

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/064435

発行日 平成24年5月10日 (2012.5.10)

(43) 国際公開日 平成22年6月10日 (2010.6.10)

(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	D
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577	B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

出願番号	特願2010-541240 (P2010-541240)	(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/JP2009/006590	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(22) 国際出願日	平成21年12月3日 (2009.12.3)	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(31) 優先権主張番号	特願2008-309369 (P2008-309369)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(32) 優先日	平成20年12月4日 (2008.12.4)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(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】 ヒト体液中のシスタチンC測定方法

(57) 【要約】

特異性の低いポリクローナル抗体や、特異性は高いものの凝集性の弱いモノクローナル抗体が大量に用いられていた従来の測定方法に対して、特異性が高く、低コストで自動化が容易なヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法を提供する。

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それと認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を組合わせた粒子増強免疫測定方法であって、それぞれの抗体感作粒子重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナルの結合量が、5重量%未満であるヒト体液中のシスタチンC特異的測定方法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を用いた粒子増強免疫測定方法であって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が、5重量%未満であるヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項 2】

不溶性担体粒子の平均粒子径が0.1~0.4 μmである請求項1記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項 3】

抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体が機能部位を含む抗体断片あるいは組換え型抗体である請求項1又は2記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項 4】

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数(k_d値)が1 nM未満で、該解離定数で相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数を除した比が2以上である請求項1記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項 5】

ヒト体液が血清、血漿、滑液、乳、唾液、脳脊髄液、精漿、羊水、尿又は涙液である請求項1~4のいずれか1項記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項 6】

高親和性のヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子であって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が5重量%未満である抗体感作粒子を含有する、ヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定試薬。

【請求項 7】

不溶性担体粒子の平均粒子径が0.1~0.4 μmである請求項6記載の測定試薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法及び粒子増強免疫測定試薬に関する。

【背景技術】**【0002】**

シスタチンCは、分子量13 kDaの塩基性低分子タンパク質(等電点pH9.3)で、全身の有核細胞で絶えず産生され、環境変化の影響を受けずに一定量が細胞外に分泌される。このため、血中濃度が一定となり他の疾患による炎症などの影響や年齢、性別、運動、食事などの影響を受けない。また、シスタチンCは、他の血漿タンパク質と複合体を形成せず、腎糸球体で濾過されて近位尿細管で再吸収されるため、糸球体濾過率(GFR)が低下すると、血中濃度が上昇することが知られており、クレアチニンに代わるGFRを表す指標として注目されている。また、腎機能検査において、早期腎症の診断指標となるため、外来や健康診断などの領域でも広く有用である。

【0003】

シスタチンCの測定方法としては、自動化されたヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法が報告されている(非特許文献1~3、特許文献1)。例えば、非特許文献1記載の方法では、凝集力が強い抗シスタチンCポリクローナル抗体を担体粒子に5%の重量比で結合させて利用しているが、非特許文献4に示されるように、シスタチンCには構造が類似したシスタチンファミリー群が存在し、各種のヒト体液によって局在が異なるため、特異性の低いポリクローナル抗体では、ヒト体液の種類(例えば、唾液や涙液)によっては

10

20

30

40

50

正確なシスタチンCの測定値が得られない可能性が極めて高い。一方、特許文献1においては、一般的にはポリクローナル抗体を用いた方が免疫凝集体を形成しやすい旨記載されている(20頁21-27行目)。また、特異性が高い抗シスタチンCモノクローナル抗体の利用が示唆されているものの、シスタチンCのような単量体で低分子量の蛋白質を測定対象とする場合は、多くの異なるモノクローナル抗体のカクテルを利用することで良い結果が得られる旨記載されており(21頁5-10行目)、実質的にはポリクローナル抗体が利用されているに等しい。さらに、性能を向上させるためには抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量が5重量%超~35重量%と著しく大量の抗体を結合させる必要があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2007/102054号パンフレット

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 40, No. 10, (1994), 1921-1926

【非特許文献2】KIDNEY INTERNATIONAL, Vol. 47, (1995), 312-318

【非特許文献3】CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 43, No. 6, (1997), 1016-1022

【非特許文献4】METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 224, (1994), 685-700

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法で汎用されるポリクローナル抗体は、特異性が低く、試料の種類によってシスタチンC特異的な測定ができないという課題が存在していた。その対策としてモノクローナル抗体の利用が考案されたが、凝集力が弱いため、不溶性担体粒子に多種類のモノクローナル抗体からなるカクテルを大量に結合させる必要があり、膨大な手間とコストを要するといった新たな課題が発生していた。それ故、これまでモノクローナル抗体のみからなるヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法は実用化されていなかった。さらに、従来ヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法では、実用的な性能を得るためには抗体感作粒子の総重量に対する結合量が5重量%超~35重量%という大量の抗体が必要であった。

従って、本発明は、特異性が高く、低コストで自動化が容易なヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、従来、シスタチンCの測定には不向きと考えられていたモノクローナル抗体においても、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、抗体感作粒子の総重量に対して5重量%未満の結合量割合で、それぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を組み合わせれば、シスタチンC特異的な粒子増強免疫測定が可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち本発明は、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を組合わせた粒子増強免疫測定方法であって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が5重量%未満であるヒト体液中のシスタチンC測定方法を提供するものである。

また、本発明は、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子の組合せであって、それぞれの抗体感作粒子の

10

20

30

40

50

総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が5重量%未満である抗体感作粒子を含有する、ヒト体液中のシスタチンC特異的な粒子増強免疫測定試薬を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、従来よりも特異性が高く、低コストで自動分析装置への適応が容易なヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法及び試薬を提供することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a、b、dをそれぞれ粒子径0.13μm、0.30μmのラテックス粒子に結合した抗体感作ラテックス粒子を、a-b、a-d、b-dと同一粒子径同士を組み合わせ、シスタチンCを測定した際の粒子増強免疫凝集に伴う感度を示したシスタチンC濃度-感度曲線である。

【図2】ELISA法で確認した抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体及び、対照とした抗ヒトシスタチンCポリクローナル抗体の特異性を示すグラフである。

【図3】本発明試薬と対照試薬のシスタチンC測定相関図(サンプル数N=50)である。

【図4】本発明試薬と対照試薬の検出限界濃度を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明で使用する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体は2種以上であり、ヒトシスタチンCと特異的に反応し、高親和性のモノクローナル抗体及び、認識部位が異なり相対的に親和力の弱いモノクローナル抗体、各1種以上を含む。尚、前記抗体には、機能部位を含む抗体断片(すなわち、ヒトシスタチンC認識部位であるFabを含む抗体断片)や、組換え型抗体(すなわち、Fab以外の構造を組換えた抗体)も含む。

前記の高親和性のモノクローナル抗体を獲得する方法は、特に限定されないが、免疫部位や融合細胞の選択、免疫するヒトシスタチンCの増量、免疫期間の延長などが高親和性の抗体を得るのに効果的である。ここでヒトシスタチンCと特異的に反応するとは、ヒトシスタチンCとは抗原抗体反応を起こすが、その他のシスタチンファミリー(例えばヒトシスタチンA、シスタチンB、シスタチンD、シスタチンE/M、シスタチンF、シスタチンS、シスタチンSA、キニノーゲンなど)とは実質的に抗原抗体反応を起こさないことをいう。

【0012】

本発明で使用する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体のうち、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体は、例えば「商品名:ピアコア(BIACORE(登録商標))GEヘルスケア社製」装置における力価測定による算出で解離定数(kd値)が1nM未満、好ましくは0.5nM以下である。尚、ピアコア装置による解析では、一般的な親和力のモノクローナル抗体の解離定数は1nM以上である。解離定数の確認方法としては、当該分野で公知の通常使用される方法であれば特に限定されないが、測定原理や測定条件によって若干、解離定数が変動する可能性がある。

このような高親和性モノクローナル抗体の例としては、後記実施例に示す、ハイブリドーマ75202(FERM BP-11186)が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。

【0013】

本発明においては、前記の高親和性モノクローナル抗体を少なくとも1種使用すれば、他の相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体は、一般的な親和力であってもよい。そのような組合せの中でも、高親和性モノクローナル抗体の解離定数で、他の相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数を除した比が2以上のものが好ましい。このようなモノクローナル抗体は常法に従って製造すること

10

20

30

40

50

ができる。なお、親和力（解離定数の相対比）に2倍以上の差があれば、解離定数が1 n M未満の高親和性モノクローナル抗体同士を組合わせて使用することもできる。

【0014】

また、本発明で使用する2種以上のモノクローナル抗体は、それぞれのモノクローナル抗体がヒトシスタチンCの異なる部位を認識するモノクローナル抗体の組合せである。当該認識部位が異なることは、例えばサンドイッチELISA法などによって確認できる。

【0015】

本発明の粒子増強免疫測定方法及び試薬において、不溶性担体粒子として用いられる素材は、検査試薬の成分として利用可能な物質であれば特に制限はないが、具体的にはラテックス、金属コロイド、シリカ、カーボンなどが挙げられる。不溶性担体粒子のサイズは、本発明の粒子増強免疫測定方法及び試薬の検出原理に応じて0.05~0.5 μmまで適宜選択できるが、自動分析装置における光学的測定においては平均粒子径0.1~0.4 μmが汎用されており、好ましくは0.1~0.2 μmである。不溶性担体粒子の平均粒子径は粒度分布計や電子顕微鏡像などで確認することができる。

10

【0016】

本発明のモノクローナル抗体の組合せにより、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量が5重量%未満であってもヒトシスタチンCの測定が可能であり、抗体量は1重量%以上4重量%未満が好ましい。

【0017】

不溶性担体粒子へのモノクローナル抗体の結合（感作）は、例えば物理吸着法や化学結合法といった常法により行うことができる。

20

【0018】

本発明の粒子増強免疫測定方法ならびに試薬及びキットにおいての測定対象試料は、種々のヒト体液であってヒトシスタチンCを含有する試料であれば特に限定されないが、例えば血清、血漿、滑液、乳、唾液、脳脊髄液、精漿、羊水、尿、涙液などのヒト体液である。

【0019】

本発明の粒子増強免疫測定方法ならびに試薬及びキットは、日立社製を始めとして東芝社製、日本電子社製、オリンパス社製、積水メディカル社製の汎用自動分析装置や近赤外を測定波長とした専用自動分析装置LPIA（登録商標）（三菱化学ヤترون社製）における濁度法、散乱光強度を測定する装置（DADE BEHRING社製）におけるネフェロメトリー法への適用が可能であるため、自動化が容易である。

30

【0020】

本発明の粒子増強免疫凝集測定試薬は、主成分の他に、試料のイオン強度や浸透圧などを緩衝する成分として、例えば、酢酸、クエン酸、リン酸、トリス、グリシン、ホウ酸、炭酸、及びグッドの緩衝液や、それらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などを含んでも良い。また、免疫学的凝集を増強する成分としてポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、リン脂質ポリマーなどの高分子を含んでも良い。また、免疫学的凝集の形成をコントロールする成分として、タンパク質、アミノ酸、糖類、金属塩類、界面活性剤類、還元性物質やカオトロピック物質など粒子増強免疫凝集測定で汎用される成分を1種類、又は複数の成分を組合わせて含んでも良い。さらに、これらの成分を組合わせたキットとしてもよい。

40

【0021】

本発明のヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法ならびに粒子増強免疫測定試薬及びキットは、試料中のヒトシスタチンCを高精度かつ特異的に測定するという用途であればいずれにも適用することができる。

【実施例】

【0022】

以下、作製例、評価例ならびに実施例を挙げて本発明の一部を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

50

【 0 0 2 3 】

〔 作 製 例 〕

高親和性抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の作製

精製ヒトシスタチンC (S C I P A C 社) 1 0 0 μ g を 1 回 の 免 疫 に 使 用 し た 。 初 回 免 疫 は 、 ヒ ト シ ス タ チ ン C と フ ロ イ ン ド の 完 全 ア ジ ュ バ ン ド を 等 量 混 合 し て 調 製 し た エ マ ル ジ ョ ン 2 0 0 μ L を 用 い 、 こ れ を B A L B / c マ ウ ス の 腹 腔 に 注 射 し た 。 追 加 免 疫 に は フ ロ イ ン ド の 不 完 全 ア ジ ュ バ ン ド を 使 用 し て 同 様 に 調 製 し た エ マ ル ジ ョ ン 2 0 0 μ L を 用 い 、 高 親 和 性 の 抗 体 を 獲 得 す る た め に 2 週 間 間 隔 で 6 回 の 追 加 免 疫 を 繰 り 返 す 長 期 免 疫 を 行 な っ た 。 マ ウ ス 眼 底 静 脈 よ り 採 血 し た 血 液 中 の 抗 体 価 を E L I S A 法 に て 測 定 し 、 抗 体 価 の 高 い マ ウ ス を 選 ん で 細 胞 融 合 に 供 し た 。 7 回 目 の 免 疫 か ら 2 週 間 後 に 、 ヒ ト シ ス タ チ ン C 1 0 0 μ g を 生 理 食 塩 液 2 0 0 μ L に 溶 解 し た も の を マ ウ ス 腹 腔 に 注 射 し 、 3 日 後 に 脾 臓 を 摘 出 し た 。 脾 臓 を R P M I 1 6 4 0 培 地 中 で ほ ぐ し た 後 、 1 5 0 0 r p m で 遠 心 分 離 し て 脾 細 胞 を 回 収 し た 。 こ れ を 牛 胎 児 血 清 フ リ ー の R P M I 1 6 4 0 培 地 で 3 回 以 上 洗 浄 後 、 1 5 % 牛 胎 児 血 清 を 含 む R P M I 1 6 4 0 培 地 2 m L を 加 え て 懸 濁 し 、 脾 細 胞 懸 濁 液 と し た 。 脾 細 胞 と ミ エ ロ マ 細 胞 S P 2 / 0 - A G 1 4 を 6 対 1 の 割 合 で 混 合 し た 後 、 5 0 % ポ リ エ チ レ ン グ リ コ ー ル 存 在 下 で 細 胞 融 合 さ せ 、 ハ イ ブ リ ド マ (融 合 細 胞) を 得 た 。 1 5 0 0 r p m の 遠 心 分 離 で 沈 殿 部 を 集 め 、 G K N 液 (グ ル コ ー ス 2 g 、 塩 化 カ リ ウ ム 0 . 4 g 、 塩 化 ナ ト リ ウ ム 8 g 、 リ ン 酸 水 素 二 ナ ト リ ウ ム 1 . 4 1 g 及 び リ ン 酸 二 水 素 ナ ト リ ウ ム 二 水 和 物 0 . 7 8 g を 精 製 水 に 溶 か し て 1 リ ッ ト ル と し た も の) に 懸 濁 、 遠 心 分 離 に よ り 洗 浄 後 、 沈 殿 部 を 回 収 し た 。 こ れ を 1 5 % 牛 胎 児 血 清 を 含 む R P M I 1 6 4 0 培 地 3 0 m L に 懸 濁 し た も の を 1 ウ ェ ル あ た り 1 0 0 μ L 、 及 び フ ィ ー ダ ー 細 胞 と し て B A L B / c マ ウ ス の 胸 腺 細 胞 を 2 . 5 × 1 0 ⁶ 個 / m L 含 む H A T 培 地 を 1 ウ ェ ル あ た り 2 0 0 μ L づ つ 9 6 穴 マ イ ク ロ プ レ ー ト 3 枚 に そ れ ぞ れ 分 注 し 、 3 7 ° C に て 5 % 炭 酸 ガ ス 培 養 器 中 で ハ イ ブ リ ド マ を 培 養 し た 。

10

20

【 0 0 2 4 】

培 養 上 清 中 の 抗 ヒ ト シ ス タ チ ン C 抗 体 の 存 在 を 、 ヒ ト シ ス タ チ ン C を 固 相 化 し た E L I S A 法 で 確 認 し 、 1 0 日 後 に 全 て の ウ ェ ル で ハ イ ブ リ ド マ の 増 殖 を 確 認 し た 。 詳 細 に は 、 1 0 μ g / m L の ヒ ト シ ス タ チ ン C 及 び 1 5 0 m M 塩 化 ナ ト リ ウ ム を 含 む 1 0 m M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 7 . 2 ; 以 下 、 P B S と 略 す) 1 0 0 μ L を 前 記 ハ イ ブ リ ド マ の 増 殖 が 確 認 さ れ た 9 6 穴 マ イ ク ロ プ レ ー ト に 分 注 し 、 4 ° C で 一 晩 放 置 し た 。 次 に 、 こ の 9 6 穴 マ イ ク ロ プ レ ー ト を 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 及 び 1 % 牛 血 清 ア ル ブ ミ ン (以 下 B S A) を 含 む P B S 3 0 0 μ L で 3 回 洗 浄 し た 後 、 各 ウ ェ ル の 培 養 上 清 を 5 0 μ L / ウ ェ ル 加 え 、 室 温 で 1 時 間 放 置 し た 。 そ の 後 、 当 該 プ レ ー ト を 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を 含 む P B S で 3 回 洗 浄 の 後 、 ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ 標 識 抗 マ ウ ス 抗 体 (積 水 メ デ ィ カ ル 株 式 会 社 製) を 5 0 μ L / ウ ェ ル 加 え 、 室 温 で 1 時 間 放 置 し た 。 そ の 後 、 当 該 プ レ ー ト を 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を 含 む P B S で 3 回 洗 浄 後 、 0 . 2 % オ ル ト フ ェ ニ レ ン ジ ア ミ ン 及 び 0 . 0 2 % 過 酸 化 水 素 を 含 む ク エ ン 酸 緩 衝 液 (p H 5) 5 0 μ L / ウ ェ ル を 加 え 、 室 温 で 1 5 分 間 放 置 後 、 4 . 5 N 硫 酸 5 0 μ L / ウ ェ ル を 加 え て 反 応 を 停 止 さ せ 、 各 ウ ェ ル の 波 長 4 9 2 n m に お け る 吸 光 度 を 測 定 し 、 吸 光 度 の 高 い ウ ェ ル を 陽 性 ウ ェ ル と し て 選 択 し た 。

30

40

【 0 0 2 5 】

単 ク ロ ー ン 化 は 限 界 希 釈 法 で 行 っ た 。 す な わ ち フ ィ ー ダ ー 細 胞 と し て B A L B / c マ ウ ス の 胸 腺 細 胞 を 1 ウ ェ ル あ た り 1 0 ⁶ 個 づ つ 分 注 し た 9 6 穴 マ イ ク ロ プ レ ー ト に 、 前 記 陽 性 ウ ェ ル 中 の ハ イ ブ リ ド マ を 1 0 個 / m L と な る よ う に 希 釈 し た も の を 0 . 1 m L づ つ 分 注 し た 。 培 地 は 、 初 回 は H T 培 地 を 、 2 回 目 以 降 は 1 5 % 牛 胎 児 血 清 を 含 む R P M I 1 6 4 0 培 地 を 用 い 、 3 7 ° C に て 5 % 炭 酸 ガ ス 培 養 器 中 で 1 0 日 間 培 養 し た 。 E L I S A 法 に よ る 陽 性 ウ ェ ル の 選 択 及 び 限 界 希 釈 法 に よ る 単 ク ロ ー ン 化 操 作 を 各 3 回 繰 り 返 し て 、 反 応 性 の 高 い 抗 ヒ ト シ ス タ チ ン C モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 産 生 ハ イ ブ リ ド マ を 得 た 。 各 ハ イ ブ リ ド マ の 約 1 0 ⁵ 個 を プ リ ス タ ン 前 処 理 し た マ ウ ス 腹 腔 に 投 与 し 、 生 成 し た 腹 水 を そ れ ぞ れ 採 取 し た 。 採 取 し た 各 腹 水 か ら 遠 心 分 離 に よ り 不 溶 物 を 除 去 し 、 等 量 の 飽 和 硫 安 液 を 加 え 、 攪 拌 し な が ら 一 晩 放 置 後 、 遠 心 分 離 で 沈 殿 を 回 収 し た 。 回 収 し た 沈 殿 を 2 0 m M ト

50

リス緩衝液 (pH 8) に溶解し、同緩衝液で透析した。透析内容物それぞれを同緩衝液で平衡化した DEAE - セファロースカラムに別個に吸着させた後、それぞれ同緩衝液中の塩化ナトリウム 0 ~ 300 mM の濃度勾配で溶出させ、各種精製抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体を得た。

【0026】

〔評価例 1〕

認識部位が異なる抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体の選択

サンドイッチ ELISA 法における反応性を指標として、作製した抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体間で認識部位が異なる組合せの探索をおこなった。具体的には、各抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体を各 1 µg / mL を含む PBS 50 µL / ウェルに加え、室温 2 時間静置してプレートに固相化した後、0.05% Tween 20 を含む PBS 300 µL で 3 回洗浄し、0.05% Tween 20 及び 1% BSA を含む PBS 300 µL / ウェルに加え、室温 1 時間静置した。その後、0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄の後、10 ng / mL ヒトシスタチン C を含む PBS 50 µL / ウェルに加え、室温 1 時間静置して反応させ、0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄の後、検出用にビオチン化した各抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 1 µg / mL を含む PBS 50 µL / ウェルに加え、室温 1 時間静置した。0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄の後、5000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ZYMED 社) を 50 µL / ウェルに加えて室温で 1 時間静置し、当該プレートを 0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄後、0.2% オルトフェニレンジアミン及び 0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (pH 5) 50 µL / ウェルを加え、室温で 15 分間反応後、4.5 N 硫酸 50 µL / ウェルを加えて反応を停止させ、各ウェルの波長 492 nm における吸光度を測定し、反応性が認められた組合せを認識部位が異なるモノクローナル抗体とした。その結果、4 種類の抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 a ~ d において表 1 に示したような組合せが可能であることを確認した。

【0027】

【表 1】

		固相化抗体			
		a	b	c	d
ビオチン化抗体	a	—	++	—	+
	b	++	—	—	++
	c	+	—	—	+
	d	++	++	—	—

++:強い反応性あり +:反応性あり -:反応性なし

【0028】

抗体 a に関しては b ~ d いずれの抗体とも組合せが可能であることを確認した。また抗体 c に関しては、固相化した状態では、組合わせる抗体に関わらず反応性を示さなくなることから、不溶性担体への結合、すなわち固相化が必要な粒子増強免疫測定方法での利用は不可能と考えられた。

【0029】

〔評価例 2〕

認識部位が異なる抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体組合せにおける粒子増強免疫凝集の確認

抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 a、b、d をそれぞれ独立して少量結合させた

抗体感作ラテックス粒子を調製し、認識部位が異なる組合わせでヒトシスタチンC濃度依存的な粒子増強免疫凝集の形成を確認した。

【0030】

(抗体感作ラテックス粒子の調製)

平均粒径0.13 μm又は0.3 μm(積水メディカル社製)の0.5%ラテックス溶液(30 mM Tris-HCl pH 8.5~9.0)に、0.2 mg/mLの各シスタチンCモノクローナル抗体溶液(30 mM Tris-HCl pH 8.5~9.0)を等量添加して4 1時間攪拌後、等量の1%BSA溶液(30 mM Tris-HCl pH 8.5~9.0)を添加して4 30分間攪拌し、遠心して上清を除去後、沈殿を精製水で再懸濁し抗体感作ラテックス粒子溶液とした。このとき、抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量は約3.8重量%となる。

10

【0031】

(第一試薬の調製)

750 mMの塩化カリウム、1%BSAを含む30 mM CHES緩衝液(pH 8.75)を調製し第一試薬とした。

【0032】

(第二試薬の調製)

2種類の抗体感作ラテックス粒子溶液を等量混合し、5 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)で最終吸光度2.0 ODとなるように希釈して第二試薬とした。試薬は評価例1の結果で強い反応性が認められたa-b、a-d、b-dの各抗体感作ラテックス粒子を、同一の粒子径同士で組合わせて調製した。

20

【0033】

(測定方法)

第一試薬と第二試薬を組合わせ、日立7170形自動分析装置を用いてヒトシスタチンC濃度依存的な粒子増強免疫凝集の形成を確認した。具体的には、濃度0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/LのヒトシスタチンC溶液2.5 μLに第一試薬100 μLを加えて37 で5分間加温後、第二試薬100 μLを加えて攪拌した。その後5分間の凝集形成に伴う吸光度変化を、主波長570 nm、副波長800 nmにおける感度として測定した。

30

【0034】

(結果)

抗体a感作ラテックス粒子と抗体b感作ラテックス粒子を組合わせた試薬で各濃度のシスタチンC溶液を測定したところ、図1記載のシスタチンC濃度-感度曲線に示したように、いずれの粒子でもシスタチンC濃度依存的に感度が上昇し測定が可能であることが確認された。0.13 μm粒子(黒四角)では低濃度域の感度がやや低いものの高濃度域の感度伸長が良好で、0.3 μm粒子(白四角)では低濃度域は高感度であるが、高濃度域の感度伸長が不良であった。また、抗体a感作ラテックス粒子と抗体d感作ラテックス粒子を組合わせた試薬では、0.13 μm粒子(黒丸)と0.3 μm粒子(白丸)における低濃度域の感度が同等で、0.13 μm粒子では高濃度域まで感度が上昇するのに対し、0.3 μm粒子ではほとんど感度伸長が認められなかった。したがって、組合せによっては利用できない粒子があるものの、両組合せとも免疫凝集測定方法への適用が可能と考えられた。一方、破線で示した抗体b感作ラテックス粒子と抗体d感作ラテックス粒子を組合わせた試薬では、0.13 μm粒子(黒三角)、0.3 μm粒子(白三角)いずれにおいても、シスタチンC濃度依存的な感度上昇はほとんど認められず、粒子増強免疫測定方法での利用は困難と考えられた。

40

【0035】

[評価例3]

ピアコアによる抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数確認

ピアコア装置(GEヘルスケア社)を利用し、常法に則り精製抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a、b、およびdの解離定数を算出した。具体的には、Mouse An

50

t i b o d y C a p t u r e K i t (G Eヘルスケア社)を用いて、センサーチップにそれぞれ抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を固定化し、濃度 $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 0.0625 、 0.125 、 0.25 、 0.5 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ までのヒトシスタチンC (R & D S y s t e m s 社)との反応性から解離定数を算出した(表2)。評価例2で粒子増強免疫測定への適用が可能と考えられた組合せa - b、a - dは、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a(解離定数: 0.29 nM)と、通常の親和力の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体b(解離定数: 1.32 nM)もしくはd(解離定数: 2.30 nM)の組合せとなっており、解離定数の比はそれぞれ、 $b/a(1.32/0.29)$ が約 4.6 、 $d/a(2.30/0.29)$ が約 7.9 と、組合わせた抗体間で明確な親和性の差が認められた。その一方で、粒子増強免疫凝集への適用が不可能と

10

【0036】

【表2】

抗体	解離定数 KD値(nM)
a	0.29
b	1.32
d	2.30

20

【0037】

〔評価例4〕

E L I S A 法による抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体特異性の確認

E L I S A 法にて、今回作製した抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a、b、dの特異性評価を行った。詳細には $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトシスタチンC及びシスタチンファミリーに属するヒトシスタチンA、シスタチンB、シスタチンD、シスタチンE/M、シスタチンF、シスタチンS、シスタチンSA、キニノーゲン(いずれもR & D S y s t e m s 社)を含むP B S $50 \mu\text{L}$ を96穴マイクロプレートに分注し、4 で一晚静置してプレートに固相化した。次にこの96穴マイクロプレートを、 0.05% T w e e n 20を含むP B S $300 \mu\text{L}$ で3回洗浄した後、 0.05% T w e e n 20及び 1% B S Aを含むP B S $300 \mu\text{L}$ /ウェル加え、室温1時間静置した。その後、作製した各抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含むP B S $50 \mu\text{L}$ /ウェル加え室温1時間静置し、 0.05% T w e e n 20を含むP B S で3回洗浄の後、P B S で5000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体(B i o s o u r c e 社)を $50 \mu\text{L}$ /ウェル加え、室温で1時間静置した。その後、当該プレートを 0.05% T w e e n 20を含むP B S で3回洗浄し、 0.2% オルトフェニレンジアミン及び 0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液(pH5) $50 \mu\text{L}$ /ウェルを加え、室温で15分間反応後、 4.5 N 硫酸 $50 \mu\text{L}$ /ウェルを加えて反応を停止させ、各ウェルの波長 492 nm における吸光度を測定した。

40

対照として、抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の代わりに抗ヒトシスタチンCウサギポリクローナル抗体(B i o V e n d o r 社)、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体

50

の代わりにペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体（C A P P E L社）を使用し特異性を比較した。

【0038】

図2に示したように、モノクローナル抗体a、b、dいずれのモノクローナル抗体もヒトシスタチンCのみと特異的に反応することが確認されたことから、これらの抗体を利用することによって、ヒト体液中のシスタチンCを特異的に測定できると考えられる。一方、対照としたポリクローナル抗体は、シスタチンCに加えてシスタチンB、シスタチンD、シスタチンE/M、シスタチンS、シスタチンSA、シスタチンSNに対して同程度の強い反応性を、またシスタチンA、シスタチンF、キニノーゲンに対しても弱い反応性を示すことから、抗シスタチンCポリクローナル抗体を利用した測定においては、これらシスタチンファミリー分子が共存する試料ではシスタチンCの正確な測定は不可能であるものと予想された。

10

【0039】

評価例1-4を繰り返した結果、さらに粒子増強免疫測定への適用が可能と考えられる抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体e、f、gを用いた組合せ1、および2を見出した。いずれも解離定数1nM未満の高親和性抗体を少なくとも1種類含む組合せで、組合せ1は高親和性抗体同士の組合せで、解離定数の比は約2.1、組合せ2は高親和性抗体と一般的な親和力の抗体の組合せで、解離定数の比は約15.4であった（表3）。

【0040】

【表3】

20

組合せ	抗体	解離定数	
		KD値(nM)	比
1	a	0.29	2.07 (a/e)
	e	0.14	
2	f	0.54	15.37 (g/f)
	g	8.30	

30

【0041】

〔実施例〕

抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a及びbを使用し、ラテックス粒子径及び、その他諸条件を日立7170形自動分析装置の測定に最適化した本発明のシスタチンC測定試薬を調製し、抗シスタチンCポリクローナル抗体を使用している既存のシスタチンC測定試薬（D A D E B E H R I N G社 N-ラテックス シスタチンCキット）と性能比較を実施した。なお抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を使用した汎用自動分析装置用の測定試薬は、入手することができなかった。

40

【0042】

（抗体感作ラテックス粒子の調製）

平均粒径0.15μmの0.5%ラテックス溶液（30mM Tris-HCl pH 8.5）に、等量の0.15mg/mL抗体a又はb溶液（30mM Tris-HCl pH 8.5）を添加して4-1時間攪拌後、等量の1%BSA溶液（30mM Tris-HCl pH 8.5）を添加して4-30分間攪拌し、遠心して上清を除去後、沈殿を精製水で再懸濁し抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a及びb感作ラテックス粒子溶液とした。このとき、抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量は約2.9重量%となる。

【0043】

50

(第一試薬の調製)

750 mMの塩化カリウム、1% BSAを含むpH 8.0の30 mM Tris-HClを調製し第一試薬とした。

【0044】

(第二試薬の調製)

抗体a感作ラテックス粒子溶液と抗体b感作ラテックス粒子溶液を等量混合し、5 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)で最終吸光度1.5 ODとなるように希釈して第二試薬とした。

【0045】

(測定試料)

ヒト血清検体

【0046】

(測定条件)

日立7170形自動分析装置：パラメータ条件

- ・検体 - 第一試薬 - 第二試薬；2.4 μ L - 120 μ L - 120 μ L
- ・分析法；2ポイントエンド法(測定ポイント18 - 34)
- ・測定波長；主波長570 nm / 副波長800 nm
- ・キャリブレーション；スプライン

【0047】

(測定方法)

濃度0、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0 mg/LのヒトシスタチンC溶液の測定感度から検量線を作成し、その検量線をもとに各試料中のシスタチンC濃度を測定し、対照試薬と相関性(サンプル数N = 50)、同時再現性(連続測定回数n = 10)、検出限界濃度(シスタチンC濃度ゼロ試料の測定平均感度 + 2SDと、シスタチンC濃度既知試料の測定平均感度 - 2SDのエラーバーが重ならない濃度を検出限界濃度とする)を比較した。

【0048】

(対照試薬及び分析装置)

対照試薬：N-ラテックス シスタチンCキット

分析装置：BN Prospec

以上 D A D E B E H R I N G 社製

【0049】

(結果)

本発明の試薬と対照試薬の検体測定値の相関性は良好であった(図3)。また再現性に関しては、本発明の試薬の変動係数は既存試薬の1/5以下と小さく再現性に優れていた(表4)。さらに検出限界濃度に関しても、対照試薬がシスタチンC濃度0.2 mg/Lであるのに対し、本発明の試薬は0.05 mg/Lと1/4以下の低濃度まで検出可能であることを確認した(図4)。

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を利用した本発明の粒子増強免疫測定方法により、抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量が、従来の試薬において利用されてきた5重量%超~35重量%よりも少量で、低コストであるのみならず、高性能かつ特異性の高いヒト体液中のシスタチンCの測定方法が達成された。

【0050】

10

20

30

40

【表 4】

	本発明試薬		対照試薬	
	試料1	試料2	試料1	試料2
	0.49	1.99	0.379	1.64
	0.49	2.00	0.397	1.69
	0.49	2.01	0.401	1.66
	0.49	2.01	0.406	1.64
	0.48	2.01	0.424	1.75
	0.48	2.01	0.408	1.71
	0.49	2.01	0.379	1.75
	0.48	2.01	0.447	1.75
	0.49	2.01	0.428	1.71
	0.50	1.99	0.383	1.72
平均値(mg/L)	0.49	2.01	0.41	1.70
標準偏差	0.006	0.008	0.023	0.043
変動係数(%)	1.30	0.42	5.57	2.55

10

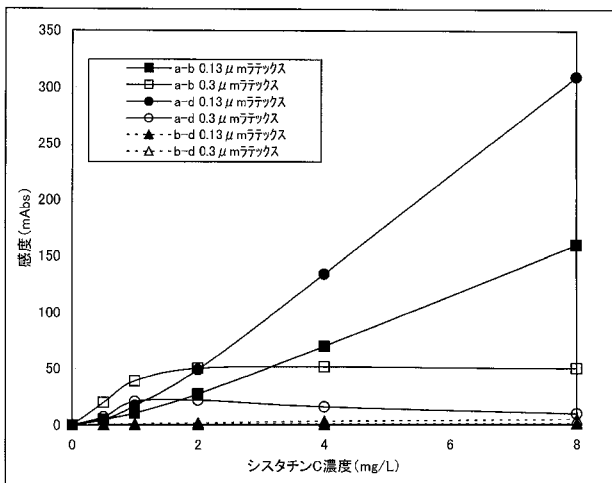
【産業上の利用可能性】

20

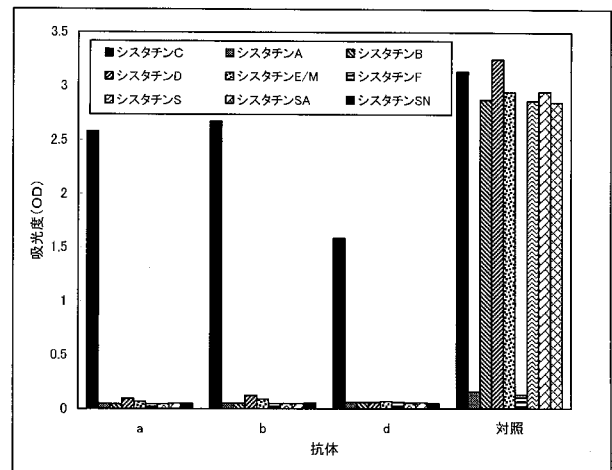
【0051】

本発明の粒子増強免疫測定方法ならびに試薬及びキットにより、高性能、安価かつ簡便なヒト体液中のヒトシスタチンCの検出・測定方法を提供する。

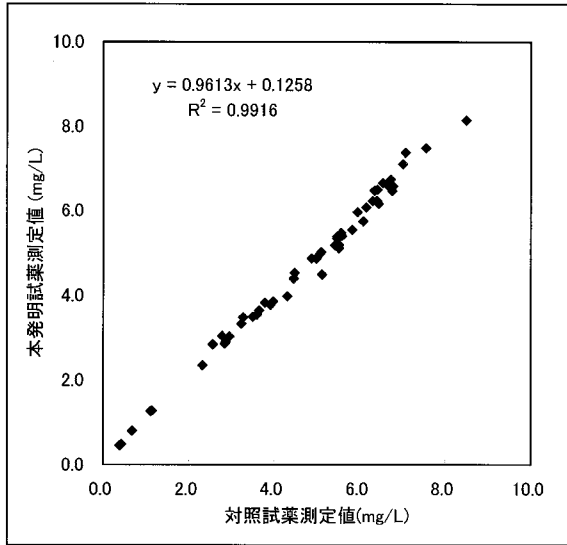
【図 1】



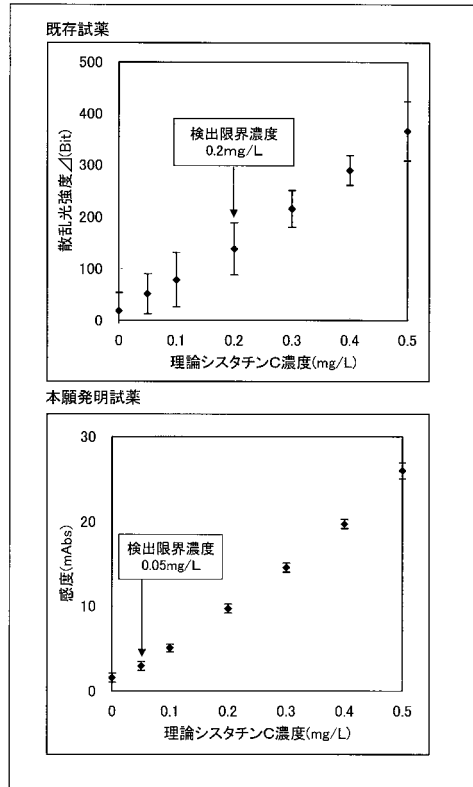
【図 2】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/006590
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(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, G01N33/543, G01N33/577 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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus(JDreamI), JMEDPlus(JDreamI)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-108929 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 23 April 1999 (23.04.1999), claims; paragraphs [0029], [0113] & US 6248597 B1 & EP 898169 A2 & DE 69803729 D & AT 213065 T & ES 2170984 T & CA 2244326 A	1-7
A	ISHIGURO et al. "The use of monoclonal antibodies to define levels of cystatin C in normal human serum." Hybridoma, 1989, Vol.8, No.3, p.303-313	1-7
A	OLAFSSON et al. "Production, characterization and use of monoclonal antibodies against the major extracellular human cysteine proteinase inhibitors cystatin C and kininogen." Scand J Clin Lab Invest, 1988, Vol.48, No.6, p.573-582	1-7
<input 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 15 January, 2010 (15.01.10)		Date of mailing of the international search report 26 January, 2010 (26.01.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/006590									
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, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(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, G01N33/543, G01N33/577											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII)											
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									
X	JP 11-108929 A (エフ・ホフマンローラ ロシュ アーゲー) 1999.04.23, 特許請求の範囲、【0029】、【0113】 & US 6248597 B1 & EP 898169 A2 & DE 69803729 D & AT 213065 T & ES 2170984 T & CA 2244326 A	1-7									
A	ISHIGURO et al." The use of monoclonal antibodies to define levels of cystatin C in normal human serum." Hybridoma, 1989, Vol.8, No.3, p.303-313	1-7									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 15.01.2010		国際調査報告の発送日 26.01.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 山村 祥子	2J 9217								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 6 5 9 0
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
A	OLAFSSON et al.” Production, characterization and use of monoclonal antibodies against the major extracellular human cysteine proteinase inhibitors cystatin C and kininogen.” Scand J Clin Lab Invest, 1988, Vol.48, No.6, p.573-582	1-7

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, SM, 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, CL, 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 中山 真也

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 高橋 弘至

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 中村 靖

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 清水 知

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(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)	人体液中胰抑素c的测定方法		
公开(公告)号	JPWO2010064435A1	公开(公告)日	2012-05-10
申请号	JP2010541240	申请日	2009-12-03
[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	中山真也 高橋弘至 中村靖 清水知		
发明人	中山 真也 高橋 弘至 中村 靖 清水 知		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/8139 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/543.581.A		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008309369 2008-12-04 JP		
其他公开文献	JP5554247B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于人体液中半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的颗粒增强免疫测定方法，与使用大量低特异性多克隆抗体或高单克隆抗体的常规测定方法相比，该方法具有更高的特异性并且易于以低成本进行自动化。特异性，但凝集性较差。公开了一种针对人体液中半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的测定方法，该方法是一种颗粒增强免疫测定方法，其利用抗体包被颗粒的组合，其中一些不溶性载体颗粒被一种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体包被。它们具有高亲和力，并且其中一些其他不溶性载体颗粒被一种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体包被，该抗人胰抑素C单克隆抗体识别的表位不同于上述第一类单克隆抗体的表位，并且亲和力相对较低，其中抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体的结合量相对于被相应抗体包被的颗粒的总重量小于5重量%。

		固相化抗体			
		a	b	c	d
ビオチン化抗体	a	—	++	—	+
	b	++	—	—	++
	c	+	—	—	+
	d	++	++	—	—

++:強い反応性あり +:反応性あり -:反応性なし