

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5785959号
(P5785959)

(45) 発行日 平成27年9月30日(2015.9.30)

(24) 登録日 平成27年7月31日(2015.7.31)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 N

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 33/543 5 4 5 A

GO 1 N 33/543 5 4 5 J

請求項の数 1 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2012-551116 (P2012-551116)
 (86) (22) 出願日 平成23年1月24日 (2011.1.24)
 (65) 公表番号 特表2013-518277 (P2013-518277A)
 (43) 公表日 平成25年5月20日 (2013.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/RU2011/000034
 (87) 国際公開番号 W02011/093745
 (87) 国際公開日 平成23年8月4日 (2011.8.4)
 審査請求日 平成25年11月28日 (2013.11.28)
 (31) 優先権主張番号 2010117620
 (32) 優先日 平成22年5月5日 (2010.5.5)
 (33) 優先権主張国 ロシア (RU)
 (31) 優先権主張番号 2010102114
 (32) 優先日 平成22年1月26日 (2010.1.26)
 (33) 優先権主張国 ロシア (RU)

(73) 特許権者 512195980
 オブチェストヴォ エス オグラニチェノ
 ワ オトヴェトストヴェノステュ “ナウ
 クノー プロイズヴォドストヴェナヤ フ
 ァルマ “マテリア メディカ ホールデ
 イング”
 ロシア共和国 1 2 7 4 7 3 モスクワ
 サモテクニー・パー 3-アイ 9
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素イムノアッセイを用いて自己抗体の濃度を測定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酵素イムノアッセイによりヒト由来の生物学的流体における自然自己抗体を定量的に測定する方法であって；物理的収着用固相を抗原で処理し、被験生物学的試料を添加し、コンジュゲート含有溶液で前記固相を処理し、前記固相と液相とを分離し、前記固相に添加した発色剤溶液の吸光度を分光光度分析することを含み；前記物理的収着用固相としてストレプトアビジンでコーティングされている物理的収着用固相を用いること；予めビオチン化されている抗原及び前記物理的収着用固相における非特異的結合部位をブロックするためのブロッキング剤としての標準的な手順に従ってビオチン化されたタンパク質のそれぞれで、前記物理的収着用固相の異なる部分処理すること；酵素で標識されており、且つヒト免疫グロブリンのアイソタイプのうちの1種若しくは全てと反応するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を前記コンジュゲート含有溶液として用いること；前記物理的収着用固相の非特異的結合部位をブロックするために用いられるタンパク質と、加熱処理中に前記自然自己抗体が分解するのを防ぐ基質とを含有するバッファーで前記被験生物学的流体を予め希釈した後、前記被験生物学的流体を鉄含有酸化剤で処理し、次いで、前記被験生物学的流体を加熱処理すること；各生物学的流体の被験試料に対して、ビオチン化抗原が固定化されていない対照物理的収着用固相を用いること；及び抗原に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を使用してプロットした検量線を用いて前記自然自己抗体の数を求めることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療、特に実験室における診断の分野に関し、ヒト由来の生物学的流体中の自然自己抗体濃度の定量的測定の効率及び信頼性を改善するために用いることができる。

【背景技術】

【0002】

固相の酵素イムノアッセイ（EIA）を用いてヒト由来の生物学的流体における内因性タンパク質に対する自己抗体の濃度を定量的に測定する方法が知られている（特許文献1）。しかし、この方法は、ヒト由来の生物学的流体中における自然自己抗体の定量的測定には殆ど用いられていない。

10

【0003】

物理的収着により固相に抗原を吸着させ、被験生物学的試料と共にインキュベートし、コンジュゲート含有溶液をインキュベートし、発色剤の吸光反応を分光光度分析することを含む酵素イムノアッセイ法が知られている（特許文献2）。

【0004】

更に、物理的収着により固相に抗原を吸着させ、被験生物学的試料と共にインキュベートし、コンジュゲート含有溶液をインキュベートし、発色剤の吸光反応を分光光度分析することを含む、自然自己抗体の濃度を測定するための酵素イムノアッセイを実施する方法も知られている（BMS 217 TEN ヒト抗IFN- α ELISA、販売元：Med Systems GmbH, Austria）。この方法は、簡便性、感受性、及び特異性は十分であるが、得られる結果が擬陽性である場合がある。この理由は、血清又は血漿中の様々な免疫グロブリンが、EIAプレートに吸着している抗原と非特異的に且つ低親和性で結合するためである。更に、自然抗体の範疇には属さない多重反応性免疫グロブリンが血中に存在することにより擬陽性の結果が引き起こされる場合もある。この理由は、前記多重反応性免疫グロブリンがEIAプレートの成分に非特異的に結合するためである。更に、EIAでは遊離自然抗体画分しか検出されないが、殆どの自然自己抗体は、その抗原と結合している複合体として血中に存在している。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

30

【特許文献1】露国特許第2137134C1号明細書（G01N33/53、1999年）

【特許文献2】露国特許第2014610C1号明細書（G01N33/535、1994年）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、EIA法を用いてヒト由来の生物学的流体中の自然自己抗体濃度を定量的に測定するための技術的に簡便で、感受性が高く、且つ特異的な方法を開発することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題は、酵素イムノアッセイを用いてヒト由来の生物学的流体中の自然自己抗体濃度を定量的に測定する方法であって、物理的収着用固相を抗原で処理し、被験生物学的試料を添加し、コンジュゲート含有溶液で前記固相を処理し、前記固相と液相とを分離させ、発色剤溶液の吸光反応を分光光度分析することを含む方法により解決される。本発明によれば、ストレプトアビジンでコーティングされている物理的収着用固相を物理的収着用固相として用いることができる。予めビオチン化されている抗原と、前記物理的収着用固相における非特異的結合部位をブロックするためのブロッキング剤としての標準的な手順に従ってビオチン化されたタンパク質を用いて前記物理的収着用固相を処理する。コンジ

50

ュゲート含有溶液として、ヒト免疫グロブリンのアイソタイプのうちの1種若しくは全ての種類と反応するモノクローナル又はポリクローナルな酵素標識抗体を用いる。更に、物理的収着用固相の非特異的結合部位をブロックするために用いられるタンパク質と、加熱処理中に自然自己抗体が分解するのを防ぐ基質とを含有するバッファーで前記被験生物学的流体を予め希釈し、次いで、加熱処理する。各生物学的流体の被験試料に対して、ビオチン化抗原が固定化されていない対応する対照物理的収着用固相を用いる（即ち、固相のストレプトアビジンと結合する各生物学的流体の被験試料に対して、物理的収着用固相の非特異的結合部位をブロックするために用いられるタンパク質と同様のビオチン化対照タンパク質を用いることにより、自然自己抗体に対して特異的な分光学的シグナル及び非特異的な分光学的シグナルを測定することを可能にする）。そして、抗原に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体に対して正規化された検量線を用いて自然自己抗体の数を求める。

10

【0008】

更に、加熱処理を行う前に、物理的収着用固相の非特異的結合部位をブロックするために用いられるタンパク質と、加熱処理中に自然自己抗体が分解するのを防ぐ基質とを含有するバッファーで希釈した被験生物学的流体を、鉄含有酸化剤で更に処理する。

【0009】

抗原を直接固定化すると抗原のエピトープの立体構造の変化及び分解が生じるので、EIA法の感受性が低下するが、本発明の方法では、ストレプトアビジンでコーティングした物理的収着用固相とビオチン化された被験試料を用いることにより、固定化されている抗原の全てのエピトープが自然自己抗体に結合可能な状態で保たれるので、感受性が高い。更に、ヒト免疫グロブリンのアイソタイプのうちの1種又は全ての種類と反応する酵素標識抗体を適用することにより、自然自己抗体の特定のアイソタイプ又は全てのアイソタイプの濃度を測定することが可能になるので、本発明の方法は適用範囲が広い。物理的収着用固相における非特異的結合部位をブロックするために用いられるタンパク質を含有するバッファーで被験試料を予め希釈することにより、被験試料中の抗体とタンパク質が固定化されている固相との非特異的結合の可能性を最小化できる。これも、本発明の方法の特異性及び感受性を高める。

20

【0010】

鉄含有酸化剤の添加及び被験試料の加熱処理により、自然自己抗体と抗原及び抗イデオタイプ抗体との複合体を破壊したり、様々なデマスキング作用により抗体パラトープによる抗原エピトープの利用可能性を確保したりすることが可能になる。被験試料をバッファーで予め希釈することにより、加熱処理中に自然自己抗体が分解されるのを防ぐことができ、自然自己抗体の総濃度（即ち、遊離型及び抗原結合型の自然自己抗体、又はパラトープがブロックされている自然抗体の総濃度）を測定することが可能になるので、擬陽性の結果が生じる可能性を低減し、且つ本発明の方法の感受性、効率、及び機能を高めることができる。

30

【0011】

各生物学的流体の被験試料について、固定化されている場合、ビオチン化ブロッキングタンパク質を備える個々の対照物理的収着用固相を用いると、自然自己抗体に対して特異的及び非特異的な分光学的シグナルを推定することが可能になるので、これも擬陽性が生じる可能性を低減し、且つ本発明の方法の感受性を高める。

40

【0012】

更に、本発明の本質的な特徴を組み合わせることにより、自然自己抗体の濃度の定量的測定の可能性を広げ、且つ本発明の課題を解決する技術的手段の範囲を広げることができる。

【図面の簡単な説明】**【0013】**

【図1】 図1は、実施例1の検量線を示す。

【図2】 図2は、実施例2の検量線を示す。

50

【図 3】図 3 は、実施例 3 の検量線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

ヒト由来の生物学的流体中の自然自己抗体濃度を定量的に測定するための本発明の方法は、以下の通り実施される。

【0015】

標準的なウェルプレートの物理的収着用固相（ウェル）をストレプトアビジン又はそのアナログ（例えば、アビジン等）でコーティングし、前記物理的収着用固相をブロッキング剤でブロッキングし、自然自己抗体の濃度を求めるために必要なビオチン化されている被験試料と共に、又は非特異的結合の対照であるビオチン化されているブロッキングタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、ゼラチン等）（対照ウェル）と共にインキュベートする。最小量のビオチン（例えば、D - ビオチニル - ε - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル）（抗原のビオチンに対するモル比 1 : 2）で抗原をビオチン化して、エピトープの破壊を最小限に抑える。

【0016】

加熱処理中に自然自己抗体が分解されるのを防ぐためにタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、ゼラチン等）、保存剤（例えば、チメロサル等）、界面活性物質（例えば、T r i t o n - X 1 0 0 等）を含有するブロッキングバッファー溶液で（50 倍 ~ 200, 000 倍に）希釈することにより、アッセイ用生物学的流体（例えば、血清、血漿等）を調製し、得られた生物学的流体溶液を 50 ~ 80 の温度で加熱処理する。

【0017】

加熱処理前に、被験生物学的流体を鉄含有酸化剤（例えば、塩化鉄（I I I）[F e C l ₃]）で更に処理することを推奨する。

【0018】

次いで、加熱処理した被験生物学的流体溶液を、検量線をプロットするために用いた特異的抗体と同じウェルに入れる。検量線のプロットには、既知の濃度の抗原に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を使用する。形成される免疫複合体（抗原 - 自然抗体）を検出するために、特定の若しくは全てのヒト免疫グロブリンの軽鎖に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体（例えば、ヤギポリクローナル抗体、ヒツジポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体等）と酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ等）とのコンジュゲートを用いる。酵素（例えば、アルカリホスファターゼ等）により分解される際に基質から分離される発色剤の量に依存して色が変化する発色剤溶液の吸光反応を用いて自然自己抗体の濃度を求める。前記基質は、特定の波長で色の特徴を分光学的に測定することができる可溶性生成物を生成する。

【実施例】

【0019】

実施例 1

ヒトのガンマインターフェロン（I F N - γ）に対する自然自己抗体の濃度を定量的に測定することで本発明の方法を実施しながら技術的な効果が得られる可能性を確認するために、インターフェロン療法を受けていない 20 人の健常ドナーから血清試料を採取した。したがって、前記ドナーの血清は、ヒトの I F N - γ に対する自己抗体は含有していないが、前記ドナーの血清中にはヒトの I F N - γ に対する自然自己抗体は存在している。

【0020】

G r e i n e r b i o - o n e G m b H 製のストレプトアビジンでコーティングされている 96 ウェルプレート（カタログ番号 6 5 5 9 9 0）のウェルの一部に、e B i o s c i e n c e s 製の組換え型ヒトガンマインターフェロン（ヒト I F N - γ、カタログ番号 3 4 - 8 3 1 9 - 8 5）100 μL を接種し、前記ウェルの他の部分（被験試料に対する対照ウェル）に、S i g m a A l d r i c h 製のウシ血清アルブミン（カタログ番

10

20

30

40

50

号 A - 3 8 0 3) を接種した。これらは両方共、湿度 1 0 0 % にて 1 0 0 μ L / ウェルの割合で U - C y T e c h B i o s c i e n c e C o m p a n y の標準的な手順 (標準操作手順番号 U C T - 1 2 7) に従ってビオチン化した (標識の原理は、安定なアミド結合を形成することにより、タンパク質の遊離アミノ基を D - ビオチニル - ϵ - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (N H S - ビオチン) と反応させ (抗原のビオチンに対するモル比 1 : 2) (反応は、穏やかに攪拌しながら室温で 2 時間インキュベートしている間に生じる) ; 次いで、ビオチン化されたタンパク質をリン酸バッファー溶液で透析して、未反応の N H S - ビオチンを除去するというものである) 。

【 0 0 2 1 】

血清試料を 2 0 倍に希釈し (即ち、1 % の T r i t o n - X 1 0 0 及び 0 . 0 0 2 % のチメロサルを含有するリン酸バッファー 1 , 9 0 0 μ L で血清 1 0 0 μ L を希釈し) 、7 5 $^{\circ}$ C で 2 0 分間インキュベートした。

10

【 0 0 2 2 】

次いで、インキュベートした溶液を更に 5 倍に希釈し (即ち、1 % のウシ血清アルブミン (B S A) 、1 % の T r i t o n - X 1 0 0 、及び 0 . 0 0 2 % のチメロサルを含有するリン酸緩衝生理食塩水 4 0 0 μ L でインキュベートした溶液 1 0 0 μ L を希釈し) 、プレートのウェルに接種するために用いた (1 ウェル当たり 1 0 0 μ L) 。

【 0 0 2 3 】

検量線をプロットするために、1 6 単位 / m L ~ 0 . 5 単位 / m L の濃度の標準抗体溶液を調製した (ヒト I F N - γ に対するマウスモノクローナル抗体、クローン M D - 2) 。本明細書では、1 0 0 p g / m L のマウスモノクローナル抗体を 1 単位 / m L と定義した。

20

【 0 0 2 4 】

調製した標準抗体、ネガティブコントロールとして用いた溶液 (1 % の B S A 、1 % の T r i t o n - X 1 0 0 、及び 0 . 0 0 2 % のチメロサルを含有するリン酸バッファー) 、及び被験試料溶液を、表 1 に示す通りプレートのウェルに接種し、3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、デカンテーションによりプレートから流体を除去し、標準洗浄溶液 (0 . 0 5 % の T w i n - 2 0 及び 0 . 0 1 % のチメロサルを含有するリン酸バッファー) でプレートをすすいだ。

【 0 0 2 5 】

表 1 は、プレートのウェルと接種した試料とのチャートを示す。

30

【表 1】

固定化抗原	I		II		III		IV		V		VI	
	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	S1	S1	S5	S5	S9	S9	S13	S13	S17	S17
B	P2	P2	S1	S1	S5	S5	S9	S9	S13	S13	S17	S17
C	P3	P3	S2	S2	S6	S6	S10	S10	S14	S14	S18	S18
D	P4	P4	S2	S2	S6	S6	S10	S10	S14	S14	S18	S18
E	P5	P5	S3	S3	S7	S7	S11	S11	S15	S15	S19	S19
F	P6	P6	S3	S3	S7	S7	S11	S11	S15	S15	S19	S19
G	N	N	S4	S4	S8	S8	S12	S12	S16	S16	S20	S20
H	N	N	S4	S4	S8	S8	S12	S12	S16	S16	S20	S20

記号の説明:

P 1: 標準抗体 (16単位/mL)

P 2: 標準抗体 (8単位/mL)

P 3: 標準抗体 (4単位/mL)

P 4: 標準抗体 (2単位/mL)

P 5: 標準抗体 (1単位/mL)

P 6: 標準抗体 (0.5単位/mL)

N: ネガティブコントロール - 1%のBSA、1%のTriton-X100、及び0.002%のチメロサル
を含有するリン酸バッファ

S1～S20:被験試料1～20

IFN- γ - 組換え型ヒトガンインターフェロン

BSA - ウシ血清アルブミン

【 0 0 2 6 】

次いで、全てのプレートのウェルに、アルカリホスファターゼとコンジュゲートしているヒトのIgA、IgM、IgGに対するヤギ抗体の混合物 (Sigma Aldrich ; カタログ番号 A - 3 3 1 3) 又はアルカリホスファターゼとコンジュゲートしているマウスのIgGに対するヤギ抗体 (Sigma Aldrich ; カタログ番号 A - 3 5 6 2) を 1 0 0 μ L ずつ接種した。アルカリホスファターゼとコンジュゲートしているマウスのIgGに対するヤギ抗体は、検量線をプロットするために用いるヒトIFN- γ に対するモノクローナル抗体 (MD - 2) の濃度を測定するために使用するものである。次いで、前記プレートを 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、デカンテーションによりプレートのウェルから流体を除去し、標準洗浄溶液 (0 . 0 5 % の Tween - 2 0 及び 0 . 0 1 % のチメロサルを含有するリン酸バッファ) でプレートを 5 回すすいだ。

【 0 0 2 7 】

コンジュゲート含有溶液のインキュベートが終了する 1 5 分間前に、基質バッファ 1 錠と Sigma Company 製の基質 (パラニトロフェニルホスフェート) (カタログ番号 N - 2 7 7 0) 1 錠とを蒸留水 2 0 mL に溶解させることにより発色剤溶液を調製

した。

【 0 0 2 8 】

調製した発色剤溶液 1 0 0 μ L を各プレートのウェルに接種し、前記プレートを 3 7 で 3 0 分間インキュベートした。

【 0 0 2 9 】

インキュベート後、全てのプレートのウェルに M e r c k K g a A 製の停止溶液 (3 N の水酸化ナトリウム) (カタログ番号 1 . 0 6 4 9 5) を接種し、標準的な光度計を用いて 4 0 5 n m の波長における吸光度を測定した。

【 0 0 3 0 】

得られた測定結果を用いて、I F N - γ に対する自然自己抗体の濃度を計算した。この目的のために、標準抗体の光学密度 (O D) の真の値、及び被験試料の真の値を以下の通り求めた：

1 . ネガティブコントロールの平均 O D (ウェル 1 G、1 H、2 G、2 H の O D の算術平均値) を計算した。

2 . 標準抗体の平均 O D (それぞれの標準 P 1 ~ P 6 のウェルにおける O D の算術平均値) を計算した。

3 . 標準抗体の O D の平均値とネガティブコントロールの O D の平均値との差として、標準抗体の O D の真の値を計算した。

計算結果を表 2 に示す。

【 表 2 】

		1	2		OD平均値:		標準抗体のOD値 ーネガティブコントロールの平均OD値:
P1	A	1.704	1.554	→	1.629	→	1.521
P2	B	1.122	1.202		1.162		1.054
P3	C	0.818	0.801		0.810		0.702
P4	D	0.497	0.453		0.475		0.367
P5	E	0.285	0.266		0.276		0.168
P6	F	0.201	0.188		0.195		0.087
N	G	0.115	0.108				
N	H	0.106	0.102		0.108		

4 . 得られた標準抗体の真の O D 値を用いて、検量線をプロットした (図 1 を参照されたい) 。グラフ中、縦軸 (y 軸) は、O D 値であり、横軸 (x 軸) は I F N - γ に対する抗体の濃度である。プロットした検量線は、以下の等式： $y = - 0 . 0 0 5 2 x ^ 2 + 0 . 1 7 7 x + 0 . 0 1 7 2$ により表すことができる。

5 . ビオチン化 I F N - γ が固定化されているプレートのウェル (表 1 の列 3、5、7、9、1 1)、及びビオチン化 B S A が固定化されているプレートのウェル (表 1 の列 4、6、8、1 0、1 2) における被験試料の平均 O D 値を計算した。例えば、被験試料 S 1 の場合、それぞれウェル A 3、B 3、及び A 4、B 4 について平均 O D 値を計算した。

6 . ビオチン化 I F N - γ が固定化されているプレートのウェルにおいて測定された被験試料の平均 O D 値と、ビオチン化 B S A が固定化されているプレートのウェルにおいて測定された被験試料の平均 O D 値との差として、被験試料の真の O D 値を計算した。例えば、被験試料 S 1 の場合、プレートのウェル A 3、B 3 で測定された平均 O D 値から、プレートのウェル A 4、B 4 で測定された平均 O D 値を減じた。

7 . 検量線 (図 1) を用いて、被験試料におけるヒト I F N - γ に対する希釈自然自

己抗体の濃度を求めた。被験試料におけるヒトIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度の真の値を得るために、得られた結果に試料の希釈係数を乗じた（即ち、100を乗じた）。

8. 結果を表3に示す。

【表3】

被験試料	ヒIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度(単位/mL)
S1	780.1
S2	774.6
S3	288.3
S4	977.1
S5	509.0
S6	688.1
S7	794.5
S8	572.4
S9	453.5
S10	753.1
S11	527.9
S12	298.8
S13	345.6
S14	443.5
S15	621.8
S16	575.2
S17	758.9
S18	857.5
S19	656.2
S20	753.5

【0031】

実施例2

ヒトIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度が増加している感染性単核症の患者20人から血清試料を採取した。

【0032】

被験試料を1,000倍に希釈し、ヒト血清アルブミンをブロッキング剤として使用し、56でインキュベートを行ったことを除いて、ヒトIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度を求めるための工程は全て実施例1に記載した手順と同様であった。

【0033】

検量線を図2に示し、得られた結果を表4に示す。

10

20

30

40

【表 4】

被験試料	ヒIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度(単位/mL)
S1	1675.9
S2	1591.7
S3	1897.5
S4	1480.0
S5	1924.4
S6	1974.6
S7	1537.4
S8	1221.1
S9	1624.5
S10	1569.9
S11	1874.6
S12	1530.2
S13	1870.8
S14	1798.9
S15	2151.8
S16	1882.2
S17	1505.0
S18	1810.2
S19	1526.6
S20	1451.4

【0034】

実施例 3

ヒトIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度を定量的に測定するための本発明の方法を実施したときに技術的な効果が得られる可能性を検証するために、加熱処理を行う前に、被験生物学的流体を鉄含有酸化剤で更に処理した。インターフェロン療法を受けていない20人の健常ドナーから血清試料を採取した。したがって、血清中にヒトのIFN- γ に対する自己抗体は存在しないが、ヒトのIFN- γ に対する自然自己抗体は存在している。

【0035】

Greiner bio-one GmbH製のストレプトアビジンでコーティングされている96ウェルプレート(カタログ番号655990)のウェルの一部に、eBio sciences製の組換え型ヒトIFN- γ (カタログ番号34-8319-85)100 μ Lを接種し、前記ウェルの他の部分(被験試料に対する対照ウェル)に、Sigma Aldrich製のウシ血清アルブミン(カタログ番号A-3803)を接種した。これらは両方共、湿度100%にて100 μ L/ウェルの割合でU-CyTech Bioscience Companyの標準的な手順(標準操作手順番号UCT-127)に従ってビオチン化した(標識の原理は、安定なアミド結合を形成することにより、タンパク質の遊離アミノ基をD-ビオチニル- ϵ -アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS-ビオチン)と反応させ(反応は、穏やかに攪拌しながら室温で2時間インキュベートしている間に生じる);次いで、ビオチン化されたタンパク質をリン酸バッファー溶液で透析して、未反応のNHS-ビオチンを除去するというものであ

る)。

【0036】

血清試料を10倍に希釈し(即ち、1%のTriton-X100及び0.002%のチメロサルを含有するリン酸バッファー90 μ Lで血清10 μ Lを希釈し)、2mMのFeCl₃で処理し、56℃で40分間インキュベートした。

【0037】

次いで、インキュベートした溶液を更に5倍に希釈し(即ち、1%のウシ血清アルブミン(BSA)、1%のTriton-X100、及び0.002%のチメロサルを含有するリン酸バッファー400 μ Lでインキュベートした溶液100 μ Lを希釈し)、プレートのウェルに接種するために用いた(1ウェル当たり100 μ L)。

10

【0038】

検量線をプロットするために、16単位/mL~0.5単位/mLの濃度の標準抗体溶液を調製した(ヒトIFN- γ に対するマウスモノクローナル抗体、クローンMD-2)。本明細書では、100pg/mLのマウスモノクローナル抗体を1単位/mLと定義した。

【0039】

調製した標準抗体、ネガティブコントロールとして用いた溶液(1%のBSA、1%のTriton-X100、及び0.002%のチメロサルを含有するリン酸バッファー)、及び被験試料溶液を、表5に示す通りプレートのウェルに接種し、37℃で2時間インキュベートした。インキュベート後、デカンテーションによりプレートから流体を除去し、標準洗浄溶液(0.05%のTween-20及び0.01%のチメロサルを含有するリン酸バッファー)でプレートを5回すすいだ。

20

【0040】

表5は、プレートのウェルと接種した試料とのチャートを示す。

【表 5】

固定化抗原	I		II		III		IV		V		VI	
	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA	ビオチン化IFN- γ	ビオチン化BSA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	S1	S1	S5	S5	S9	S9	S13	S13	S17	S17
B	P2	P2	S1	S1	S5	S5	S9	S9	S13	S13	S17	S17
C	P3	P3	S2	S2	S6	S6	S10	S10	S14	S14	S18	S18
D	P4	P4	S2	S2	S6	S6	S10	S10	S14	S14	S18	S18
E	P5	P5	S3	S3	S7	S7	S11	S11	S15	S15	S19	S19
F	P6	P6	S3	S3	S7	S7	S11	S11	S15	S15	S19	S19
G	N	N	S4	S4	S8	S8	S12	S12	S16	S16	S20	S20
H	N	N	S4	S4	S8	S8	S12	S12	S16	S16	S20	S20

記号の説明:

P 1: 標準抗体 (16単位/mL)

P 2: 標準抗体 (8単位/mL)

P 3: 標準抗体 (4単位/mL)

P 4: 標準抗体 (2単位/mL)

P 5: 標準抗体 (1単位/mL)

P 6: 標準抗体 (0.5単位/mL)

N: ネガティブコントロール - 1%のBSA、1%のTriton-X100、及び0.002%のチロメサル
を含有するリン酸バッファ

S1～S20:被試験料1～20

IFN- γ - 組換え型ヒトガンマイインターフェロン

BSA - ウシ血清アルブミン

【 0 0 4 1 】

次いで、全てのプレートのウェルに、アルカリホスファターゼとコンジュゲートしているヒトのIgA、IgM、IgGに対するヤギ抗体の混合物 (Sigma Aldrich ; カタログ番号 A - 3 3 1 3) 又はアルカリホスファターゼとコンジュゲートしているマウスのIgGに対するヤギ抗体 (Sigma Aldrich ; カタログ番号 A - 3 5 6 2) を 1 0 0 μ L ずつ接種した。アルカリホスファターゼとコンジュゲートしているマウスのIgGに対するヤギ抗体は、検量線をプロットするために用いるヒトIFN- γ に対するモノクローナル抗体 (MD - 2) の濃度を測定するために使用するものである。次いで、前記プレートを 3 7 で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、デカンテーションによりプレートのウェルから流体を除去し、標準洗浄溶液 (0 . 0 5 % の T w i n - 2 0 及び 0 . 0 1 % のチメロサルを含有するリン酸バッファー) でプレートを 5 回すすいだ。

【 0 0 4 2 】

コンジュゲート含有溶液のインキュベートが終了する 1 5 分間前に、基質バッファー 1

錠とSigma Company製の基質（パラニトロフェニルホスフェート）（カタログ番号N-2770）1錠とを蒸留水20mLに溶解させることにより発色剤溶液を調製した。

【0043】

調製した発色剤溶液100μLを各プレートのウェルに接種し、前記プレートを37で30分間インキュベートした。

【0044】

インキュベート後、全てのプレートのウェルにMerck KgaA製の停止溶液（3Nの水酸化ナトリウム）（カタログ番号1.06495）を接種し、標準的な光度計を用いて405nmの波長における吸光度を測定した。

10

【0045】

得られた測定結果を用いて、IFN-γに対する自然自己抗体の濃度を計算した。この目的のために、標準抗体の光学密度（OD）の真の値、及び被験試料のODの真の値を以下の通り求めた：

1. ネガティブコントロールの平均OD（ウェル1G、1H、2G、2HのODの算術平均値）を計算した。

2. 標準抗体の平均OD（それぞれの標準P1～P6のウェルにおけるODの算術平均値）を計算した。

3. 標準抗体のODの平均値とネガティブコントロールのODの平均値との差として、標準抗体のODの真の値を計算した。

20

計算結果を表6に示す。

【表6】

		1	2		OD平均値:		標準抗体のOD値 —ネガティブコントロールの平均OD値:
P1	A	1.798	1.781	→	1.790	→	1.657
P2	B	1.253	1.311		1.282		1.149
P3	C	0.806	0.744		0.775		0.642
P4	D	0.509	0.577		0.543		0.410
P5	E	0.284	0.338		0.311		0.178
P6	F	0.219	0.235		0.227		0.094
N	G	0.138	0.125				
N	H	0.139	0.129		0.133		

30

4. 得られた標準抗体の真のOD値を用いて、検量線をプロットした（図3を参照されたい）。グラフ中、縦軸（y軸）は、OD値であり、横軸（x軸）はIFN-γに対する抗体の濃度である。プロットした検量線は、以下の等式： $y = -0.0049x^2 + 0.1807x + 0.0184$ により表すことができる。

40

5. ビオチン化IFN-γが固定化されているプレートのウェル（表5の列3、5、7、9、11）、及びビオチン化BSAが固定化されているプレートのウェル（表5の列4、6、8、10、12）における被験試料の平均OD値を計算した。例えば、被験試料S1の場合、それぞれウェルA3、B3、及びA4、B4について平均OD値を計算した。

6. ビオチン化IFN-γが固定化されているプレートのウェルにおいて測定された被験試料の平均OD値と、ビオチン化BSAが固定化されているプレートのウェルにおいて測定された被験試料の平均OD値との差として、被験試料の真のOD値を計算した。例えば、被験試料S1の場合、プレートのウェルA3、B3で測定された平均OD値から、

50

プレートのウェル A 4、B 4 で測定された平均 O D 値を減じた。

7. 検量線 (図 3) を用いて、被験試料におけるヒト I F N - γ に対する希釈自然自己抗体の濃度を求めた。被験試料におけるヒト I F N - γ に対する自然自己抗体の濃度の真の値を得るために、得られた結果に試料の希釈係数を乗じた (即ち、100 を乗じた)。

8. 結果を表 7 に示す。

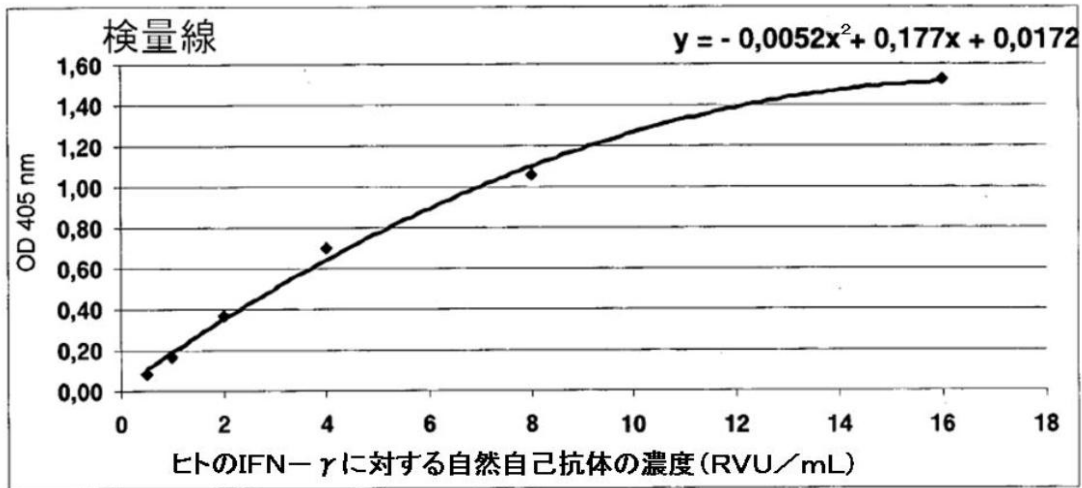
【表 7】

被試験試料	ヒIFN- γ に対する自然自己抗体の濃度(単位/mL)
S1	744.4
S2	935.6
S3	876.8
S4	563.9
S5	1001.1
S6	957.6
S7	1019.1
S8	794.7
S9	592.5
S10	1088.8
S11	1116.4
S12	1006.8
S13	1036.6
S14	428.0
S15	422.2
S16	1433.9
S17	1042.9
S18	1354.5
S19	702.5
S20	1344.2

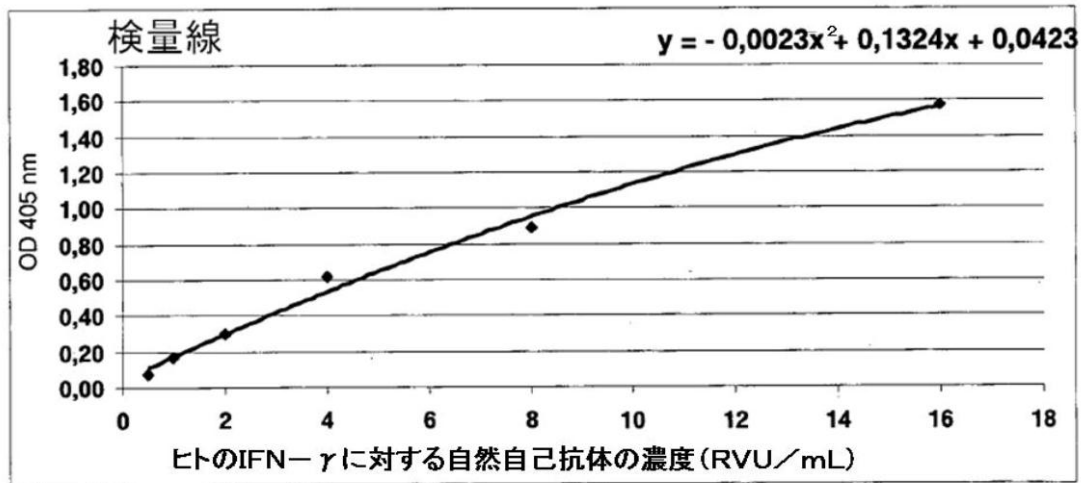
【0046】

したがって、ヒトの I F N - γ に対する自然自己抗体を含有する血清に本発明を適用した実施例により、本発明の特徴を組み合わせる実施した際のヒト I F N - γ に対する自然自己抗体の濃度の定量的測定の効率及び信頼性が証明された。また、実施例 3 の通り、被験生物学的流体を更に処理すると本発明の方法の効率が高まる。

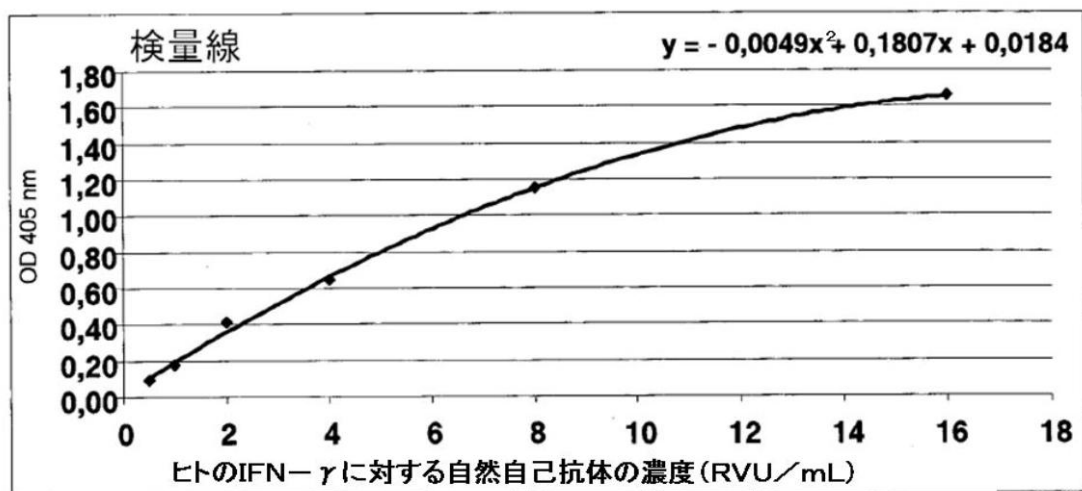
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 スヴェトラナ アレクサンドロヴナ・セルゲーエワ
ロシア共和国 117535 モスクワ ウリツァ ロッソチャンスカヤ 1 / 1 - 214
- (72)発明者 セルゲイ アレクサンドロヴィッチ・タラソフ
ロシア共和国 143040 モスコフスカヤ オブラスチ オディンツォヴスキー アール - エ
ヌ ゴリツィノ ウリツァ ソヴェトスカヤ 56 / 3 - 97, 98
- (72)発明者 アレクサンダー ウラジーミロヴィッチ・タラソフ
ロシア共和国 143040 モスコフスカヤ オブラスチ オディンツォヴスキー アール - エ
ヌ ゴリツィノ ウリツァ ソヴェトスカヤ 56 / 3 - 97, 98
- (72)発明者 ペーター ハイチ・ファン デル メイデ
オランダ NL - 3951 ビーケー マルン パーツ ボス 27

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表2002 - 518675 (JP, A)
特開昭61 - 076423 (JP, A)
Gross J et al, J Immunol Methods, 2006年 6月30日, 313(1-2), 176-182
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33 / 53 - 33 / 577

专利名称(译)	使用酶免疫测定法测量自身抗体浓度的方法		
公开(公告)号	JP5785959B2	公开(公告)日	2015-09-30
申请号	JP2012551116	申请日	2011-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	胸部特尔诺沃ES小仓利基诺瓦奥托已经托斯特已经卢武铉斯图现在化工技术专业伊豆特尔诺沃多斯特哥德堡，娜雅医药本草控股		
申请(专利权)人(译)	胸部特尔诺沃ES Oguranichenowa奥托已经托斯特已经卢武铉斯图“Naukuno - 专业伊豆特尔诺沃多斯特哥德堡，娜雅医药”本草控股“		
当前申请(专利权)人(译)	胸部特尔诺沃ES Oguranichenowa奥托已经托斯特已经卢武铉斯图“Naukuno - 专业伊豆特尔诺沃多斯特哥德堡，娜雅医药”本草控股“		
[标]发明人	スヴェトラナアレクサンドロヴナセルゲーエフ セルゲイアレクサンドロヴィッチタラソフ アレクサンダーウラジーミロヴィッチタラソフ ペーターヘイチファンデルメイデ		
发明人	スヴェトラナ アレクサンドロヴナ・セルゲーエフ セルゲイ アレクサンドロヴィッチ・タラソフ アレクサンダー ウラジーミロヴィッチ・タラソフ ペーター ヘイチ・ファン デル メイデ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.U G01N33/543.545.A G01N33/543.545.J		
代理人(译)	广田幸一		
优先权	2010117620 2010-05-05 RU 2010102114 2010-01-26 RU		
其他公开文献	JP2013518277A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用物理吸着固相是链亲和素包被的，治疗与生物素化的蛋白以阻断生物素化抗原的非特异性结合位点的物理吸着固相物理吸附固相涉及定量测量方法在人类生物流体天然自身抗体。含有共轭物的溶液，其中包括单克隆抗体或多克隆酶标记的抗体与一种或全部人免疫球蛋白同种型的反应。和蛋白以阻断非特异性与含有基板，以防止在热处理时，热处理的天然自身抗体的降解的缓冲物理吸附固相，预先稀释的测试生物流体的结合。使用控制物理吸着固相对于每个生物流体试样。使用使用单克隆和多克隆抗体对抗原的校准曲线绘制测定自身抗体的自然数。点域1

(21) 出願番号	特願2012-551116 (P2012-551116)	(73) 特許権者	512195980
(86) (22) 出願日	平成23年1月24日 (2011.1.24)		
(65) 公表番号	特表2013-518277 (P2013-518277A)		
(43) 公表日	平成25年5月20日 (2013.5.20)		
(86) 国際出願番号	PCT/RU2011/000034		
(87) 国際公開番号	WO2011/093745		
(87) 国際公開日	平成23年8月4日 (2011.8.4)		
審査請求日	平成25年11月28日 (2013.11.28)		
(31) 優先権主張番号	2010117620	(74) 代理人	100107515
(32) 優先日	平成22年5月5日 (2010.5.5)		
(33) 優先権主張国	ロシア (RU)	(74) 代理人	弁理士 廣田 浩一
(31) 優先権主張番号	2010102114		
(32) 優先日	平成22年1月26日 (2010.1.26)	(74) 代理人	弁理士 流 良広
(33) 優先権主張国	ロシア (RU)		
		(74) 代理人	100115347
			弁理士 松田 奈緒子