

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/116268

発行日 平成23年7月21日 (2011. 7. 21)

(43) 国際公開日 平成21年9月24日 (2009. 9. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 A	
GO 1 N 33/531 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 B	
	GO 1 N 33/531 B	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号 特願2009-524244 (P2009-524244)	(71) 出願人 390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/001176	
(22) 国際出願日 平成21年3月17日 (2009. 3. 17)	
(11) 特許番号 特許第4459299号 (P4459299)	(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(45) 特許公報発行日 平成22年4月28日 (2010. 4. 28)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-73047 (P2008-73047)	(74) 代理人 100068700 弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日 平成20年3月21日 (2008. 3. 21)	(74) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫
	(74) 代理人 100117156 弁理士 村田 正樹
	(74) 代理人 100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性LR11の定量方法

(57) 【要約】

血清等の生体試料から、何ら煩雑な分離操作をすることなく、簡便かつ正確に免疫学的手段により、生体試料の可溶性LR11を定量する方法を提供。

哺乳動物由来試料中の可溶性LR11の免疫学的定量方法であって、試料をポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシルーN-メチルグルカミド、及びコール酸塩から選ばれる界面活性剤の1種以上で処理することを特徴とする可溶性LR11の免疫学的測定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物由来試料中の可溶性LR11の免疫学的定量方法であって、試料をポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる界面活性剤の1種以上で処理することを特徴とする可溶性LR11の免疫学的測定方法。

【請求項 2】

試料が、血液、血漿、血清、髄液又は尿である請求項1記載の免疫学的定量方法。

【請求項 3】

免疫学的定量方法が、少なくとも2種の異なる抗原認識部位を有する抗体を用いて免疫複合体を形成する工程を含むものである請求項1又は2記載の免疫学的定量方法。

10

【請求項 4】

界面活性剤がアシル-N-メチルグルカミンである請求項1～3のいずれか1項記載の免疫学的定量方法。

【請求項 5】

抗可溶性LR11抗体と、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる1種以上の界面活性剤とを含むことを特徴とする可溶性LR11免疫学的測定用キット。

20

【請求項 6】

抗可溶性LR11抗体と、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる1種以上の界面活性剤との組み合わせの、可溶性LR11免疫学的測定用キットの製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類動物由来試料中の可溶性LR11の定量方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats (LR11) は、LDL受容体ファミリーの特徴的な構造を有するLDL受容体類似タンパク(特許文献1、非特許文献1)であり、正常血管壁細胞ではほとんど発現されていないが、肥厚内膜平滑筋細胞において特異的に発現が認められていることが知られている(非特許文献2)。また、培養平滑筋細胞を用いた検討では、平滑筋細胞の増殖に伴いLR11の発現量が亢進し、培養液中にLR11の分泌が認められることや、カフ障害マウスモデルにおいて、LR11遺伝子を発生工学的に機能欠損させると、平滑筋細胞の遊走及び増殖によって引き起こされる血管内膜の肥厚が阻害されることが知られている(非特許文献3)。更に、近年、LR11は、膜結合型とともにプロテアーゼによって切断された可溶性LR11が存在することが示されている(非特許文献4)。また、ヒト血液中に、可溶性LR11が存在することが報告された(非特許文献5)。

40

【0003】

可溶性LR11の測定方法としては、LR11と親和性を有するシャペロン分子RAP (receptor associated protein) を結合させた不溶性担体を用いて、試料中の可溶性LR11を分離した後、SDS-PAGE、ウエスタンブロットを行い、抗LR11抗体による免疫染色で検出する方法(非特許文献5、6)等が知られているが、試料中の可溶性LR11を分離する操作が必要であり、操作が煩雑である。

【先行技術文献】

【0004】

50

【特許文献1】特開平9-163988号公報

【非特許文献1】J.Biol.Chem.1996;271, p24761-24768

【非特許文献2】Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.1999;19, p2687-2695

【非特許文献3】Circ.Res.2004;94; p752-758

【非特許文献4】医学のあゆみ、Vol.221, No.13, p1200-1203

【非特許文献5】J Clin Invest. 2008 ;118, p2733-2746

【非特許文献6】第39回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 プログラム・抄録集、一般演題（ポスター）189, p264

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0005】

また、本発明者らは、動脈硬化性疾患患者の血中の可溶性LR11の濃度が、健常者に比べて有意に高値となることを見出し、血中に存在する可溶性LR11濃度の測定は、新たな動脈硬化性疾患のマーカーになることを報告した（非特許文献5、特願2007-160225）が、そのような診断のためにも、簡便な操作で可溶性LR11を定量する方法の開発が望まれている。

しかしながら、体液、たとえば血清成分が存在する系、すなわち血清や血漿を対象として、可溶性LR11と反応する抗体を用いて免疫学的測定を行った場合、何らかの妨害物質の影響により、可溶性LR11が正確に定量できないことが判明した。

従って、本発明の目的は、血清等の生体試料から、何ら煩雑な分離操作をすることなく、簡便かつ正確に免疫学的手段により、生体試料の可溶性LR11を定量する方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで、本発明者らは、体液、たとえば血清や血漿を直接測定試料とした場合でも可溶性LR11を正確に定量すべく、妨害物質の影響防止手段について種々検討した結果、試料をある特定の界面活性剤で処理した後、免疫学的測定法で測定を行えば、試料中の可溶性LR11を簡便かつ正確に定量できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、哺乳動物由来試料中の可溶性LR11の免疫学的測定方法であって、試料をポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミド、及びコール酸塩から選ばれる界面活性剤の1種以上で処理することを特徴とする可溶性LR11の免疫学的定量方法を提供するものである。

30

【0008】

また、本発明は、抗可溶性LR11抗体と、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる1種以上の界面活性剤とを含むことを特徴とする可溶性LR11免疫学的測定用キットを提供するものである。

40

【0009】

また、本発明は、抗可溶性LR11抗体と、上記特定の界面活性剤との組み合わせの、可溶性LR11免疫学的測定用キットを製造するための使用を提供するものである。

【発明の効果】

【0010】

本発明の定量法及び免疫学的測定用キットにより、体液、たとえば血液等の試料中に存在する可溶性LR11の濃度を簡便に高感度で測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】固相化可溶性LR11に対する各モノクローナル抗体の反応を示す。

50

- 【図2】 サンドイッチELISAによる精製ヒト可溶性LR11の測定を示す。
 【図3】 サンドイッチELISAによる精製ウサギ可溶性LR11の測定を示す。
 【図4】 ELISA系での血清の影響を示す。
 【図5】 界面活性剤処理による血清成分の影響回避を示す。
 【図6】 血清成分の影響除去に有効な界面活性剤 (MEGA-9) 濃度を示す。
 【図7】 固相化モノクローナル抗体A2-2-3とのサンドイッチELISAを示す。
 【図8】 固相化モノクローナル抗体M3とのサンドイッチELISAを示す。
 【図9】 固相化モノクローナル抗体M5とのサンドイッチELISAを示す。
 【図10】 固相化モノクローナル抗体R14とのサンドイッチELISAを示す。
 【図11】 固相化モノクローナル抗体R23とのサンドイッチELISAを示す。 10
 【図12】 ヒト血清中可溶性LR11の測定を示す。
 【図13】 各種哺乳動物の血清中可溶性LR11の測定を示す (A: MEGA-9 処理、
 B: 未処理)。

【図14】 ヒト脳髄液中LR11の測定を示す (A: MEGA-9 処理、B: 未処理)。
 【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の定量方法は、哺乳動物由来試料中の可溶性LR11の免疫学的定量方法である。哺乳動物としては、ヒトを含む哺乳動物、例えばヒト、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、モルモット、マウス等が挙げられる。試料としては、血清成分と同様の妨害物質を含む生体試料、例えば血液、血漿、血清等のほか、髄液や尿が挙げられる。 20

【0013】

本発明における免疫学的定量方法は、抗原抗体反応を利用した可溶性LR11の定量方法であれば特に制限されないが、体液、たとえば血清成分による妨害物質の影響回避という点から、少なくとも2種の抗体を用いる定量方法が好ましい。特に、少なくとも2種の異なる抗原認識部位を有する抗体を用いて免疫複合体を形成する工程を含む定量方法が好ましい。本発明において、少なくとも2種の異なる抗原認識部位を有する抗体を用いて免疫複合体を形成する工程を含む定量方法とは、例えばサンドイッチELISAやラテックス比濁免疫アッセイ (L T I A) 等が挙げられる。

【0014】

抗可溶性LR11抗体としては、血清から精製した可溶性LR11と反応する抗体であれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでも良いが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。当該抗体の作製は周知の方法にて作製することができる。 30

【0015】

ポリクローナル抗体の作製には、例えば、免疫する動物としてマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ等が用いられる。抗血清は、抗原を動物の皮下、皮内、または腹腔等に、一回又は複数回投与した後、血清から得ることができる。タンパク質、ペプチドを抗原として用いる時は、免疫賦活効果を有する補液との混合物の免疫がより好ましい。

【0016】

また、モノクローナル抗体の作製には、公知のモノクローナル抗体作製方法、例えば、 40
 長宗香明、寺田弘共著、「単クローン抗体」廣川書店 (1990年) や、Jame W.Golding, "Monoclonal Antibody", 3rd edition, Academic Press, 1996年に従い作製することができる。また、DNA免疫法によりモノクローナル抗体を作製することもでき、Nature 199 2 Mar12;356, p152-154やJ.Immunol Methods Mar 1;249, p147-154を参考に作製することができる。

【0017】

抗体の作製に用いられる抗原としては、LR11タンパク質若しくはその一部断片 (ペプチド)、又はLR11タンパク質若しくはその一部断片をコードするcDNAを組み込んだベクターを用いることができる。当該一部断片としては、例えば、後記する配列番号1や配列番号2で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。当該アミノ酸配列は、1若しく 50

は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたものであってもよい。

LR11の高次構造を認識するモノクローナル抗体を得るために、ヒトLR11全長遺伝子が入った構築物である全長LR11ベクターが最適な免疫用抗原遺伝子となるが、そのほか、前記LR11タンパク質の一部断片（ペプチド）をコードする遺伝子が挿入された構築物も免疫用抗原遺伝子として使用できる。DNA免疫法は、上記遺伝子構築物を単独または混合して、免疫動物に対して様々な遺伝子導入法（例えば筋肉注射、エレクトロポレーション、又は遺伝子銃等）のいずれかを用いて、動物（マウス、又はラット等）の皮下に注入し、細胞内に取り込ませることにより実施できる。

【0018】

ペプチド抗原を用いたモノクローナル抗体の作製例を参考として次に示す。

10

(1) ハイブリドーマの調製

LR11の一部アミノ酸配列 [432-447] の合成ペプチド (SMNEENMRSVITFDKG) (配列番号1) のC末端にシステイン残基を導入し、架橋剤のNBS (PIERCE社製) を用いて、KLH (Keyhole limpet hemocyanin) のリジン残基を介して両者を結合させ免疫原とした。この免疫原を完全フロイントアジュバンド (GIBCO社製) と1対1で混和乳化し、0.1mg/0.1mL (エマルジョン) で6週齢の雌BALB/Cマウスの皮下に1週間間隔で10回投与後、最終免疫の3日後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓から得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞SP2/O-Ag14とを6対1の割合で混合し、PEG/DMSO Solution (SIGMA社製) 等の細胞凝集体存在下にて細胞融合させた。融合細胞は脾臓細胞として 2.5×10^6 /mLになるようにHA 20
T培地に懸濁し、96穴培養プレート (CORNING社製) に0.2mLずつ分注した。これを5%CO₂インキュベーター中で37℃にて培養し、おおよそ2週間後に、ハイブリドーマの生育してきた培養上清について、次に示すELISA法にしたがって、前記の合成ペプチド (配列番号1) に対する抗体の有無を確認し、抗体産生が有望なハイブリドーマ株を選択した。

【0019】

具体的には、まず、マイクロプレート (NUNC社製) に前記の合成ペプチド (配列番号1) を固相化した。これに、各培養上清中のIgGを反応させた後、ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgGヤギ抗体を反応させ、次いでオルトフェニレンジアミン (東京化成社製) を含むペルオキシダーゼ基質溶液を加え発色させ、1.5N硫酸を加えて発色を 30
停止させた後、マイクロプレートリーダー (Abs. 492nm) で測定した。こうして、前記の合成ペプチドに反応性を示したハイブリドーマ株を選択し、限界希釈法によるクローン化を行った。LR11に対する最終的な反応性は、後述する血清から精製した可溶性LR11との反応性により確認した。こうして、抗ヒト可溶性LR11モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (A2-2-3) を樹立した。

【0020】

(2) モノクローナル抗体の調製

2週間前にプリスタン0.5mLを腹腔内に注射しておいた12週齢の雌BALB/Cマウスに、上記で得られたハイブリドーマを細胞数 0.5×10^6 個の量で腹腔内に投与した。約14日後に腹水を採取し、遠心分離して上清を得た。該上清を等量の吸着用緩衝液 (3mol/L NaCl-1.5mol/L Glycine-NaOH、pH 8.5) と混和後、濾過した。この濾液を吸着用緩衝液で平衡化したプロテインAカラム (GEヘルスケア バイオサイエンス社製) に通して抗体をカラムに吸着させた後、0.1mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) でカラムより溶出させ、抗LR11モノクローナル抗体 (A2-2-3抗体) を精製した。 40

【0021】

また、DNA免疫法によるモノクローナル抗体の作製例を参考として次に示す。

(1) 発現ベクターの構築

LR11の全長遺伝子 (Q92673) を構成する一部分の遺伝子断片 (LR11のアミノ配列 [1000-1550] (配列番号2) からなるペプチドをコードする遺伝子) 50

を、FLAGタグ付の哺乳動物発現ベクター (pcDNA3.1, Invitrogen社製) に組込んだ。発現ベクターはヒトアルカリフォスファターゼ由来 GPI アンカー配列からなるペプチドをコードする DNA を含む。これを LR11 [1000-1550] ベクターとした。

【0022】

(2) CHO発現物の確認

構築した LR11 [1000-1550] ベクターにより、目的とする遺伝子産物が、設計通りに細胞膜表面に発現するかどうかについて、免疫前に CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来) を用いた一過性導入発現実験により確認した。すなわち、前日に 6-well plate の well あたり 1×10^6 個の細胞を plating した。5% CO₂、37℃ の条件下で一晩培養した。Transfection 当日、ポリスチレンラウンドチューブ内でプラスミド希釈液 (3 μg plasmid DNA + 500 μL Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)) と lipofectamine2000 希釈液 (9 μL の Lipofectamine2000 + 500 μL の D-MEM) を良く混ぜ、室温で 20 分間インキュベート後、前日に plating してあった培養上清を捨て、細胞を剥がさないように静かに細胞に添加した。5% CO₂、37℃ で 5 時間インキュベート後、上清を取り除き、5% FCS を含む D-MEM 培地を添加後 24 時間 5% CO₂、37℃ で培養した。

翌日、細胞は Dissociation buffer (Invitrogen 社) で plate から剥がし、フローサイトメトリー (FCM) 解析に使用された。FCM 解析は以下のように実施した。すなわち、1 次抗体反応は、細胞に 3% FCS 入り PBS 中で ANTI-FLAG (登録商標) M2 抗体 (SIGMA) を 4℃、30 分間反応させた。2 次抗体は、細胞を 3% FCS 入り PBS で洗浄後、3% FCS 入り PBS 中で PE 標識した抗マウス IgG 抗体 (Beckman) を 4℃、30 分間反応させた。細胞を 3% FCS 入り PBS で洗浄後、適量の 3% FCS 入り PBS に懸濁し、フローサイトメーターに供した。

この結果、構築した LR11 [1000-1550] ベクターにより目的の遺伝子産物が細胞表面に発現していることが確認された。

【0023】

(3) DNA 免疫法による抗体の作製

DNA 免疫法は、前記 (1) の LR11 [1000-1550] ベクターを単独または混合して金粒子に感作したものを、遺伝子銃で免疫動物 (マウス又はラット) の皮下に打ち込み、細胞内に取り込ませた。具体的には、Helios (登録商標) Gene Gun Optimization Kit (Bio-Rad) を用い、該キットの使用説明書に従って、25 mg の金粒子あたり 200 μg の前記 LR11 [1000-1550] ベクターを感作したものを投与した。免疫は 2 週間おきに 4 回実施した。4 回目の免疫時に、少量の抗血清をサンプリングし、3% FCS 入り PBS で 1,000 倍希釈した抗血清を 1 次抗体として FCM 解析を行った。この際、前記 (2) の目的とする遺伝子産物を一過性発現させた CHO 細胞 (以下、強制発現細胞ともいう) を用いて FCM 解析を行い、抗体価が上昇していることを確認した。また、モノクローナル抗体の作製は一般的な細胞融合法を用いて実施した。すなわち、最終ブースト (final boost) を 2 回行った後、免疫した動物を解剖し、定法に従い抗体産生細胞を単離してマウス骨髄腫細胞と細胞融合させて抗体産生ハイブリドーマ株を調製した。これらハイブリドーマ株を培養後、その培養上清の一部をとり、強制発現細胞を用いた酵素免疫測定法および FCM を行った場合、抗原蛋白質に反応するが、非抗原蛋白質には反応しないハイブリドーマ株を選択した。

尚、強制発現細胞を用いた酵素免疫測定法は、次のようにして行った。強制発現細胞を 96 ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清を第一抗体として反応させ、第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加した。ここで、第二抗体とは、第一抗体のマウス IgM グロブリンまたはラット IgM グロブリンを認識できる抗体であり、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗体である。反応後、第二抗体を標識した酵素に応じた蛍光基質を添加し、蛍光測定プレートリーダーで解析した。

【0024】

次いで、選択したハイブリドーマ株について限界希釈法によりクローニングを行い、安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択した。

次に、腹水からのモノクローナル抗体の大量調製を次のようにして実施した。プリスタン0.5 mLで前処理したヌードマウスに、 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ クローン化ハイブリドーマ細胞を含む0.5 mLのリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)を腹腔内注射した。およそ2週間後に、腹水を集め、モノクローナル抗体をプロテインAで親和精製した。

こうしてDNA免疫法により抗可溶性LR11マウスモノクローナル抗体(M3)及び(M5)、抗LR11ラットモノクローナル抗体(R14)及び(R23)を精製した。LR11に対する最終的な反応性は、後述する血清から精製した可溶性LR11との反応性により確認した。以上が、DNA免疫法によるモノクローナル抗体の作製例である。 10

【0025】

本発明方法においては、試料を特定の界面活性剤で処理した後に免疫学的定量を行う。当該処理により、試料中の可溶性LR11定量を妨害する物質の影響を防止することができる。

該界面活性剤としては、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる1種以上である。

このうち、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド及びアシル-N-メチルグルカミンがより好ましく、アシル-N-メチルグルカミンが特に好ましい。 20

【0026】

ポリオキシアルキレンアルキルエーテル及びポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテルとしては、ポリオキシエチレン C_8-C_{24} アルキルエーテル、ポリオキシエチレン C_8-C_{24} アルキルフェニルエーテルが好ましく、具体例としては、ポリオキシエチレンオクチルエーテル、ポリオキシエチレンデシルエーテル、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンデシルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンドデシルフェニルエーテル等が挙げられる。ここで、ポリオキシエチレン数は4~40が好ましい。ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルの市販品としてはTriton X-100(登録商標)等が挙げられる。 30

【0027】

アルキルグリコシド及びアルキルチオグリコシドとしては、 C_8-C_{24} アルキルグルコシド、 C_8-C_{24} アルキルマルトシド、 C_8-C_{24} アルキルチオグルコシド、 C_8-C_{24} アルキルチオマルトシドが好ましく、具体例としては、n-オクチル- β -D-グルコシド、n-オクチル- α -D-グルコシド、n-オクチル- β -D-マルトシド、n-デシル- β -D-マルトシド、n-デシル- β -D-マルトシド、n-ヘプチル- β -D-チオグルコシド、n-オクチル- β -D-チオグルコシド、n-ノニル- β -D-チオマルトシド等が挙げられ、中でもn-オクチル- β -D-グルコシドが好ましい。この市販品としてはn-オクチル- β -D-グルコシド(同仁化学研究所製)等が挙げられる。コール酸塩としては、コール酸ナトリウム、コール酸カリウム等が挙げられる。 40

【0028】

アシル-N-メチルグルカミンとしては、 C_8-C_{24} アルカノイル-N-メチルグルカミンが好ましく、具体例としては、オクタノイル-N-メチルグルカミン、ノナノイル-N-メチルグルカミン、デカノイル-N-メチルグルカミン等が挙げられ、中でもオクタノイル-N-メチルグルカミンやノナノイル-N-メチルグルカミンが好ましい。オクタノイル-N-メチルグルカミンの市販品としてはMEGA-8(同仁化学研究所製)、ノナノイル-N-メチルグルカミンの市販品としてはMEGA-9(同仁化学研究所製)等が挙げられる。

【0029】

試料を界面活性剤で処理する手段としては、免疫測定前又は測定時の試料中に、上記特 50

定の界面活性剤を添加すればよく、免疫測定前に添加することが好ましい。

界面活性剤の使用濃度は、用いる種類により適宜決定すれば良いが、例えば試料中0.1～15質量%、さらに2～10質量%が好ましい。処理温度は、5～40℃、特に10～30℃が好ましく、このときの反応時間は、界面活性剤処理並びに処理検体と抗体の結合を含めて、1～24時間、更に6～20時間が好ましい。

また、試料を、1（原液）～50倍、特に4～30倍に希釈することが好ましい。このとき、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液等のpH7～10の中性～アルカリ性の緩衝液で希釈するのが好ましい。

【0030】

上記特定の界面活性剤が添加されている試料を用いて通常的手段により抗可溶性LR11抗体を用いた免疫学的定量を行えばよい。

免疫学的定量方法としては、例えば免疫染色（ウエスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、サンドイッチELISA法、免疫比濁法（TIAやLTIA）、エンザイムイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等が挙げられる。

このとき、抗可溶性LR11抗体と反応する可溶性LR11を、定量又は半定量的に評価する場合、基準となるLR11と比較することが好ましい。基準となるLR11としては、例えば、既知濃度の血清可溶性LR11、平滑筋細胞や神経芽細胞株の培養細胞若しくは培養上清より回収したLR11、リコンビナントLR11、又は抗体作製において免疫原として使用した合成ペプチド等を使用することが好ましい。

【0031】

上記免疫学的測定において、サンドイッチELISA法による定量を例にして説明すれば、例えば抗可溶性LR11モノクローナル抗体の1種を適当な緩衝液中で不溶性担体に固定化して固相化抗体とし、第二の抗体として認識部位の異なる抗可溶性LR11モノクローナル抗体を酵素で標識し、これらを被検体と反応させ、第二の抗体に結合させた酵素の活性を測ることにより、試料中の可溶性LR11を測定することができる。また、第二の抗体として、ビオチン標識した抗可溶性LR11モノクローナル抗体を用い、被検体との反応後に酵素標識したアビジンを反応させ、該標識酵素の活性を測ることにより、試料中のLR11を測定することもできる。

【0032】

上記で使用する不溶性担体としては、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン等の各種合成高分子、ガラス、シリコン、不溶性多糖（架橋デキストラン、ポリサッカライド）等が好ましく、これらの担体は球状、棒状、微粒子等の形状、あるいは試験管、マイクロプレート等の形態で用いることができる。固相化抗体の作成の条件としては、球状、棒状、試験管、マイクロプレートの形態の担体を用いる場合の抗体濃度は各々1～10μg/mLであり、微粒子の形態の担体を用いる場合の抗体濃度は1～10mg/mLである。また、緩衝液は、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液等のpH7～10の中性～アルカリ性の緩衝液を用い、4℃～25℃で1時間～72時間感作して調製することが好ましい。

【0033】

使用する酵素標識抗体は、公知の方法によって作製することができる。例えば、中根らの方法（Nakane P.K et al, J.Histochem Cytochem, 22, p1084-1089, 1974）あるいは石川らの方法（マレイミド法：「酵素免疫測定法 第3版」医学書院）等に従い、断片化していない免疫グロブリン分子をそのままか、あるいは必要に応じて抗体を適当なプロテアーゼで限定分解してF(a b')₂、又はF a b'とした後、酵素で標識することにより酵素標識抗体を作製できる。標識に使用する酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等が挙げられる。

ビオチン標識抗体も公知の方法によって作製できるが、市販のビオチン化試薬（例えば、PIERCE社製、Sulfo-NHS-Biotinylation Kit）を用いることで更に容易に作製することができる。

酵素標識アビジンも公知の方法によって作製できるが、市販品（例えば、PIERCE社製、StreptAvidin, Horseradish Peroxidase Conjugated）を使用することもできる。

【0034】

また、標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、及び必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素を用い、発色剤として o -フェニレンジアミン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン、2, 2'-アジノジ-〔3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸〕アンモニウム塩等；酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、基質として、 p -ニトロフェニルフォスフェート、3-(4-メトキシスピロ〔1, 2-ジオキセタン-3, 2'-トリシクロ〔3. 3. 1. 1^{3,7}〕デカン〕-4-イル)フェニルフォスフェート：AMPPD等；酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、基質として、 β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド等；酵素としてグルコースオキシダーゼを用いる場合には、ペルオキシダーゼの共存下で基質として、 β -D-グルコース、発色剤としてペルオキシダーゼの発色剤を用いることができる。

10

【0035】

後記実施例に示すように、血清成分と同様の妨害物質を含む生体試料を上記特定の界面活性剤で処理した後、可溶性LR11と反応する抗体にて免疫学的測定を行えば、前記試料中の可溶性LR11を簡便且つ正確に定量することができる。よって、本発明は、前記免疫学的測定を実施するにあたって、抗可溶性LR11抗体と、上記特定の界面活性剤を予め組み合わせさせたキット、すなわちこれらを含む可溶性LR11免疫学的測定用キットを提供することもできる。また、抗可溶性LR11抗体及び上記特定の界面活性剤を、可溶性LR11免疫学的測定用キットを製造するために使用することができる。

20

当該免疫学的測定用キットは、抗可溶性LR11抗体と、上記特定の界面活性剤とを含むが、これら成分が第一試薬と第二試薬として別々の状態、又は混合された状態であってもよい。また、当該キットには、可溶性LR11の検出に用いる任意の構成要素、例えば緩衝液、安定化剤や反応容器等を含んでいてもよい。

【0036】

そして、前述のとおり、血中に存在する可溶性LR11の濃度の測定は、動脈硬化性疾患マーカーとなるので、前記キットは動脈硬化性疾患の存在・程度の評価に用いることができる。

30

ここで、「動脈硬化性疾患」とは、動脈硬化病変の進展に付随して引き起こされる疾患を含む概念である。当該疾患としては、例えば、心筋梗塞、経皮的冠動脈形成術後の再狭窄、脳梗塞、脳出血、大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症等が挙げられるが、これらに限定されない。

また、「存在・程度の評価」とは、既に動脈硬化性疾患に罹患している場合に限らず、将来的に罹患する可能性があるか否かを判定する場合も包含する概念である。

【0037】

前記動脈硬化性疾患の存在・程度の評価の方法としては、例えば、動脈硬化性疾患が疑われる哺乳動物から生体試料を採取し、上述の如く可溶性LR11濃度を測定し、別に予め動脈性疾患の疑いのない健常哺乳動物集団から同様に採取した生体試料中の可溶性LR11濃度を算出しておき、両者の濃度レベルを比較することによって、動脈硬化性疾患の存在・程度の評価を行なうことができる。

40

【0038】

ここで、「健常」とは、動脈硬化性疾患を有さない個体を云う。動脈硬化性疾患の有無の客観的な指標としては、ヒトにおいては、冠動脈の閉塞等の動脈硬化性疾患の既往歴がなく、例えば、日本高血圧学会の「高血圧治療ガイドライン2004」による正常血圧（収縮期血圧130mmHg未満、拡張期血圧85mmHg未満）；日本糖尿病学会の「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告（1999）」に基づく正常型（空腹時血糖が110mg/dl未満）；及び日本動脈硬化学会の「高脂血症の診断基準（2002年）

50

」に該当しないこと（即ち空腹時採血の血清脂質値が総コレステロール220mg/dl未満、LDLコレステロール140mg/ml未満、HDLコレステロール40mg/dl以上、及びトリグリセリド150mg/dl未満）、を云う。

【0039】

さらに、本発明のキットを用いて可溶性LR11濃度の経時変化をモニターすることによって、薬剤等による治療の効果判定を行なうこともできる。

このときの判定は、可溶性LR11の濃度変化によってすることができ、例えば、増加傾向を示す場合は疾患（例えば動脈硬化性疾患）の進展、減少又は横ばい傾向を示す場合には疾患の進展が抑制されていると判定される。

【実施例】

10

【0040】

以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0041】

(参考例1)

ウサギ血清或いはヒト血清中の可溶性LR11の精製は次のようにして実施した。

(可溶性LR11の精製)

ヒトRAP遺伝子を組み込んだpGEX2T（GEヘルスケア バイオサイエンス社製）ベクターにより形質転換した大腸菌DH5 α を培養して、遠心分離により菌体を回収した。3Lの培養液から回収した菌体を、リゾチーム及び界面活性剤TritonX-100（登録商標）を含むリン酸緩衝液（pH7.2）に懸濁して超音波処理により菌体を破碎した。この破碎液の遠心上清中のRAP/GST融合タンパク質をGlutathione Sepharose 4 FF（GEヘルスケア バイオサイエンス社製）10mLに通し吸着させた後、リン酸緩衝液（PBS, pH7.2）で洗浄しRAP-セファロース樹脂を調製した。

20

このRAP-セファロース樹脂10mLとウサギ血清またはヒト血清1Lをそれぞれ混和し、4℃で穏やかに攪拌しながら一晚反応させた後、RAP-セファロース樹脂をそれぞれ回収してリン酸緩衝液（pH7.2）で洗浄した。次にクエン酸緩衝液（pH5.0）にてウサギ可溶性LR11またはヒト可溶性LR11をそれぞれ溶出して濃縮後、リン酸緩衝液（pH7.2）で透析して、精製ウサギ可溶性LR11または精製ヒト可溶性LR11とした。

30

【0042】

(実施例1)

1) 血清から精製した可溶性LR11とモノクローナル抗体との反応性

固相化可溶性LR11に対する各モノクローナル抗体の反応性は、次のようにして確認した。まず、マイクロプレート（NUNC社製）に、精製ウサギ可溶性LR11（Lot. 061208）を20mMリン酸緩衝液、pH7.2（PBS）で100倍希釈した液、または精製ヒト可溶性LR11（Lot. 061208）をPBSで20倍希釈した液を50 μ L/ウェル用いてそれぞれの可溶性LR11を一晚固相化した。これを0.05% Tween20（登録商標）含有20mMリン酸緩衝液、pH7.2（BSA-PBS T）で洗浄後、1% BSA及び0.05% Tween20（登録商標）含有20mMリン酸緩衝液、pH7.2（BSA-PBS T）を1ウェル当たり100 μ L添加し室温で1時間ブロッキングした。PBSTで洗浄後、これに、ビオチン化試薬（PIERCE社製）にてビオチン標識した各モノクローナル抗体A2-2-3、M3、及びR14をBSA-PBSTで希釈して10 μ g/mLとした抗体液50 μ Lを添加し、室温で2時間反応させた。PBSTで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（PIERCE社製）をBSA-PBSTで希釈して0.2 μ g/mLとした液50 μ Lを添加し、室温で2時間反応させ、PBSTで洗浄後、次いでOPD基質溶液（20mMオルトフェニレンジアミン、12mM過酸化水素を含む0.1Mクエン酸緩衝液pH5.0）50 μ Lを加え、室温で10分間反応させ、1.5N硫酸50 μ Lを加えて発色を停止させた後、マイ

40

50

クロプレートリーダー (Abs. 492 nm) で測定した。尚、抗体の反応性の陰性コントロールとしてマウス IgG を用いた。

その結果 (図 1)、モノクローナル抗体 A2-2-3、M3、M5、R14、及び R23 は、陰性コントロールであるマウス IgG では、反応が殆ど認められなかったのに対し、固相化ウサギ可溶性 LR11 及び固相化ヒト可溶性 LR11 にそれぞれ反応が認められた。

【0043】

2) ELISA 測定系

モノクローナル抗体 A2-2-3、M3、M5、R14、または R23 を PBS でそれぞれ 5 μ g/mL に希釈した後、マイクロプレート (NUNC 社製) に 1 ウェル当たり 50 μ L を添加し、一晚固相化した。尚、陰性コントロールとしてマウス IgG も固相化した。これを PBST にて洗浄後、BSA-PBST を 1 ウェル当たり 100 μ L 添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、これに、精製ウサギ可溶性 LR11 (Lot. 061208) を BSA-PBST で 25 倍希釈した液、または精製ヒト可溶性 LR11 (Lot. 061208) を BSA-PBST で 25 倍希釈した液を 50 μ L 添加し、室温で 2 時間反応させた。PBST で洗浄後、ビオチン標識したモノクローナル抗体 A2-2-3、M3、M5、R14、または R23 を BSA-PBST で希釈して 10 μ g/mL とした抗体液 50 μ L 添加し、室温で 2 時間反応させた (陰性コントロールにはビオチン標識したマウス IgG を用いた)。PBST で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (PIERCE 社製) を BSA-PBST で希釈して 0.2 μ g/mL とし 50 μ L 添加し、室温で 2 時間反応させた。PBST で洗浄後、次いで OPD 基質液を 50 μ L 添加し、室温で 10 分間反応させ、1.5 N 硫酸 50 μ L を加えて発色を停止させた後、マイクロプレートリーダー (Abs. 492 nm) で測定した。

【0044】

その結果、表 1 及び表 2 に示すように、次のモノクローナル抗体の組み合わせのサンドイッチ ELISA 系にて、液相の精製ウサギ可溶性 LR11 及びヒト可溶性 LR11 を検出することが確認された。

【0045】

【表 1】

モノクローナル抗体-モノクローナル抗体サンドイッチ ELISA (抗原: 精製ヒト LR11)

		液相側抗体					
		マウス IgG	A2-2-3	M3	M5	R14	R23
固相側抗体	マウス IgG	-0.003	0.015	0.024	0.007	-0.017	-0.020
	A2-2-3	0.003	0.110	0.432	0.449	0.693	0.690
	M3	0.001	1.075	0.029	1.017	2.061	1.915
	M5	-0.001	0.150	0.158	0.079	0.308	0.309
	R14	-0.004	1.130	0.861	0.870	-0.012	0.422
	R23	-0.002	0.878	1.264	1.165	-0.005	0.007

吸光度(492nm)

【0046】

【表 2】

モノクローナル抗体-モノクローナル抗体サンドイッチ ELISA (抗原: 精製ウサギ LR11)

		液相側抗体					
		マウス IgG	A2-2-3	M3	M5	R14	R23
固相側抗体	マウス IgG	0.043	-0.017	-0.017	-0.017	-0.019	-0.026
	A2-2-3	-0.004	0.007	1.898	0.856	1.822	1.212
	M3	-0.001	2.552	0.003	1.915	2.867	2.895
	M5	-0.007	0.229	0.300	0.144	0.535	0.361
	R14	-0.009	2.032	1.119	1.029	0.002	0.058
	R23	-0.009	1.579	2.475	1.833	0.005	0.041

吸光度(492nm)

10

【0047】

固相側抗体A2-2-3-液相側抗体M3、M5、R14、R23

固相側抗体M3-液相側抗体A2-2-3、M5、R14、R23

固相側抗体M5-液相側抗体A2-2-3、M3、R14、R23

固相側抗体R14-液相側抗体A2-2-3、M3、M5、R23

固相側抗体R23-液相側抗体A2-2-3、M3、M5

20

【0048】

3) サンドイッチ ELISA による精製 LR11 の測定

マイクロプレート (NUNC 社製) に PBS で希釈して $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ としたモノクローナル抗体 M3 を 1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加して室温で 2 時間固相化した。PBST で洗浄後、BSA-PBST を 1 ウェルあたり $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 添加し室温で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、これに、参考例 1 で示した方法で精製したウサギ可溶性 LR11 またはヒト可溶性 LR11 を BSA-PBST で希釈して反応させた。PBST で洗浄後、ビオチン標識したモノクローナル抗体 R14 を BSA-PBST で希釈し $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ として反応させた。PBST で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (PIERCE 社製) を BSA-PBST で希釈して $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ として反応させ、PBST で洗浄後、次いで TMB 基質液 ($0.3 \text{mg}/\text{mL}$ 3, 3'-5, 5'-Tetramethyl-benzidine dihydrochloride (SIGMA 社製)、 12mM 過酸化水素を含む 0.1M クエン酸緩衝液、 $\text{pH} 3.7$) $50 \mu\text{L}$ を加え室温で 30 分間発色させた。その後、 1.5N 硫酸 $50 \mu\text{L}$ を加えて発色を停止させた後、マイクロプレートリーダー (Abs. 450nm) で測定した。

30

その結果、図 2 及び図 3 に示すように、精製可溶性 LR11 を用いれば、抗原濃度すなわちウサギ可溶性 LR11 またはヒト可溶性 LR11 濃度を変動させた場合、抗原濃度依存的な反応を得られることが確認された。

【0049】

4) ELISA 系に与える血清の影響

40

まず、マイクロプレート (NUNC 社製) にモノクローナル抗体 M3 を PBS で $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して 1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加して室温で 2 時間固相化した。PBST で洗浄後、BSA-PBST を 1 ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加して室温で 1 時間ブロッキングした。

PBST で洗浄後、これに、精製ウサギ可溶性 LR11 (Lot. 070601) を BSA-PBST で 100 倍、200 倍、又は 400 倍希釈したもの、或いは、精製ウサギ可溶性 LR11 (Lot. 070601) をヒト血清で 100 倍、200 倍、又は 400 倍希釈したもの $50 \mu\text{L}$ をそれぞれ加え、室温で 2 時間反応させた。

PBST で洗浄後、ビオチン標識したモノクローナル抗体 R14 を BSA-PBST で希釈して $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ としたもの $50 \mu\text{L}$ を加え、室温で 2 時間反応させた。PBST で

50

洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（PIERCE社製）をBSA-PBSTで希釈して $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ としたもの $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で2時間反応させ、次いでTMB基質液 $50 \mu\text{L}$ を加え、室温で30分間発色させた。

その後、 1.5N 硫酸 $50 \mu\text{L}$ を加えて発色を停止させた後、マイクロプレートリーダー（Abs. 450nm ）で測定した。

その結果、図4に示すように、緩衝液ベースではウサギ可溶性LR11の濃度依存的反応が認められたのに対し、ヒト血清ベースでは血清成分の影響により反応阻害を受け検出できなかった。

また、2)で液相の精製ウサギ可溶性LR11及びヒト可溶性LR11を検出することが確認できた抗体のいずれの組み合わせにおいても、同様に血清成分の影響により検出できなかったことから、特定の抗体の組み合わせの場合に限らず、血清成分の影響が認められた。

【0050】

5) 界面活性剤処理による血清成分の影響回避

マイクロプレート（NUNC社製）に、モノクローナル抗体M3をPBSで $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して1ウエルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で2時間固相化した。

PBSTで洗浄後、BSA-PBSTを1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間ブロッキングした。PBSTで洗浄後、これに、精製ウサギ可溶性LR11（Lot. 070601）が反応時50倍、100倍、200倍希釈になるよう添加（BlankはPBS）したヒト血清（ヒト血清濃度は反応時10倍希釈）を、Tween 20（登録商標）、Triton-X100（登録商標）、オクタノイル-N-メチルグルカミン（MEGA-8）、ノナノイル-N-メチルグルカミン（MEGA-9）、コール酸Na、及びn-オクチル- β -D-グルコピラノシドの各界面活性剤3.6%存在下で、1ウエルあたり $50 \mu\text{L}$ で室温（ $15^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ ）で2時間反応させた。

PBSTで洗浄後、ビオチン標識した抗ヒト可溶性LR11モノクローナル抗体R14をBSA-PBSTで希釈して $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした標準抗体液を、1ウエルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加して室温で4時間反応させた。これらをPBSTで洗浄後、BSA-PBSTで希釈して $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ としたペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（PIERCE社製）を、1ウエルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加して室温で2時間反応させた。

次いで、PBSTで洗浄後、TMB基質液を1ウエルあたり $50 \mu\text{L}$ 加え室温で30分間発色させた後、 1.5N 硫酸を1ウエルあたり $50 \mu\text{L}$ 加えて発色を停止させた。これを、マイクロプレートリーダー（Abs. 450nm ）で測定した。

その結果、図5の如く、界面活性剤Tween 20（登録商標）では血清成分の影響を回避できなかったが、Triton-X100（登録商標）、MEGA-8、MEGA-9、コール酸Na、n-オクチル- β -D-グルコピラノシドでは、血清成分の共存下においても、添加したウサギ可溶性LR11（Lot. 070601）の濃度依存的な反応が得られ、その効果は、特にMEGA-8及びMEGA-9で顕著であることが判る。尚、図5は試薬Blank値を差し引いたものである。

【0051】

（実施例2）

（MEGA-9濃度変動）

実施例1の5)と同様にして、精製ウサギ可溶性LR11（Lot. 070601）をPBSにて50倍、100倍に希釈したものをそれぞれ添加（BlankはPBS）したヒト血清（反応時8倍希釈）を、界面活性剤MEGA-9（0%、2.5%、5%、10%）存在下で反応させた。その結果（図6）、MEGA-9が2.5%～10%ではほぼ同等の反応が得られ、血清成分の影響を回避して可溶性LR11の測定が可能であることが判る。

【0052】

（実施例3）

実施例2の固相側モノクローナル抗体M3と液相側モノクローナル抗体R14の組み合

10

20

30

40

50

わせ以外のモノクローナル抗体の組み合わせについて、MEGA-9 (0%、2%、4%、5%、7.5%) の効果を確認した。尚、試料はヒト血清 (終濃度8倍希釈したもの) である。その結果 (図7~図11)、検討した何れの組み合わせにおいても、MEGA-9の添加により測定値の上昇が認められ、2%~7.5%でほぼ一定の値が得られたことから、特定の抗体の組合わせに限らず、界面活性剤の添加により血清成分の影響を受けることなく、可溶性LR11の測定が可能であることが判る。

【0053】

(実施例4)

(ヒト血清中可溶性LR11の測定)

精製したウサギ可溶性LR11 (Lot. 071120) 及び蛋白濃度既知の高純度ウシ血清アルブミンを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動して銀染色しこの染色像をデンストメトリーで解析して、精製したウサギ可溶性LR11 (Lot. 071120) のLR11濃度を算出したところ、 $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。この値付けした精製ウサギ可溶性LR11を標準物質として、下記の方法により測定したヒト血清中の濃度を算出した。

マイクロプレート (NUNC社製) に、モノクローナル抗体M3をPBSで $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温で2時間固相化した。PBSTで洗浄後、BSA-PBSTを1ウエルあたり $200 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間ブロッキングした。

PBSTで洗浄後、これに、3例のヒト血清をPBSで32倍、16倍、8倍、又は4倍にそれぞれ希釈したものを、5%MEGA-9存在下で、1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加して、室温 ($15^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$) で一晩反応させた。

その後、ビオチン標識したモノクローナル抗体R14をBSA-PBSTで希釈して $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした標準抗体液を、1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温で4時間反応させた。これらをPBSTで洗浄後、BSA-PBSTで希釈して $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ としたペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (PIERCE社製) を、1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。

次いで、PBSTで洗浄後、次いでTMB基質液を1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 加え室温で30分間発色させた後、 1.5N 硫酸を1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 加えて発色を停止させた。これを、マイクロプレートリーダー (Abs. 450nm) で測定した。

その結果 (図12)、MEGA-9で処理した場合は、3例の血清全てにおいて血清希釈濃度、すなわち血清中LR11濃度依存的な反応を示し、得られたLR11濃度換算値について、血清希釈32倍から8倍の範囲で良好な希釈直線性が認められた。

【0054】

(実施例5)

(ヒト以外の哺乳動物血清中可溶性LR11の測定)

実施例4の測定方法に準じて、ウサギ、サル、ヤギ、ブタの各血清をMEGA-9で処理した後、サンドイッチELISAで測定した。

その結果、いずれの場合もヒト血清と同様に良好な希釈直線性が認められた (図13A)。これに対し、MEGA-9で処理しなかった場合、サル、ヤギ、ブタの血清では殆ど吸光度増加が認められず、ウサギ血清では吸光度増加が認められるものの、MEGA-9で処理した場合に比べ著しく吸光度の増加割合が小さかった (図13B)。

【0055】

(実施例6)

(ヒト脳髄液中可溶性LR11の測定)

実施例4で使用した値付けした精製ウサギ可溶性LR11を標準物質として、下記の方法により、希釈したヒト脳髄液中の可溶性LR11濃度を算出した。

マイクロプレート (NUNC社製) にモノクローナル抗体M3をPBSで $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して、1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温で2時間固相化した。PBSTで洗浄後、10%シェークロースを含むBSA-PBSTを、1ウエルあたり $200 \mu\text{L}$ 添

加し、室温で1時間ブロッキングした。このブロッキング液を吸引除去後、プレートを乾燥させた。

これに、3例のヒト脳髄液をPBSで32倍、16倍、8倍、4倍、および2倍にそれぞれ希釈したものを、5%MEGA-9存在下で、1ウエルあたり100μL添加して、室温(15℃~25℃)で一晩反応させた。

その後、ビオチン標識したモノクローナル抗体R14をBSA-PBSTで希釈して0.4μg/mLとした標識抗体液を、1ウエルあたり100μL添加して室温で4時間反応させた。これらをPBSTで洗浄後、BSA-PBSTで希釈して0.2μg/mLとしたペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(PIERCE社製)を、1ウエルあたり100μL添加して室温で1時間反応させた。

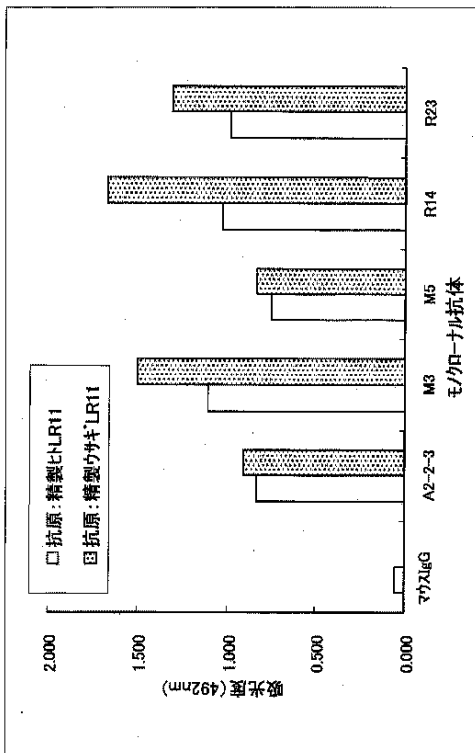
10

次いで、PBSTで洗浄後、TMB基質液を1ウエルあたり100μL加えて室温で30分間発色させた後、1.5N硫酸を1ウエルあたり100μL加えて発色を停止させた。これを、マイクロプレートリーダー(Abs.450nm)で測定した。

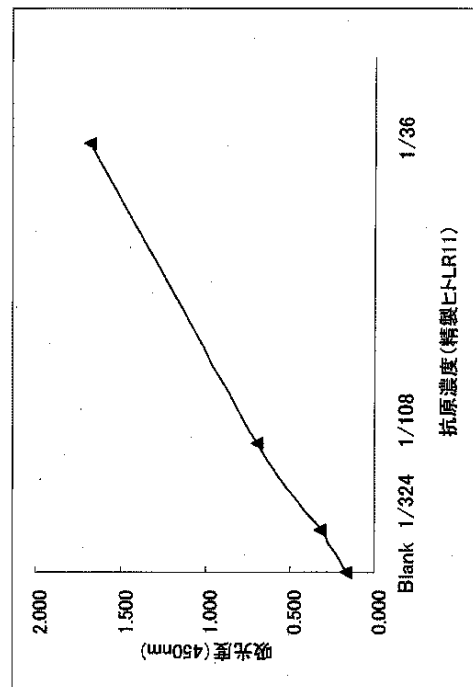
その結果、MEGA-9で処理した場合は、3例の脳髄液全てにおいて、脳髄液希釈濃度すなわち脳髄液中LR11濃度依存的な反応を示し、得られたLR11濃度換算値について、脳髄液希釈32倍から2倍の範囲で良好な希釈直線性が認められた(図14A)。

これに対し、MEGA-9で処理しなかった場合は、何れの脳髄液でも十分な吸光度増加は見られなかったため、LR11濃度換算値が著しく小さい値となり(図14B)、正確な測定ができていないと考えられた。

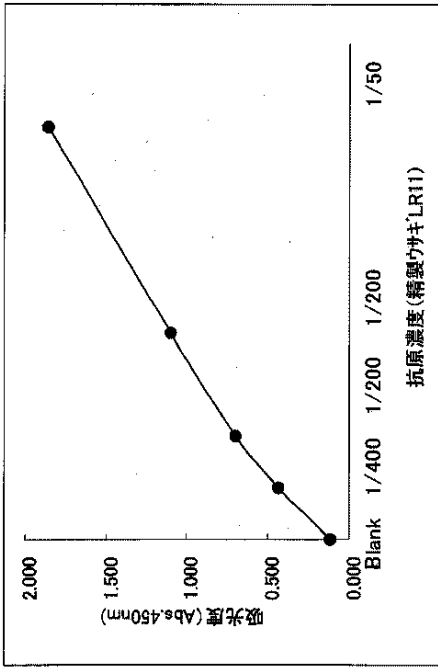
【図1】



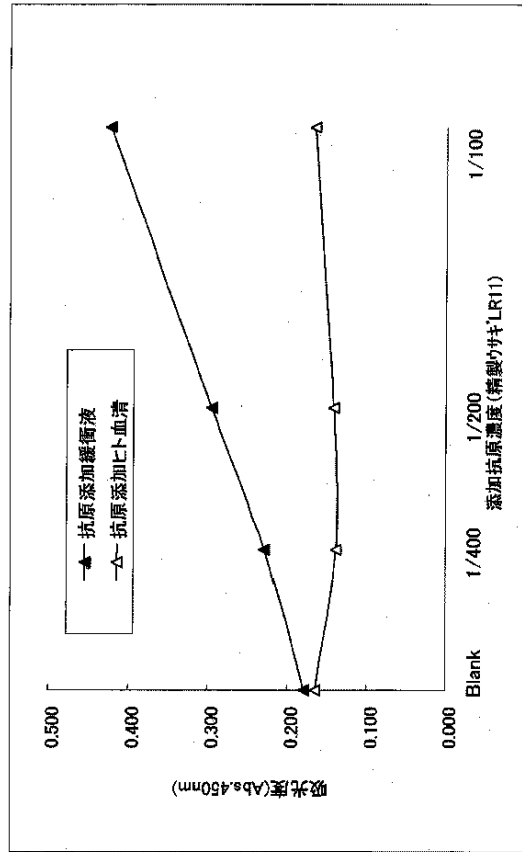
【図2】



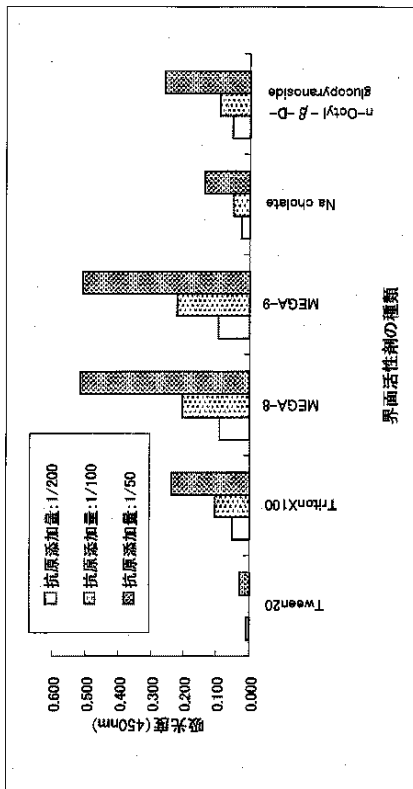
【図 3】



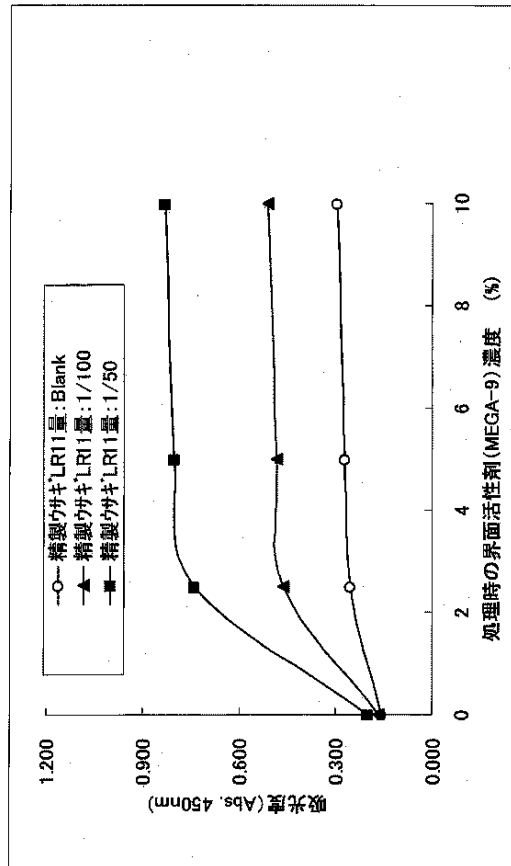
【図 4】



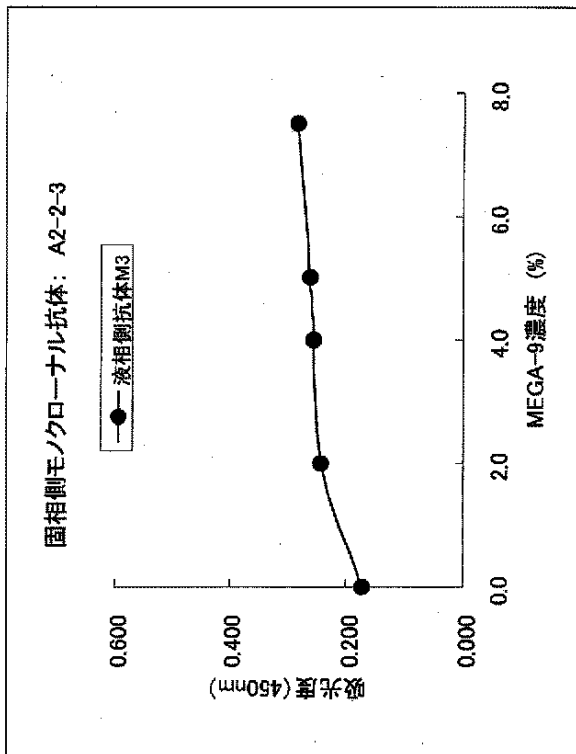
【図 5】



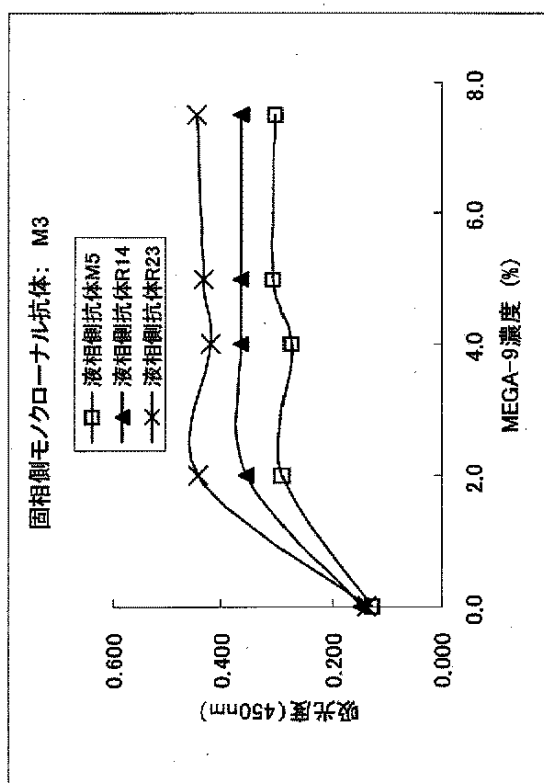
【図 6】



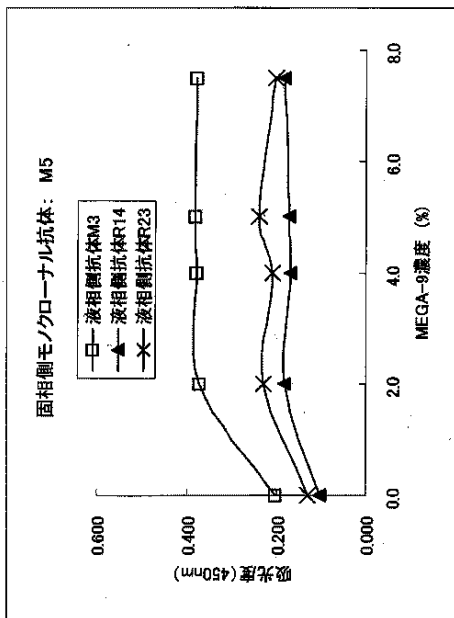
【図 7】



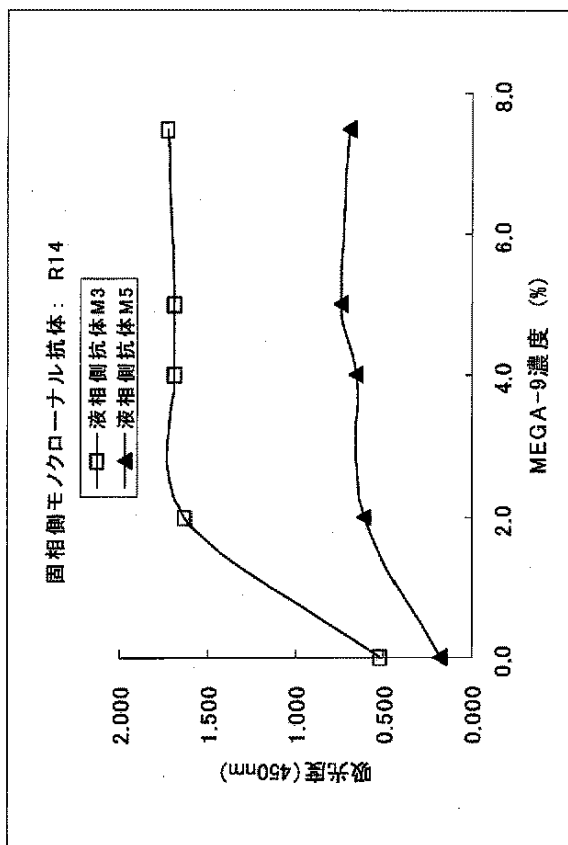
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2009116268000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年6月24日(2009.6.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物由来試料中の可溶性LR11の免疫学的定量方法であって、試料をポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる界面活性剤の1種以上で処理することを特徴とする可溶性LR11の免疫学的測定方法。

【請求項2】

試料が、血液、血漿、血清、髄液又は尿である請求項1記載の免疫学的定量方法。

【請求項3】

免疫学的定量方法が、少なくとも2種の異なる抗原認識部位を有する抗体を用いて免疫複合体を形成する工程を含むものである請求項1又は2記載の免疫学的定量方法。

【請求項4】

界面活性剤がアシル-N-メチルグルカミンである請求項1～3のいずれか1項記載の免疫学的定量方法。

【請求項5】

抗可溶性LR11抗体と、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルフェニルエーテル、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる1種以上の界面活性剤とを含むことを特徴とする可溶性LR11免疫学的測定用キット。

【手続補正書】

【提出日】平成21年10月26日(2009.10.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物由来の血液、血漿、血清又は髄液の試料中の可溶性LR11の免疫学的定量方法であって、試料をポリオキシエチレンC₈-C₂₄アルキルフェニルエーテル、C₈-C₂₄アルキルグリコシド、C₈-C₂₄アルカノイル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる界面活性剤で処理することを特徴とする可溶性LR11の免疫学的測定方法。

【請求項2】

免疫学的定量方法が、少なくとも2種の異なる抗原認識部位を有する抗体を用いて免疫複合体を形成する工程を含むものである請求項1記載の免疫学的定量方法。

【請求項3】

界面活性剤が、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、n-オクチル-β-D-グルコシド、オクタノイル-N-メチルグルカミン、ノナノイル-N-メチルグルカミン、及びコール酸ナトリウムから選ばれるものである請求項1又は2項記載の免

疫学的定量方法。

【請求項4】

抗可溶性LR11抗体と、ポリオキシエチレン C_8-C_{24} アルキルフェニルエーテル、 C_8-C_{24} アルキルグリコシド、 C_8-C_{24} アルカノイル-N-メチルグルカミン、及びコール酸塩から選ばれる界面活性剤とを含むことを特徴とする哺乳動物由来の血液、血漿、血清又は髄液を試料とする可溶性LR11免疫学的測定用キット。

【請求項5】

界面活性剤が、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、n-オクチル- β -D-グルコシド、オクタノイル-N-メチルグルカミン、ノナノイル-N-メチルグルカミン、及びコール酸ナトリウムから選ばれるものである請求項4項記載の可溶性LR11免疫学的測定用キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/001176
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/02, G01N33/48, G01N33/531		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAplus (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANJUAN ZHU, et al., LR11, an LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration., Circulat.Res., 2004, Vol.94, No.6, P.752-758	1-6
A	KENJI OHWAKI, et al., A secreted soluble form of LR11, specifically expressed in intimal smooth muscle cells, accelerates formation of lipid-laden macrophages, Arter.Thromb.Vasc. Biol., 2007.05.16, Vol.27, No.5, P.1050-1056	1-6
P,X	Masanao MATSUO et al., "Kayosei LR11 no ELISA ni yoru Sokuteikei no Kaihatsu", Dai 40 Kai Japan Atherosclerosis Society Sokai Gakujutsu Shukai Program Shorokushu, 27 June, 2008 (27.06.08), page 239	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April, 2009 (24.04.09)		Date of mailing of the international search report 12 May, 2009 (12.05.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001176

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 2008/155891 A1 (Sekisui Medical Co., Ltd.), 24 December, 2008 (24.12.08), Par. No. [0018] (Family: none)	1-6

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 1 1 7 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/02, G01N33/48, G01N33/531			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAplus(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	YANJUAN ZHU, et al., LR11, an LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration., Circulat. Res., 2004, Vol.94, No.6, P.752-758	1-6	
A	KENJI OHWAKI, et al., A secreted soluble form of LR11, specifically expressed in intimal smooth muscle cells, accelerates formation of lipid-laden macrophages, Arter. Thromb. Vasc. Biol., 2007.05.16, Vol.27, No.5, P.1050-1056	1-6	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日に後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 24.04.2009		国際調査報告の発送日 12.05.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子	2 J 3906
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2009/001176

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	松尾正直 他, 可溶性LR11のELISAによる測定系の開発, 第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会プログラム・抄録集, 2008.06.27, P.239	1-6
P, A	WO 2008/155891 A1 (積水メディカル株式会社) 2008.12.24, 【0018】 (ファミリーなし)	1-6

フロントページの続き

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

(72)発明者 松尾 正直

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72)発明者 海老沼 宏幸

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72)発明者 深町 勇

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72)発明者 武城 英明

千葉県千葉市中央区青葉町1-2-4-2-9

(72)発明者 齋藤 康

千葉県千葉市中央区葛城2-4-2-2

Fターム(参考) 2G045 AA13 BA01 BB29 DA36 FB03

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

专利名称(译)	可溶性LR11的测定方法		
公开(公告)号	JPWO2009116268A1	公开(公告)日	2011-07-21
申请号	JP2009524244	申请日	2009-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	松尾正直 海老沼宏幸 深町勇 武城英明 齋藤康		
发明人	松尾 正直 海老沼 宏幸 深町 勇 武城 英明 齋藤 康		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/531		
CPC分类号	G01N1/34 C07K16/28 G01N33/92		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/48.A G01N33/48.B G01N33/531.B		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BA01 2G045/BB29 2G045/DA36 2G045/FB03		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008073047 2008-03-21 JP		
其他公开文献	JP4459299B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种通过简单且准确的免疫学方法而无需任何复杂的分离操作即可定量来自诸如血清的生物样品的生物样品中的可溶性LR11的方法。一种用于免疫定量哺乳动物来源样品中可溶性LR11的方法，该方法包括聚氧化烯烷基醚，聚氧化烯烷基苯基醚，烷基糖苷，烷基硫代糖苷，酰基-N-甲基葡萄糖酰胺和胆酸。可溶性LR11的免疫学测定方法，包括用一种或多种选自盐的表面活性剂处理。

		液相侧抗体					
		マウスIgG	A2-2-3	M3	M5	R14	R23
固相侧抗体	マウスIgG	-0.003	0.015	0.024	0.007	-0.017	-0.020
	A2-2-3	0.003	0.110	0.432	0.449	0.693	0.690
	M3	0.001	1.075	0.029	1.017	2.061	1.915
	M5	-0.001	0.150	0.158	0.079	0.308	0.309
	R14	-0.004	1.130	0.861	0.870	-0.012	0.422
	R23	-0.002	0.878	1.264	1.165	-0.005	0.007

吸光度(492nm)