

(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2008-301833
(P2008-301833A)

(43) 公開日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/02 (2006.01)
G 01 N 33/53 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 P 21/08 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
G 01 N 33/53
C 12 N 5/00
C 12 P 21/08

テーマコード(参考)

C 4 B 02 4
D 4 B 06 4
B 4 B 06 5

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2008-229775 (P2008-229775)
(22) 出願日 平成20年9月8日(2008.9.8)
(62) 分割の表示 特願平10-196038の分割
原出願日 平成10年7月10日(1998.7.10)

(71) 出願人 000138277
株式会社三菱化学ヤトロン
東京都新宿区西五軒町13番1号
(74) 代理人 100090251
弁理士 森田 憲一
(74) 代理人 100139594
弁理士 山口 健次郎
(72) 発明者 河野 功
東京都千代田区東神田1丁目11番4号
株式会社ヤトロン内
(72) 発明者 伊藤 由美子
東京都千代田区東神田1丁目11番4号
株式会社ヤトロン内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規なモノクローナル抗体及びニック β 2グリコプロテインIの免疫学的分析方法

(57) 【要約】

【課題】生体試料中のニック β 2グリコプロテインIを、試料中に同時に含まれると考えられるインタクト β 2グリコプロテインIの量に影響を受けることなく、迅速かつ正確に測定することのできるニック β 2グリコプロテインIの免疫学的分析方法、及びそれに使用するモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】第1のモノクローナル抗体は、 β 2グリコプロテインIと反応しないが、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた β 2グリコプロテインIとは反応し、第2のモノクローナル抗体は、 β 2グリコプロテインI、及びプロテアーゼにより一部に開裂を受けた β 2グリコプロテインIと反応する。前記免疫学的分析方法では、第1のモノクローナル抗体少なくとも1種類と、別種の第2のモノクローナル抗体又は第3のモノクローナル抗体を使用する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

2グリコプロテインⅠと反応しないが、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠとは反応することを特徴とする、モノクローナル抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 2】

プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの第Vドメインに反応する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 3】

プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの第Iドメイン～第IVドメインからなる領域に反応する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント。 10

【請求項 4】

2グリコプロテインⅠ、及びプロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠと反応することを特徴とする、モノクローナル抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 5】

プロテアーゼにより一部に開裂を受けた前記 2グリコプロテインⅠが、 2グリコプロテインⅠの第Vドメインに開裂を受けたものである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 6】

プロテアーゼが、プラスミン又は顆粒球エラスターーゼである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、ハイブリドーマ。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを第1抗体として不溶性担体に固定化し、この固定化された第1抗体と被検試料とを接触させ、続いて、前記の第1抗体とは別種の請求項 1 に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は請求項 4 に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体と接触させ、前記の固定化第1抗体とプロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠとの複合体と結合した前記第2抗体の前記標識からの信号、又は前記の固定化第1抗体とプロテアーゼにより一部に開裂を受けた

2グリコプロテインⅠとの複合体と結合しなかった前記第2抗体の前記標識からの信号を検出することを特徴とする、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの免疫学的分析方法。 30

【請求項 9】

不溶性担体に固定化された請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント少なくとも 1 種類と、不溶性担体に固定化された請求項 1 に記載の別種のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント又は請求項 4 に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント 1 種類と、被検試料とを接触させ、凝集反応を観察することを特徴とする、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの免疫学的分析方法。 40

【請求項 10】

プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠを分析することを特徴とする、生体内凝固線溶異常の検出法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠ（以下、ニ

10

20

30

40

50

ック 2グリコプロテインIと称することがある)に特異的に反応する各種の新規モノクローナル抗体及びその抗体フラグメント、前記モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ、ニック 2グリコプロテインIの免疫学的分析方法、並びに生体内凝固線溶異常の検出法に関する。ニック 2グリコプロテインIは、生体内凝固線溶異常の予知マーカーとして有用である。

【0002】

本明細書において、「ニック 2グリコプロテインI」とは、プロテアーゼによりアミノ酸配列の一部に開裂を受けて2本のポリペプチド鎖からなるものの、それらがジスルフィド結合により結合している 2グリコプロテインIを意味する。

また、本明細書においては、プロテアーゼによる開裂を受けていない 2グリコプロテインIを、前記の「ニック 2グリコプロテインI」と区別する必要がある場合には、「インタクト 2グリコプロテインI」と称することがある。従って、本明細書において、単に「 2グリコプロテインI」と称する場合には、特に断わらない限り、「インタクト 2グリコプロテインI」を指すものとする。

【背景技術】

【0003】

2グリコプロテインIは、5つの繰り返しドメイン構造(第Iドメイン～第Vドメイン)を有する糖タンパク質であり、例えば、ヒト 2グリコプロテインIは、326個のアミノ酸からなり、分子量が約50,000である。インタクト 2グリコプロテインIは、血液中に約200μg/mlの濃度で存在し、陰性荷電リン脂質(例えば、カルジオリピン又はホスファチジルセリンなど)、ヘパリン、又はDNAなどの負電荷物質と結合することができる。インタクト 2グリコプロテインIの生理的な機能としては、陰性荷電リン脂質への結合による内因系凝固反応の阻害作用、及び血小板膜上でのリン脂質依存性プロトロンビナーゼ活性の阻害作用を示すことから、凝固制御因子としての役割が示唆されている。

【0004】

一方、2グリコプロテインIにおける第Vドメイン内的一部分に、プロテアーゼにより開裂(例えば、ヒト 2グリコプロテインIにおいては、第317番目のリジン残基と第318番目のトレオニン残基との間での開裂、あるいは、第314番目のアラニン残基と第315番目のフェニルアラニン残基との間での開裂)を受けたニック 2グリコプロテインIは、前記の陰性荷電リン脂質との結合親和性が約1/100に低下することが報告されている[J. E. Huntら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第90巻, 第2141頁～第2145頁, (1993年)]。また、第317番目のリジン残基と第318番目のトレオニン残基との間での開裂は、プラスミンの作用により生じることが報告されている[大蔵ら, Blood, 第91巻, 第4173頁～第4179頁, (1998年)]。

このように、インタクト 2グリコプロテインIは、生体内で凝固制御因子としての役割を担っているが、様々な病態(例えば、癌、白血病、又は炎症など)において血管内凝固系が活性化されると、それに引き続き活性化される線溶系酵素であるプラスミンにより開裂を受け、陰性荷電リン脂質との結合親和性が低下し、ニック 2グリコプロテインIとして血中に遊離するものと考えられる。

【0005】

また、全身性炎症性自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス(SLE)の患者の一部においては、陰性荷電リン脂質に結合した 2グリコプロテインIに対して反応する抗リン脂質抗体が血中に出現する。この抗リン脂質抗体の存在により、血管内皮細胞膜において免疫複合体が形成されることで、補体系の活性化、ひいては全身炎症反応に発展する。炎症反応に伴い、局所で活性化された顆粒球より放出されたエラスターーゼにより、2グリコプロテインIが開裂を受けることも考えられる。実際、前記のJ. E. Huntらの報告では、顆粒球エラスターーゼの特異性に一致する 2グリコプロテインIの第Vドメイン内の第314番目のアラニン残基と第315番目のフェニルアラニン残基と

10

20

30

40

50

の間での開裂が示されている。また、生体内においてはプラスミンだけでなく、顆粒球エラスターーゼも線溶に関与している可能性が示唆されている [Blood Coagulation and Fibrinolysis, 第6巻, 259頁, (1995年)]。

【0006】

これらの事実及び報告から明らかなように、生体試料中のニック 2グリコプロテインIの存在の有無を検出するか、あるいは、その存在量を測定することができれば、生体内凝固線溶異常の有無又は程度を判断することができる。しかしながら、ニック 2グリコプロテインIの免疫学的分析方法は、従来全く知られていなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の課題は、生体試料中のニック 2グリコプロテインIを、前記試料中に同時に含まれると考えられるインタクト 2グリコプロテインIの量に影響を受けることなく、迅速かつ正確に測定することのできるニック 2グリコプロテインIの免疫学的分析方法を提供することにある。また、本発明の課題は、前記免疫学的分析方法に用いることのできる新規モノクローナル抗体、そのモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ、並びに生体内凝固線溶異常の検出法を提供することにある。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、被検試料中のインタクト 2グリコプロテインIの干渉を受けることなく、患者由来の被検試料中のニック 2グリコプロテインIの量を特異的に、簡便かつ迅速に、EIA法及び凝集法により測定することができる。これは、本発明により初めて可能になったものである。従って、本発明は生体内凝固線溶異常を把握するための有効な手段を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記の課題は、本発明による、2グリコプロテインI(すなわち、インタクト 2グリコプロテインI)と反応しないが、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインI(すなわち、ニック 2グリコプロテインI)とは反応することを特徴とする、モノクローナル抗体(以下、「本発明による第1のモノクローナル抗体」と称することがある)又はその抗体フラグメントによって達成することができる。

また、本発明は、2グリコプロテインI(すなわち、インタクト 2グリコプロテインI)及びニック 2グリコプロテインIと反応することを特徴とする、モノクローナル抗体(以下、「本発明による第2のモノクローナル抗体」と称することがある)又はその抗体フラグメントに関する。

また、本発明は、前記モノクローナル抗体(すなわち、前記の本発明による第1のモノクローナル抗体、又は前記の本発明による第2のモノクローナル抗体)を產生することを特徴とする、ハイブリドーマに関する。

【0010】

また、本発明は、本発明による第1のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを第1抗体として不溶性担体に固定化し、この固定化された第1抗体と被検試料とを接触させ、続いて、前記の第1抗体とは別種の本発明による第1のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は本発明による第2のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体と接触させ、前記の固定化第1抗体 - ニック 2グリコプロテインI複合体と結合した前記第2抗体の前記標識からの信号、又は前記の固定化第1抗体 - ニック 2グリコプロテインI複合体と結合しなかつた前記第2抗体の前記標識からの信号を検出することを特徴とする、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインIの免疫学的分析方法に関する。

【0011】

また、本発明は、不溶性担体に固定化された、本発明による第1のモノクローナル抗体

10

20

30

40

50

又はその抗体フラグメント少なくとも1種類と、不溶性担体に固定化された、別種の本発明による第1のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント又は本発明による第2のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント1種類と、被検試料とを接触させ、凝集反応を観察することを特徴とする、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた2グリコプロテインIの免疫学的分析方法に関する。

更に、本発明は、ニック2グリコプロテインIを分析することを特徴とする、生体内凝固線溶異常の検出法に関する。

【0012】

本明細書において、「ニック2グリコプロテインI」とは、前記のとおり、プロテアーゼによりアミノ酸配列の一部に開裂を受けて2本のポリペプチド鎖からなるものの、それらがジスルフィド結合により結合している2グリコプロテインIを意味する。具体的には、前記「ニック2グリコプロテインI」には、(1)プラスミンにより第Vドメインに開裂(ヒト2グリコプロテインIにおいては、第317番目のリジン残基と第318番目のトレオニン残基との間で開裂)を受けたニック2グリコプロテインI(以下、P-ニック2グリコプロテインIと称することがある)、及び(2)顆粒球エラスターーゼにより第Vドメインに開裂(ヒト2グリコプロテインIにおいては、第314番目のアラニン残基と第315番目のフェニルアラニン残基との間で開裂)を受けたニック2グリコプロテインI(以下、E-ニック2グリコプロテインIと称することがある)が含まれる。

10

【0013】

また、本明細書において、2グリコプロテインI(インタクト2グリコプロテインI及びニック2グリコプロテインIの両方を含む)における「第Iドメイン～第IVドメインからなる領域」とは、ヒト2グリコプロテインIにおいては、326個のアミノ酸から構成されるヒト2グリコプロテインIにおける(アミノ末端側から数えて)第1番目のアミノ酸残基～第241番目のアミノ酸残基からなる領域を意味する。

20

【0014】

更に、2グリコプロテインI(インタクト2グリコプロテインI及びニック2グリコプロテインIの両方を含む)における「第Vドメイン」とは、ヒト2グリコプロテインIにおいては、326個のアミノ酸から構成される2グリコプロテインIにおける(アミノ末端側から数えて)第242番目のアミノ酸残基～第326番目のアミノ酸残基からなる領域を意味する。

30

【0015】

なお、ニック2グリコプロテインIにおける「第Vドメイン」は、その一部に開裂(ヒト2グリコプロテインIにおいては、第317番目のリジン残基と第318番目のトレオニン残基との間での開裂、あるいは、第314番目のアラニン残基と第315番目のフェニルアラニン残基との間での開裂)を受け、ジスルフィド結合により結合した2本のポリペプチド鎖からなる。

一方、インタクト2グリコプロテインIにおける「第Vドメイン」は、ヒト2グリコプロテインIにおいては、326個のアミノ酸から構成される2グリコプロテインIにおける(アミノ末端側から数えて)第242番目のアミノ酸残基～第326番目のアミノ酸残基からなる、開裂を受けていないドメインである。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明による第1のモノクローナル抗体は、インタクト2グリコプロテインI(特に、ヒトイント2グリコプロテインI)とは反応せず、プロテアーゼ(特に、プラスミン又は顆粒球エラスターーゼ)により一部(特に、第Vドメイン)に開裂を受けた

2グリコプロテインI[特に、プロテアーゼ(特に、プラスミン又は顆粒球エラスターーゼ)により一部(特に、第Vドメイン)に開裂を受けたヒト2グリコプロテインI]とのみ反応する。

本発明による好みい第1のモノクローナル抗体は、(1)インタクト2グリコプロ

50

テインⅠとは反応せず、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠと反応し、しかも、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの第Vドメインに反応する（以下、「本発明によるモノクローナル抗体1A」と称することがある）か、あるいは、（2）インタクト 2グリコプロテインⅠとは反応せず、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠと反応し、しかも、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの第Ⅰドメイン～第Ⅳドメインからなる領域に反応する（以下、「本発明によるモノクローナル抗体1B」と称することがある）。

【0017】

本発明によるモノクローナル抗体1Aのエピトープは、ニック 2グリコプロテインⅠの第Vドメイン〔例えば、ヒトニック 2グリコプロテインⅠにおける（アミノ末端側から数えて）第242番目のアミノ酸残基～第326番目のアミノ酸残基からなる領域〕に存在する。本発明によるモノクローナル抗体1Aのエピトープとしては、非還元状態のインタクト 2グリコプロテインⅠ及び非還元状態のインタクト 2グリコプロテインⅠ第Vドメインにおいて分子内に隠れているが、還元状態のインタクト 2グリコプロテインⅠ及び非還元状態のインタクト 2グリコプロテインⅠ第Vドメインにおいて露出するエピトープであることが好ましい。本発明によるモノクローナル抗体1Aとしては、後述する実施例で得られるモノクローナル抗体N G P I - 59を挙げることができる。

10

【0018】

本発明によるモノクローナル抗体1Bのエピトープは、ニック 2グリコプロテインⅠの第Ⅰドメイン～第Ⅳドメインからなる領域〔例えば、ヒトニック 2グリコプロテインⅠにおける（アミノ末端側から数えて）第1番目のアミノ酸残基～第241番目のアミノ酸残基からなる領域〕に存在する。本発明によるモノクローナル抗体1Bのエピトープとしては、立体構造依存的なエピトープ、すなわち、非還元状態のニック 2グリコプロテインⅠではエピトープの構造を保持し、還元状態のニック 2グリコプロテインⅠではエピトープの構造を保持しないエピトープであることが好ましい。本発明によるモノクローナル抗体1Bとしては、後述する実施例で得られるモノクローナル抗体N G P I - 60を挙げることができる。

20

【0019】

本発明による第2のモノクローナル抗体は、インタクト 2グリコプロテインⅠ（特に、ヒトインタクト 2グリコプロテインⅠ）、及びプロテアーゼ（特に、プラスミン又は顆粒球エラスターーゼ）により一部（特に、第Vドメイン）に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠ〔特に、プロテアーゼ（特に、プラスミン又は顆粒球エラスターーゼ）により一部（特に、第Vドメイン）に開裂を受けたヒト 2グリコプロテインⅠ〕と反応する。

30

【0020】

本発明による第2のモノクローナル抗体のエピトープは、2グリコプロテインⅠ（インタクト 2グリコプロテインⅠ及びニック 2グリコプロテインⅠの両方を含む）の第Ⅰドメイン～第Ⅳドメインからなる領域〔例えば、ヒトニック 2グリコプロテインⅠにおける（アミノ末端側から数えて）第1番目のアミノ酸残基～第241番目のアミノ酸残基からなる領域〕に存在することが好ましく、立体構造非依存的なエピトープ、すなわち、非還元状態の 2グリコプロテインⅠにおいても、還元状態の 2グリコプロテインⅠにおいても、エピトープとして機能するエピトープであることがより好ましい。本発明による第2のモノクローナル抗体としては、後述する実施例で得られるモノクローナル抗体N G P I - 23を挙げることができる。

40

【0021】

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、近年各方面で行われている細胞融合法で作成されたハイブリドーマによるモノクローナル抗体產生法により得ることができる。すなわち、ニック 2グリコプロテインⅠ（好ましくは、ヒトニック 2グリコプロテインⅠ）を抗原として使用し、種々のニック 2グリコプロテインⅠ、インタクト 2グリコプロ

50

テインⅠ、及び／又はそれらのフラグメントを用いてスクリーニングを実施することによって、本発明のモノクローナル抗体を產生する本発明のハイブリドーマを調製することができ、そのハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体を調製することができる。本発明のハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の調製は、常法、例えば、続生化学実験講座（日本生化学会編）又は免疫生化学研究法（日本生化学会編）に記載の方法に従って行うことができる。

【0022】

本発明のモノクローナル抗体は、そのモノクローナル抗体を產生することのできる本発明のハイブリドーマ（例えば、マウス・ハイブリドーマ）を、例えば、適当な培地又は哺乳動物（例えば、マウス）の腹腔内で培養することにより製造することができる。10

本発明のハイブリドーマは、一般的には、例えば、ニック 2グリコプロテインⅠで免疫した哺乳動物又は鳥類（例えば、マウス）の脾臓細胞と哺乳動物（例えば、マウス）のミエローマ細胞（骨髄腫細胞）とを、Nature, 第256巻, 495頁(1975年)に記載の方法により細胞融合して製造することが可能である。詳細には、下記実施例に記載の方法によって製造することができる。

【0023】

前記のハイブリドーマを培養することのできる培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であればよく、好適にはダルベッコ氏変法イーグル氏最小必須培地（Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium：以下、DMEと称する）にウシ胎児血清、L-グルタミン、L-ピルビン酸、及び抗生物質（ペニシリンGとストレプトマイシン）を含む培地が用いられる。20

前記のハイブリドーマの培養は、培地中で行う場合には、例えば、5%CO₂濃度及び37°の条件下で約3日間行う。あるいは、マウスの腹腔内で行う場合には、例えば、約14日間行う。

【0024】

このようにして製造された培養液又は哺乳動物の腹水から、例えば、タンパク質の単離・精製に一般的に用いられている方法により、本発明のモノクローナル抗体を分離・精製することが可能である。

そのような方法としては、例えば、硫酸安塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、又は凍結乾燥等を挙げることができる。30

【0025】

本発明の抗体フラグメントは、本発明のモノクローナル抗体のフラグメントであって、しかも、もとのモノクローナル抗体と同じ反応特異性を有する抗体フラグメントである。

すなわち、本発明による第1のモノクローナル抗体の抗体フラグメントは、インタクト 2グリコプロテインⅠとは反応せず、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠとのみ反応する。

また、本発明によるモノクローナル抗体1Aの抗体フラグメントは、インタクト 2グリコプロテインⅠとは反応せず、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠとのみ反応し、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの第Vドメインに反応する。40

また、本発明によるモノクローナル抗体1Bの抗体フラグメントは、インタクト 2グリコプロテインⅠとは反応せず、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠとのみ反応し、プロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠの第Iドメイン～第IVドメインからなる領域に反応する。

更に、本発明による第2のモノクローナル抗体の抗体フラグメントは、インタクト 2グリコプロテインⅠ、及びプロテアーゼにより一部に開裂を受けた 2グリコプロテインⅠと反応する。

【0026】

本発明の抗体フラグメントには、例えば、F_ab、F_ab'、F(a b')₂、又はFv等が含まれる。これらのフラグメントは、例えば、本発明のモノクローナル抗体を常法によりタンパク質分解酵素によって消化し、続いて、タンパク質の分離・精製の常法に従って得ることができる。

【0027】

このようにして得られた本発明による抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体及びその抗体フラグメントの内、本発明による第 1 のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントは、ニック 2 グリコプロテイン I とのみ特異的に結合する能力を有するので、例えば、(1) 本発明による第 1 のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント 2 種類以上を用いることにより、あるいは、(2) 本発明による第 1 のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント 1 種類以上と、本発明による第 2 のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント 1 種類以上と組み合わせて用いることにより、本発明による抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体又はその抗体フラグメントは、ニック

2 グリコプロテイン I の各種の免疫学的分析方法の試薬として有用である。なお、本明細書において、前記「分析方法」には、分析対象物質の存在の有無を確認する検出方法と、分析対象物質の量を測定する定量方法の両方が含まれる。

【0028】

例えば、本発明による第 1 のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを第 1 抗体として不溶性担体に固定化し、この固定化された第 1 抗体と被検試料とを接触させ、続いて、第 1 抗体とは別種の本発明による第 1 のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第 2 抗体、又は本発明による第 2 のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第 2 抗体と接触させると、前記の固定化第 1 抗体 - ニック 2 グリコプロテイン I 複合体と結合した前記第 2 抗体又は前記の固定化第 1 抗体 - ニック 2 グリコプロテイン I 複合体と結合しなかった前記第 2 抗体の前記標識からの信号を検出することができるので、本発明による抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体又はその抗体フラグメントは、ニック 2 グリコプロテイン I の免疫学的分析方法（サンドイッチ法）の試薬として有用である。

【0029】

また、本発明による第 1 のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント少なくとも 1 種類と、別種の本発明による第 1 のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント又は本発明による第 2 のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント 1 種類とを不溶性担体に固定化し、これらの固定化したモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントと被検試料とを接触させると、被検試料中のインタクト 2 グリコプロテイン I とは凝集反応を起こさず、ニック 2 グリコプロテイン I との間でのみ凝集反応を起こさせることができるので、本発明による抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体又はその抗体フラグメントは、ニック 2 グリコプロテイン I の免疫学的分析方法（凝集法）の試薬として有用である。

【0030】

従って、本発明による抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを用いて、本発明の免疫学的分析方法を実施することができる。本発明の免疫学的分析方法に用いる被検試料は、ニック 2 グリコプロテイン I を含む可能性のある試料であれば特に限定されるものでないが、例えば、生体試料、特には血液、血漿、血清、又は尿、好ましくは血漿又は血清である。本発明の免疫学的分析方法においては、被検試料を前処理せずに（例えば、クロマトグラフィーの手法で、あらかじめインタクト 2 グリコプロテイン I とニック 2 グリコプロテイン I とを分離操作することなく）、そのまま使用しても、被検試料中に存在するインタクト 2 グリコプロテイン I の妨害を避けることができる。

【0031】

サンドイッチ法を利用する本発明の免疫学的分析方法では、具体的には、本発明による第 1 のモノクローナル抗体（例えば、本発明によるモノクローナル抗体 1A 又は本発明に

10

20

30

40

50

よるモノクローナル抗体 1 B) 又はその抗体フラグメントを適當な不溶性担体に固定化する(第1抗体)。次に、不溶性担体と被検試料との非特異的結合を避けるために、適當なブロッキング剤[例えば、ウシ血清アルブミン(B S A)やゼラチン等]で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、未希釈の検体試料を加えて一定時間(たとえば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(1次反応)。続いて、前記第1次抗体として用いたモノクローナル抗体とは別種の本発明による第1のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は本発明による第2のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体を加えて一定時間(たとえば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(2次反応)。これを適當な洗浄液(例えば、界面活性剤を含む生理食塩水)で洗浄してから、不溶性担体上に存在する標識抗体の量を定量する。その値から、被検試料中のニック 2 グリコプロテイン I の量を算出することができる。また、1次反応と2次反応とを同時にを行うことも可能である。

10

【0032】

本発明のサンドイッチ法による免疫学的分析方法に使用することのできる不溶性担体は特に限定されるものでなく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース及びこれらの組み合わせ等を例示することができる。

20

【0033】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、又は発光物質を使用するのが有利である。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、-D-ガラクトシダーゼ等、また、蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート等、また、発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、ルシフェリン等を使用することができる。

【0034】

凝集反応を利用する本発明の免疫学的分析方法において、不溶性担体としては、一般に抗原抗体反応の凝集反応を利用する免疫学的分析方法において用いられる任意の不溶性担体を用いることができ、例えば、ラテックス粒子(特には、ポリスチレンラテックス粒子)を挙げることができる。モノクローナル抗体を不溶性担体に固定化させるには、公知の方法、例えば、化学結合法(架橋剤としてカルボジイミド、グルタルアルデヒド等を用いる)又は物理吸着法を用いることができる。こうして、モノクローナル抗体と不溶性担体との複合体(抗体/担体複合体)を形成し、これを本発明の免疫学的分析方法に用いることができる。

30

【0035】

本発明の免疫学的測定方法(凝集法)においては、前記の不溶性担体に固定化した少なくとも2種のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント、すなわち、(1)本発明による第1のモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント少なくとも1種類と、(2)別種の本発明による第1のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント又は本発明による第2のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント1種類とを使用するが、使用するモノクローナル抗体の各々のエピトープが互いに離れている方が凝集反応が起きやすい点で、本発明によるモノクローナル抗体 1 A 若しくはその抗体フラグメント、本発明によるモノクローナル抗体 1 B 若しくはその抗体フラグメント、又は本発明による第2のモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントの少なくとも2種を使用することが好ましい。

40

【0036】

本発明の免疫学的測定方法(凝集法)においては、例えば、モノクローナル抗体を2種用いる場合には、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した抗体/担体複合体を2種用いるか、あるいは、2種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した抗体/担体複合体を用いることができる。

50

また、モノクローナル抗体を3種用いる場合には、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した抗体／担体複合体を3種用いるか、あるいは、3種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した抗体／担体複合体を用いることができる。更に、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した抗体／担体複合体1種と、2種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した抗体／担体複合体1種との組み合わせを用いることもできる。

スライド板を用いる場合には目視的に、又は反応セルを用いる場合には特定の波長を用いて分光学的に凝集反応を測定し、被検試料中のニック2グリコプロテインI濃度を定量することができる。

【0037】

10

ニック2グリコプロテインIは、生体内凝固線溶異常の予知マーカーであるので、本発明の免疫学的分析方法を用いて、被検試料中に含まれるニック2グリコプロテインIを検出することによって、あるいは、ニック2グリコプロテインIの量を測定し、その測定値と健常人の平均値とを比較することによって、生体内凝固線溶異常の有無及び／又は程度を検出することができる。

【実施例】

【0038】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0039】

20

《実施例1：各種タンパク質の調製》

(a) インタクト2グリコプロテインIの調製

2グリコプロテインIは、E. Polzらの方法 [Int. J. Biochem., 第11巻, 265頁, (1980年)]に準じて行った。

すなわち、ヒト正常血漿300mlに終濃度1.3%となるように過塩素酸を添加し、4で15分間処理した後に、遠心分離(5,000×g, 10分間)を実施した。遠心分離により得られた上清に、1/3容量の1M-Tris-HCl(pH8.0)を添加して中性に戻した後に、限外濾過により濃縮した。この濃縮液を、予め10mM-Tris-HCl(pH8.0)で平衡化したヘパリン固定化HiTrapカラム(Pharmacia Biotech, スウェーデン)に充填し、10mM-Tris-HCl(pH8.0)と1M-NaClを含む10mM-Tris-HCl(pH8.0)とを用いたグラジェント溶出法により、インタクト2グリコプロテインIを溶出した。このインタクト2グリコプロテインIは、NaCl濃度が0.20Mである画分付近に溶出された。ヒト正常血漿300mlより、精製インタクト2グリコプロテインI4.5mgが得られた。

【0040】

30

得られた精製インタクト2グリコプロテインIを、以下に示すニック2グリコプロテインIの調製のための原料及び抗ニック2グリコプロテインIモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選別するためのELISA用抗原として、更には、抗ニック2グリコプロテインIモノクローナル抗体の認識部位の同定に使用した。

【0041】

40

(b) P-ニック2グリコプロテインIの調製

実施例1(a)で調製したインタクト2グリコプロテインI-3mgを20mM-NaCl及び0.3mM-CaCl₂を含有する0.1M-Tris-HCl(pH8.0)3mlに溶解し、この溶解液にヒトプラスミン86μgを添加した。このときのインタクト2グリコプロテインIとプラスミンとのモル比(インタクト2グリコプロテインI:プラスミン)は、50:1であった。37で2時間インキュベートした後に、予め10mM-Tris-HCl(pH8.0)で平衡化したヘパリン固定化HiTrapカラム(Pharmacia Biotech, スウェーデン)に充填し、10mM-Tris-HCl(pH8.0)にてカラムを洗浄した後に、10mM-Tris-HCl(

50

pH 8.0) と 1M-NaCl を含有する 10 mM-Triis-HCl (pH 8.0) を用いたグラジェント溶出法により、P-ニック 2グリコプロテイン I を溶出した。P-ニック 2グリコプロテイン I は、NaCl 濃度が 0.15M である画分付近に溶出され、P-ニック 2グリコプロテイン I 2.0 mg を得た。

【0042】

得られた P-ニック 2グリコプロテイン I を、抗ニック 2グリコプロテイン I モノクローナル抗体作製のための免疫原として、また、抗ニック 2グリコプロテイン I モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選別するための E L I S A 用抗原として、更には、抗ニック 2グリコプロテイン I モノクローナル抗体の認識部位の同定に使用した。

【0043】

(c) リコンビナント第 V ドメイン及びインタクト第 V ドメインの調製

ヒト 2グリコプロテイン I をコードする全遺伝子配列を含むプラスミド pUC118-2-GPI 上の第 IV ドメインと第 V ドメインとの間のヒンジ領域に相当する箇所に、部位特異的突然変異誘発 (site-directed mutagenesis) 法により制限酵素 HindIII の切断部位を導入した [松浦ら, Int. Immunol., 第 3巻, 第 1217 頁～第 1221 頁, (1991 年)]。得られたプラスミドを制限酵素 HindIII で切断することにより生じる、ヒト 2グリコプロテイン I の第 V ドメイン (第 242 番目のアミノ酸残基～第 326 番目のアミノ酸残基からなる領域) をコードする領域の 5' 側に、活性化血液凝固 Xa 因子による切断部位をコードする DNA 断片をリンカーとして接続し、得られた DNA 断片を酵母 (Pichia pastoris) の発現ベクターである pPIC9 (Invitrogen 社; 米国) に挿入した。このようにして構築した第 V ドメイン発現ベクターを、pNPD5 と名付けた。この第 V ドメイン発現ベクター pNPD5 において、前記活性化血液凝固 Xa 因子による切断部位及び第 V ドメインをコードする領域の 5' 側には、酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 由来の分泌シグナルが存在している [萩原ら, J. Biochem., 第 121巻, 第 128 頁～第 137 頁, (1997 年)]。

【0044】

第 V ドメイン発現ベクター pNPD5 を制限酵素 BglII で切断し、直鎖状にしてからヒスチジン要求株である宿主 GS115 (Invitrogen 社; 米国) にトランスフォーメーションした。抗 2グリコプロテイン I・ウサギポリクローナル抗体 (Serbio 社; フランス) を用いたニトロセルロース膜ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングの結果、高効率に第 V ドメインを発現する形質転換株 GS115 (pNPD5) を得た。

【0045】

得られた形質転換株 GS115 (pNPD5) を、増殖培地 [4% グリセロールを含む BM 培地 [酵母エキス (Difco 社) 10 g / リットル, 肉ペプトン (Sigma 社) 20 g / リットル, 酵母窒素ベース (yeast nitrogen base; Difco 社) 6.7 g / リットル, D-ビオチン (ナカライトスク社) 0.4 mg / リットル, 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 100 ml / リットル]] 2 リットル中で、600 nm における吸光度が 6.0 を示すまで増殖させた後に、誘導培地 (3% メタノールを含む BM 培地) 0.66 リットルに交換し、更に 13 時間培養を続けることにより、N 末端側に酵母由来の分泌シグナル及び活性化血液凝固 Xa 因子による切断部位とが連結した 2グリコプロテイン I の第 V ドメイン (以下、リコンビナント第 V ドメインと称する) を培地中に発現させた。

【0046】

遠心分離にて細胞画分を除去した後に、上清を、50 mM-NaCl 及び 1 mM-EDTA を含有する 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) で 6 倍に希釈し、予め 50 mM-NaCl 及び 1 mM-EDTA を含有する 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) にて平衡化した CM-Sepharose CL-6B カラム (Pharmacia-Biotech) に充填した。充分にカラムを洗浄した後に、50 mM-NaCl 及び 1 mM-E

10

20

30

40

50

D T A を含有する 5 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) と 0 . 8 M - N a C l 及び 1 m M - E D T A を含有する 5 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) によるグラジェント溶出法により溶出した。目的の溶出フラクションを限外濾過により濃縮した後に、蒸留水に對して透析し、更には、 C o s m o s i l 5 C 1 8 - A R カラムを用いた逆相 H P L C により、リコンビナント第 V ドメインを精製した。

【 0 0 4 7 】

このようにして調製したリコンビナント第 V ドメインの N 末端には、酵母 (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) 由來の分泌シグナルと活性化血液凝固 X a 因子による切断部位とが存在する。これを除去するために、リコンビナント第 V ドメインを 1 . 3 m M - C a C l ₂ 、 0 . 1 M - N a C l 、及び 0 . 1 % アジ化ナトリウムを含有する 6 0 m M - H E P E S (p H 8 . 0) に溶解した後に、活性化血液凝固 X a 因子を 3 7 で 9 時間作用させた。この際のリコンビナント第 V ドメインに対する活性化血液凝固 X a 因子の質量比は 1 / 5 0 であった。この分解物を C o s m o s i l 5 C 1 8 - A R カラムを用いた逆相 H P L C により分離し、精製第 V ドメインを得た。培養液 1 リットル当たり、第 V ドメイン 1 0 0 m g が得られた。

この精製第 V ドメインを、以下に示すニック第 V ドメインの調製のための原料及び抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナルの認識部位の同定に使用した。なお、ここで調製した第 V ドメインを、以下のニック第 V ドメインと区別するために「インタクト第 V ドメイン」と称することもある。

【 0 0 4 8 】

(d) P - ニック第 V ドメインの調製

実施例 1 (c) で調製した第 V ドメイン (インタクト第 V ドメイン) 1 m g を 2 0 m M - N a C l 及び 0 . 3 m M - C a C l ₂ を含む 0 . 1 M - T r i s - H C l (p H 8 . 0) 3 m l に溶解し、これにヒト・プラスミン 1 4 4 μ g を添加した。この際の第 V ドメインとプラスミンとのモル比 (第 V ドメイン : プラスミン) は 5 0 : 1 であった。 3 7 で 2 時間インキュベートした後に、 C o s m o s i l 5 C 1 8 - A R カラムを用いた逆相 H P L C によりニック第 V ドメインを分離、精製した。

このようにして調製した P - ニック第 V ドメインを、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体の認識部位の同定に使用した。

【 0 0 4 9 】

《 実施例 2 : ハイブリドーマの調製 》

(a) 免疫化した脾臓細胞の調製

前記実施例 1 (2) で得られた P - ニック 2 グリコプロテイン I 免疫原溶液 (A 2 8 0 n m = 1 . 0) を等量のフロインド氏完全アジュバントと乳化するまで混和し、その混合液 0 . 1 m l をマウス腹腔内に投与することにより免疫を行った (第 1 回免疫) 。 3 0 日経過後に、そのマウスに前記と同様の方法で腹腔内に投与した (第 2 回免疫) 。第 2 回免疫から、 2 1 日経過後に、 P - ニック 2 グリコプロテイン I 溶液 (A 2 8 0 n m = 1 . 0) を等量の生理的食塩水で希釈し、その希釈液 0 . 1 m l を、マウスの静脈内に投与した (最終免疫) 。最終免疫から 3 日経過後に、マウスから脾臓を無菌的に摘出し、以下の工程に使用した。

【 0 0 5 0 】

(b) 細胞融合

無菌的に摘出した前記の脾臓を、 1 5 % ウシ胎児血清を含む D M E 培地 5 m l を入れたシャーレーに入れた。次に、脾臓を 1 5 % ウシ胎児血清を含む D M E 培地約 1 5 m l で還流して脾細胞を流出させた後、この脾細胞懸濁液をナイロンメッシュに通した。この脾細胞を 5 0 m l 遠心チューブに集めて 5 0 0 × g で 1 0 分間遠心した。こうして得たペレットにヘモライジング溶液 (1 5 5 m M - N H ₄ C l , 1 0 m M - K H C O ₃ , 及び 1 m M - N a ₂ E D T A ; p H 7 . 0) 5 m l を加え、懸濁させた。 0 で 5 分間放置すると、懸濁液中の赤血球が破壊された。 1 5 % ウシ胎児血清を含む D M E 培地 1 5 m l を加えてから遠心分離した。このようにして得た細胞ペレットを D M E 培地で遠心法によって洗浄し

10

20

30

40

50

、生きている脾細胞数を測定した。

【0051】

一方、予め培養しておいたマウス骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）SP2/0-Ag14（約 2×10^7 個）に前記脾臓細胞（ 1×10^8 個）を加え、DME培地中でよく混合し、遠心分離を行った（ $500 \times g$ ，10分間）。その上清を吸引し、ペレットをよく解きほぐし、38℃に保温しておいた40%ポリエチレングリコール4000溶液0.5mlを滴下し、遠心チューブを手で、1分間穏やかに回転することによってポリエチレングリコール溶液と細胞ペレットとを混合させた。次に、38℃に保温しておいたDME培地を30秒毎に1mlずつ加えてチューブを穏やかに回転させた。この操作を10回繰り返した後、15%ウシ胎児血清を含むDME培地20mlを加えて、遠心分離（ $500 \times g$ ，10分間）を行った。上清を除去した後、細胞ペレットを15%ウシ胎児血清を含むHAT培地（DME培地にアミノブテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-5} M、及びヒポキサンチン 1×10^{-4} Mになるように添加したもの）で、遠心法によって2回洗浄した後、前記HAT培地40mlに懸濁した。
10

【0052】

この細胞懸濁液を96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに $200 \mu l$ ずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃の炭酸ガス培養器で培養を開始した。培養中、2~3日間隔で各ウェルの培地約 $100 \mu l$ を除き、新たに前記のHAT培地 $100 \mu l$ を加えることによりHAT培地中で増殖するハイブリドーマを選択した。8日頃から15%ウシ胎児血清を含むHT培地（DME培地にチミジン 1.6×10^{-5} M及びヒポキサンチン 1×10^{-4} Mになるように添加したもの）に交換し、ハイブリドーマの増殖を観察するとともに、約10日目に、後述するELISA法により、抗ニック2グリコプロテインIモノクローナル抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。
20

【0053】

(C) ハイブリドーマの樹立

ハイブリドーマ培養上清中の産生抗体の有無をELISA法により測定した。96ウェルELISA用プレート（Immulon II；日本ダイナテック株式会社）の各ウェルに、前述の精製P-ニック2グリコプロテインI溶液（A280nm=0.05；生理食塩水で希釈した）を $50 \mu l$ ずつ分注し、25℃で2時間放置した。次に、0.05%トゥイーン（Tween）20を含む生理食塩水（以下、トゥイーン20-生理食塩水と称する）で3回洗浄した後、各ウェルの培養上清 $50 \mu l$ を加え、25℃で1時間反応させた。
30

次に、トゥイーン20-生理食塩水で洗浄した後に、トゥイーン20-生理食塩水で200倍希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウス免疫グロブリン・ウサギIgG抗体（ダコ社；デンマーク） $50 \mu l$ を各ウェルに加えた。反応終了後、トゥイーン20-生理食塩水で各ウェルを3回洗浄し、酵素基質溶液（0.5 mM-4-アミノアンチピリン、10 mMフェノール、及び0.005%過酸化水素水を含む20 mMトリス-塩酸緩衝液；pH 7.4） $200 \mu l$ を各ウェルに加え、25℃で30分間反応させ、各ウェルの492nmにおける吸光度を測定した。

【0054】

その結果、382ウェル中3ウェルに抗体産生が認められた。その3ウェル中の各ハイブリドーマを24ウェルプレートに移し、15%ウシ胎児血清を含むHT培地で4~5日間培養した。その後、再度ELISA法によって抗ニック2グリコプロテインIモノクローナル抗体の産生の有無を確認してから、限界希釈法によりクローニングした。10日後に、ELISA法によって抗ニック2グリコプロテインIモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローンをスクリーニングした。その結果、各ハイブリドーマにつき、20~40個の抗体産生クローンが得られた。これらのクローンの中から、増殖の良い、抗体分泌能の高い、しかも安定なクローンを選び、前述と同様の方法により再クローニングを行い、本発明の抗ニック2グリコプロテインIモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマNGPI-23、ハイブリドーマNGPI-59、及びハイブリドーマNG
40

10

20

30

40

50

P I - 6 0 を樹立した。

これらのハイブリドーマ 3 種は、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に平成 10 年 7 月 9 日から寄託されている。ハイブリドーマ N G P I - 2 3 の受託番号は F E R M P - 1 6 8 9 1 であり、ハイブリドーマ N G P I - 5 9 の受託番号は F E R M P - 1 6 8 9 2 であり、そして、ハイブリドーマ N G P I - 6 0 の受託番号は F E R M P - 1 6 8 9 3 である。

【 0 0 5 5 】

《実施例 3 : モノクローナル抗体の製造》

(a) イン・ビトロ法

マウスハイブリドーマ N G P I - 2 3 を、 1 5 % ウシ胎児血清を含む D M E 培地で 3 7 10 にて 5 % 二酸化炭素雰囲気中において 7 2 ~ 9 6 時間培養した。培養物を遠心分離 (1 0 , 0 0 0 × g , 1 0 分間) した後、上清に固形の硫酸アンモニウムを 5 0 % 最終濃度となるように徐々に加えた。混合物を氷冷下で 3 0 分間攪拌した後、 6 0 分間放置し、遠心分離 (1 0 , 0 0 0 × g , 1 0 分) した後、得られた沈渣を少量の 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) に溶解し、 1 0 0 0 倍量の 1 0 m M リン酸緩衝液に対して透析した。

【 0 0 5 6 】

透析物を、 1 0 m M リン酸緩衝液で予め平衡化した D E A E - セルロースのカラムに充填した。モノクローナル抗体の溶出は、 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) と 0 . 2 M - N a C l を含む 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) との間でグラジェント溶出法により行った。溶出されたモノクローナル抗体を限外濾過法で濃縮し、 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) に対して透析した。ウシ血清 I g G を除くために、透析物をヤギ抗ウシ血清 I g G - セファロース 4 B のカラムに通した。次に通過液を、 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) で平衡化したプロテイン A - セファロース 4 B のカラムに充填した。カラムを p H 3 . 5 の緩衝液で溶出して、精製した本発明の抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 を得た。なお、本明細書においては、各ハイブリドーマの名称を、そのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体の名称としても使用する。

ハイブリドーマ N G P I - 5 9 及びハイブリドーマ N G P I - 6 0 についても、ハイブリドーマ N G P I - 2 3 と同様の前記操作をそれぞれ実施し、本発明のモノクローナル抗体 N G P I - 5 9 及びモノクローナル抗体 N G P I - 6 0 を得た。

【 0 0 5 7 】

(b) イン・ビボ法

ブリストン (2 , 6 , 1 0 , 1 4 - テトラメチルペントデカン) 0 . 5 m l を 1 0 ~ 1 2 週齢の B A L B / C 系マウスの腹腔内に投与し、投与後 1 4 ~ 2 0 日目のマウス腹腔内にインピトロで増殖させたハイブリドーマ N G P I - 2 3 、ハイブリドーマ N G P I - 5 9 、及びハイブリドーマ N G P I - 6 0 をマウス一匹あたり $2 \times 1 0^6$ 細胞となるよう接種した。

各ハイブリドーマにつき、一匹のマウスから約 1 0 ~ 1 5 m l の腹水が得られた。その抗体濃度は、 5 ~ 1 0 m g / m l であった。腹水中のモノクローナル抗体の精製は、前記のイン・ビボ法と同様の方法で行った（但し、ヤギ抗ウシ血清 I g G - セファロース 4 B のカラムを通す操作は、実施しなかった）。

【 0 0 5 8 】

《実施例 4 : モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスの同定》

本発明の抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 、モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 、及びモノクローナル抗体 N G P I - 6 0 の免疫グロブリンクラスの同定は、オクテロニー免疫拡散法により行った。結果を表 1 に示す。

10

20

30

40

【表1】

モノクローナル抗体	免疫グロブリンのクラス
NGPI-23	IgG1, κ
NGPI-59	IgG2a, κ
NGPI-60	IgG1, κ

【0059】

《実施例5：モノクローナル抗体の特異性》

(a) E L I S A法

前記実施例1で調製したインタクト 2グリコプロテインI、P-ニック 2グリコプロテインI、インタクト第Vドメイン、及びP-ニック第Vドメインを、150mM-NaClを含む50mM-Tris-HCl(pH8.0)で5μg/mlとなるように希釈し、96ウェルELISA用プレート(Immulation II;日本ダイナテック株式会社)の各ウェルに、抗原希釈液50μlずつを分注し、25℃で2時間放置することで固定化した。次に、トワイーン20-生理食塩水でウェルを3回洗浄した後、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体NGPI-23、モノクローナル抗体NGPI-59、及びモノクローナル抗体NGPI-60を0.05%トワイーン(Tween)20及び150mM-NaClを含む50mM-Tris-HCl(pH8.0)で5μg/mlとなるように希釈し、各ウェルにモノクローナル抗体希釈液50μlずつを分注し、25℃で1時間反応させた。対照試験は、各抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体の代わりに、SP2/0細胞をマウス腹腔に投与して採取した腹水を使用して実施した。

【0060】

ウェルを洗浄した後、トワイーン20-生理食塩水で200倍希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウス免疫グロブリン・ウサギIgG(ダコ社；デンマーク)の希釈液を50μlずつ各ウェルに加えた。反応終了後、トワイーン20-生理食塩水で各ウェルを3回洗浄し、酵素基質溶液(0.5mM 4-アミノアンチピリン、10mMフェノール、及び0.005%過酸化水素水を含む20mMトリス-塩酸緩衝液；pH7.4)200μlを各ウェルに加え、25℃で30分間発色反応させ、各ウェルの492nmにおける吸光度を測定した。各モノクローナル抗体と各抗原との結合反応の結果を表2に示す。表2において、抗原(A)はインタクト 2グリコプロテインIを示し、抗原(B)はP-ニック 2グリコプロテインIを示し、抗原(C)はインタクト第Vドメイン示し、抗原(D)はP-ニック第Vドメインを示し、「+」は結合反応性を有することを示し、「-」は結合反応性がないことを示す。

【0061】

【表2】

モノクローナル抗体	抗原			
	(A)	(B)	(C)	(D)
NGPI-23	+	+	-	-
NGPI-59	-	+	-	+
NGPI-60	-	+	-	-
腹水	-	-	-	-

【0062】

表2の結果から明らかなように、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体NGPI-23は、インタクト 2グリコプロテインI及びP-ニック 2グリコプロテインIに反応し、インタクト第Vドメイン及びP-ニック第Vドメインに反応しなかった。すなわち、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体NGPI-23は、インタクト 2グリコプロテインI及びP-ニック 2グリコプロテインIにおける第Ⅰド

10

20

30

40

50

メイン～第IVドメインからなる領域に反応することが判明した。

しかも、後述するように、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 2 3は、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 5 9又は抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 6 0と組み合わせることによりサンドイッチ免疫測定法の構築が可能であることから、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 5 9及び抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 6 0とは異なる部位に反応する。

【0063】

抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 5 9は、インタクト 2グリコプロテインI及びインタクト第Vドメインには反応せず、P - ニック 2グリコプロテインI及びP - ニック第Vドメインに反応した。すなわち、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 5 9は、プロテアーゼ、特にはプラスミンにより開裂を受けたP - ニック 2グリコプロテインIの第Vドメインに特異的に反応することが判明した。10

【0064】

抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 6 0は、インタクト 2グリコプロテインI、インタクト第Vドメイン、及びP - ニック第Vドメインには反応せず、P - ニック 2グリコプロテインIにのみ反応した。すなわち、抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 6 0は、プロテアーゼ、特にはプラスミンにより開裂を受けたP - ニック 2グリコプロテインIの第Vドメイン以外の領域、つまり、P - ニック 2グリコプロテインIの第Iドメイン～第IVドメインからなる領域に特異的に反応することが判明した。20

【0065】

また、各抗原を固相に固定化する際に、ヘパリン(濃度: 30 μg / ml)、又は陰性荷電リン脂質であるカルジオリピン(濃度: 100 μM)を共存させても、インタクト 2グリコプロテインI及びインタクト第Vドメインに対する抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 5 9及びN G P I - 6 0の反応性は認められなかった。このことは、ヘパリン又は陰性荷電リン脂質のカルジオリピンが、2グリコプロテインIに結合することで誘導されるエピトープとは全く異なるエピトープを抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体N G P I - 5 9及びN G P I - 6 0が認識することを示している。30

【0066】

(b) イムノプロット法

前記実施例1で調製したインタクト 2グリコプロテインI、P - ニック 2グリコプロテインI、インタクト第Vドメイン、及びP - ニック第Vドメインを、非還元下あるいは還元下の SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G E)にて分画した後、ゲル中のタンパク質をニトロセルロースメンブレンに電気的に転写した。このメンブレンを、5%スキムミルク及び0.15M-NaClを含む10mMトリス-HC1緩衝液(pH 7.5)中に25度30分間浸した後、一次抗体として各抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体であるモノクローナル抗体N G P I - 2 3、モノクローナル抗体N G P I - 5 9、又はモノクローナル抗体N G P I - 6 0を25度1時間反応させた。対照試験は、各抗ニック 2グリコプロテインIモノクローナル抗体の代わりに、SP2/0細胞をマウス腹腔に投与して採取した腹水を使用して実施した。40

【0067】

0.05%トウィーン-20及び0.15M-NaClを含む10mMトリス-HC1緩衝液(pH 7.5)でメンブレンを3回洗浄した後、二次抗体としてアルカリフィオスファターゼ標識抗マウスIgG・ヤギIgG抗体(バイオラッド社)を25度1時間反応させた。前記と同様の方法でメンブレンを洗浄した後、5mM-MgCl₂を含む0.1Mジエタノールアミン緩衝液(pH 9.5)に、ニトロブルーテトラゾリウム(終濃度=0.33mg/ml)及び5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート-p-50

トルイジン（終濃度 = 0 . 1 7 m g / m l ）を加えた溶液を発色液として用いた。この発色液を 2 5 ℃ で 5 ~ 1 0 分間反応させた。反応停止は、メンブレンを蒸留水で数回洗浄することにより行った。

非還元下の SDS - PAGE で分画した後のイムノプロットの結果を表 3 に示し、還元下の SDS - PAGE で分画した後のイムノプロットの結果を表 4 に示す。また、表 3 及び表 4 において、抗原 (A) はインタクト 2 グリコプロテイン I を示し、抗原 (B) は P - ニック 2 グリコプロテイン I を示し、抗原 (C) はインタクト第 V ドメインを示し、抗原 (D) は P - ニック第 V ドメインを示し、「+」は結合反応性を有することを示し、「-」は結合反応性がないことを示す。

【 0 0 6 8 】

10

【 表 3 】

モノクローナル抗体	抗原			
	(A)	(B)	(C)	(D)
NGPI-23	+	+	-	-
NGPI-59	-	+	-	+
NGPI-60	-	+	-	-
腹水	-	-	-	-

【 0 0 6 9 】

20

【 表 4 】

モノクローナル抗体	抗原			
	(A)	(B)	(C)	(D)
NGPI-23	+	+	-	-
NGPI-59	+	+	+	+
NGPI-60	-	-	-	-
腹水	-	-	-	-

【 0 0 7 0 】

30

表 3 の結果（すなわち、非還元下の SDS - PAGE で分画した後のイムノプロットの結果）は、実施例 5 (a) で示した表 2 の結果（すなわち、ELISA の結果）と一致する。すなわち、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 NGPI-23 は、インタクト 2 グリコプロテイン I 及び P - ニック 2 グリコプロテイン I に反応し、インタクト第 V ドメイン及び P - ニック第 V ドメインに反応しなかった。すなわち、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 NGPI-23 は、インタクト 2 グリコプロテイン I 及び P - ニック 2 グリコプロテイン I における第 I ドメイン～第 IV ドメインからなる領域に反応することが判明した。

【 0 0 7 1 】

抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 NGPI-59 は、インタクト 2 グリコプロテイン I 及びインタクト第 V ドメインには反応せず、P - ニック 2 グリコプロテイン I 及び P - ニック第 V ドメインに反応した。すなわち、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 NGPI-59 は、プロテアーゼ、特にはプラスミンにより開裂を受けた P - ニック 2 グリコプロテイン I の第 V ドメインに特異的に反応することが判明した。

【 0 0 7 2 】

抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 NGPI-60 は、インタクト 2 グリコプロテイン I 、インタクト第 V ドメイン、及び P - ニック第 V ドメインには反応せず、P - ニック 2 グリコプロテイン I にのみ反応した。すなわち、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 NGPI-60 は、プロテアーゼ、特にはプラスミン

40

50

により開裂を受けた P - ニック 2 グリコプロテイン I の第 V ドメイン以外の領域、つまり、P - ニック 2 グリコプロテイン I の第 I ドメイン～第 IV ドメインからなる領域に特異的に反応することが判明した。

【 0 0 7 3 】

表 4 の結果（すなわち、還元下の SDS - PAGE で分画した後のイムノプロットの結果）から明らかなように、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 は、インタクト 2 グリコプロテイン I 及び P - ニック 2 グリコプロテイン I に反応し、インタクト第 V ドメイン及び P - ニック第 V ドメインに反応しなかった。すなわち、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 は、インタクト 2 グリコプロテイン I 及び P - ニック 2 グリコプロテイン I における第 I ドメイン～第 IV ドメインからなる領域に存在する立体構造非依存的なエピトープに反応することが判明した。
10

【 0 0 7 4 】

抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 は、P - ニック 2 グリコプロテイン I 及び P - ニック第 V ドメインに反応するだけでなく、更に、非還元の状態では反応しなかったインタクト 2 グリコプロテイン I 及びインタクト第 V ドメイン（表 3 参照）にも反応した。この結果より、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 は、非還元状態のインタクト 2 グリコプロテイン I 及びインタクト第 V ドメインにおいては分子内に隠れているが、還元状態では露出するエピトープを認識していることが判明した。
20

【 0 0 7 5 】

抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 6 0 は、還元状態のインタクト 2 グリコプロテイン I 、還元状態の P - ニック 2 グリコプロテイン I 、還元状態のインタクト第 V ドメイン、及び還元状態の P - ニック第 V ドメインのいずれにも反応しなかった。すなわち、非還元状態で反応した P - ニック 2 グリコプロテイン I （表 3 参照）にも、還元状態では反応しなかった。この結果より、抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 6 0 は、非還元状態でのみ、P - ニック 2 グリコプロテイン I における第 I ドメイン～第 IV ドメインからなる領域に構成される立体構造依存的なエピトープを認識していることが判明した。
30

【 0 0 7 6 】

《実施例 6：酵素免疫測定法によるニック 2 グリコプロテイン I の測定》

ナカネ及びカワオイ [Journal of Histochemistry and Cytochemistry] 第 22 卷，第 1084 頁～第 1091 頁（1974 年）] の方法に準じて、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼを抗ニック 2 グリコプロテイン I モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 及び N G P I - 5 9 に結合させた。この酵素標識抗体を用いてニック 2 グリコプロテイン I のサンドイッチ酵素免疫測定を以下のようにして行った。
40

【 0 0 7 7 】

すなわち、モノクローナル抗体 N G P I - 6 0 を 2 0 μg / ml の濃度で含有する 5 0 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH 9.5）1 0 0 μl を 9 6 ウェル E L I S A 用マイクロタイタープレート（Immulation-II；日本ダイナテック株式会社）の各ウェルに入れて、2 5 ℃ で 2 時間放置した。そのプレートをトワイーン 2 0 - 生理食塩水で 3 回洗浄した。このようにして抗体を作成したプレートのウェルに、正常血漿に前記実施例 1 (b) で調製した P - ニック 2 グリコプロテイン I を、1 0 0 0 n g / ml 、3 1 6 n g / ml 、1 0 0 n g / ml 、3 2 n g / ml 、1 0 n g / ml 、及び 3 . 2 n g / ml の濃度となるようにそれぞれ添加して調製した試料 1 0 0 μl を加え、2 5 ℃ で 1 時間反応させた。次に、トワイーン 2 0 - 生理食塩水で洗浄した後に、先に調製したペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 、0 . 1 5 M - NaCl 、及び 2 % ウシアルブミンを含む 2 0 mM - Tris - HCl 緩衝液（pH 7.5）1 0 0 μl を加え、2 5 ℃ で 1 時間反応させた。
50

【0078】

続いて、トゥイーン20 - 生理食塩水でプレートを洗浄した後、酵素基質液 [1 mM - 2 , 2' - アジノ - ジ (3 - エチルベンツチアゾリンスルホン酸) ジアンモニウム塩 (A B T S) 及び 0 . 0 0 2 5 % 過酸化水素水を含む溶液 ; pH 4 . 5] 2 0 0 μl ずつを各ウェルに加え、25℃で40分間反応させた後に、各ウェルの 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (M P R A 4 i 型 ; 東ソー) で測定した。得られた検量線を図1に示す。

また、固相化抗体としてモノクローナル抗体 N G P I - 6 0 を用い、ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体としてモノクローナル抗体 N G P I - 5 9 を用いた場合、及び固相化抗体としてモノクローナル抗体 N G P I - 5 9 を用い、ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体としてモノクローナル抗体 N G P I - 2 3 を用いた場合にも同様の検量線を得ることができた。
10

【0079】

《実施例7：生体内凝固線溶異常をきたした患者群並びに健常人群におけるニック2グリコプロテインIの測定》

実施例6で示した酵素免疫測定法（すなわち、固相化抗体としてモノクローナル抗体 N G P I - 6 0 を用い、ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体として N G P I - 2 3 を用いた酵素免疫測定法）により、生体内凝固線溶異常をきたした患者群（21例）、並びに健常人群（10例）におけるニック2グリコプロテインI濃度を測定した。結果を図2に示す。健常人群のニック2グリコプロテインI濃度は、全例において 4 ng / ml 以下であった。それに対して、生体内凝固線溶異常をきたした患者群のそれは、全例において 30 ng / ml 以上であった。
20

【0080】

《実施例8：抗体と不溶性担体との複合体含有液の調製》

(a) 不溶性担体上に1種類のモノクローナル抗体を担持する複合体含有液の調製

モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 (2 . 0 mg / ml) を含有する水溶液 2 ml と、ラテックス溶液 (2 % ポリスチレンラテックス、日本合成ゴム；粒径 = 0 . 3 1 0 μm) 2 ml とを混合し、2時間攪拌して抗体をラテックス粒子上に固定化した。遠心分離 (2 0 , 0 0 0 × g , 2 0 分間) した後、沈殿を 0 . 1 % ウシアルブミン溶液に懸濁し、1時間攪拌した。再び、遠心分離 (2 0 , 0 0 0 × g , 2 0 分間) した後、沈殿を蒸留水に懸濁し、2時間攪拌した。こうしてモノクローナル抗体 N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液を得た。
30

モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 の代わりに、モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 又はモノクローナル抗体 N G P I - 6 0 を用いること以外は前記操作をそれぞれ繰り返すことにより、モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液、及びモノクローナル抗体 N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を調製した。

【0081】

(b) 不溶性担体上に2種類のモノクローナル抗体を担持する複合体含有液の調製

モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 及びモノクローナル抗体 N G P I - 5 9 をそれぞれ 1 . 0 mg / ml ずつ含有する水溶液 2 ml と、前記実施例8 (a) で用いたラテックス溶液 2 ml とを混合し、2時間攪拌して抗体をラテックス粒子上に固定化した。以下、前記実施例8 (a) と同様の操作を行ない、モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 / モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液を調製した。
40

モノクローナル抗体の組み合わせを変更し、前記操作を繰り返すことにより、モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 / モノクローナル抗体 N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液、及びモノクローナル抗体 N G P I - 5 9 / モノクローナル抗体 N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を調製した。

【0082】

(c) 不溶性担体上に3種類のモノクローナル抗体を担持する複合体含有液の調製

モノクローナル抗体 N G P I - 2 3 、モノクローナル抗体 N G P I - 5 9 、及びモノク
50

ローナル抗体N G P I - 6 0 をそれぞれ 0 . 6 6 m g / m l ずつ含有する水溶液 2 m l と、前記実施例 8 (a) で用いたラテックス溶液 2 m l とを混合し、2 時間攪拌して抗体をラテックス粒子上に固定化した。以下、前記実施例 8 (a) と同様の操作を行ない、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を調製した。

【 0 0 8 3 】

《実施例 9 : スライド凝集反応による P - ニック 2 グリコプロテイン I の測定》

前記実施例 8 で調製した種々の抗体ラテックス複合体含有液又はそれらの混合液 3 0 μ l と、正常血漿に実施例 1 (2) で調製した P - ニック 2 グリコプロテイン I を種々濃度で添加して調製した試料 3 0 μ l とをスライドガラス上で混合し、揺動して 3 分後に凝集像を目視的に判定した。

10

【 0 0 8 4 】

結果を表 5 に示す。表 5 において、「+」は凝集ありを、そして「-」は凝集なしを意味する。また、表 5 の「モノクローナル抗体 / ラテックス複合体の種類」欄に示す「N G P I - 2 3 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液を意味し；以下、同様に、「N G P I - 5 9 」は、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液を；「N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を；「N G P I - 2 3 / N G P I - 5 9 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液を；「N G P I - 2 3 / N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を；「N G P I - 5 9 / N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を；「N G P I - 2 3 / N G P I - 5 9 / N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液を、それぞれ意味する。

20

【 0 0 8 5 】

また、同欄に示す「N G P I - 2 3 + N G P I - 5 9 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液との等量混合液を意味し；以下、同様に、「N G P I - 2 3 + N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液との等量混合液を；「N G P I - 5 9 + N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液との等量混合液を；「N G P I - 2 3 + N G P I - 5 9 + N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液との等量混合液を意味する。

30

【 0 0 8 6 】

更に、同欄に示す「N G P I - 2 3 + N G P I - 5 9 / N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液との 1 : 2 混合液を意味し；以下、同様に、「N G P I - 5 9 + N G P I - 2 3 / N G P I - 6 0 」は、モノクローナル抗体N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液との 1 : 2 混合液を；「N G P I - 6 0 + N G P I - 2 3 / N G P I - 5 9 」は、モノクローナル抗体N G P I - 6 0 / ラテックス複合体含有液と、モノクローナル抗体N G P I - 2 3 / N G P I - 5 9 / ラテックス複合体含有液との 1 : 2 混合液を意味する。

40

【 0 0 8 7 】

【表5】

モノクローナル抗体 ／ラテックス複合体の種類	ニックβ2グリコプロテインI濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
	6.4～ 12.8	3.2～ 6.4	1.6～ 3.2	0.8～ 1.6	0.4～ 0.8	0.2～ 0.4	0.1～ 0.2	0.05～ 0.1
NGPI-23	-	-	-	-	-	-	-	-
NGPI-59	-	-	-	-	-	-	-	-
NGPI-60	-	-	-	-	-	-	-	-
NGPI-23 + NGPI-59	+	+	+	+	+	-	-	-
NGPI-23 + NGPI-60	+	+	+	+	+	+	-	-
NGPI-59 + NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-23 + NGPI-59 + NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-23 / NGPI-59	+	+	+	+	+	+	-	-
NGPI-23 / NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-59 / NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-23 / NGPI-59 / NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-23 + NGPI-59 / NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-59 + NGPI-23 / NGPI-60	+	+	+	+	+	+	+	-
NGPI-60 + NGPI-23 / NGPI-59	+	+	+	+	+	+	+	-

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

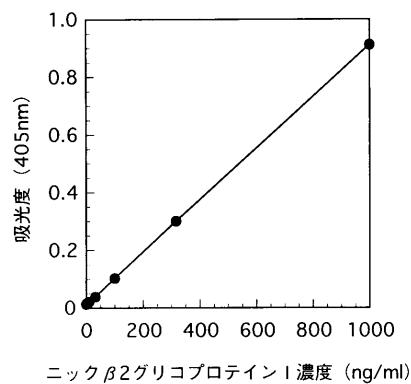
50

【0088】

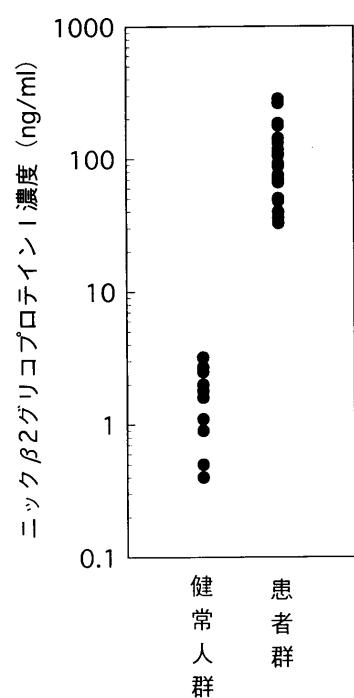
【図1】本発明によるモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法により、ニック β 2グリコプロテインIの測定を行った検量線を示すグラフである。

【図2】本発明によるモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法により、健常人(10例)と生体内凝固線溶異常をきたした患者群(21例)のニック β 2グリコプロテインI濃度を測定した結果を示すグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 犬塚 貴美子

東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号 株式会社ヤトロン内

(72)発明者 中原 邦彦

東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号 株式会社ヤトロン内

(72)発明者 加藤 久雄

大阪府吹田市上山田 8 - 1 3 - 1 0 1 3

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA31 BA61 DA02 DA05 EA04 FA18 GA03 HA15

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13

4B065 AA92X AA92Y AB05 AC14 CA46

专利名称(译)	新型单克隆抗体和尼克β2糖蛋白I的免疫学分析方法		
公开(公告)号	JP2008301833A	公开(公告)日	2008-12-18
申请号	JP2008229775	申请日	2008-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron		
[标]发明人	河野功 伊藤由美子 犬塚貴美子 中原邦彦 加藤久雄		
发明人	河野 功 伊藤 由美子 犬塚 貴美子 中原 邦彦 加藤 久雄		
IPC分类号	C12N15/02 G01N33/53 C12N5/10 C12P21/08		
F1分类号	C12N15/00.C G01N33/53.D C12N5/00.B C12P21/08 C07K16/06 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/FA18 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
其他公开文献	JP4608570B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫测定分析方法，迅速准确地测量生物样品中的缺口β2糖蛋白I，而不受完整β2糖蛋白I的影响，该β2糖蛋白I被认为同时包含在切口β2糖蛋白I中，并提供用于此的单克隆抗体。

ŽSOLUTION：第一个单克隆抗体不与β2糖蛋白I反应，但与部分蛋白酶切割的β2糖蛋白I反应，第二个单克隆抗体与β2糖蛋白和部分蛋白酶切割的β2糖蛋白I反应。在免疫学分析中，至少有一个使用第一种单克隆抗体和不同种类的第一种单克隆抗体或第二种单克隆抗体。Ž

モノクローナル抗体	抗原			
	(A)	(B)	(C)	(D)
NGPI-23	+	+	-	-
NGPI-59	-	+	-	+
NGPI-60	-	+	-	-
腹水	-	-	-	-