

(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2013-124224

(P2013-124224A)

(43) 公開日 平成25年6月24日(2013.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	A
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531	A
C O 7 K 16/26 (2006.01)	C O 7 K 16/26	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2011-273218 (P2011-273218)	(71) 出願人	000003300
(22) 出願日	平成23年12月14日 (2011.12.14)		東ソー株式会社
			山口県周南市開成町4560番地
		(72) 発明者	小林 龍司
			神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社東京研究センター内
		Fターム(参考)	4H045 AA11 AA20 AA50 CA42 DA75 EA50 FA71

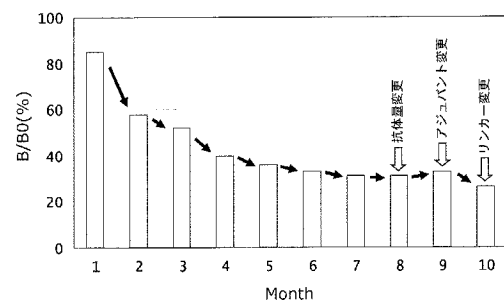
(54) 【発明の名称】 抗原検出感度が高い抗体を取得するための免疫方法

(57) 【要約】

【課題】 競合法を用いた抗原抗体反応による低分子量化合物の測定で使用する抗体の取得方法であって、従来の抗体より、前記低分子量化合物（抗原）に対する検出感度の高い抗体を取得する方法を提供すること。

【解決手段】 低分子量化合物とキャリアタンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫することで、前記低分子量化合物に対する抗体を得る際、前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫することで、前記課題を解決する。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

低分子量化合物とキャリアータンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて動物を免疫することで、前記低分子量化合物に対する抗体を得る方法であって、
前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて動物を免疫する、前記方法。

【請求項 2】

前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体が、
低分子量化合物とキャリアータンパク質とを第一のリンカーを介して結合することで得られる、第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体、および
低分子量化合物とキャリアータンパク質とを第二のリンカーを介して結合することで得られる、第二の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体であり、
最初に第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて継続的に動物を免疫後、第二の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて継続的に動物を免疫する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体における、低分子量化合物とリンカーとの結合位置が同一である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

低分子量化合物がステロイドホルモンである、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

ステロイドホルモンがプロゲステロン (Progesterone) であり、前記複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体におけるプロゲステロンとリンカーとの結合位置が、プロゲステロンの 11 位の炭素原子である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

低分子量化合物とキャリアータンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体と、リンカーを介して標識物質と結合した低分子量化合物と、
を含む、前記低分子量化合物の測定試薬であって、前記抗体が、
前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体である、前記測定試薬。

30

【請求項 7】

前記複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体のうちの一つにおける、低分子量化合物とキャリアータンパク質との結合を介するリンカーが、標識物質と低分子量化合物との結合を介するリンカーと同一である、請求項 6 に記載の試薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗原検出感度が高い抗体を取得するための、動物への免疫方法に関する。

40

【背景技術】**【0002】**

脊椎動物には、自己を病気から守るための免疫系が備わっている。免疫系とは、体内へ侵入した病原体を認識して攻撃し、排除する生体保護システムである。ここで重要なのが、生体自身 (自己) とそれ以外の異物 (非自己) との識別である。この識別で主要な役割を果たしているのが、抗体である。

【0003】

抗体は主に血液中にあり、血流によって体内を循環している。そして病原体が体内へ侵入すると、前記抗体が当該病原体中の特定物質を特異的に認識し、結合する。この時、抗体が認識する特定物質のことを抗原と呼ぶ。抗体と抗原との結合は、「鍵と鍵穴」に相当

50

するメカニズムで行なわれる。すなわち、抗体の抗原結合部位（鍵穴）に当てはまる抗原（鍵）のみが結合できる仕組みである。そのため、抗体と抗原との結合にはそれぞれの立体構造が非常に重要といえる。

【0004】

抗体と抗原との特異的相互作用（結合）は高い親和性を有している。例えば、マウスモノクローナル抗体とその抗原との結合における解離定数（ K_d ）は 1×10^{-9} から 10^{-10} にもなる。これは仮に、抗体と抗原の濃度がそれぞれ 1 M となるように混ぜた場合、96%以上の抗原が抗体と結合するほどの高い親和性である。そのため、たとえ微量の抗原であってもそれが体内へ侵入すると、抗体によって捕捉することが可能である。

【0005】

前述したように、抗体と抗原との結合には特異性と親和性という点で大きな特徴がある。そのため抗体は、夾雑物中にある微量の特定物質を検出するための道具として非常に有用といえる。そしてこの利点を生かして、実験用試薬、免疫診断試薬、治療用医薬品など、数多くの製品が開発されている。

【0006】

抗体を用いて特定物質を検出する方法についてはこれまで非常によく研究されており、数多く報告されている。しかしその中心となる部分に注目すると、数種類に分類することができる。最も代表的な方法が、サンドイッチ法と競合法である。サンドイッチ法は、抗原を二種類の抗体で挟みこむことで捕捉し、検出する手法である。この方法ではまず、一方の抗体（一次抗体）を担体に固定化しておき、この一次抗体の働きにより、抗原を担体上に固定する。次に酵素や蛍光色素などで標識したもう一方の抗体（二次抗体）を加える。この標識した二次抗体が担体上に固定された抗原を捕捉して結合する。そしてこの標識した二次抗体により発せられるシグナルを検出することで抗原を定量する（図1）。一方競合法は、一種類の抗体を用いて抗原を検出する方法である。この方法では、抗体を担体に固定化しておき、抗原を含む試料および酵素や蛍光色素などで標識した抗原（標識化抗原）を添加する。試料中の抗原量が増えると、抗体と結合する標識化抗原が減り、シグナルが弱くなる。抗原を含まない試料を添加したときにおける標識化抗原により発せられるシグナルを100%としたときの、抗原を含む試料を添加したときにおける標識化抗原により発せられるシグナルの割合から、試料中の抗原量を算出する（図2）。

【0007】

サンドイッチ法、競合法、いずれの方法でも、抗原を定量的に検出できる。しかし、その測定原理の違いにより利点と欠点がある。サンドイッチ法では、二次抗体の量を自由に増やすことができるため、シグナルを増幅することができる。そのため、微量の抗原でも高い感度で検出できる。しかし、測定に適した二種類の抗体を用意する必要があるため、サンドイッチ法で検出できる物質は、抗体と相互作用する部位を複数有した、比較的分子量の大きいものに限られる。一方競合法では、使用する抗体が一種類で済み、実験操作がサンドイッチ法より1ステップ少ないため測定時間が短く済み、抗体と相互作用する部位が少ない低分子量化合物（非特許文献1）であっても抗原を定量的に検出できる。しかし、サンドイッチ法のようにシグナルを増幅することはできないため、同じ性能の抗体を使用した場合で比較すると、感度の点ではサンドイッチ法より劣る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】生化学、82(8)、710:2010

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

前述したように、低分子量化合物は抗体と相互作用する部位が少ないため、当該化合物を抗原抗体反応を利用して定量するには、サンドイッチ法ではなく競合法による測定が用いられる。しかしながら、競合法はサンドイッチ法と比較し、抗原である低分子量化合物

10

20

30

40

50

を高い感度で検出することは困難であった。また低分子量化合物を高い感度で検出する抗体の取得には、通常、複数匹の動物に対して同時に免疫を行ない、その中で最も性能の良い抗体を選ぶ戦略で取得を試みるが、目的の感度を有する抗体を取得できるかどうかは運次第であり、結果として取得に伴い多くの動物の命を犠牲にするなど、課題があった。

【 0 0 1 0 】

前記問題を解消するため、免疫に使用する抗原量やアジュバントの種類について数多くの研究が行なわれてきた。しかし現在までのところ、前記課題を解決する方法は見つっていない。

【 0 0 1 1 】

本発明は前記課題の解決を目指したものである。すなわち、本発明が解決しようとする課題は、競合法を用いた抗原抗体反応による低分子量化合物の測定で使用する抗体の取得方法であって、従来の抗体より、前記低分子量化合物（抗原）に対する検出感度の高い抗体を取得する方法を提供するものである。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

前記課題を鑑みてなされた本発明は、以下の態様を包含する。

【 0 0 1 3 】

すなわち本発明の第一の態様は、

低分子量化合物とキャリアタンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫することで、前記低分子量化合物に対する抗体を得る方法であって、
前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫する、前記方法である。

20

【 0 0 1 4 】

また本発明の第二の態様は、

前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体が、低分子量化合物とキャリアタンパク質とを第一のリンカーを介して結合することで得られる、第一の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体、および
低分子量化合物とキャリアタンパク質とを第二のリンカーを介して結合することで得られる、第二の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体であり、
最初に第一の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて継続的に動物を免疫後、第二の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて継続的に動物を免疫する、前記第一の態様に記載の方法である。

30

【 0 0 1 5 】

また本発明の第三の態様は、前記複数の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体における、低分子量化合物とリンカーとの結合位置が同一である、前記第一または第二の態様に記載の方法である。

【 0 0 1 6 】

また本発明の第四の態様は、低分子量化合物がステロイドホルモンである、前記第一から第三のいずれかの態様に記載の方法である。

40

【 0 0 1 7 】

また本発明の第五の態様は、ステロイドホルモンがプロゲステロン（progesterone）であり、前記複数の低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体におけるプロゲステロンとリンカーとの結合位置が、プロゲステロンの 11 位の炭素原子である、前記第四の態様に記載の方法である。

【 0 0 1 8 】

さらに本発明の第六の態様は、

低分子量化合物とキャリアタンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物 - キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体と、リンカーを介して標識物質と結合した低分子量化合物と、

50

を含む、前記低分子量化合物の測定試薬であって、前記抗体が、前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体である、前記測定試薬である。

【0019】

また本発明の第七の態様は、前記複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体のうちの一つにおける、低分子量化合物とキャリアータンパク質との結合を介するリンカーが、標識物質と低分子量化合物との結合を介するリンカーと同一である、前記第六の態様に記載の試薬である。

【0020】

以下、本発明を詳細に説明する。

10

【0021】

低分子量化合物に対する抗体を取得する際、当該化合物はその小ささのために抗体と相互作用する部位が少ない。そのため、前記化合物単独で動物を免疫しても免疫原性が低く、前記化合物に対する抗体が得られにくい。そこで、リンカーを介してウシ血清アルブミン (BSA) 等のキャリアータンパク質と前記化合物とを結合した、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体の態様で動物を免疫する (非特許文献 1)。これにより免疫原性を示すようになり、前記化合物に対する抗体を取得することができる。

【0022】

低分子量化合物に対する抗体を用いて当該化合物を検出する際、通常は競合法が用いられる。その際注意しなければならないのが、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体、および標識物質と結合した低分子量化合物 (標識化抗原) を作製するときに、低分子量化合物とキャリアータンパク質 (または標識物質) との間を介するリンカーである。低分子量化合物 (抗原) と当該化合物に対する抗体とを相互作用 (結合) させるには、互いの立体構造が重要である。そのため、前記複合体および前記標識化抗原を作製する際、通常は、リンカー構造および低分子量化合物とリンカーとの結合位置を、互いに同一とする。その理由として、リンカー構造を互いに異なる構造とする、および / または、低分子量化合物とリンカーとの結合位置を互いに異なる位置とすることで、低分子量化合物における、前記化合物に対する抗体と相互作用する部位が隠れる可能性があり、結果として、当該抗体による前記化合物の認識を妨害する可能性があるからである。

20

【0023】

しかしながら、本発明者が鋭意検討した結果、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体をリンカー構造の異なる 2 種類以上 (複数) 用意し、当該 2 種類以上 (複数) の複合体を用いて動物を免疫することで取得した抗体が、1 種類の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて動物を免疫することで取得した抗体よりも、前記化合物の検出感度が向上することを見出した。なお、前記複数の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体における、低分子量化合物とリンカーとの結合位置は同一としたほうが好ましい。その理由として、前記複数の複合体における、低分子量化合物とリンカーとの結合位置を異なる位置とすると、低分子量化合物における前記化合物に対する抗体と相互作用する部位が隠れる可能性があるからである。

30

【0024】

本発明の抗体取得方法の具体例として、低分子量化合物とキャリアータンパク質とを第一のリンカーを介して結合することで得られる、第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体と、低分子量化合物とキャリアータンパク質とを第二のリンカーを介して結合することで得られる、第二の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体と、を用意し、最初に第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて継続的に動物を免疫後、第二の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いて継続的に動物を免疫することで前記低分子量化合物に対する抗体を取得する方法、があげられる。前記具体例において、第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を得るのに用いる第一のリンカーを、標識化抗原を得るのに用いるリンカーと同一構造とし、かつ、前記第一の複合

40

50

体における低分子量化合物とリンカーとの結合位置を、標識化抗原における低分子量化合物とリンカーとの結合位置と同一の位置とすると好ましい。前記具体例において、第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いた免疫から、第二の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いた免疫に切り替える時期としては、第一の低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いた免疫により得られる抗体の性能（抗原検出感度）が向上しなくなった時点、または向上度合いが低くなった時点で行なえばよい。動物に免疫する低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を切り替えることで、前記複合体中における低分子量化合物の外部への露出構造に変化が生じる。そのため切り替え後の複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体における低分子量化合物の認識部位は、切り替え前の複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体における認識部位より変化する。すなわち、切り替え後の複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体は、切り替え前の複合体を用いて動物を免疫して得られる抗体と比較し、標識化抗原に対する親和性が落ち、非標識化抗原との親和性が相対的に上昇する。これにより、低分子量化合物（抗原）を検出する感度が向上する。前記具体例における、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を用いた継続的な免疫方法の一例として、前記複合体と適切なアジュバントとの混合物を、1週間から2週間毎に、1ヶ月から12ヶ月間、動物に免疫する方法があげられる。

10

【0025】

本発明において、低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体を免疫する動物としては、当業者が通常用いる、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ヤギが例示できる。

20

【0026】

本発明の方法で取得できる抗体の対象抗原（低分子量化合物）は、リンカーと結合可能な部位を少なくとも1つ以上有する抗原であればよく、一例として、トリヨードサイロニン（T3）、チロキシシン（T4）、3,5-ジヨード-L-チロニン（T2）等の甲状腺ホルモンや、エストロン（E1）、エストラジオール（E2）、エストリオール（E3）、プロゲステロン（progesterone）、コルチゾール（cortisol）等のステロイド骨格を有したステロイドホルモンがあげられる。中でもステロイドホルモンは、リンカーと結合可能な部位が多いことから、本発明の方法で取得する抗体の対象抗原（低分子量化合物）として好ましい。

【0027】

本発明の方法で使用する、低分子量化合物とキャリアータンパク質との結合を介するリンカーは、得られる抗体と標識化抗原との相互作用を完全に損なわない範囲であれば特に限定はないが、入手の容易さや価格の安さからアミノ基と反応性を有するNHS（N-Hydroxysuccinimide）化合物がよく利用される。その他にも、イミドエステル化合物といったアミノ基と反応性を有する化合物、カルボジイミド化合物といったカルボキシル基と反応性を有する化合物、マレイミド化合物やハロアセチル化合物、ピリジルアセチル化合物といったチオール基と反応性を有する化合物等もリンカーとして利用可能である。さらに低分子量化合物 - キャリアータンパク質複合体として、低分子量化合物とキャリアータンパク質とを、アビジン - ビオチン間結合のような高い親和性を有する非共有結合により結合した複合体を用いてもよい。

30

40

【0028】

本発明の方法で使用する、リンカーを介して低分子量化合物と結合するキャリアータンパク質は、概ね分子量10kDa以上のタンパク質であれば特に制限はなく、一例として、GFP（Green Fluorescent Protein）、CFP（Cyan Fluorescent Protein）、YFP（Yellow Fluorescent Protein）、RFP（Red Fluorescent Protein）といった蛍光タンパク質や、DnaK、DnaJ、GroEL、GroES、ClpBといったバクテリア由来のヒートショックプロテイン（Heat Shock Protein）等が使用できる。ただし通常は、入手の容易さおよび価格の安さから、BSA（Bovine Serum Albumin）、BCP（Blue Carrier

50

Protein)、KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)、OVA(Ovalbumin)等がキャリアタンパク質として用いられる。

【発明の効果】

【0029】

本発明の抗体取得方法は、低分子量化合物とキャリアタンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物-キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫することで、前記低分子量化合物に対する抗体を得る際、前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物-キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫することの特徴としている。本発明の方法で得られた抗体は、従来の抗体と比較し、前記化合物に対する検出感度が向上している。そのため、抗原抗体反応を利用した低分子量化合物の測定試薬に、本発明の方法で得られた抗体を採用することで、前記化合物をより高感度に測定することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】サンドイッチ法の測定原理を示した図。

【図2】競合法の測定原理を示した図。

【図3】実施例1で作製したプロゲステロン誘導体(Prog A、Prog B)を示す図。

【図4】実施例3による免疫で得られた抗体の性能(抗原検出感度)変化を示す図。

20

【図5】免疫開始9ヵ月目および10ヵ月目に採血し得られた抗体の抗原検出感度を評価した結果を示す図。

【実施例】

【0031】

以下、ウサギ抗プロゲステロン(progesterone)抗体を用いたプロゲステロン測定試薬を例として、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0032】

実施例1 抗原複合体の作製

以下に示す方法で、プロゲステロン-BSA複合体を調製した。

(1) 抗プロゲステロンウサギ抗体を取得するため、プロゲステロン(progesterone)の11位の炭素原子にリンカーを結合した誘導体を2種類作製した(図3)。リンカーとして4-NHS-1,4-dioxo-1-oxybutaneを用いて作製した誘導体(11 α -(4-NHS-1,4-dioxo-1-oxybutane)-progesterone)を以下Prog Aとし、リンカーとして2-carbonyl(4-NHS-4-oxo-1-aminobutane)-1-oxy carbonylcyclohexaneを用いて作製した誘導体(11 α -[2-carbonyl(4-NHS-4-oxo-1-aminobutane)-1-oxy carbonylcyclohexane]-progesterone)を以下Prog Bとする。

30

(2) (1)で作製した誘導体(Prog A、Prog B)3.5mgをそれぞれ50 μ LのDMSOへ溶かした後、BSA溶液(キャリアタンパク質であるBSA25mgを50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)2.5mLに溶かして得られる溶液)を徐々に撹拌しながら添加し、室温で30分間反応させた。

40

(3) 反応液を分画分子量10kDaの透析膜の中へ入れ、1LのPBS(Phosphate Buffered Saline)中4で3回透析することで未反応の誘導体を除いた。透析後、透析膜の中から、プロゲステロン-BSA(Prog A-BSAまたはProg B-BSA)複合体を回収し、これをウサギの免疫に使用した。

【0033】

実施例2 標識化抗原(CJ)の作製

アルカリホスファターゼ(ALP)とProg Aとを用いて、以下の方法で標識化抗

50

原 (C J) を作成した。

(1) 5 mg の A L P を分画分子量 10 k D a の透析膜の中へ入れ、500 mL の 50 mM ホウ酸緩衝液 (p H 9 . 0) 中 4 で 3 回透析した。透析処理した A L P 溶液に、1 mg の P r o g A を 540 μ L の D M S O に溶かして得られた D M S O 溶液 10 μ L を加え、4 で一晩反応させた。

(2) 反応液を分画分子量 10 k D a の透析膜の中へ入れ、1 L の 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) 中 4 で 3 回透析することで未反応の P r o g A を除いた。透析後、透析膜の中の液体を回収し、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) で平衡化した D E A E カラムにアプライした。

(3) アプライしたカラムを洗浄バッファー (5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0)、20 mM N a C l) にて洗浄後、溶出バッファー (5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0)、100 mM N a C l) をアプライすることで、C J をカラムから溶出させ精製した。

(4) 精製した C J を分画分子量 10 k D a の透析膜の中へ入れ、1 L の保存バッファー (25 mM T r i s - H C l (p H 7 . 5)、5 mM M g C l ₂、0 . 1 mM Z n C l ₂、0 . 1 % N a N ₃) 中 4 で 3 回透析した。透析後、透析膜の中から、C J (P r o g A - A L P) を回収し、これを以降の実施例で使用した。

【0034】

実施例 3 ウサギへの免疫

実施例 1 で作製した抗原複合体を用いて、以下の方法でウサギに免疫を行なった。

(1) まず日本白色種の雌のウサギを用意した。そしてこのウサギが 12 週齢となった時点で、0 . 5 mg の P r o g A - B S A 複合体とフロイント完全アジュバントとを等量混合したものを免疫した。その後は 0 . 25 mg の P r o g A - B S A 複合体とフロイント不完全アジュバントとを等量混合したものを 1 週間毎に免疫を行なった。

(2) 免疫開始後、1 ヶ月毎に少量採血し、血清を調製後、後述の方法 (実施例 4 に記載の方法) で免疫の経過 (抗体性能) を調べた。

(3) 免疫により得られる抗体の性能 (抗原検出感度) の向上が鈍くなってきたところで、免疫方法を変更した。まず免疫開始後 8 ヶ月目では、免疫に使用する抗原量を 0 . 25 mg / 回から 0 . 5 mg / 回へ増量して 1 週間毎に 1 ヶ月間免疫を行なった。次に免疫開始後 9 ヶ月目では、免疫に使用するアジュバントをフロイント不完全アジュバントからフロイント完全アジュバントに変更して 1 週間毎に 0 . 5 mg ずつ 1 ヶ月間免疫を行なった。そして免疫開始後 10 ヶ月目では、抗原複合体を P r o g A - B S A 複合体から P r o g B - B S A 複合体に、免疫に使用するアジュバントをフロイント完全アジュバントからフロイント不完全アジュバントに、それぞれ変更して 1 週間毎に 0 . 5 mg ずつ 1 ヶ月間免疫を行なった。なお免疫で得られる抗体は、各工程が終了した時点で採血し、血清を調製後、後述の方法 (実施例 4 に記載の方法) でそれぞれ抗体性能 (抗原検出感度) の経過観察を行なった。

【0035】

実施例 4 免疫の経過観察

実施例 3 によるウサギへの免疫で得られる抗体の性能 (抗原検出感度) 変化を以下の方法で調べることで、経過観察を行なった。なお本操作は、東ソー社製エンザイムイムノアッセイ装置 A I A - 600 I I を用いて 37 にて全自動で行なった。

(1) 実施例 2 で作製した C J (P r o g A - A L P) を、抗ウサギ I g G 抗体を固定化した磁性粒子と混合した。

(2) プロゲステロン濃度が既知のキャリブレーション溶液 (C a l 6 : 45 . 4 n g / m L、東ソー社製) を用意し、(1) の混合物に一定量添加した。

(3) 実施例 3 による免疫で得られた抗血清を (2) に添加し、10 分間反応した。

(4) 反応後、B / F (B o u n d / F r e e) 分離を行ない、A L P 基質を添加後、磁性粒子と結合した C J から発せられる蛍光シグナルを検出した。

(5) プロゲステロンを全く含まないキャリブレーション (C a l 1) を加えた時のシグナル

10

20

30

40

50

(B0)を100%としたときの、Cal6を加えた時のシグナル(B)を相対的な値($B/B0[\%]$)として算出した。この $B/B0$ が低い値を示すほど、抗原に対する抗体の親和性が高いことを意味している。すなわち $B/B0$ 値が低いほど、得られた抗体の抗原検出感度が高いことになる。

【0036】

実施例3による免疫で得られた抗体の性能(抗原検出感度)変化を調べた結果を図4に示す。免疫開始当初は $B/B0$ 値が順調に低下しており、抗体性能(抗原検出感度)が順調に向上していることがわかる。しかしながら免疫開始後6ヶ月目以降は、 $B/B0$ 値の低下がわずかとなり、抗体の性能(抗原検出感度)向上が鈍くなっていることがわかる。そこで免疫開始後8ヶ月目には免疫に使用する抗原量を変更し、免疫開始後9ヶ月目には免疫に使用するアジュバントを変更したが、 $B/B0$ 値にほとんど変化がなく、抗体の性能(抗原検出感度)向上はみられなかった。ところが免疫開始後10ヶ月目に、免疫に使用する抗原をProg A-BSA複合体からProg B-BSA複合体に変更したところ、 $B/B0$ 値が再び低下し、得られる抗体の性能(抗原検出感度)が向上した。

10

【0037】

実施例5 抗体性能(抗原検出感度)の定量的評価

実施例3による免疫で得られた抗体の抗原検出感度を以下の方法で定量的に評価した。なお本操作は、東ソー社製エンザイムイムノアッセイ装置AIA-600IIを用いて37℃にて全自動で行なった。

(1)実施例2で作製したCJ(Prog A-ALP)を、抗ウサギIgG抗体を固定化した磁性粒子と混合した。

20

(2)プロゲステロン濃度が既知のキャリブレータ(calibrator)溶液(Cal12からCal6、東ソー社製)を用意し、(1)の混合物にそれぞれ一定量添加した。

(3)実施例3による免疫で得られた抗血清を(2)に添加し、10分間反応した。

(4)反応後、B/F分離を行ない、ALP基質を添加後、磁性粒子と結合したCJから発せられる蛍光シグナルを検出した。

(5)プロゲステロンを全く含まないキャリブレータ(Cal1)を加えた時のシグナル(B0)を100%としたときの、各キャリブレータ(Cal2からCal6)を加えた時のシグナル(B)を相対的な値($B/B0[\%]$)として算出した。プロゲステロン濃度を横軸(対数)、 $B/B0(\%)$ を縦軸にとり、各キャリブレータ使用時の測定結果をプロットして検量線を作成した。

30

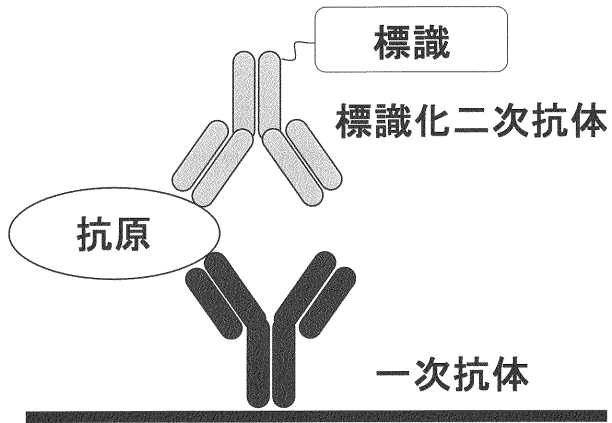
(6) $B/B0=50\%$ となる時のプロゲステロン濃度(C50)を指標として、得られた抗体の抗原検出感度を定量的に評価した。

【0038】

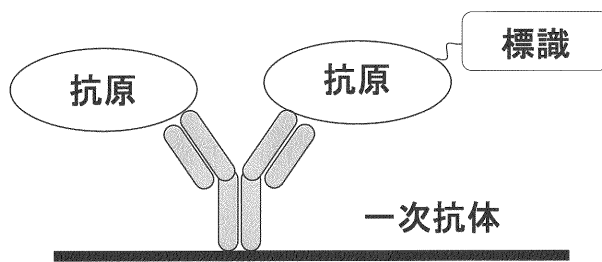
実験結果を図5に示す。免疫に使用する抗原をProg A-BSA複合体(免疫開始9ヵ月に採血し得られた抗体)からProg B-BSA複合体(免疫開始10ヵ月目に採血し得られた抗体)へ変更することで、C50が7.3ng/mL(免疫開始9ヵ月目に採血し得られた抗体)から5.8ng/mL(免疫開始10ヵ月目に採血し得られた抗体)となり、検出感度が向上することがわかった(図5)。すなわち、低分子量化合物とキャリアタンパク質とをリンカーを介して結合することで得られる、低分子量化合物-キャリアタンパク質複合体を用いて動物を免疫することで、前記低分子量化合物に対する抗体を得る際、前記リンカーの異なる複数の低分子量化合物-キャリアタンパク質複合体を用意し、当該複数の複合体を用いて動物を免疫することで、得られる抗体の性能(抗原検出感度)をさらに向上させることができる。

40

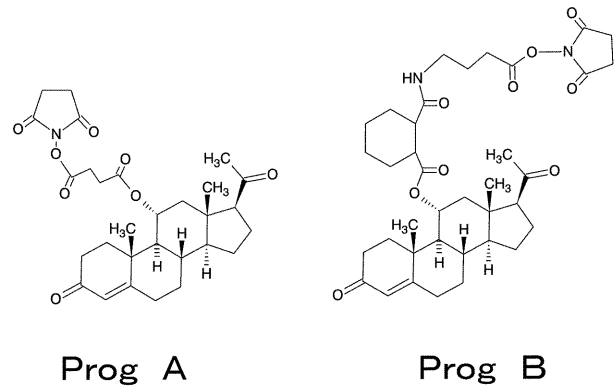
【図 1】



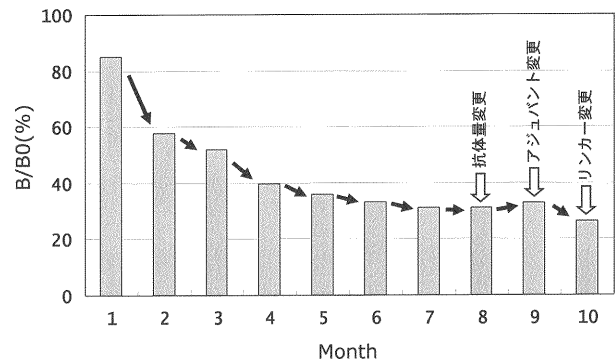
【図 2】



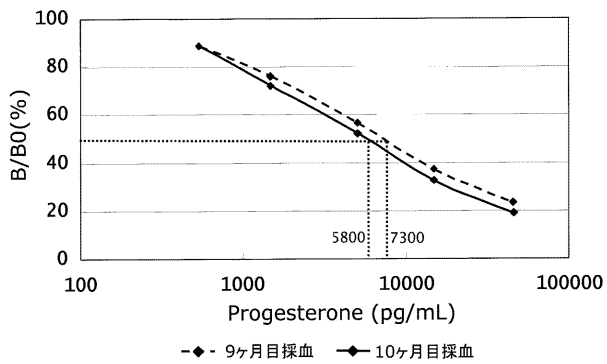
【図 3】



【図 4】



【図 5】



专利名称(译)	获得具有高抗原检测灵敏度的抗体的免疫方法		
公开(公告)号	JP2013124224A	公开(公告)日	2013-06-24
申请号	JP2011273218	申请日	2011-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	小林龍司		
发明人	小林 龍司		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/53 G01N33/531 C07K16/26		
FI分类号	C07K16/00 G01N33/53.A G01N33/531.A C07K16/26		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA50 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供通过竞争方法通过抗原 - 抗体反应获得用于测量低分子量化合物的抗体的方法，以及从常规抗体获得对低分子量化合物（抗原）具有高检测灵敏度的抗体的方法它提供。 解决方案：当通过接头结合低分子量化合物和载体蛋白获得的低分子量化合物 - 载体蛋白复合物对动物进行免疫时，获得针对低分子量化合物的抗体，用所述接头的多种不同的低分子量化合物 - 载体蛋白复合物免疫动物。 点域4

