

(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2016-65795

(P2016-65795A)

(43) 公開日 平成28年4月28日(2016.4.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577	B

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2014-194707 (P2014-194707)	(71) 出願人	000006770
(22) 出願日	平成26年9月25日 (2014. 9. 25)		ヤマサ醤油株式会社
			千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
		(72) 発明者	村田 誠
			千葉県銚子市新生町2-10-1 ヤマサ
			醤油株式会社内

(54) 【発明の名称】 非特異的反応阻害剤、それを用いた免疫学的測定法

(57) 【要約】

【課題】 非特異的反応阻害剤を提供する。

【解決手段】 有効成分として抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) を含有する非特異的反応阻害剤、反応液中に抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) を共存させることを特徴とする免疫学的測定法を提供する。

本発明の阻害剤を用いることで、以下の効果を奏し、本発明は産業上有益な発明である。

(1) H B R で抑制できなかった異好性抗体による非特異反応を抑制できるものである。

(2) H B R よりも少量の添加で異好性抗体による非特異反応を抑制できるものである。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

反応液中に抗ヒトリウマチ因子（I g M 型）マウスモノクローナル抗体（I g G 型）を共存させることを特徴とする免疫学的測定法。

【請求項 2】

有効成分として抗ヒトリウマチ因子（I g M 型）マウスモノクローナル抗体（I g G 型）を含有する非特異的反応阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非特異的反応阻害剤及びそれを用いた免疫学的測定法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

免疫学的測定方法としては、免疫比濁法、ラテックス免疫比濁法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ラジオイムノアッセイ法、イムノクロマトグラフィー法等が挙げられる。

【0003】

このような免疫学的測定法において、本来の目的とする特異的な抗原抗体反応以外の非特異的な反応により偽陽性や偽陰性を引き起こすものが存在し、測定結果に大きな影響を与えている。これら免疫学的測定法における非特異反応における原因として、異好性抗体やリウマチ因子などが知られている。異好性抗体とは他種属抗体に結合する血清中の抗体と定義され、代表的なものにヒト抗マウス抗体（Human Anti-Mouse Antibody；HAMA）がある。リウマチ因子はI g GのFc領域を認識するI g Mクラスの抗体であり、リウマチの患者だけでなく自己免疫疾患の患者、さらには健常人の血液にも認められる。

【0004】

これらは免疫測定法において、測定に使用する抗体に非特異に反応することにより測定値の信頼性が損なわれてしまうことがしばしば認められ、測定に使用する抗体とHAMAとの非特異反応を防止できなければ、不正確な測定結果により、診断ミス等の重大な問題を生じる可能性がある。したがって免疫学的測定法において常に注意すべきこととして、偽陽性、偽陰性の原因の1つである検体に共存するリウマチ因子やHAMAなどに起因する非特異的反応の影響を阻止又は緩和させることが肝要である。

【0005】

これまでにこの非特異反応を抑制するために種々の方法が提供されている。抗体分子のFc部分を酵素反応で取り除いたF（ab'）₂分子を用いる免疫測定法が提案されている（特許文献1）。また、動物血清中から分離したI g Gクラスの抗体やI g Gクラスのマウスモノクローナル抗体又はマウス血清を免疫反作用緩衝液に共存させる方法が知られている（特許文献2）。さらに、I g Gだけでなく、抗リウマチ因子抗体、I g Mクラスの抗体を共存させることも報告されている（特許文献3、4、5）。さらにまた、I g Gなどの代わりにγ-グロブリンを添加して非特異反応を抑制する方法が開示されている（特許文献6）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開昭54-119292

【特許文献2】特開2006-38823

【特許文献3】特開2011-27751

【特許文献4】特開平9-68531

【特許文献5】特開平7-12818

【特許文献6】特開平9-49840

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

しかしながら、上記の方法はいずれも比較的效果を有するものの、必ずしも十分とは言えず、それ以外の方法の開発が切望されていた。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

そこで本発明者は、鋭意検討を重ねた結果、抗ヒトリウマチ因子（I g M型）マウスモノクローナル抗体（I g G型）が、異好性抗体の影響を阻止又は緩和させるための異好性阻止試薬として有名なHBR（SCANTIBODIES LABORATORY社製）より有効であることを見出し、本発明を完成させた。したがって、本発明は以下のとおりである。

【0009】

（1）反応液中に抗ヒトリウマチ因子（I g M型）マウスモノクローナル抗体（I g G型）を共存させることを特徴とする免疫学的測定法。

（2）有効成分として抗ヒトリウマチ因子（I g M型）マウスモノクローナル抗体（I g G型）を含有する非特異的反応阻害剤。

【発明の効果】**【0010】**

本発明は、反応液中に抗ヒトリウマチ因子（I g M型）マウスモノクローナル抗体（I g G型）を共存させることを特徴としており、これにより、従来法または異好性阻止試薬HBR（SCANTIBODIES LABORATORY社製）と比較し、以下の効果を奏することから、産業上きわめて有益である。

（1）HBRで抑制できなかった異好性抗体による非特異反応を抑制できるものである。

（2）HBRよりも少量の添加で異好性抗体による非特異反応を抑制できるものである。

【発明を実施するための形態】**【0011】**

本願発明は、上述したように、有効成分として抗ヒトリウマチ因子（I g M型）マウスモノクローナル抗体（I g G型）を含有する非特異的反応阻害剤、および当該反応阻害剤を用いた免疫学的測定法に関するものである。

【0012】

「抗ヒトリウマチ因子（I g M型）マウスモノクローナル抗体（I g G型）」とは、ヒト由来のI g M型リウマチ因子を抗原として公知の方法で作成されたI g G型のマウスモノクローナル抗体を意味する。

【0013】

ヒト由来のI g M型リウマチ因子は、すでに市販されており、当該市販品を利用することができる。また、遺伝子組換え手法を用いて調製した組換え品であっても利用可能である。

【0014】

このような抗原を用いたマウスモノクローナル抗体の調製は、公知の方法で行うことができる。すなわち、抗原を投与する動物としてはマウスを使用し、完全フロインドアジュバンド、不完全フロインドアジュバンド、ミョウバンアジュバンド、水酸化アルミニウムアジュバンド、百日咳菌アジュバンドなどの各種アジュバンドと上述の抗原とのエマルジョンを調製し、これをマウスの静脈内、腹腔内、皮下または皮内に投与すればよい。投与量は、0.001～1mg/匹程度が好適である。初回投与後、1～4週間おきに1～5回程度の上記と同様の追加免疫を行うことにより、マウス体内でヒトI g M型リウマチ因子に対する抗体産生を誘導する。

【0015】

次に、抗体産生を誘導した動物から脾細胞、リンパ節細胞、末梢血リンパ球などの抗体産生細胞を常法により取得する。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、マウスに由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては

10

20

30

40

50

、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。通常、8 - アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株はヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) を欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (HAT) 培地に生育できない。また細胞の性質として免疫グロブリンを分泌しない、いわゆる非分泌型の細胞株であることが好ましい。

【0016】

このようなミエローマ細胞株の具体例としては、P3x63Ag8 (ATCC TIB-9) (Nature, 256, 495-497 (1975))、P3x63Ag8U.1 (P3U1) (ATCC CRL-1597) (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978))、P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) (J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979))、P2/NSI/1-Ag4-1 (ATCC TIB-18) (European J. Immunology, 6, 511-519 (1976))、Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581) (Nature, 276, 269-270 (1978))などのマウスミエローマ細胞株を例示することができる。

10

【0017】

細胞融合にあたっては、抗体産生細胞に適合したミエローマ細胞を選定する。細胞融合では、イーグルの最少必須培地 (MEM)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で $10^6 \sim 10^8$ 細胞/mlのミエローマ細胞と抗体産生細胞を混合比1:4~1:10に混合し、37℃で1~10分間細胞同士を接触させることにより効率よく融合を行うことができる。細胞融合を促進させるため、平均分子量1,000~6,000のポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニールアルコール、センダイウィルスなどの融合促進剤を使用することができる。また、電気パルスを利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合させることもできる。

20

【0018】

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する手段としては、選択的培地における細胞の選択的増殖を利用する方法を用いることができる。たとえば、細胞懸濁液を15%ウシ胎児血清 (FCS) 含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロプレート上に $10^3 \sim 10^6$ 細胞/ウェル程度まき、各ウェルに選択培地 (たとえば、HAT培地など) を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。ミエローマ細胞として8 - アザグアニン耐性株、選択培地としてHAT培地を用いた場合は、未融合のミエローマ細胞は培養10日目ぐらいまでに死滅し、正常細胞である抗体産生細胞もインビトロ (in vitro) では長期間生育できないので、培養10~14日目から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

30

【0019】

ヒトIgM型リウマチ因子を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの検索は、酵素免疫測定法 (EIA、ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) などによって行うことができる。たとえば、ヒトIgM型リウマチ因子を吸着させた96ウェルELISA用マイクロプレートにモノクローナル抗体を含む培養上清を添加してヒトIgM型リウマチ因子と反応させ、次いで結合した特異抗体に酵素標識抗免疫グロブリン抗体を反応させるか、あるいはビオチン標識抗免疫グロブリン抗体を反応させたのちアビジンD-酵素標識体を反応させ、次いでいずれの場合とも各ウェルに酵素基質を加えて発色させる。ヒトIgM型リウマチ因子を固定化したウェルのみで発色する培養上清を選別することにより、ヒトIgM型リウマチ因子と特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを検索することができる。

40

【0020】

50

ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法などにより行うことができる。

【0021】

このようにして取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を産生する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法などが採用されうる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10～15% FCS含有RPM1-1640培地、無血清培地などの動物細胞培養用培地中で通常の方法で培養し、その培養上清液から抗体を取得することができる。腹水から回収する方法では、ハイブリドーマと腫瘍組織適合性が一致する動物に、プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔内に投与した後、たとえばマウスの場合にはハイブリドーマを約 10^6 細胞/匹腹腔内投与する。ハイブリドーマは10～18日ほどで腹水腫瘍を形成し、血清および腹水中に高濃度に抗体を生産する。

10

【0022】

抗体の精製が必要とされる場合には、硫酸塩析法、DEAEセルロースなどの陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインA-セファロースなどを用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択し、組み合わせることにより精製することができる。

【0023】

得られたモノクローナル抗体のクラスは、公知の方法で決定し、IgG型のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのみを選別し、得られたIgG型のモノクローナル抗体を本発明の阻害剤の有効成分として使用する。なお、有効成分の抗体は、未処理の抗体であって良く、また(Fab')₂、Fabなどの抗体処理物(抗体断片)であってもかまわない。

20

【0024】

次に、本願発明の非特異的反応阻害剤を利用した免疫学的測定は、反応液中に抗ヒトリウマチ因子(IgM型)マウスモノクローナル抗体(IgG型)を共存させることを特徴としており、それ以外の項目に関しては、抗体を利用する測定法であれば、測定原理、条件等は制限されない。たとえば、反応様式による分類として、競合反応法と非競合反応法(イムノメトリックアッセイ)が知られており、本発明においてはいずれの方法も採用できる。検出方法による分類として、抗原抗体反応の結果を直接検出する非標識法(ネフェロメトリーなど)と、なんらかのマーカ-を使用して検出する標識法が知られているが、本発明ではいずれの方法によってもよい。BF分離を行う必要のあるヘテロジニアス法と必要のないホモジニアス法が知られており、本発明にはいずれの方法を適用してもよい。反応相による分類として、全反応が液相で行われる液相法と免疫反応の相手を固相化して反応を行う固相法が知られているが、本発明においてはいずれの方法も採用できる。

30

【0025】

これら、公知の一般法の中から、本発明の測定法の目的に適合する方法を適宜選択すればよい。なお、一般的方法の詳細についてはたとえば以下の文献に記載されている。

【0026】

- ・入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」((株)講談社、昭和54年5月1日発行)
- ・石川英治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)((株)医学書院、1982年12月15日発行)
- ・臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ-技術と応用」(臨床病理刊行会、1983年発行)
- ・「バイオテクノロジー事典」((株)シーエムシー、1986年10月9日発行)
- ・「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 70」(Immunochemical techniques (Part A))
- ・「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 73」(Immunochemical techniques (Part B))

40

50

- ・「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 74」
(Immunochemical techniques (Part C))
- ・「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 84」
(Immunochemical techniques (Part D: Selected Immunoassay))
- ・「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 92」
(Immunochemical techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))

【0027】

10

反応系に共存させる非特異的反応阻害剤の有効成分である抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) の濃度としては、0.1 ~ 500 μ g / mL、好ましくは1 ~ 200 μ g / mLから適宜選定することが可能である。

【0028】

なお、免疫学的測定時、反応液中に抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) を共存させずに、免疫学的測定に先立ち、反応に供するサンプルを本発明の非特異的反応阻害剤で前処理する方法であっても、本発明の測定法では利用可能である。

【実施例】

【0029】

20

以下、実施例、試験例により本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。

抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) の調製

精製ヒトリウマチ因子 - I g M型を、フロインド完全アジュバンドと共に、BALB / cマウスに2 ~ 3週間おきに3回腹腔内に投与した。3回免疫後、10 μ gをマウスに静脈投与し、最終免疫を行った。最終免疫から3日後にマウスの脾臓を摘出し、この脾臓細胞とマウス骨髓腫細胞Sp2 / 0 - Ag14 (Sp2) とをケラーとミルシュタインの方法に従って細胞融合した。すなわち、脾臓細胞と骨髓腫を10 : 1で混合後、遠心分離して得たペレットに50%ポリエチレングリコール含有RPMI 1640溶液1 mLを徐々に加えて細胞を融合した。さらにこれにRPMI 1640培地を加えて10 mLとし、遠心分離して得たペレットを10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有RPMI 1640培地にSp2として 3×10^4 個 / 100 μ lとなるように懸濁させ、96ウェルマイクロタイタープレート10枚に各ウェル100 μ lずつ分注した。

30

【0030】

1日後、HAT培地を100 μ l添加し、その3 ~ 4日おきに培地の半分量を新しいHAT培地で交換した。融合後7日目に培養上清をサンプリングし、上記ELISA法のマウス血清の代わりに培養上清を用いてスクリーニングを行った。抗ヒトリウマチ因子 - I g M型マウスモノクローナルI g G抗体に対する抗体陽性ウェルを検索し、限界希釈法によりクローニングを行い、抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) を産生するハイブリドーマ23株 (代表的なものとして「9D3」と「3A3」を例示できる) を樹立した。

40

【0031】

次に、上記ハイブリドーマから分泌されるモノクローナル抗体を常法により精製し、これを用いてリウマチ検体とHAM A検体の各試料における非特異反応の有無を以下の2つの試験により確認した。

【0032】

(2) オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCT) 測定試薬を用いたEIA法における検証

検体希釈液に本発明の抗ヒトリウマチ因子 (I g M型) マウスモノクローナル抗体 (I g G型) を25 μ g / mLの濃度になるように添加し、コントロールとして市販の異好性

50

阻止試薬 HBR を同様に 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように添加し、試験に供した。

【0033】

すなわち、酵素標識抗体液 50 μL を抗体固相プレートの所定のウェルに分注し、続けて本発明の抗ヒトリウマチ因子 (IgM 型) マウスモノクローナル抗体 (IgG 型) (9D3 および 3A3)、または市販の HBR を添加した希釈液で希釈した検体 50 μL を抗体固相プレートの各ウェルに分注した後、2 時間静置後洗浄し、TMBZ で発色を行い、450 nm の吸光度の測定を行った。また、標準液の吸光度から検量線を作成し、検体の吸光度から濃度を算出した。

【0034】

(血清中 OCT 測定における非特異反応抑制剤の効果)

その結果、下記表 1 に示すように、非特異反応の抑制効果は検体によって異なるが、本発明の抗ヒトリウマチ因子 (IgM 型) マウスモノクローナル抗体 (IgG 型) を用いた場合、市販の HBR と比較して、リウマチ因子保有検体や HAMA 保有検体による非特異反応を有意に抑制できることが明らかになった。

【0035】

【表 1】

	OCT濃度 (ng/mL)			
	添加なし	対照試薬	本発明試薬	
		HBR	9D3	3A3
リウマチ検体 1	222.7	214.2	207.5	208.9
リウマチ検体 2	164.9	29.7	27.9	27.3
リウマチ検体 3	50.5	49.6	44.5	44.9
リウマチ検体 4	155.6	143.6	135.7	141.2
リウマチ検体 5	92.4	20.3	18.6	19.0
HAMA 検体	360.0	222.8	203.9	213.6
健常人 1	22.8	18.4	21.0	23.7
健常人 2	26.0	27.2	27.2	25.4

【0036】

(3) インスリン測定用ラテックス試薬を用いた凝集法における検証

ラテックスインスリンキット「ヤマサ」を使用し、本発明の抗ヒトリウマチ因子 (IgM 型) マウスモノクローナル抗体 (IgG 型) (9D3 および 3A3) または市販の HBR との性能を比較した。

すなわち、キットの第一試薬に本発明の抗ヒトリウマチ因子 (IgM 型) マウスモノクローナル抗体 (IgG 型) または市販の HBR を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように添加したものを使用した。

【0037】

まず、第一試薬と検体を混合後、5 分後に抗ヒトインスリン抗体を感作したラテックス粒子を含有するラテックス液 100 μL を混合物に加え、37 で反応させ、0.5 ~ 2 分後にかけて全自動分析装置日立 TBA-120FR を用いて波長 660 nm での吸光度を測定し、各測定点の間の吸光度変化量を求めた。インスリンの濃度を定量するため、インスリン既知濃度の標準物質を測定して得られた検量線をもとに検体中のインスリン濃度を算出した。

【0038】

(血清中インスリン測定における非特異反応抑制剤の効果)

その結果、下記表 2 に示すように、非特異反応の抑制効果は検体によって異なるが、本発明の抗ヒトリウマチ因子 (I g M 型) マウスモノクローナル抗体 (I g G 型) を用いた場合、市販の H B R と比較し、リウマチ因子保有検体や H A M A 保有検体による非特異反応を有意に抑制できることが明らかになった。

【 0 0 3 9 】

【表 2】

	インスリン濃度 (μ U/mL)			
	添加なし	対照試薬	本発明試薬	
		HBR	9D3	3A3
リウマチ検体 A	21.0	21.4	14.9	17.8
リウマチ検体 B	18.1	19.0	14.1	15.3
HAMA検体 A	7.4	7.2	8.3	7.0
HAMA検体 B	8.1	12.7	8.6	5.0
健常人 A	7.3	6.5	6.2	6.0
健常人 B	14.5	13.3	13.2	11.8
健常人 C	12.3	10.9	11.1	10.8

10

20

【産業上の利用可能性】

【 0 0 4 0 】

本願発明により、免疫測定法において非特異反応を抑制できるため、リウマチ因子や異好性抗体を含む試料についても該非特異因子により生じる非特異反応を抑制して、測定対象を正確に測定することができ、測定精度が向上し、より信頼性の高い臨床検査が可能となる。

专利名称(译)	非特异性反应抑制剂，使用它的免疫学测定方法		
公开(公告)号	JP2016065795A	公开(公告)日	2016-04-28
申请号	JP2014194707	申请日	2014-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	山佐株式会社		
申请(专利权)人(译)	山佐公司		
[标]发明人	村田 誠		
发明人	村田 誠		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/577.B		
其他公开文献	JP6005705B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 要解决的问题：提供一种非特异性反应抑制剂。 解决方案：一种非特异性反应抑制剂，在反应溶液中包含抗人类风湿因子（IgM型）小鼠单克隆抗体（IgG型）作为有效成分，抗人类风湿因子（IgM型）小鼠单克隆抗体（IgG型）。 本发明提供了一种免疫学测定方法，其特征在于通过使用本发明的抑制剂，表现出以下效果，并且本发明是工业上有益的发明。（1）可以抑制由于HBR不能抑制的异源抗体引起的非特异性反应。（2）通过添加比HBR少的量，可以抑制由于嗜异性抗体引起的非特异性反应。 [选择图]无	(21) 出願番号	特願2014-194707 (P2014-194707)	(71) 出願人	000006770
	(22) 出願日	平成26年9月25日 (2014.9.25)	(72) 発明者	ヤマサ醤油株式会社 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 村田 誠 千葉県銚子市新生町2-10-1 ヤマサ 醤油株式会社内