

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 344397

(P2003 - 344397A)

(43)公開日 平成15年12月3日(2003.12.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D
33/483			33/483	C
33/543	521		33/543	521
33/577			33/577	B
33/72			33/72	A
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10数)				

(21)出願番号 特願2003 - 72893(P2003 - 72893)

(22)出願日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(31)優先権主張番号 特願2002 - 77324(P2002 - 77324)

(32)優先日 平成14年3月19日(2002.3.19)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 重藤 修行

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器

産業株式会社内

(74)代理人 100077931

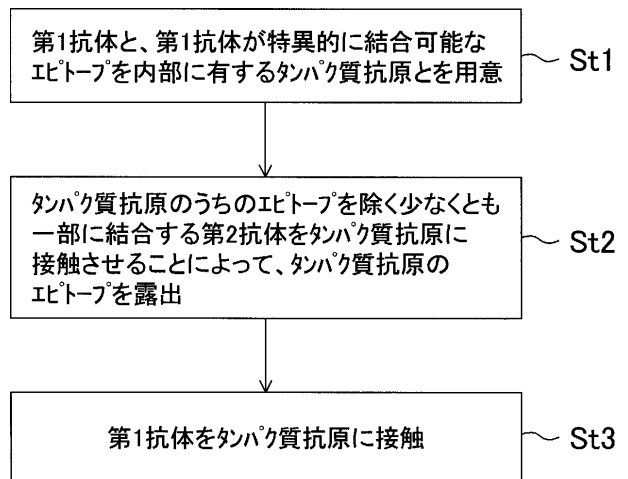
弁理士 前田 弘 (外10名)

(54)【発明の名称】 免疫学的測定方法、それに用いる試験片、および免疫学的測定装置

(57)【要約】

【課題】 測定精度、利便性等の良好な免疫学的測定方法を提供する。

【解決手段】 本発明の免疫学的測定方法は、図1に示すように、第1抗体と、第1抗体が特異的に結合可能なエピトープを内部に有するタンパク質抗原とを用意する工程 S t 1 と、タンパク質抗原のうちのエピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体をタンパク質抗原に接触させることによって、タンパク質抗原のエピトープを露出させる工程 S t 2 と、工程 S t 2 の後に、第1抗体をタンパク質抗原に接触させる工程 S t 3 とを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質抗原を測定する免疫学的測定方法であって、

第1抗体と、上記第1抗体が特異的に結合可能なエピトープを内部に有するタンパク質抗原とを用意する工程

(a)と、

上記タンパク質抗原のうちの上記エピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体を上記タンパク質抗原に接触させることによって、上記タンパク質抗原の上記エピトープを露出させる工程(b)と、

上記工程(b)の後に、上記第1抗体を上記タンパク質抗原に接触させる工程(c)と、

を含む免疫学的測定方法。

【請求項2】 請求項1に記載の免疫学的測定方法において、

上記第2抗体は、モノクローナル抗体である免疫学的測定方法。

【請求項3】 請求項1に記載の免疫学的測定方法において、

上記第1抗体は、固体支持体に固定化されている免疫学的測定方法。

【請求項4】 請求項3に記載の免疫学的測定方法において、

上記固体支持体は、マイクロタイタープレートである免疫学的測定方法。

【請求項5】 請求項3に記載の免疫学的測定方法において、

上記固体支持体は、試験片である免疫学的測定方法。

【請求項6】 請求項1に記載の免疫学的測定方法において、

上記タンパク質抗原は、ヘモグロビンA1cである免疫学的測定方法。

【請求項7】 タンパク質抗原の免疫学的測定に用いられる試験片であって、

基材と、

上記基材上に設けられ、タンパク質抗原の内部に位置するエピトープに特異的に結合可能な第1抗体が固定された抗体固定部と、

上記基材上において上記抗体固定部から離間して設けられた試料滴下領域と、

上記基材上において上記抗体固定部と試料滴下領域との間に位置し、且つ上記抗体固定部から離間して設けられ、上記タンパク質抗原のうちの上記エピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体が含浸された衝撃付与部と、

を備える試験片。

【請求項8】 基材と、試料滴下領域と、上記基材上において上記試料滴下領域から離間して設けられ、タンパク質抗原の内部に位置するエピトープに特異的に結合可能な第1抗体が固定された抗体固定部と、上記基材上に

において上記抗体固定部と試料滴下領域との間に位置し、且つ上記抗体固定部から離間して設けられ、上記タンパク質抗原のうちの上記エピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体が含浸された衝撃付与部とを備える試験片が導入される免疫学的測定装置であって、上記試料滴下領域に試料を滴下する試料滴下部と、上記抗体固定部を光学的に測定する光学的測定部とを備える免疫学的測定装置。

【発明の詳細な説明】

10 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗原、代表的には、タンパク質抗原を測定する免疫学的測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】抗原抗体反応は、抗原の特徴的な構造部位(エピトープ)に抗体が結合する反応である。タンパク質抗原において、上述の特徴的な構造部位(エピトープ)は、アミノ酸3~4残基から構成されるといわれている。タンパク質抗原中の任意の3~4残基のアミノ酸配列および立体構造を認識する抗体は、そのタンパク質抗原に特異的なものである。従って、全く同じアミノ酸配列および立体構造を有する夾雑物が混入しない限り、抗体が誤反応をすることはない。通常は、このような誤反応の可能性はほとんどないに等しい。このように、通常、抗体は、タンパク質抗原中の任意のアミノ酸配列および立体構造を認識するものであれば良い場合が多い。

【0003】ところが、わずかな構造の違いを確実に認識する必要がある場合には、抗原の任意の部位を認識する抗体では役に立たないことがある。例えば、糖化タンパク質のひとつであるヘモグロビンA1c(以下HbA1cと称する)を免疫学的に測定する場合、抗HbA1c抗体は、HbA1cと、必ず同時に存在する非糖化タンパク質であるヘモグロビンA0(以下HbA0と略称する)との違いを確実に認識するものでなければならない。しかしながら、この両者の違いは、アミノ酸鎖のN末端にフルクトースが結合しているか、していないかのみである。従って、抗HbA1c抗体は、フルクトースを含むアミノ酸鎖のN末端部位に結合するものでなければならない。つまり、抗HbA1c抗体に対するエピトープが、HbA1cのフルクトースを含むアミノ酸鎖のN末端部位でなければならない。このような抗体を作製する方法としては、任意のキャリアタンパク質に人為的に所望のエピトープを結合させた人工免疫原を用いるのが一般的である。このようにして得られた抗体は、確実に所望のエピトープを認識する。ところが、実際には、HbA1cがそうであるように、所望のエピトープがタンパク質構造体の内部に埋め込まれている場合が多い。このため、単にタンパク質抗原と抗体とを混合しただけでは、抗原抗体反応が生じないことがあった。

30 40 50 【0004】そこで、従来では、タンパク質抗原の内部

に埋め込まれた所望のエピトープを露出させるために、タンパク質抗原を熱変性させている。例えば、特許文献1は、タンパク質抗原を熱変性させることで所望のエピトープを露出させ、これを試料として測定に用いる方法を開示している。

【0005】

【特許文献1】特公平7-23891号公報。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、熱変性は、タンパク質抗原の所望のエピトープを露出させる方法としては有効であるが、制御が難しく、温度、時間などの最適条件を検討する作業が事前に必要である。また、タンパク質抗原を溶解している緩衝液の組成によってもその最適条件が変わってくる可能性がある。従って、従来のタンパク質抗原の免疫学的測定方法は、全体的にみて非常に煩雑である。

【0007】本発明は、上記事情を鑑みてなされたものであり、測定精度、利便性等の良好な免疫学的測定方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の免疫学的測定方法は、タンパク質抗原を測定する免疫学的測定方法であって、第1抗体と、上記第1抗体が特異的に結合可能なエピトープを内部に有するタンパク質抗原とを用意する工程(a)と、上記タンパク質抗原のうちの上記エピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体を上記タンパク質抗原に接触させることによって、上記タンパク質抗原の上記エピトープを露出させる工程(b)と、上記工程(b)の後に、上記第1抗体を上記タンパク質抗原に接触させる工程(c)とを含む。

【0009】本発明によれば、エピトープが内部に埋め込まれているタンパク質を、高い精度で、あるいは簡便で迅速に測定することが可能である。また、第2抗体が結合したタンパク質の全体量を、タンパク質抗原の量と同時に測定することが可能である。

【0010】上記第2抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0011】このことによって、タンパク質抗原において、第2抗体が結合する部位が均一となる。従って、タンパク質抗原内のエピトープを安定して露出させることができ、タンパク質抗原の測定精度、検出感度および測定結果の再現性が向上する。

【0012】上記第1抗体は、固体支持体に固定化されていてもよい。

【0013】上記固体支持体は、マイクロタイタープレートであってもよい。

【0014】上記固体支持体は、試験片であってもよい。

【0015】上記タンパク質抗原は、ヘモグロビンA1cである。

【0016】本発明の試験片は、タンパク質抗原の免疫学的測定に用いられる試験片であって、基材と、上記基材上に設けられ、タンパク質抗原の内部に位置するエピトープに特異的に結合可能な第1抗体が固定された抗体固定部と、上記基材上において上記抗体固定部から離間して設けられた試料滴下領域と、上記基材上において上記抗体固定部と試料滴下領域との間に位置し、且つ上記抗体固定部から離間して設けられ、上記タンパク質抗原のうちの上記エピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体が含浸された衝撃付与部とを備える。

【0017】本発明によれば、試料滴下領域に測定したいタンパク質(すなわちタンパク質抗原)を含む試料溶液を滴下した後、試料溶液の溶媒を展開すると、衝撃付与部においてタンパク質抗原は、標識された物質が結合し、且つ、エピトープが露出した状態となる。続いて、タンパク質抗原は、抗体固定部に到達すると抗体固定部に留められる。従って、抗体固定部を光学的に測定(例えば吸光度などを測定)することによって、タンパク質抗原の有無および含有量などを算出することができる。

【0018】本発明の別の免疫学的測定装置は、基材と、試料滴下領域と、上記基材上において上記試料滴下領域から離間して設けられ、タンパク質抗原の内部に位置するエピトープに特異的に結合可能な第1抗体が固定された抗体固定部と、上記基材上において上記抗体固定部と試料滴下領域との間に位置し、且つ上記抗体固定部から離間して設けられ、上記タンパク質抗原のうちの上記エピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体が含浸された衝撃付与部とを備える試験片が導入される免疫学的測定装置であって、上記試料滴下領域に試料を滴下する試料滴下部と、上記抗体固定部を光学的に測定する光学的測定部とを備える免疫学的測定装置。

【0019】本発明によれば、エピトープが内部に埋め込まれているタンパク質の測定を、試験片を用いて自動化することができる。このため、エピトープが内部に埋め込まれているタンパク質の測定を行なう測定者に対して特別な技術を必要としない。従って、非常に簡便にエピトープが内部に埋め込まれているタンパク質の測定を行なうことができる。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明は、抗原、代表的には、タンパク質抗原を測定する免疫学的測定方法に関する。より詳細には、本発明は、所望のエピトープが内部に埋め込まれているために抗体と反応できないタンパク質抗原が抗体と効果的に反応し得るように改変し、それによって得られたタンパク質抗原を用いた免疫学的測定方法に関する。

【0021】(実施形態1)以下、図を参照しながら本発明の実施の形態を説明する。図1は、本実施形態の免疫学的測定方法を表すフローチャートである。

【0022】本発明の免疫学的測定方法は、タンパク質

抗原を測定する免疫学的測定方法であり、図1に示すように、第1抗体と、第1抗体が特異的に結合可能なエピトープを内部に有するタンパク質抗原とを用意する工程St1と、タンパク質抗原のうちのエピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体をタンパク質抗原に接触させることによって、タンパク質抗原のエピトープを露出させる工程St2と、工程St2の後に、第1抗体をタンパク質抗原に接触させる工程St3とを含む。

【0023】次に、各工程を詳細に説明する。

【0024】まず、工程St1において、第1抗体と、第1抗体に抗原として認識されるタンパク質（すなわち、タンパク質抗原）を用意する。ここで、タンパク質抗原と第1抗体との組み合わせは、測定者が測定したいタンパク質（すなわち、標的タンパク質）と、それを認識する抗体との組み合わせであり、特に限定されるものではない。具体的には、タンパク質抗原は、所望の任意のタンパク質分析物であって、代表的には、医学および診断学の分野で測定対象になり得る、プロタミン類、ムコタンパク質類、糖タンパク質類、グロブリン類、アルブミン類、リンタンパク質、ヒストン類、リポタンパク質、クロモタンパク質、ヌクレオタンパク質などを包含し得る。

【0025】次に、工程St2において、タンパク質抗原のうちのエピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体（補助抗体）をタンパク質抗原に接触させることによって、タンパク質抗原のエピトープを露出させる。このとき用いる第2抗体は、タンパク質抗原に衝撃を与えるものを用いる。なお、本明細書で用いる用語「衝撃」は、タンパク質抗原に立体構造の変化を生じさせる影響を意味する。第2抗体をタンパク質抗原に接触させることによって、タンパク質抗原の内部に埋没した所望のエピトープが露出するため、所望のエピトープに特異的に結合する抗体が接近することができる。従って、タンパク質抗原と抗体とが免疫学的に反応することが可能となる。

【0026】第2抗体（補助抗体）は、代表的にはモノクローナル抗体であって、当業者に周知の方法、例えば、KoehlerおよびMilstein (Nature 256:495 [1975]) に記載されるハイブリドーマ技術、Kosborら、1983、Immunol. Today 4:72、Coteら、1983、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026) に記載されるヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびColeら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R Liss Inc.、New York, NY、77-96頁[1985]に記載のEBVハイブリドーマ技術などによって容易に調製され得る。

【0027】ここで、上述のモノクローナル抗体の調整

方法を簡単に述べる。まず、所望の選択されたタンパク質抗原を用いて、適切な動物を免疫化する。免疫化の後、動物から脾臓を取り出し、選択条件下で脾臓細胞を不死化骨髄腫細胞と融合する。その後、得られた細胞を各クローンに分離し、各クローンの上清について、タンパク質抗原に結合する抗体の産生を試験する。次いで、第1抗体と、第1抗体が結合するエピトープとの結合を促進するか否かを試験することによって補助抗体を調整する。なお、免疫化に際して、タンパク質抗原を、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などの担体物質に結合させ、抗体の産生を確実にする。このような担体物質の使用は当業者に公知である。

【0028】抗体を産生する技術は当該分野で周知である。例えば、Godingら、MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (第2版) Acad. Press、N.Y. に記載されている。

【0029】第2抗体（補助抗体）は、第1抗体と、第1抗体が結合するエピトープとの反応を促進するのに十分な量でタンパク質抗原と混合して用いられる。具体的に、第1抗体と、第1抗体が結合するエピトープとの反応を促進するためには、第2抗体の分子数とタンパク質抗原の分子数との比が1:10~10:1であるように第2抗体とタンパク質抗原とが混合されていることが好ましい。

【0030】また、第2抗体は、必要に応じて、当該分野で公知の方法により任意の標識方法により標識されたものが用いられる。標識の例としては、酵素標識、色素標識、磁性標識、放射性標識、色の付いた粒子（金コロイド、ラテックスなど）などが挙げられる。

【0031】なお、本実施形態ではタンパク質抗原に衝撃を与える材料として、タンパク質抗原のうちのエピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体を用いているが、例えば、ジチオスレイトールおよびグアニジン等の化学薬剤、ならびに酵素等のタンパク質をタンパク質抗原を含む溶液中に添加する化学的手法、あるいはタンパク質抗原を含む溶液に光照射、超音波処理等を行なう物理的手法等を用いることができる。

【0032】上記化学的手法では、カオトロピック剤 (chaotropic agent) と呼ばれる化学薬剤が、適切な濃度で用いられる。カオトロピック剤としては、代表的には、グアニジン、尿素、ドデシル硫酸ナトリウム、デオキコレート、胆汁算塩類、有機溶剤（メタノール、プロパノール、アセトニトリルなど）、チオシアン酸カリウム、非イオン界面活性剤、メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどが好適に用いられる。このような化学薬剤は、通常、室温条件、つまり非加熱条件下で、タンパク質抗原と接触させて用いられる。このような、化学薬品は、タンパク質抗原中の所望

のエピトープを露出するために十分な濃度で用いられる。例えば、グアニジンを用いる場合、通常、約1モル濃度以上、好ましくは約3モル濃度で、約5分～数時間の間タンパク質抗原と接触させることによって、タンパク質抗原中の所望のエピトープを露出させる。

【0033】なお、上述の化学的手法および物理的手法は、タンパク質抗原に立体構造の大きな変化を生じさせる。また、上記各手法は、タンパク質抗原の至適温度から著しく高い温度条件で行なわれることもある。従って、タンパク質抗原の活性および立体構造は著しく変化 10 する可能性がある。このため、後述する工程S t 3において、抗原抗体反応が生体内の環境とは大きく異なる可能性が高い。

【0034】一方、本実施形態のタンパク質抗原のうちのエピトープを除く少なくとも一部に結合する第2抗体（補助抗体）を用いる方法は、タンパク質抗原を変性させることなく、タンパク質抗原に立体構造の比較的小さな変化を生じさせる。また、この方法は、タンパク質抗原の至適温度付近で行なわれる。従って、タンパク質抗原の立体構造が著しく変化する可能性は小さい。このため、後述する工程S t 3において、抗原抗体反応が生体内の環境と非常に近くなり、より生体内の環境を反映した測定結果が得られる。

【0035】次に、工程S t 3において、第1抗体をタンパク質抗原に接触させる。このとき、上記工程S t 2で露出されたタンパク質抗原の所望のエピトープに第1抗体が結合する。

【0036】特に、本実施形態の免疫学的測定方法では、第1抗体が固体支持体に固定化されている。固体支持体としては、例えば、ニトロセルロース製メンブレ 30 ン、酢酸セルロース製メンブレ、ガラス繊維濾紙、不織布などからなる試験片が好適に用いられる。また、固体支持体として、マイクロタイタープレートもまた好適に用いることができる。マイクロタイタープレートは、ポリスチレン製、ポリビニール製、ポリカーボネート製、ポリプロピレン製、シリコン系、ガラス系、デキストラン系材料から形成されたマイクロタイタープレートであり得る。

【0037】本実施形態の免疫学的測定方法は、以上に述べた工程S t 1～S t 3を行なった後、当業者に公知 40 である免疫アッセイ法により、タンパク質抗原を測定する。例えば、免疫アッセイ法としては、酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、免疫比濁法、免疫比ろろ法、または免疫クロマトグラフィ法などが適用可能である。上記の各免疫アッセイ法のなかでも、感度の面で優れている酵素免疫測定法、あるいは簡便性および迅速性に優れている免疫クロマトグラフィ法を用いれば、本実施形態の免疫学的測定方法の測定精度、あるいは利便性がより向上する。

【0038】本実施形態の免疫学的測定方法によれば、 50

例えばH b A 1 cのように特徴的なエピトープが内部に埋め込まれているタンパク質を、高い精度で、あるいは簡便で迅速に測定することが可能である。

【0039】また、タンパク質抗原に衝撃を与える材料として第2抗体を用いる場合、第2抗体が結合したタンパク質の全体量を、タンパク質抗原の量と同時に測定することが可能である。

【0040】（実施形態2）次に、上記実施形態1の免疫学的測定方法において用いられる試験片および測定装置を図を参照しながら説明する。図2は、上記実施形態1の免疫学的測定方法において用いられる試験片を表す図であり、図3は上記実施形態1の免疫学的測定方法において用いられる測定装置を表す図である。

【0041】（試験片）図2に示すように、試験片100は、基材101からなり、抗体固定部102と、衝撃付与部103と、試料滴下領域104とを備える。

【0042】基材101は、測定したいタンパク質（すなわちタンパク質抗原）を含む試料溶液の溶媒を含浸する材料から形成されており、例えば、ニトロセルロース製メンブレ、酢酸セルロース製メンブレ、ガラス繊維濾紙、不織布などから形成されている。

【0043】抗体固定部102には、タンパク質抗原を認識する抗体（すなわち上記実施形態1における第1抗体）が固定されている。

【0044】衝撃付与部103には、タンパク質抗原に衝撃を与える標識された物質（例えば、上記実施形態1における金コロイドで標識された第2抗体）が含まれている。

【0045】試料滴下領域104は、測定したいタンパク質（すなわちタンパク質抗原）を含む試料溶液が滴下される領域である。

【0046】試料滴下領域104に測定したいタンパク質（すなわちタンパク質抗原）を含む試料溶液を滴下した後、試料溶液の溶媒を図2に示す矢印Aの方向に沿って展開すると、衝撃付与部103においてタンパク質抗原は、標識された物質が結合し、且つ、エピトープが露出した状態となる。続いて、タンパク質抗原は、抗体固定部102に到達すると抗体固定部102に留められる。従って、抗体固定部102を光学的に測定（例えば吸光度などを測定）することによって、タンパク質抗原の有無および含有量などを算出することができる。

【0047】本実施形態の試験片100では、衝撃付与部103にタンパク質抗原に衝撃を与える標識された物質が固定されている。具体的には、タンパク質抗原に衝撃を与える標識された物質として、上記実施形態1における金コロイドで標識された第2抗体が挙げられるがこれに限定されない。例えば、上記実施形態1で述べたカオトロピック剤と、タンパク質抗原に結合するが衝撃を与えない抗体とをそれぞれ衝撃付与部103に固定して おいてもよい。

【0048】(測定装置)図3に示すように、測定装置200は、試験片100が挿入されたときに、挿入された試験片100の試料滴下領域104に試料溶液を滴下する試料滴下部201と、試験片100の抗体固定部102を光学的に測定する光学的測定部202と、試料滴下部201および光学的測定部202に電氣的に接続された制御・解析部203とを備える。

【0049】測定装置200内に試験片100が挿入されると、試験片100は試料滴下部201に運搬され、試料滴下部201内に設置される。試料滴下部201には予め試料溶液および試料溶液の溶媒をそれぞれ貯留しておく槽が設けられており、試験片100が試料滴下部201内に設置されたことが制御・解析部203で検知されると、制御・解析部203は、試料滴下部201に対して試料滴下領域104に試料溶液を滴下するように指示を行なう。試料滴下領域104に試料溶液が滴下されると、続いて試料滴下部201から試料溶液の溶媒が試料滴下領域104に滴下され、試料溶液中に含まれる試料が試験片100に展開される。

【0050】次に、制御・解析部203に設定された所定の時間が経過すると、試験片100は光学的測定部202に運搬され、光学的測定部202内に設置される。この後、試験片100の抗体固定部102を光学的に測定する。測定によって得られたデータは制御・解析部203に転送され、演算、解析などが行なわれる。

【0051】本発明の測定装置200によれば、上記実施形態1の免疫学的測定方法の各工程を、試験片100を用いて自動化することができる。このため、上記実施形態1の免疫学的測定方法を実施するための特別な技術を、測定者に対して必要としない。従って、非常に簡単に上記実施形態1の免疫学的測定方法を実施することができる。

【0052】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。以下の実施例は、例示の目的で提供され、本発明を限定するものではない。

【0053】なお、以下の実施例においては、タンパク質抗原としてHbA1cを、第1抗体として抗HbA1c抗体を用いている。また、エピトープを露出する手段として、グアニジンおよび第2抗体(補助抗体)をそれぞれ使い、測定の基本原理として、酵素免疫測定法、免疫クロマトグラフィ法を用いている。なお、以下に説明する実施例では、第2抗体を「補助抗体」と称する。

【0054】(抗HbA1c抗体の作製)HbA0に対して特徴的なHbA1cの構造を、エピトープとして認識する抗HbA1c抗体であるモノクローナル抗体を以下の方法で作製した。

【0055】1. マウスの免疫

図4に示した化学構造のHbA1cエピトープ(フルクトース-VAL-HIS-LEU-THR-CYS)

が、チキン-グロブリン(CGG)1分子あたりに31分子結合したCGGコンジュゲートを作製し、これを人工免疫原としてマウスに免疫した。生後約8週のマウス(Balb/c)5匹に、作製した人工免疫原(CGコンジュゲート・アジュバント混合)をそれぞれの腹腔内に100 μ Lずつ注射した。免疫注射後、77日を経過したマウスについて、眼静脈より50~100 μ Lの血液を遠心管に採取した。血清を遠心分離し、ELISA法による抗体価の評価を行なったところ、全てのマウスについて抗HbA1c抗体の産生が確認された。なお、ここでのELISA評価には固相抗原として、図4に示した化学構造のHbA1cエピトープ(フルクトース-VAL-HIS-LEU-THR-CYS)が、ウシ血清アルブミン(BSA)1分子あたりに2分子結合したBSAコンジュゲート、ならびにネイティブのHbA1cを用いた。

【0056】前述の抗体価の評価で、特に力価の高かったマウスについてマウスの脾臓を肥大させるためにブースト(弱い免疫原の注射)を行なった。免疫原はCGGコンジュゲートをリン酸緩衝液(PBS)で希釈して得た1mg/mL溶液を、アジュバントを加えずにそのまま用いた。

【0057】2. 細胞融合

ブースト後3日を経過したマウスの脾臓細胞を摘出し、平均分子量1,500のポリエチレングリコールを用いる常法により、マウス骨髄腫由来細胞ライン(P3X63-Ag8.653)と融合した。フィーダー(成長因子を供給する細胞)として同じマウスの脾臓細胞を用い、96ウェルプレート2枚の上で15%のウシ胎児血清(以下、FCS)を含むHAT培地で培養した。1週間後、15%のFCSを含む新鮮HAT培地と交換した。

【0058】3. クローニング

ELISA法による抗体価の測定を行い、力価の高いものから上位5ウェルを選択した。ウェルあたり1個の細胞が含まれる濃度に希釈(限界希釈)し、96ウェルのマイクロプレート5枚に分注した。フィーダーとして生後5週のマウス(Balb/c)の胸線細胞を用いて初期増殖を促した。プレートのサイズを上げながら培養を進め、適時上清についてELISA法による抗体価測定を繰り返し、HbA1cに対して高い力価を示し、かつ良好な増殖を示している細胞群を最終的に選別し、200mL中で5 \times 10⁵細胞/mLの濃度に至るまで培養を進めた。最終的に選別された細胞は、上清を遠心分離し、5 \times 10⁶細胞/mLの濃度でFCS:ジメチルスルホキシド=9:1の溶液1mLに浮遊させ、使用するまで、-80 $^{\circ}$ Cで凍結した後、液体窒素中に移して長期保存状態にした。

【0059】使用に際し、プロテインA結合セファロースゲル(ファルマシア社製)を用いたアフィニティーク

ロマトグラフィにより細胞培養上清からモノクローナル抗体を精製した。このモノクローナル抗体は、Mouse Monoclonal Typing Kit (パインディングサイト社製) による検定の結果、IgGであることを確認し、F3A7と命名した。なお、この抗体(F3A7)は、エピトープがBSAに結合したBSAコンジュゲート、およびプレート上に固相化されたHbA1cには結合するが、溶液中、フリーの状態のHbA1cには結合しなかった。また、F3A7はHbA0に対しては状況(固相化、フリー)に関係なくほとんど結合しなかった。

【0060】(補助抗体の作製) HbA1cエピトープを露出する能力を有する補助抗体を以下のように作製した。1mg/mlに調製したヒトヘモグロビンを免疫原としてマウスを免疫し、抗体価の評価を前述の場合と同様に行なった。初回免疫後80日を経過したマウスについて、前述と同様にブースト免疫を行い、細胞融合を行なった。融合後のウェルの選択は以下のELISA条件での測定で行なった。

【0061】抗HbA1c抗体(F3A7)を0.1mg/mlに調製し、96ウェルのELISAプレートに100μl/ウェルで注入して、4で一晩静置して固定化した。これを1%BSA・PBS、200μl/ウェルでブロッキング(室温、30分)し、PBSで3回洗浄した。このプレートに50μl/ウェルで培養上清を入れた後、最終濃度 10^{-7} MとなるようにHbA1cのPBS溶液を50μl/ウェルで加えた(総量100μl/ウェル)。室温で3時間静置した後、PBSで3回洗浄した。このプレートに0.2μg/mlに調製したペルオキシダーゼ標識抗ヘモグロビン抗体(ベツチル社製)を100μl/ウェルで加え、室温で30分間静置した後、PBSで3回洗浄した。このプレートに4mg/mlに調製したo-フェニレンジアミンのリン酸クエン酸緩衝液(pH=5)を100μl/ウェルで加え、5分間の酵素反応を行なった。4Nの硫酸で反応を停止した後、プレートリーダーを用いて492nmの吸光度を測定した。

【0062】上記のELISA測定により、発色の見られたウェルを選択し、前述の抗HbA1c抗体の場合と同様にクローニングを行なって、精製モノクローナル抗体を得た。このモノクローナル抗体は、Mouse Monoclonal Typing Kit (パインディングサイト社製) による検定の結果、IgMタイプの抗体であることを確認し、HbM4と命名した。なお、HbM4は、HbA0とHbA1cの両方に結合した。また、HbM4を産生する細胞株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成15年1月30日に寄託した(受託番号FERM BP-8286号)。

【0063】(酵素免疫測定法によるフリーのHbA1

cの測定)

1. グアニジンを用いた測定

10^{-4} MのHbA1cのPBS溶液に最終濃度3Mとなるようにグアニジン塩酸塩を加え、室温で3時間静置した。この溶液をPBSで希釈し 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} MのHbA1c希釈系列を調製した。また、比較のため、グアニジンを含まない同様の希釈系列も作製した。

【0064】抗HbA1c抗体(F3A7)を0.1mg/mlに調製し、96ウェルのELISAプレートに100μl/ウェルで注入して、4で一晩静置して固定化した。これを1%BSA・PBS、200μl/ウェルでブロッキング(室温、30分)し、PBSで3回洗浄した。このプレートに、上記のように調製したHbA1cの希釈系列を100μl/ウェルで加え、室温で3時間静置した後、PBSで3回洗浄した。0.2μg/mlに調製したペルオキシダーゼ標識抗ヘモグロビン抗体(ベツチル社製)を100μl/ウェルで加え、室温で30分間静置した後、PBSで3回洗浄した。このプレートに4mg/mlに調製したo-フェニレンジアミンのリン酸クエン酸緩衝液(pH=5)を100μl/ウェルで加え、5分間の酵素反応を行なった。4Nの硫酸で反応を停止した後、プレートリーダーを用いて492nmの吸光度を測定した。その結果を図5に示す。図5に示されるように、グアニジンで処理されなかったHbA1cが約 10^{-7} M濃度以上でのみ抗HbA1c抗体(F3A7)と反応したのに対し、グアニジンで処理されたHbA1cは約 10^{-9} M濃度からF3A7と反応することが確認された。このように、グアニジンの添加による化学的衝撃でHbA1cのエピトープが、抗体との反応に有効な程度に露出したことが示された。

【0065】2. 補助抗体(HbM4)を用いた測定 HbM4の0.02mg/mlのPBS溶液(最終濃度0.01mg/ml)を調製し、補助抗体として用いた。HbA1cの希釈系列は前述と同様、最終濃度で 10^{-5} M~ 10^{-11} Mになるように 2×10^{-5} M~ 2×10^{-11} Mのものを用いた。前述と同様の方法で固定化、ブロッキングしたプレートに、HbA1cの希釈系列50μlとHbM4の溶液50μlとを各ウェルに入れ、室温で3時間静置した後、PBSで3回洗浄した。その後、前述と同様の方法で、ペルオキシダーゼ標識抗ヘモグロビン抗体との反応、および基質を加えた酵素反応を行なって、492nmの吸光度を測定した。その結果を図6に示す。図6に示されるように、補助抗体を用いない場合、HbA1cが約 10^{-7} M濃度以上でのみ抗HbA1c抗体(F3A7)と反応したのに対し、補助抗体を用いた場合、HbA1cは約 10^{-9} M濃度からF3A7と反応することが確認された。このように、HbM4を加えることでHbA1cのエピトープが有効に露出されていることがわかる。

【0066】(免疫クロマトグラフィ法によるフリーのHbA1cの測定)

1. グアニジンを用いた測定

エピトープ露出効果の見られない抗ヘモグロビン抗体(Hb4-1、別途作製したものを)、pH9の条件下で粒径20nmの金コロイド表面に吸着させ、金コロイド標識ヘモグロビン抗体(Au-Hb4-1)を作製した。この標識抗体を含む溶液を、1%のBSAを含むpH8.2のトリス緩衝液を用いて、520nmの吸光度が5.0になるように調製し、25μlずつ分注した

後、凍結乾燥して使用するまで4で保存した。
【0067】一方、図7に示すように、抗HbA1c抗体(F3A7)を、1mg/mlの濃度となるようにPBS溶液中に調製した後、幅0.5cm、長さ2.5cmのニトロセルロースメンブレン(ミリポア社製)上にライン状に塗布し、自然乾燥して、メンブレン上に固定化した。

【0068】測定には、前述の酵素免疫測定法の場合と同様のグアニジン処理をした 10^{-7} MのHbA1c溶液と、比較のためのグアニジン処理をしていない同濃度のHbA1c溶液を試料として用いた。

【0069】まず、グアニジン処理をした試料25μlを、あらかじめ作製・凍結乾燥保存しておいた金コロイド標識ヘモグロビン抗体(Au-Hb4-1)と混合した。凍結乾燥状態であったAu-Hb4-1が完全に溶解するのを確認した後、この溶液を図7のメンブレンの片端に添加した。添加した溶液はキャピラリー効果によって展開し、F3A7が固定化してある部分に達した時、金コロイドによる発色が現れた。試料の添加から5分後、固定化部の520nmでの吸光度をスキャニング

デンシトメータ(島津製作所製、CS-9300)で測定したところ、その値は0.35であった。次に比較のため、グアニジン処理をしていないHbA1c試料を同様に展開したところ、固定化部での発色は見られなかった。ちなみに、この場合の固定化部の520nmでの吸光度は0.02で固定化部以外のバックグラウンドとほぼ同じ値であった。

【0070】2. 補助抗体(HbM4)を用いた測定
補助抗体HbM4を前述のグアニジンの場合と同様に金コロイド表面に吸着させ、金コロイド標識HbM4(Au-HbM4)を作製した。また、固定化メンブレンは前述と同様のF3A7を固定化したものを用いた。
【0071】 10^{-7} MのHbA1c溶液(特に処理をしていない通常のもの)25μlを凍結乾燥保存してあった金コロイド標識HbM4(Au-HbM4)と混合し、完全に溶解するのを確認した後、固定化メンブレンの片端に添加し、メンブレン上を展開させた。HbA1c試料には特に処理を施していないにもかかわらず、固*

*定化部での発色が確認できた。試料添加から5分経過後の固定化部の520nmでの吸光度は0.55であった。前述のAu-Hb4-1の場合、処理をしていないHbA1c試料では発色が確認できなかったことから、このAu-HbM4は発色に寄与する標識抗体としての機能に加え、エピトープの露出化の機能を同時に有する有用な材料であることがわかる。

【0072】以上説明したように、本発明の免疫学的測定方法を用いれば、その構造内部にエピトープが埋め込まれて測定が困難であったタンパク質も、熱変性させることなく、容易に測定することができるようになる。

【0073】また、本発明の免疫学的測定方法は、既存の酵素免疫法、蛍光法、凝集法、比ろう法、免疫クロマトグラフィ法といった従来の多くの基本測定方法に適用することができる。なかでも免疫クロマトグラフィ法への適用は、簡便・迅速という免疫クロマトグラフィ法の特徴を最大限に活かすことができるため非常に有効である。

【0074】

【発明の効果】本発明によれば、測定精度、利便性等の良好な免疫学的測定方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の実施形態1の免疫学的測定方法を表すフローチャートである。

【図2】図2は、本発明の試験片を表す図である。

【図3】図3は、本発明の測定装置を表す図である。

【図4】図4は、HbA1cのエピトープ(フルクトース-VAL-HIS-LEU-THR-CYS)の化学構造を表す図である。

【図5】図5は、抗HbA1c抗体(F3A7)とフリーのHbA1cとの結合において、酵素免疫測定法でのグアニジン処理の効果を表した図である。

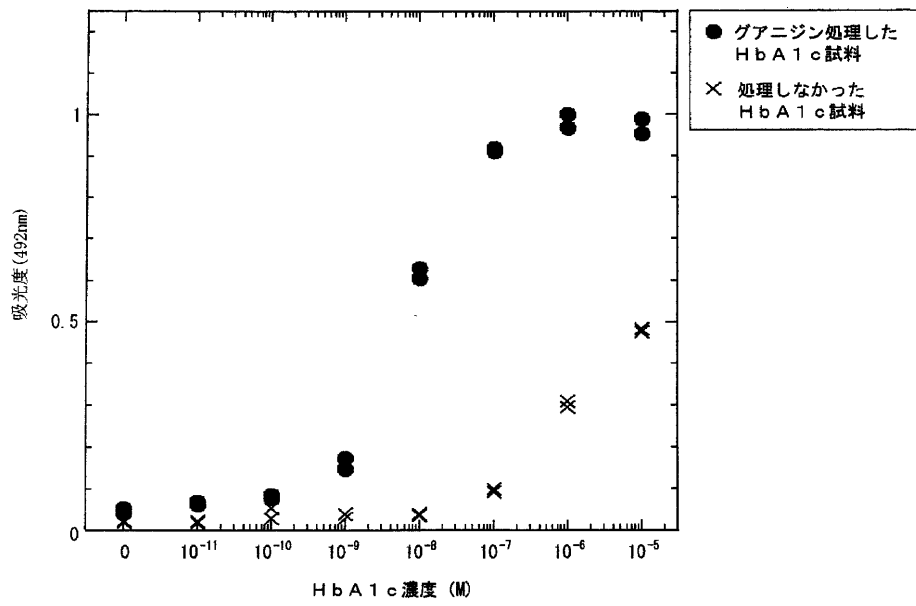
【図6】図6は、抗HbA1c抗体(F3A7)とフリーのHbA1cとの結合において、酵素免疫測定法での補助抗体(HbM4)添加の効果を表した図である。

【図7】図7は、免疫クロマトグラフィ法で用いられる測定系の概容を表す図である。

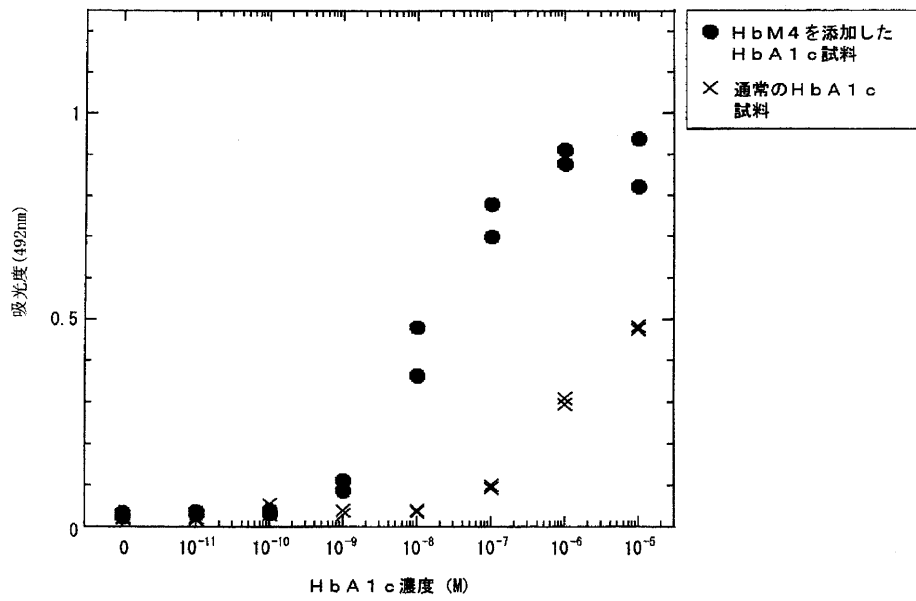
【符号の説明】

- 100 試験片
- 101 基材
- 102 抗体固定部
- 103 衝撃付与部
- 104 試料滴下領域
- 200 測定装置
- 201 試料滴下部
- 202 光学的測定部
- 203 制御・解析部

【図5】



【図6】



专利名称(译)	免疫学测量方法，用于其的试验片和免疫学测量装置		
公开(公告)号	JP2003344397A	公开(公告)日	2003-12-03
申请号	JP2003072893	申请日	2003-03-18
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	重藤修行		
发明人	重藤 修行		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/483 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/72		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/483.C G01N33/543.521 G01N33/577.B G01N33/72.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BB36 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/DA48 2G045/FA11 2G045/FA13 2G045/FA26 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB15 2G045/GC10 2G045/JA01		
优先权	2002077324 2002-03-19 JP		
其他公开文献	JP2003344397A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种具有良好的测量精度，便利性等的免疫学测量方法。 解答：如图1所示，本发明的免疫学测量方法包括步骤St1：制备第一抗体和内部具有能够与第一抗体特异性结合的表位的蛋白抗原的蛋白抗原。 步骤St2，通过使蛋白质抗体与第二抗体相接触而暴露蛋白质抗原的表位，该第二抗体与除了抗原决定部位之外的至少一部分蛋白质抗原结合，并且在步骤St2之后，第一抗体变为蛋白质抗原。 和St3联系的步骤。

