融合に供した（なお抗体価の確認方法は後述する培養上清中の抗アルブミン抗体の存在確認方法と同様である）。4回目の免疫から2週間後に、アルブミン100 μgを生理食塩液200 μLに溶解したものをマウス腹腔に注射し、3日後に脾臓を摘出した。該摘出した脾臓をRPMI 1640培地中でほぐした後、1500 rpmで遠心分離して脾細胞を回収した。これを牛胎児血清フリ

一のRPMI 1640培地で3回以上遠心・沈殿による洗浄後、沈殿部に対して15%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地2 mLを加えて懸濁し、脾細胞懸濁液とした。脾細胞とミエローマ細胞SP2/O-AG14を細胞数で6対1の割合で混合した後、50%ポリエチレングリコール存在下で細胞融合させた。1500 rpmの遠心分離で沈殿部を集め、GKN液（グルコース2 g、塩化カリウム0.4 g、塩化ナトリウム8 g、リン酸水素二ナトリウム1.41 g及びリン酸二水素ナトリウム二水和物0.78 gを精製水に溶かして1リットルとしたもの）に懸濁・遠心分離により洗浄後、沈殿部を回収した。該沈殿部を15%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地30 mLに懸濁したものを1ウェルあたり100 μ L分注し、同じウェルに、フィーダー細胞としてBALB/cマウスの胸腺細胞を 2.5×10^6 個/mL含むHAT培地を1ウェルあたり200 μ L分注した。96穴マイクロプレート3枚に分注し、37℃にて5%炭酸ガス培養器中で培養した。

【0022】

培養上清中の抗アルブミン抗体の存在は、精製ヒトアルブミンを固相化したELISA法で確認した。培養10日後に全てのウェルで融合細胞の増殖を確認した。抗アルブミン抗体の存在確認方法の詳細は以下である。

まず、10 μ g/mLのアルブミン及び150 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.2；以下、PBSと略す）100 μ Lを96穴マイクロプレートに分注し、4℃で1晩放置した。次にこれを0.05% Tween 20及び1%牛血清アルブミンを含むPBS 300 μ Lで3回洗浄した後、培養を行った3枚の96穴マイクロプレート各ウェルの培養上清を50 μ L/ウェル加え室温で1時間放置した。その後、0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（第一化学薬品社製）を50 μ L/ウェル加え、室温で1時間放置した。これを0.5% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、0.2% オルトフェニレンジアミン及び0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液（pH 5）50 μ L/ウェルを加え、室温で15分間放置後、4.5 N硫酸50 μ L/ウェルを加えて反応を停止させ、波長492 nmにおける吸光度を測定した。測定の結果、吸光度の高いウェルを抗アルブミン抗体の存在する（即ち、抗アルブミン抗体産生融合細胞の存在する）ウェル（陽性ウェル）として選択した。

【0023】

単クローン化は限界希釈法で行った。すなわちフィーダー細胞としてBALB/cマウスの胸腺細胞を1ウェルあたり 10^6 個ずつ分注した96穴マイクロプレートに、陽性ウェル中の融合細胞を10個/mLとなるように希釈したものを0.1 mLずつ分注した。培地は、初回はHT培地を、2回目以降は15%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地を用い、37℃にて5%炭酸ガス培養器中で10日間培養した。前記した、精製ヒトアルブミンを固相化したELISA法による陽性ウェルの選択及び限界希釈法による単クローン化操作を各3回繰り返して30種の抗アルブミンモノクローナル抗体産生細胞を得た。各細胞の約 10^5 個をプリスタン前処理したマウス腹腔に投与し、生成した腹水をそれぞれ採取した。採取した各腹水から遠心分離により不溶物を除去し、等量の飽和硫酸液を加え、攪拌しながら1晩放置後、遠心分離で沈殿を回収した。回収した沈殿を20 mMトリス緩衝液（pH 8）に溶解し、同緩衝液で透析した。透析内容物それぞれを同緩衝液で平衡化したDEAEセファロースカラムに別個に吸着させた後、それぞれ同緩衝液中の塩化ナトリウム0~300 mMの濃度勾配で溶出させて得たIgG画分を50 mMグリシン緩衝液で透析し得られた30種の精製抗体のうち、サンドイッチ法で最も高感度が得られる2種類の抗体の組み合わせ（抗体1-8と抗体3-8）を選択した。

【0024】

(2) アルブミン測定用ラテックス試薬の調製

選択した2種類の抗アルブミンモノクローナル抗体のうち、抗体3-8を2.8 mg/mL含む20 mMトリス緩衝液（pH 8.5）3 mLに、平均粒子径50 nmの4%ラテックス（積水化学工業社製）懸濁液3 mLを加え、4℃にて2時間攪拌した。これに0.4%牛血清アルブミンを含む20 mMトリス緩衝液（pH 8.5）6 mLを加え、4℃で

1時間攪拌した。遠心分離後、沈殿を5 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)で、波長600 nmにおける吸光度が4.0 mODとなるように再懸濁し、抗アルブミン抗体3-8感作ラテックスを調製した。遊離状態の抗体1-8と抗体3-8感作ラテックスを混合し第一試薬を調製した。

【0025】

次に、ヒト血清アルブミン0.5 mg/mLを含む10 mM CHES緩衝液(pH 5.5) 3 mLを用い、平均粒径300 nmの0.5%ラテックス(積水化学工業社製)懸濁液3 mLを加え、4℃にて1時間攪拌した。遠心分離後、上清を除去し、沈殿を5 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)で、波長600 nmにおける吸光度が2.15 ODとなるように再懸濁し、アルブミン感作ラテックス溶液として第二試薬を調製した。

10

【0026】

(3) アルブミンの測定

汎用型の日立7170型自動分析装置を用いて各濃度のアルブミン試料を測定し、測定感度を確認した。具体的には、第一試薬100 μLに各濃度のアルブミンを含有する試料液3 μLをそれぞれ加えて攪拌後、37℃で5分間加温し、さらに第二試薬100 μLを添加して37℃、5分間の主波長570 nm/副波長800 nmにおける吸光度変化量を測定した。まず、アルブミン濃度0 μg/mLの際の初期凝集を表1に示した。さらに5、12.5、25、50、100、200、400、800 μg/mLのアルブミンを含有する各試料測定時の初期凝集からの吸光度変化量を測定し、アルブミン濃度対(マイナス)吸光度(以下同様)の反応曲線として図1に実線で示した。この反応曲線の形状に基づき0、5、25、100、400、800 μg/mLの6ポイントから検量線を作成し、各濃度のアルブミン試料の吸光度変化量をアルブミン濃度に換算した測定値を表2に示した。

20

【0027】

(4) 比較例

比較例として実施例と最終の抗体濃度が同一となるように下記(A)～(E)の5種類の第一試薬を調製した。

- (A) 遊離状態の抗体1-8を単独で含有する第一試薬
- (B) 抗体1-8感作ラテックスを単独で含有する第一試薬
- (C) 遊離状態の抗体1-8と抗体1-8感作ラテックスの両方を含有する第一試薬
- (D) 遊離状態の抗体1-8と遊離状態の抗体3-8の両方を含有する第一試薬
- (E) 抗体1-8感作ラテックスと抗体3-8感作ラテックスの両方を含有する第一試薬

30

薬

上記(A)～(E)の各第一試薬と、(2)で調製した第二試薬を組み合わせ、(3)の方法に従って測定を行った。実施例と同様に初期凝集の結果を表1に、アルブミン濃度対吸光度の反応曲線を図1に、各比較例の反応曲線の形状に基づき0～800 μg/mLの範囲から選択した至適な濃度ポイントから検量線を作成し、各濃度のアルブミン試料の吸光度変化量をアルブミン濃度に換算した測定値を表2に示した。

【0028】

(5) 結果

表1に示したように、実施例の初期凝集(吸光度)に対して、比較例A、B、Cは約半分、比較例Dは2/3程度の初期凝集しか得られておらず、凝集阻害法における基本的な測定性能が劣っていることが容易に推察された。一方、比較例Eでは実施例よりも大きい初期凝集が得られた。

40

【0029】

【表 1】

実施例		332.3
比較例	A	157.3
	B	185.2
	C	144.4
	D	214.3
	E	438.3

単位 (mA b s)

10

【0030】

図1のアルブミン濃度対ー(マイナス)吸光度の反応曲線より、実施例(ー●ー)では凝集阻止反応の感受性が高く、アルブミン低濃度域(5ー50 μ g/mL)で大きな感度(ー吸光度)変化を示すと同時にアルブミン高濃度域(100ー800 μ g/mL)でも明瞭な感度変化を示すことから、低濃度域から高濃度域まで広範囲に精度良くアルブミンを測定できることが確認された。一方、比較例A(ー□ー)、同C(ー△ー)ではアルブミン低濃度域でほとんど感度変化が認められないため、低濃度域を正確に測定することができない。また、比較例D(ー×ー)はアルブミン濃度対ー吸光度の反応曲線の形状が実施例と近似しているものの、初期凝集や感度変化自体が実施例に対して小さく、測定精度に課題がある。比較例B(ー○ー)、同E(ーー)ではアルブミン低濃度域で大きな感度変化を示すが、高濃度域では感度変化がないため、低濃度域から高濃度域までを広範囲に測定することができない。

20

【0031】

表2に示したように、実施例では低濃度から高濃度までほぼ理論値どおりの測定値が得られた。比較例A、Cではアルブミン0 μ g/mLを含む低濃度域を正確に測定することができなかった。また、比較例B、Eでは高濃度域を正確に測定することができなかった。比較例Dではいずれの濃度でも理論値との乖離が大きく、測定値全般の正確性に問題が認められた。

30

【0032】

【表 2】

アルブミン濃度	実施例	比較例 A	比較例 B	比較例 C	比較例 D	比較例 E
0	0.0	6.9	0.0	2.5	0.0	0.0
5	4.2	0.0	5.8	7.2	4.2	5.2
12.5	12.1	0.0	11.9	19.0	7.0	11.9
25	26.9	17.9	24.4	26.1	18.2	25.7
50	50.1	34.0	50.2	58.4	45.2	49.4
100	97.7	100.4	103.5	111.8	88.8	64.1
200	206.6	194.0	134.6	178.5	198.6	68.0
400	405.7	398.8	153.0	418.3	330.0	69.7
800	809.0	808.3	155.3	785.4	684.0	70.4

単位 (μ g/mL)

40

【0033】

50

上記実施例及び比較例について、同条件で同時再現性試験を行った（ $n = 5$ ）。結果を表3に示す。

表3に示したように、実施例では低濃度から高濃度まで再現性良く、変動係数6%以下の値が得られ、測定平均値もアルブミン濃度レベルと同等の測定値が得られた。比較例A、C、Dでは再現性が悪く、特に低濃度の変動係数が20%を上回る場合があった。比較例B、Eでは、再現性良く測定できているものの、高濃度域における測定平均値はアルブミン濃度レベルと乖離しており、正確性が低かった。

【0034】

【表3】

アルブミン濃度	再現性(n=5)	実施例	比較例 A	比較例 B	比較例 C	比較例 D	比較例 E
12.5 レベル	平均($\mu\text{g/mL}$)	10.8	30.4	11.4	22.5	9.7	10.9
	変動係数(%)	5.2	47.8	4.4	24.2	15.7	4.2
25 レベル	平均($\mu\text{g/mL}$)	25.5	39.9	24.8	27.4	22.7	25.9
	変動係数(%)	3.2	33.4	1.2	24.9	8.3	1.5
50 レベル	平均($\mu\text{g/mL}$)	57.3	56.1	52.8	45.3	51.8	49.9
	変動係数(%)	3.7	15.1	7.2	20.3	5.1	0.4
200 レベル	平均($\mu\text{g/mL}$)	208.6	229.0	119.8	230.7	221.8	63.6
	変動係数(%)	1.7	3.6	2.6	3.1	2.4	0.2
800 レベル	平均($\mu\text{g/mL}$)	815.7	821.2	134.6	818.7	471.2	65.1
	変動係数(%)	0.5	0.7	3.1	1.5	2.8	0.1

10

20

【産業上の利用可能性】

【0035】

本発明によれば、測定対象リガンドを低濃度域から高濃度域まで高感度かつ広範囲に測定できると同時に、良好な測定再現性能を有する凝集阻害測定法及び凝集阻害測定用試薬を提供することができる。特に、免疫反応を利用する場合、地帯現象を発生しないという特徴から測定値の信頼性が高く、また、異常高値を呈する可能性のあるリガンドを測定する場合には粒子凝集法よりも正確な測定方法を提供することができる。

30

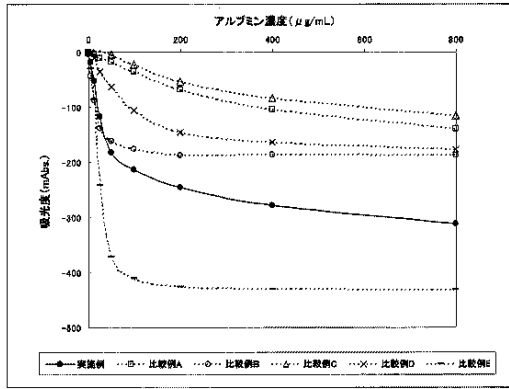
【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】 図1は、実施例及び比較例におけるアルブミン濃度対一吸光度の反応曲線を示す。

。

【図1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/000785
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, G01N33/53, G01N33/545		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubMed, JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-337092 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 07 December, 2001 (07.12.01), (Family: none)	1-12
A	Kimiko AOKI, "Ran'yo Yakubutsu no Men'eki Sokuteiho", Japanese Journal of Forensic Toxicology, Vol.14, No.2, pages 114 to 117, (1996)	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 October, 2007 (11.10.07)		Date of mailing of the international search report 30 October, 2007 (30.10.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 0 0 7 8 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, G01N33/53, G01N33/545											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) PubMed, JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	JP 2001-337092 A (第一化学薬品株式会社) 2001.12.07 (ファミリーなし)	1-12									
A	青木公子, 「乱用薬物の免疫測定法」, 法中毒, Vol.14, No.2, pp.114-117, (1996)	1-12									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献									
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 11.10.2007		国際調査報告の発送日 30.10.2007									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典	2 J 9507								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252								

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	凝集抑制测定方法和凝集抑制测定试剂		
公开(公告)号	JPWO2008012944A1	公开(公告)日	2009-12-17
申请号	JP2008526677	申请日	2007-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	吉田忠晃 高橋弘至		
发明人	吉田 忠晃 高橋 弘至		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54306		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/53.D G01N33/545.B G01N33/543.581.C		
优先权	2006200558 2006-07-24 JP		
其他公开文献	JP4176826B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种聚集抑制测定方法和聚集抑制测定试剂，其可以高灵敏度地在低浓度范围至高浓度范围的宽范围内测定样品中的配体，同时具有良好的测定再现性。使用带有携带配体的不溶性载体颗粒和游离的特异性受体的不溶性载体颗粒和配体上的结合位点不同于所述游离受体的特异性受体的聚集抑制测量方法和聚集抑制测量 提供使用试剂。[选择图]无

アルブミン濃度	実施例	比較例 A	比較例 B	比較例 C	比較例 D	比較例 E
0	0.0	6.9	0.0	2.5	0.0	0.0
5	4.2	0.0	5.8	7.2	4.2	5.2
12.5	12.1	0.0	11.9	19.0	7.0	11.9
25	26.9	17.9	24.4	26.1	18.2	25.7
50	50.1	34.0	50.2	58.4	45.2	49.4
100	97.7	100.4	103.5	111.8	88.8	64.1
200	206.6	194.0	134.6	178.5	198.6	68.0
400	405.7	398.8	153.0	418.3	330.0	69.7
800	809.0	808.3	155.3	785.4	684.0	70.4

単位 (μg/ml)