

(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2004-239880
(P2004-239880A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2GO45
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	F 4BO24
// CO 7 K 14/47	C 1 2 N 15/00	A 4HO45
C 1 2 N 15/09	CO 7 K 14/47	

審査請求 未請求 請求項の数 8 書面 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2003-67314 (P2003-67314)	(71) 出願人	000131474 株式会社シノテスト 東京都千代田区神田神保町一丁目5番地
(22) 出願日	平成15年2月4日(2003.2.4)	(72) 発明者	山田 晋吾 神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト相模原事業所内
		(72) 発明者	井上 恵一 神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト相模原事業所内
		(72) 発明者	矢ヶ部 恵子 神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト相模原事業所内
		(72) 発明者	川原 幸一 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘八丁目35番1号 鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み換え体よりなるヒトHMG-1標準物質及びこれを用いる試料中のヒトHMG-1測定方法

(57) 【要約】

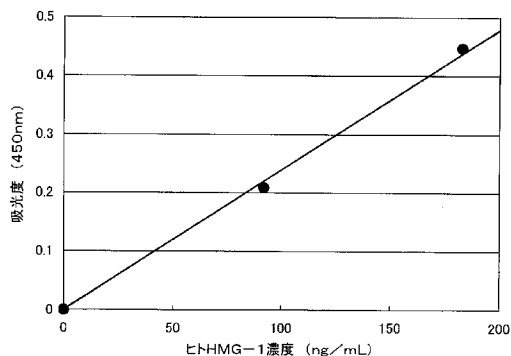
【課題】原料の入手が容易であり、調製の操作が複雑ではなく、多量に得ることが出来、原料費及び調製に掛かる費用が安価であり、不純物を含まないか又はごく少量であり、測定対象物質であるヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1(ヒトHMG-1)と同じ反応性を示し、かつ継続的に同じ反応性のものを得ることが出来るヒトHMG-1測定用標準物質を提供する。

また、質の高い校正及び精度管理を安価に行うことが出来、更に正確かつ精密な測定値を継続的に得ることが出来る試料中のヒトHMG-1の測定方法を提供する。

【解決手段】遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなるヒトHMG-1測定用標準物質。

また、試料中のヒトHMG-1の測定において、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を標準物質として校正又は精度管理を行う、試料中のヒトHMG-1の測定方法。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 よりなるヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 測定用標準物質。

【請求項 2】

遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 のアミノ酸配列が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 分子に 1 ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入若しくは付加、又は修飾を施したものである、請求項 1 記載の測定用標準物質。

【請求項 3】

遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 分子の一部よりなるものである、請求項 1 又は 2 記載の測定用標準物質。

【請求項 4】

遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 が、試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 の免疫学的測定の標準物質として用いられるものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の測定用標準物質。

【請求項 5】

試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 の測定において、遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 を標準物質として校正又は精度管理を行うことを特徴とする、試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 の測定方法。

【請求項 6】

遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 のアミノ酸配列が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 分子に 1 ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入若しくは付加、又は修飾を施したものである、請求項 5 記載の測定方法。

【請求項 7】

遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 分子の一部よりなるものである、請求項 5 又は 6 記載の測定方法。

【請求項 8】

試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 の測定が免疫学的測定法により行われるものである、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、敗血症等の疾患のマーカーとなりうるヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 の測定用標準物質に関するものであり、更にこの測定用標準物質を用いる試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 の測定方法に関するものである。

本発明は、臨床検査、臨床病理学、免疫学及び医学などの生命科学分野、並びに分析化学などの化学分野等において有用なものである。

【0002】

【従来の技術】

ハイモビリティーグループプロテイン (High Mobility Group Protein) (以下「HMG」と略することがある。) は、クロマチン構造に含まれる大量の非ヒストンタンパク質として 1964 年に発見され、すべての高等動植物に普遍的に含まれるタンパク質であり、種族間で一次構造の保存性は極めて高い。

また、核内ばかりではなく、細胞質内にも豊富に存在することが分かっている。

生理作用ははっきりとは分かっていないが、HMG は DNA と結合する際に二重螺旋構造

10

20

30

40

50

を緩めることから、転写反応の際にDNAの高次構造を最適構造に変化させて転写活性を高めるといふ、極めて広範囲の転写促進因子及びヌクレオソーム弛緩因子として機能すると考えられている。

【0003】

HMGには、いくつかの種類が存在する。例えば、ハイモビリティーグループプロテイン-1(HMG-1)、ハイモビリティーグループプロテイン-2(HMG-2)、ハイモビリティーグループプロテイン-3(HMG-3)、ハイモビリティーグループプロテイン-8(HMG-8)、ハイモビリティーグループプロテイン-17(HMG-17)、ハイモビリティーグループプロテイン-I(HMG-I)、ハイモビリティーグループプロテイン-Y(HMG-Y)、ハイモビリティーグループプロテイン-I(Y)(HMG-I(Y))、ハイモビリティーグループプロテイン I-C(HMG I-C)等を挙げることができる。

10

【0004】

なお、本発明者らが、遺伝情報処理ソフトウェア「GENETYX」(Software Development社)を使用してアミノ酸配列の相同性の解析を行ったところ、ヒトのHMG-1に対して、ウシのHMG-1の相同性は98.6%であり、ブタのHMG-1の相同性は99.1%であった。また、同様に、ヒトのHMG-1に対して、ヒトのHMG-2の相同性は81.2%であり、ウシのHMG-2の相同性は72.3%であり、ブタのHMG-2の相同性は79.4%であった。

【0005】

ワングらは1999年に、HMG-1自体を免疫原として調製したポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロット法により、初めて血清中(血液中)のHMG-1の定量測定を行った。

20

その結果、ワングらは、HMG-1が敗血症のマーカーとなりうることを示した。

そして、敗血症の患者において、生き残る患者と、死に至る患者を判別することが、精密に血液中のHMG-1を測定することによって可能であることを示した。

即ち、ただ単に血液中でのHMG-1の存在を確認するだけではなく、精密に定量することの有用性が明らかにされた(非特許文献1参照)。

【0006】

ところで、試料中に含まれる測定対象物質の定量測定を行うには、試料の測定値(吸光度等)を、濃度既知の標準物質の測定値と比較して、試料中の測定対象物質の定量値を算出すること〔校正(キャリブレーション)〕が必要である。

30

また、試料中に含まれる測定対象物質の定量測定を繰り返し行う際には、その測定が正確に、かつ精密に行われているか確かめるため、濃度既知の標準物質を測定し、その定量値を確認すること〔精度管理〕が行われる。

この校正、そして精度管理とも、標準物質を使用する。

【0007】

従来試料中のヒトHMG-1の測定においては、ヒトの臓器等より抽出し、精製したHMG-1が、又は動物由来のHMG-1が、標準物質として用いられていた。

測定対象物質がヒトのHMG-1であるので、標準物質も同じヒトのHMG-1を使用することが、反応性に差異がなく、好ましいことは明らかである。

40

しかしながら、ヒトのHMG-1は、ヒトの臓器や細胞等の核の中より抽出し、精製しなければならないので、まず、ヒトの臓器等を入手することが困難であり、例え入手できたとしてもHMG-1の抽出及び精製が繁雑であった。そして、このような繁雑な操作にてヒトHMG-1を精製できたとしても、得られるヒトHMG-1はごく少量に過ぎなかった。

【0008】

なお、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1は、既に知られている(非特許文献2参照)。しかしながら、これをヒトHMG-1測定時の標準物質として用いようとする発想は、未だかつてなかった。

50

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】

H . W a n g ら , S C I E N C E , 2 8 5 巻 , 9 号 , 2 4 8 ~ 2 5 1 頁 , 1 9 9 9 年 発 行
。

【 0 0 1 0 】

【 非特許文献 2 】

A . M i s t r y ら , B i o T e c h n i q u e s , 2 2 巻 , 7 1 8 ~ 7 1 9 頁 , 1 9
9 7 年 発 行 。

【 0 0 1 1 】

【 発明が解決しようとする課題 】

前述したように、従来、試料中のヒト H M G - 1 を測定しようとする際に用いられる標準物質としての H M G - 1 は、ヒトの臓器等より抽出し精製した H M G - 1 か、又は動物由来の H M G - 1 であった。

このうち、動物由来の H M G - 1 は、測定対象物質であるヒトの H M G - 1 とは反応性に差異がある可能性があり好ましくない。

【 0 0 1 2 】

また、ヒトの臓器等より抽出し精製した H M G - 1 は、ヒトの臓器や細胞等の核の中より抽出し、精製しなければならないので、まず、ヒトの臓器等を入手しなければならない。しかしながら、これは困難であり、例えば入手できたとしても H M G - 1 の抽出及び精製が繁雑であった。そして、このような繁雑な操作によりヒト H M G - 1 を精製できたとしても、得られるヒト H M G - 1 はごく少量に過ぎないものであった。

即ち、動物由来の H M G - 1 又はヒトの臓器等より抽出し精製した H M G - 1 を、ヒト H M G - 1 の測定における標準物質として用いることには、上記のような種々の問題点があった。

【 0 0 1 3 】

これに対して、本発明の第一の課題は、以下の特徴を有するヒト H M G - 1 測定用標準物質を提供することである。

- ・ 原料の入手が容易である。
- ・ 調製の操作が繁雑ではない。
- ・ 多量に得ることが出来る。
- ・ 原料費及び調製に掛かる費用が安価である。
- ・ 不純物を含まないか又はごく少量である。
- ・ 測定対象物質であるヒト H M G - 1 と同じ反応性を示す。
- ・ 継続的に同じ反応性のものを得ることが出来る。

【 0 0 1 4 】

また、本発明の第二の課題は、次の特徴を有する、試料中のヒト H M G - 1 の測定方法を提供することである。

- ・ 質の高い校正及び精度管理を安価に行うことが出来る。
- ・ 正確かつ精密な測定値を継続的に得ることが出来る。

【 0 0 1 5 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 よりなるヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 測定用標準物質。

(2) 遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 のアミノ酸配列が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 分子に 1 ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入若しくは付加、又は修飾を施したものである、前記 (1) の測定用標準物質。

(3) 遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン - 1 分子の一部よりなるものである、

10

20

30

40

50

前記(1)又は(2)記載の測定用標準物質。

(4) 遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1が、試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1の免疫学的測定の標準物質として用いられるものである、前記(1)~(3)のいずれか1項に記載の測定用標準物質。

(5) 試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1の測定において、遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1を標準物質として校正又は精度管理を行うことを特徴とする、試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1の測定方法。

(6) 遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1のアミノ酸配列が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1分子に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入若しくは付加、又は修飾を施したものである、前記(5)記載の測定方法。

(7) 遺伝子組み換え法により調製したヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1が、ヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1分子の一部よりなるものである、前記(5)又は(6)記載の測定方法。

(8) 試料中のヒト・ハイモビリティーグループプロテイン-1の測定が免疫学的測定法により行われるものである、前記(5)~(7)のいずれか1項に記載の測定方法。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

〔1〕ヒトHMG-1測定用標準物質

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1である。遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1であれば、いかなるものでもよい。

【0017】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質である遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1は、ヒトHMG-1分子に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入若しくは付加、又は修飾を施したものであってもよい。

【0018】

また、本発明のヒトHMG-1測定用標準物質である遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1は、ヒトHMG-1分子の一部よりなるものであってもよく、又はヒトHMG-1分子の全部よりなるものであってもよい。

【0019】

本発明において、ヒトHMG-1を遺伝子組み換え法により調製する方法であるが、遺伝子組み換え法として知られている通常の方法等を用いればよい。

【0020】

例えば、ヒトHMG-1の遺伝子をクローニングし、得られたヒトHMG-1遺伝子をプラスミド等の発現ベクターへ組み込む。

この発現ベクターを大腸菌等の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養することによりヒトHMG-1を発現させることが出来る。

ヒトHMG-1の遺伝子の塩基配列をクローニングする方法としては、例えば、PCR法、リコンビナントPCR法、ライゲーション法、リンカーライゲーション法等を挙げることができる。例えば、PCR法を用いる場合には、ヒトHMG-1の遺伝子の塩基配列をプライマーを用いて増幅させることにより、ヒトHMG-1の遺伝子の塩基配列を得ることが出来る。

【0021】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、試料中のヒトHMG-1を測定する際の標準物質として使用するものである。

【0022】

10

20

30

40

50

例えば、試料中のヒトHMG-1の測定時に、試料の測定値(吸光度等)を、濃度既知の標準物質の測定値と比較して、試料中のヒトHMG-1の定量値を算出する校正(キャリブレーション)の際に標準物質として使用する。

【0023】

また、試料中のヒトHMG-1の測定を行う際に、その測定が正確かつ精密に行われているか確かめるため、濃度既知の標準物質を測定し、この標準物質の測定値又はヒトHMG-1定量値を評価し、測定が正確かつ精密に行われているか確認を行う精度管理の際に標準物質として使用する。

【0024】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、試料中のヒトHMG-1の測定を、免疫学的測定により行う際の標準物質として、特に好適である。 10

【0025】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を、蒸留水若しくは精製水などの水、ヒト若しくは動物の血清、ヒト若しくは動物の血漿、又は他の溶液等に添加、溶解したものであってもよい。

【0026】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質には、必要に応じ、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1とともに、緩衝剤、有機溶媒、糖類、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、補酵素、金属イオンなどの無機物質、安定化剤、防腐剤、活性化剤、キレート剤、界面活性剤又は他の高分子物質等を含有させてもよい。 20

【0027】

なお、緩衝剤としては、目的とするpH範囲に緩衝能がある緩衝剤を適宜使用することができる。このような緩衝剤としては、例えば、トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン(Tris)、リン酸緩衝液、イミダゾール、グリシルグリシン、PIPES、ACES、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、HEPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、CAPSO、CAPS、MES、Bis-Tris、Bis-Trisプロパン、ADA、MOPSO等を挙げることができる。

【0028】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、液状形態や凍結形態でもよい。また、粉末形態、凍結乾燥形態又は固形形態等のいずれの形態でもよく、この場合には、使用時に水等の溶媒に溶解させて液体化して用いる。 30

【0029】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、例えば、蒸留水若しくは精製水などの水、ヒト若しくは動物の血清、ヒト若しくは動物の血漿、又は他の溶液等の適当な溶媒に、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を添加、溶解させることにより製造することが出来る。

【0030】

〔2〕ヒトHMG-1測定方法

1. 総論

本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法(以下「本発明の測定方法」ということがある)は、試料中のヒトHMG-1の測定において、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を標準物質として校正又は精度管理を行うことを特徴とするものである。 40

【0031】

即ち、試料中のヒトHMG-1の測定において、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を標準物質として使用し、この標準物質を用いて校正を行うことを特徴とするものである。

【0032】

また、試料中のヒトHMG-1の測定において、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を標準物質として使用し、この標準物質を用いて精度管理を行うことを特徴とす 50

るものである。

【0033】

本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法において、校正又は精度管理に使用する標準物質は、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1であれば、いかなるものでもよい。

【0034】

本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法において、標準物質として使用する遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1は、ヒトHMG-1分子に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入若しくは付加、又は修飾を施したものであってもよい。

【0035】

また、本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法において、標準物質として使用する遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1は、ヒトHMG-1分子の一部よりなるものであってもよく、又はヒトHMG-1分子の全部よりなるものであってもよい。

【0036】

なお、本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法において、標準物質として使用する遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1の詳細は、前記「〔1〕ヒトHMG-1測定用標準物質」の項に記載した通りである。

【0037】

本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法においては、試料中のヒトHMG-1の測定に際し、試料の測定とは別に、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質（ヒトHMG-1濃度は既知）を測定し、得られた試料の測定値（吸光度等）を、前記の濃度既知の標準物質の測定値（吸光度等）と比較して、試料中のヒトHMG-1の定量値を算出する。即ち、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質により校正（キャリブレーション）を行う。

【0038】

なお、得られた試料の測定値を、前記の濃度既知の標準物質の測定値と比較して、試料中のヒトHMG-1の定量値を算出する方法であるが、例えば、標準物質の濃度を横軸に取り、その時の測定値を縦軸に取ったグラフ（検量線）を作成するか、又は、標準物質の濃度とその時の測定値との関係を表す数式を求める等を行う。次に、測定対象物質の測定値を前記のグラフ（検量線）又は数式に当てはめて、この測定対象物質の定量値を求める。

【0039】

また、本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法においては、試料中のヒトHMG-1の測定を行う際に、その測定が正確、かつ精密に行われているか確かめるため、試料の測定とは別に、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質（ヒトHMG-1濃度は既知）を測定し、前記の濃度既知の標準物質の測定値（又はこの測定値より算出したヒトHMG-1定量値）を評価して、試料中のヒトHMG-1の測定が誤差が生じることなく正確かつ精密に行われているか確認する。即ち、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質により精度管理を行う。

【0040】

なお、本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法におけるヒトHMG-1を測定するための原理としては、例えば、ヒトHMG-1に特異的に結合する抗体とヒトHMG-1との抗原抗体反応（免疫学的反応）、又はヒトHMG-1に特異的に結合するリガンドとヒトHMG-1との結合反応などの、ヒトHMG-1に特異的な親和性を有し結合する物質とヒトHMG-1との結合反応による測定法等を挙げることができる。

【0041】

このうち、試料中のヒトHMG-1の測定を免疫学的測定法により行う際に、本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法は、特に好適である。

【0042】

2. 免疫学的測定法

以下、試料中のヒトHMG-1の測定を免疫学的測定法により行う場合を例にとって、本

10

20

30

40

50

発明の測定方法を詳細に説明する。

【0043】

(1) 測定法

この免疫学的測定法としては、例えば、酵素免疫測定法 (ELISA、EIA)、蛍光免疫測定法 (FIA)、放射免疫測定法 (RIA)、発光免疫測定法 (LIA)、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法、赤血球凝集反応法、粒子凝集反応法、特開平9-229936号公報及び特開平10-132819号公報などに記載された測定対象物質 (被検物質) に対する特異的結合物質が固定され、これで被覆された面を有する担体、及び測定対象物質 (被検物質) に対する特異的結合物質が固定された粒子を用いる測定法、又は Dahlbeackらが示した ELSA法 (Enzyme-linked Ligandsorbent Assay) (Thromb. Haemost., 79巻, 767~772頁, 1998年発行; WO98/23963) 等を挙げることができる。

10

【0044】

そして、前記の免疫学的測定法においては、サンドイッチ法、競合法又は均一系法 (ホモジニアス系法) 等のいずれの手法においても、本発明の測定方法を適用することができる。

また、本発明の測定方法における測定は、用手法により行ってもよいし、又は分析装置等の装置を用いて行ってもよい。

【0045】

(2) 測定試料

本発明の測定方法における試料としては、血液、血清、血漿、尿、精液、髄液、唾液、汗、涙、腹水もしくは羊水などの体液; 大便; 血管もしくは肝臓などの臓器; 組織; 細胞; 又は大便、臓器、組織もしくは細胞などの抽出液等、ヒトHMG-1が含まれる可能性のある生体試料であれば対象となる。

20

【0046】

(3) 標識抗体を用いた免疫学的測定法

本発明の測定方法を酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫学的測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法等により行うことができる。

30

【0047】

前記測定方法に用いる固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなるマイクロカプセル、ビーズ、マイクロプレート (マイクロタイタープレート)、試験管、スティック又は試験片等の形状の固相担体を用いることができる。

固相化抗体は、抗体と固相担体とを物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により吸着、結合させて調製することができる。

【0048】

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体と固相担体を緩衝液などの溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液などに溶解した抗体と固相担体を接触させること等により行うことができる。また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」, 臨床病理刊行会, 1983年発行; 日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」, 東京化学同人, 1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させること等により行うことができる。

40

【0049】

50

また、更に非特異的反應や固相担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要があれば、抗体を固相化させた固相担体の表面又は内壁面に、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミンもしくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、固相担体のブロッキング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

【0050】

標識物質としては、酵素免疫測定法の場合には、パーオキシダーゼ（POD）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素又はアミラーゼ等を用いることができる。また、蛍光免疫測定法の場合には、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イソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート又はジクロロトリアジンイソチオシアネート等を用いることができる。そして、放射免疫測定法の場合には、トリチウム、ヨウ素125又はヨウ素131等を用いることができる。また、発光免疫測定法においては、NADH-FMN₂-ルシフェラーゼ系、ルミノール-過酸化水素-POD系、アクリジニウムエステル系又はジオキセタン化合物系等を用いることができる。

10

【0051】

抗体と酵素等の標識物質との結合法は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ-技術と応用-」，臨床病理刊行会，1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」，東京化学同人，1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体と標識物質をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と標識物質のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより結合を行うことができる。

20

【0052】

本発明の測定方法においては、溶媒として、各種の水系溶媒を用いることができる。この水系溶媒としては、例えば、精製水、生理食塩水、又は、トリス緩衝液、リン酸緩衝液もしくはリン酸緩衝生理食塩水などの各種緩衝液等を挙げることができる。この緩衝液のpHについては、適宜適当なpHを選択して用いればよく、特に制限はないものの、通常は、pH3~12の範囲内のpHを選択して用いることが一般的である。

【0053】

また、本発明の測定方法においては、前記の抗体を固相化した固相担体、又は前記の抗体と酵素などの標識物質を結合させた標識抗体を、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、カゼインもしくはその塩などのタンパク質；各種塩類；各種糖類；脱脂粉乳；正常ウサギ血清などの各種動物血清；アジ化ナトリウムもしくは抗生物質などの各種防腐剤；活性化物質；反応促進物質；ポリエチレングリコールなどの感度増加物質；非特異的反應抑制物質；又は、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等の1種又は2種以上と共存させてもよい。そして、これらを共存させる際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001~10%（W/V）が好ましく、特に0.01~5%（W/V）が好ましい。

30

【0054】

測定の操作法は公知の方法等（日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ-技術と応用-」，臨床病理刊行会，1983年発行；石川榮治ら編「酵素免疫測定法」，第3版，医学書院，1987年発行；北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No.31 酵素免疫測定法」，共立出版，1987年発行）により行うことができる。

40

【0055】

例えば、固相化抗体と試料を反応させ、同時に標識抗体を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させることにより、「固相担体=固相化抗体=ヒトHMG-1=標識抗体」の複合体を形成させる。そして、未結合の標識抗体を洗浄分離して、「固相化抗体=ヒトHMG-1」を介して固相担体に結合した標識抗体の量又は未結合の標識抗体の量より

50

試料中に含まれていた H M G - 1 の量 (濃度) のみを測定することができる。

【 0 0 5 6 】

具体的には、酵素免疫測定法の場合は、抗体に標識した酵素に、その至適条件下で基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法等により測定する。また、蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。そして、発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

【 0 0 5 7 】

そして、得られた試料の測定値 (吸光度等) を、遺伝子組み換え法により調製したヒト H M G - 1 よりなる標準物質 (ヒト H M G - 1 濃度は既知) を測定して得られた測定値 (吸光度等) と比較して、試料中のヒト H M G - 1 の定量値を算出する。〔校正〕

10

【 0 0 5 8 】

また、前記のようにして、試料の測定とは別に、遺伝子組み換え法により調製したヒト H M G - 1 よりなる標準物質 (ヒト H M G - 1 濃度は既知) を測定し、前記の濃度既知の標準物質の測定値 (又はこの測定値より算出したヒト H M G - 1 定量値) を評価して、試料中のヒト H M G - 1 の測定が誤差が生じることなく正確かつ精密に行われているか確認する。〔精度管理〕

【 0 0 5 9 】

(4) 凝集反応法による免疫学的測定法

本発明の測定方法を、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、又は目視的に測る測定法により実施する場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

20

【 0 0 6 0 】

抗体を固相担体に感作させて用いる場合には、固相担体としては、ポリスチレン、スチレン - スチレンスルホン酸塩共重合体、アクリロニトリル - ブタジエン - スチレン共重合体、塩化ビニル - アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル - アクリル酸共重合体、ポリアクロレイン、スチレン - メタクリル酸共重合体、スチレン - グリシジル (メタ) アクリル酸共重合体、スチレン - ブタジエン共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、赤血球、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ができる。

30

抗体を固相担体に感作させる方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により行うことができる。

【 0 0 6 1 】

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体と固相担体を緩衝液等の溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液等に溶解した抗体と固相担体を接触させること等により行うことができる。また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第 5 3 号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」, 臨床病理刊

40

【 0 0 6 2 】

また、更に非特異的反応や固相担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要があれば、抗体を固相化させた固相担体の表面又は内壁面に、ウシ血清アルブミン (B S A)、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミンもしくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、固相担体のブロッ

50

キング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

【0063】

なお、ラテックス比濁法を測定原理とする場合、固相担体として用いるラテックス粒子の粒径については、特に制限はないものの、ラテックス粒子が測定対象物質（ヒトHMG-1）を介して結合し、凝集塊を生成する程度、及びこの生成した凝集塊の測定の容易さ等の理由より、ラテックス粒子の粒径は、その平均粒径が、0.04～1μmであることが好ましい。

【0064】

また、ラテックス比濁法を測定原理とする場合、抗体を固相化させたラテックス粒子を含ませる濃度については、試料中のヒトHMG-1の濃度、抗体のラテックス粒子表面上での分布密度、ラテックス粒子の粒径、試料と測定試薬の混合比率等の各種条件により最適な濃度は異なるので一概にいうことはできない。

10

【0065】

しかし、通常は、試料と測定試薬が混合され、ラテックス粒子に固相化された抗体と試料に含まれていたヒトHMG-1との抗原抗体反応が行われる測定反応時に、抗体を固相化させたラテックス粒子の濃度が、反応混合液中において0.005～1%（w/v）となるようにするのが一般的であり、この場合、反応混合液中においてこのような濃度になるような濃度の「抗体を固相化させたラテックス粒子」を測定試薬に含ませる。

【0066】

また、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の間接凝集反応法を測定原理とする場合、固相担体として用いる粒子の粒径については、特に制限はないものの、その平均粒径が0.01～100μmの範囲内にあることが好ましく、0.5～10μmの範囲内にあることがより好ましい。そして、これらの粒子の比重は、1～10の範囲内にあることが好ましく、1～2の範囲内にあることがより好ましい。

20

【0067】

本発明の測定方法においては、抗体を感作した固相担体を、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、カゼインもしくはその塩などのタンパク質；各種塩類；各種糖類；脱脂粉乳；正常ウサギ血清などの各種動物血清；アジ化ナトリウムもしくは抗生物質などの各種防腐剤；活性化物質；反応促進物質；ポリエチレングリコールなどの感度増加物質；非特異的反応抑制物質；又は、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等の1種又は2種以上と共存させてもよい。そして、これらを共存させる際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001～10%（W/V）が好ましく、特に0.01～5%（W/V）が好ましい。

30

【0068】

なお、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の間接凝集反応法を測定原理とする場合の測定に使用する容器としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリメタクリレートなどからなる、試験管、マイクロプレート（マイクロタイプレート）又はトレイ等を挙げることができる。これらの容器の溶液収容部分（マイクロプレートのウェル等）の底面は、U型、V型又はUV型等の底面中央から周辺にかけて傾斜を持つ形状であることが好ましい。

40

【0069】

測定の操作法は公知の方法等により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と抗体、又は試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光又は散乱光などの吸光度等を測定する。そして、得られた試料の測定値（吸光度等）を、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質（ヒトHMG-1濃度は既知）を測定して得られた測定値（吸光度等）と比較して、試料中のヒトHMG-1の定量値を算出する。〔校正〕

【0070】

また、前記のようにして、試料の測定とは別に、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質（ヒトHMG-1濃度は既知）を測定し、前記の濃度既知の標

50

準物質の測定値（又はこの測定値より算出したヒトHMG-1定量値）を評価して、試料中のヒトHMG-1の測定が誤差が生じることなく正確かつ精密に行われているか確認する。〔精度管理〕

【0071】

なお、目視的に測定を行う場合には、プレートやマイクロプレート等の前記容器中で、試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。なお、この目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

【0072】

次に、得られた試料の凝集状態を、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質（ヒトHMG-1濃度は既知）を測定して得られた凝集状態と比較して、試料中のヒトHMG-1の有無又はその濃度を判定する。〔校正〕

【0073】

また、前記のようにして、試料の測定とは別に、遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1よりなる標準物質（ヒトHMG-1濃度は既知）を測定し、前記の濃度既知の標準物質の判定結果を評価して、試料中のヒトHMG-1の測定が誤差が生じることなく正確かつ精密に行われているか確認する。〔精度管理〕

【0074】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0075】

〔実施例1〕（遺伝子組み換え法によるヒトHMG-1の調製）

ヒトHMG-1をヒト脳cDNAからDNA増幅を行いクローン化した。

PCR産物は、BamHIとHindIIIで修飾し、シークエンス・ベクターのpCAL-nベクター（Stratagene社、カリフォルニア州、アメリカ合衆国）のBamHI-HindIIIサイトにサブクローン化し、DNA配列の確認を行った。

次に、このBamHI-HindIIIで修飾されたPCR産物をグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現させるために、pEX発現ベクターのBamHI-HindIIIサイトにサブクローン化した。

その後、この組み換えプラスミドをE.coli・JM1に、トランスフォームした。

【0076】

トランスフォームされた細胞を1L程で培養を行った後、IPTGの誘導をかけ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ・ヒトHMG-1融合タンパク質を、E.coli・JM1で発現させた。

この発現させたE.coli・JM1を集菌後、30mL程度のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）〔137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム及び5.59mMリン酸水素二ナトリウムを含む水溶液（pH7.2）〕に分散させた。

【0077】

そして、これを超音波処理により破碎し、遠心分離後、上澄み液を回収した。

この上澄み液中に含まれるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ・ヒトHMG-1融合タンパク質をグルタチオン・カラム（ファルマシア社）により精製した。

次に、この精製したグルタチオン-S-トランスフェラーゼ・ヒトHMG-1融合タンパク質から、第Xa因子を作用させて、ヒトHMG-1を切り出した。

以上の遺伝子組み換え操作により、ヒトHMG-1を取得、調製した。

【0078】

〔実施例2〕（検量線の作成）

後述する参考例1で調製したパーオキシダーゼ標識抗体及び参考例2で調製したマイクロプレート固相化抗体を免疫学的測定試薬として使用し、実施例1の遺伝子組み換え法によ

り調製したヒトHMG-1を標準物質として酵素免疫測定法(サンドイッチ法)により測定を行った。そして、この免疫学的測定方法における検量線を作成した。

【0079】

1. 測定試薬

1 パーオキシダーゼ標識抗体

参考例1で調製した、ヒトHMG-1には結合するが、ヒトHMG-2には結合しない抗体にパーオキシダーゼを結合させたパーオキシダーゼ標識抗体を、酵素免疫測定法のサンドイッチ法における酵素標識抗体として使用した。

【0080】

2 マイクロプレート固相化抗体

参考例2で調製した、ヒトHMG-1とヒトHMG-2の両方に結合する抗体をマイクロプレートの各ウェルに固相化したマイクロプレート固相化抗体を、酵素免疫測定法のサンドイッチ法における固相化抗体として使用した。

【0081】

3 洗浄液

0.05%ツイーン20(Tween20)を含むリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)を調製し、洗浄液とした。

【0082】

4 パーオキシダーゼ基質液

3mMの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2μLの1.7%過酸化水素を使用直前に添加したものを調製して、標識としたパーオキシダーゼの基質、即ちパーオキシダーゼ基質液とした。

【0083】

5 反応停止液

6N硫酸水溶液を調製して、反応停止液とした。

【0084】

2. 試料

1 遺伝子組み換えヒトHMG-1を含む試料(標準物質)

実施例1の遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を含む溶液を、0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で十分に透析した。

この透析後の前記ヒトHMG-1を含む溶液のタンパク質濃度をプロテインアッセイ(バイオラッド社製)で求めた。

そして、この前記ヒトHMG-1を含む溶液を、0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で希釈して、前記ヒトHMG-1濃度が、92ng/mL又は183ng/mLの試料をそれぞれ調製した。

【0085】

2 0ng/mLの試料

前記の0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)を、ヒトHMG-1濃度が0ng/mLの試料とした。

【0086】

3. 酵素免疫測定法(サンドイッチ法)による測定

1 前記2で調製した、前記遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1を含む2種類の試料、及び0ng/mLの試料をそれぞれ、生理食塩水で2倍に希釈した。

【0087】

2 前記1で希釈した各試料を、前記1のマイクロプレート固相化抗体のウェル

に100μLを添加して、37℃で2時間静置して、マイクロプレートに固相化した抗体と、前記試料に含まれていた遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1との抗原抗

10

20

30

40

50

体反応を行わせた。

【0088】

3 次に、前記のマイクロプレート固相化抗体の各ウェルを前記1の洗浄液で洗浄した。

【0089】

4 前記1のパーオキシダーゼ標識抗体を、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で1,000倍希釈した。次にこれを、前記3の洗浄操作を行ったマイクロプレート固相化抗体の各ウェルに、100 μ Lずつ添加した後、37 $^{\circ}$ Cで2時間静置した。これにより、マイクロプレートに固相化している抗体に結合した遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1に、パーオキシダーゼ標識抗体を結合させる反応を行わせた。

【0090】

5 その後、前記のマイクロプレート固相化抗体の各ウェルを前記1の洗浄液で洗浄した。

【0091】

6 次に、前記のマイクロプレート固相化抗体の各ウェルに、前記1のパーオキシダーゼ基質液を100 μ Lずつ添加した。そして、室温で反応させた。

【0092】

7 前記のパーオキシダーゼ基質液の添加15分後に、前記1の反応停止液を、前記のマイクロプレート固相化抗体の各ウェルに100 μ Lずつ添加して、標識パーオキシダーゼの反応を停止させた。

【0093】

8 次に、前記のマイクロプレート固相化抗体の各ウェル中の溶液の吸光度(450nm)をマイクロプレートリーダー(バイオラッド社製)により測定した。

【0094】

9 以上の操作により得られた、前記の試料中の遺伝子組み換え法により調製したヒトHMG-1の濃度を横軸に取り、450nmにおける吸光度の測定値を縦軸に取った図、即ち検量線を作成した。(図1)

【0095】

なお、吸光度の測定値は、0ng/mLの試料の測定値(吸光度)を試薬盲検値として差し引いたものであり、92ng/mLの試料の測定値(吸光度)は0.209であり、183ng/mLの試料の測定値(吸光度)は0.447であった。

【0096】

〔実施例3〕(血清試料中のヒトHMG-1の測定)

実施例2で作成した検量線を用いて、血清試料中のヒトHMG-1の測定値の校正を行い、定量値を求めた。

【0097】

1. 測定試薬

前記実施例2で使用した、「1 パーオキシダーゼ標識抗体」、「2 マイクロプレート固相化抗体」、「3 洗浄液」、「4 パーオキシダーゼ基質液」、及び「5 反応停止液」を各々用いた。

【0098】

2. 試料

1 ヒト血清試料

5種類のヒト血清を試料として用いた。(ヒト血清試料-1、ヒト血清試料-2、ヒト血清試料-3、ヒト血清試料-4、及びヒト血清試料-5)

【0099】

2 0ng/mLの試料

0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)を、ヒトHMG-1濃度が0ng/mLの試料とした。

【0100】

10

20

30

40

50

3. 酵素免疫測定法（サンドイッチ法）による測定

1 前記2の5種類のヒト血清試料を、前記実施例2の「3. 酵素免疫測定法（サンドイッチ法）による測定」の項に記載された通りに操作を行い、各々の血清試料の測定値（吸光度）を得た。

【0101】

ヒト血清試料 - 1の測定値（吸光度）は0.180であり、ヒト血清試料 - 2の測定値（吸光度）は0.077であり、ヒト血清試料 - 3の測定値（吸光度）は0.040であり、ヒト血清試料 - 4の測定値（吸光度）は0.021であり、そしてヒト血清試料 - 5の測定値（吸光度）は0.014であった。

【0102】

なお、各々の測定値（吸光度）は、0 ng/mLの試料の測定値（吸光度）を試薬盲検値として差し引いたものである。

【0103】

2 これらの測定値（吸光度）を前記実施例2で作成した検量線（図1）に当てはめ、校正を行い、各々の定量値を求めた。これらの定量値を以下示す。

【0104】

ヒト血清試料 - 1 : 75 ng/mL
 ヒト血清試料 - 2 : 32 ng/mL
 ヒト血清試料 - 3 : 17 ng/mL
 ヒト血清試料 - 4 : 9 ng/mL
 ヒト血清試料 - 5 : 6 ng/mL

【0105】

以上のことにより、遺伝子組み換え法により調製したヒトHM G - 1を標準物質として作成した検量線により校正を行い、血清試料中のヒトHM G - 1の定量値を求めることができた。

【0106】

〔参考例1〕（パーオキシダーゼ標識抗体の調製）

ヒトHM G - 1には結合するが、ヒトHM G - 2には結合しない抗体にパーオキシダーゼを標識化して、パーオキシダーゼ標識抗体を調製した。

【0107】

（1）モノクローナル抗体の調製

「Cys Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys」で表されたペプチドと担体（KLH）との結合物を免疫原として、これをフロイント完全アジュバントと等量混合したものを8週齢のメスのBALB/cマウス（日本チャールズリバー社）の腹部皮下に免疫注射した。

このマウスの血中の抗体価がプラトーに達した後、このマウスより脾臓を取得した。

【0108】

次に、この脾臓細胞と、BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ欠損の骨髓腫細胞株であるP3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク 9085）とを、ポリエチレングリコール1500含有RPMI1640培地液中で混合し、細胞融合させた。

【0109】

その後、クローニングを行い、ヒトHM G - 1には結合するがヒトHM G - 2には結合しない抗体（モノクローナル抗体）を産生するハイブリドーマ〔MD77〕を取得した。

そして、このハイブリドーマを培養して、ヒトHM G - 1には結合するがヒトHM G - 2には結合しない抗体（モノクローナル抗体）を調製した。

【0110】

（2）抗体へのチオール基の導入

前記（1）の、ヒトHM G - 1には結合するがヒトHM G - 2には結合しない抗体（モノクローナル抗体）を、10 mg/mLの濃度で含有する0.1 Mリン酸緩衝液溶液（pH

10

20

30

40

50

6.5)の0.5 mLに、S-アセチルメルカプト無水コハク酸の0.6 mgをN, N'-ジメチルホルムアミドの10 µLに溶解したものを添加して、室温で30分間反応させた。

【0111】

その後これに、0.1 MのEDTAの20 µL、0.1 Mのトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)の0.1 mL、及び1 Mのヒドロキシルアミン塩酸塩(pH 7.0)の0.1 mLをそれぞれ添加して、30 で5分間放置した。

【0112】

次にこれを、5 mMのEDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化しておいたセファデックスG-25のカラムに通し、単純ケル濾過クロマトグラフィーを行い、過剰のS-アセチルメルカプト無水コハク酸を取り除き、抗体画分を集めた。

10

【0113】

以上の操作により、前記のヒトHMG-1には結合するがヒトHMG-2には結合しない抗体(モノクローナル抗体)に、チオール基を導入した。

【0114】

(3) パーオキシダーゼへのマレイミド基の導入

パーオキシダーゼ(西洋ワサビ由来)4 mgを0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)の0.3 mLに溶解後、N-サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の1.0 mgをN, N'-ジメチルホルムアミドの60 µLに溶解したものを添加して、30 で60分間反応させた。

20

その後、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で一夜透析を行った。以上の操作により、前記のパーオキシダーゼに、マレイミド基を導入した。

【0115】

(4) 標識抗体の調製

前記(3)で調製したマレイミド基を導入したパーオキシダーゼ及び前記(2)で調製したチオール基を導入した抗体を一对一で混合し、30 で20時間反応させて、前記抗体へのパーオキシダーゼの導入(標識化)を行った。

【0116】

その後これを、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化しておいたウルトラゲルAcA34のカラムに通し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

30

このゲル濾過クロマトグラフィーの各画分を、10%ポリアクリルアミド電気泳動にかけて確認を行い、未結合のパーオキシダーゼが混入しないように、パーオキシダーゼが結合した抗体の画分だけを集めた。

【0117】

このパーオキシダーゼが結合した抗体の画分を濃縮して、ヒトHMG-1には結合するがヒトHMG-2には結合しない抗体にパーオキシダーゼを結合させたもの、即ちパーオキシダーゼ標識抗体を得た。そして、このパーオキシダーゼ標識抗体を含む溶液のタンパク質濃度を測定した。

【0118】

〔参考例2〕(マイクロプレート固相化抗体)

40

ヒトHMG-1とヒトHMG-2の両方に結合する抗体をマイクロプレートに固相化して、マイクロプレート固相化抗体を調製した。

【0119】

(1) モノクローナル抗体の調製

「Cys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala」で表されたペプチドと担体(BSA)との結合物を免疫原として、これをフロイント完全アジュバントと等量混合したものを8週齢のメスのBALB/cマウス(日本チャールズブリバー社)の腹部皮下に免疫注射した。

【0120】

このマウスの血中の抗体価がプラトーに達した後、このマウスより脾臓を取得した。

50

次に、この脾臓細胞と、BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ欠損の骨髓腫細胞株であるP3-X63-Ag8-U1株(癌研究リサーチソースバンク 9085)とを、ポリエチレングリコール1500含有RPMI1640培地液中で混合し、細胞融合させた。

【0121】

その後、クローニングを行い、ヒトHMG-1とヒトHMG-2の両方に結合する抗体(モノクローナル抗体)を産生するハイブリドーマ(MD78)を取得した。

そして、このハイブリドーマを培養して、ヒトHMG-1とヒトHMG-2の両方に結合する抗体(モノクローナル抗体)を調製した。

【0122】

(2) 前記(1)で得た、ヒトHMG-1とヒトHMG-2の両方に結合する抗体(モノクローナル抗体)を、リン酸緩衝生理食塩水(5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム(pH7.2))により15μg/mLとした後、96ウェル-マイクロプレート(ヌンク社製)に1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、前記抗体を前記マイクロプレートの各ウェルに吸着させ、固相化した。

10

【0123】

(3) この抗体が固相化されたマイクロプレートを洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween20))を含むリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2))で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH7.2)を1ウェル当り300μLずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

20

以上の操作により、ヒトHMG-1とヒトHMG-2の両方に結合する抗体(モノクローナル抗体)をマイクロプレートに固相化した、マイクロプレート固相化抗体を調製した。

【0124】

【発明の効果】

本発明のヒトHMG-1測定用標準物質は、原料の入手が容易であり、調製の操作が繁雑ではなく、多量に得ることが出来、原料費及び調製に掛かる費用が安価であり、不純物を含まないか又はごく少量であり、測定対象物質であるヒトHMG-1と同じ反応性を示し、かつ継続的に同じ反応性のものを得ることが出来る標準物質である。

30

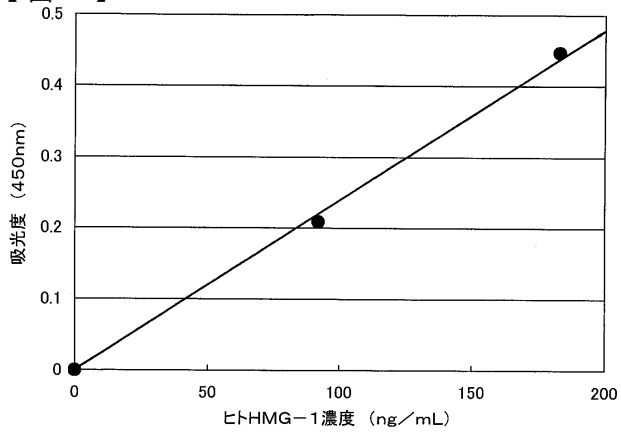
【0125】

また、本発明の試料中のヒトHMG-1の測定方法は、質の高い校正及び精度管理を安価に行うことが出来、更に正確かつ精密な測定値を継続的に得ることが出来る測定方法である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のヒトHMG-1測定用標準物質を用いて作成した検量線を示した図である。

【 図 1 】



フロントページの続き

(72)発明者 丸山 征郎

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘八丁目3番1号 鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座内

Fターム(参考) 2G045 AA13 BB50 BB51 CA26 DA36 FA11 FB01 FB03 GC10

4B024 AA11 BA80 CA04 DA06

4H045 AA30 BA10 CA40 EA50

专利名称(译)	重组人hmg-1标准物质及其样品中人类hmg-1的测定方法		
公开(公告)号	JP2004239880A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2003067314	申请日	2003-02-04
申请(专利权)人(译)	株式会社シノテスト		
[标]发明人	山田晋吾 井上惠一 矢ヶ部惠子 川原幸一 丸山征郎		
发明人	山田 晋吾 井上 惠一 矢ヶ部 惠子 川原 幸一 丸山 征郎		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C12N15/09 G01N33/50		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/50.F C12N15/00.A C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/GC10 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：为了容易地获得原材料，准备大量的准备工作，获取大量的原材料，降低原材料成本和准备所需的成本，不包含杂质或仅包含非常少量的杂质并进行测量。提供用于人类HMG-1分析的标准物质，该物质具有与目标物质人类高迁移率族蛋白1（人类HMG-1）相同的反应性，并且可以连续获得相同的反应性。此外，本发明提供了一种用于测量样品中的人类HMG-1的方法，该方法使得能够以低成本进行高质量的校准和质量控制，并且能够连续地获得更加准确和精确的测量值。用于人类HMG-1测量的标准物质，包括通过基因重组方法制备的人类HMG-1。此外，在测量样品中的人类HMG-1时，一种测量样品中的人类HMG-1的方法，其中将通过基因重组方法制备的人类HMG-1用于校准或质量控制的标准物质。[选型图]图1

