

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4755112号
(P4755112)

(45) 発行日 平成23年8月24日(2011.8.24)

(24) 登録日 平成23年6月3日(2011.6.3)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 F
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 G
	GO 1 N 33/577 B
請求項の数 17 (全 15 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2006-549047 (P2006-549047)	(73) 特許権者 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
(86) (22) 出願日 平成17年12月22日(2005.12.22)	(74) 代理人 100133905 弁理士 石井 良夫
(86) 国際出願番号 PCT/JP2005/023568	(74) 代理人 100113837 弁理士 吉見 京子
(87) 国際公開番号 W02006/068206	(74) 代理人 100127421 弁理士 後藤 さなえ
(87) 国際公開日 平成18年6月29日(2006.6.29)	(74) 代理人 100090941 弁理士 藤野 清也
審査請求日 平成20年9月8日(2008.9.8)	(72) 発明者 本庄 由紀 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 第一 化学薬品株式会社診断薬研究所内
(31) 優先権主張番号 特願2004-373382 (P2004-373382)	
(32) 優先日 平成16年12月24日(2004.12.24)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原を測定するための試薬及び抗原の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫凝集反応により抗原を測定するための試薬において、
検体中に含まれる遊離型の抗原および該遊離型の抗原と共存物質とで複合体を形成する複合体型の抗原に対する少なくとも3種類の抗体を含み、
該抗体のうち少なくとも2種類の抗体は、担体に感作され、かつ、該両抗原に反応するものであり、

該抗体の混合比率は、該両抗原と所定のモル反応性を示すように調整されている、抗原の測定試薬。

【請求項2】

所定のモル反応性が等モル反応性である請求項1に記載の抗原の測定試薬。

【請求項3】

抗体が3種類である請求項1又は2に記載の抗原の測定試薬。

【請求項4】

抗体が全て担体に感作されている請求項1～3のいずれかに記載の抗原の測定試薬。

【請求項5】

1種類の抗体が感作された担体と、他の1種類の抗体が感作された担体の粒径が異なる請求項1～4のいずれかに記載の抗原の測定試薬。

【請求項6】

共存物質が蛋白質である請求項1～5のいずれかに記載の測定試薬。

【請求項 7】

蛋白質が、遊離型の抗原と複合体を形成することにより該遊離型の抗原が有する活性を阻害するもの、又はアルブミンである、請求項 6 に記載の測定試薬。

【請求項 8】

遊離型の抗原と複合体を形成することにより該遊離型の抗原が有する活性を阻害するものが、プロテアーゼインヒビター、又は遊離型の抗原の輸送蛋白である請求項 7 に記載の測定試薬。

【請求項 9】

遊離型の抗原が、プロテアーゼ、ホルモン、又は薬物である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の測定試薬。

10

【請求項 10】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗原の測定試薬。

【請求項 11】

免疫凝集反応により P S A を測定するための試薬において、
P S A - A C T 及び f P S A の両方に反応し、認識部位の異なる 3 種類のモノクローナル抗体を感作したラテックスを含み、
そのうち 2 種類の抗体をそれぞれ感作したラテックスが、他の 1 種類の抗体を感作したラテックスよりもその粒径が大きく、
各抗体の混合比率が、該両抗原と等モル反応性を示すように調製されている、P S A の測定試薬。

20

【請求項 12】

抗体をそれぞれ感作した担体が 1 の試薬に含まれている請求項 11 に記載の P S A の測定試薬。

【請求項 13】

他の 1 種類の抗体を感作したラテックスの粒径が $0.02 \sim 0.22 \mu\text{m}$ である請求項 11 又は 12 に記載の P S A の測定試薬。

【請求項 14】

免疫凝集反応による P S A 測定試薬の製造方法において、
P S A - A C T 抗原及び f P S A 抗原の両方に反応し認識部位の異なる 3 種類の抗体を感作した担体を用意し、
あらかじめ 3 種類の抗体のうち 2 種類の抗体をそれぞれ感作した担体の混合比率を所定の範囲に設定し、
次に、他の 1 種類の抗体を感作した担体を前記 2 種類の抗体の混合物に添加し、両抗原と抗体が所定のモル反応性を示すように調整することを特徴とする P S A 測定試薬の製造方法。

30

【請求項 15】

所定のモル反応性が等モル反応性である請求項 14 に記載の P S A 測定試薬の製造方法。

【請求項 16】

免疫凝集反応による P S A の測定方法において、
P S A - A C T 及び f P S A の両方に反応し、認識部位の異なる 3 種類の抗体を感作した担体を含み、
そのうち 2 種類の抗体を感作した担体が、他の 1 種類の抗体を感作した担体よりもその粒径が大きく、かつ
3 種類の各抗体の混合比率が、該両抗原と抗体が所定のモル反応性を示すように調整されている測定試薬を用いて検体中の P S A を測定する方法。

40

【請求項 17】

所定のモル反応性が等モル反応性である請求項 16 に記載の検体中の P S A を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫凝集反応により抗原を測定するための測定試薬及び抗原の測定方法に関する。詳しくは、ラテックス免疫比濁法（L T I A法）により抗原を測定するにあたり、遊離型の抗原（例えばf P S A）と検体中の共存物質と複合体を形成している複合体型の抗原（例えばP S A - A C T）の反応性を調整して測定する抗原の測定試薬および測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

前立腺癌は男性にみられる悪性疾患であり、特に米国及び日本において、急激に増加している腫瘍である。前立腺癌は増殖の遅い腫瘍であること、放射線療法や抗男性ホルモン療法が奏効しやすいという特徴があることから、早期発見が重要な課題である。

10

【0003】

ここで、前立腺上皮細胞から分泌され前立腺癌細胞によっても産生される前立腺特異抗原（以下単にP S Aということがある）は、セリンプロテアーゼの一種で、分子量33、000～34、000ダルトンの糖蛋白である。そして、P S Aには、血中でプロテアーゼインヒビターと結合する複合体型と、非結合の遊離型前立腺癌特異抗原（以下f P S Aということがある）が存在するが、血中のP S Aの多くは複合体型であり、1 - アンチキモトリプシン複合前立腺特異抗原（以下P S A - A C Tということがある）や2 - マクログロブリン複合前立腺特異抗原等がある。このうち、免疫法で測定できるのは、f P S AとP S A - A C Tの2種類であり、日本で現在実用化されている20種を超える血清中P S Aの総量を測定するキットにおいて、被検液によってその測定値と真の値との乖離の程度が異なることが問題となっている。この主な原因は、個々のキットで、f P S AとP S A - A C Tに対する測定試薬の反応性に違いがあることによるものと考えられている。

20

【0004】

すなわち、免疫法のうちでもラテックス等を用いた凝集反応によるいわゆる免疫凝集反応測定法では、抗原抗体反応が1段階で行われるため、P S Aに対するモノクローナル抗体の、f P S Aと反応性及びP S A - A C Tとの反応性が異なり、その結果測定結果に誤差が生じるという問題があった。

30

【0005】

このような問題を解決する従来技術として、例えば特許文献1には、f P S Aにおける1 - アンチキモトリプシンと結合可能な領域に抗体を結合させ、f P S AとP S A - A C Tの分子量を近づけ、エピトープの数を揃えることでP S Aに対する抗体に対する、f P S Aの反応性とP S A - A C Tの反応性を近づけることで、該抗体を感作した担体と両者のP S Aとを等モル対応で測定することを可能としたことが記載されている。

【特許文献1】特開2001 - 311733号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

40

しかし、上記従来 of 測定方法は、あらかじめf P S Aとのみ反応するという特殊な抗体を必要とするという問題があった。また、該特殊な抗体を用いてf P S Aと反応させるという前処理をした後に、両P S Aに対する抗体を感作した担体を用いてP S Aの総量を測定するものであり、2段階の反応を行わせる必要があった。

従って、より簡便かつ正確にP S Aの総量を測定する方法の開発が望まれていた。なお、特に断らない限りはP S Aの測定とは、P S Aの総量を測定することを意味する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、免疫凝集法を用いた抗原の測定法について鋭意検討を行ったところ、検体中に含まれる遊離型の抗原および該遊離型の抗原と共存物質とで複合体を形成する複合

50

体型の抗原について認識部位の異なる少なくとも3種類の抗体を含み、該抗体のうち少なくとも2種類の抗体は、担体に感作され、かつ、両抗原に反応するものを測定用試薬として構成したところ、各抗体の混合比率を調整することで、該両抗原の反応性を調整することができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下の構成を有する。

(1) 免疫凝集反応により抗原を測定するための試薬において、

検体中に含まれる遊離型の抗原および該遊離型の抗原と共存物質とで複合体を形成する複合体型の抗原について認識部位の異なる少なくとも3種類の抗体を含み、

該抗体のうち少なくとも2種類の抗体は、担体に感作され、かつ、該両抗原に反応するものであり、

10

該抗体の混合比率は、該両抗原と所定のモル反応性を示すように調整されている、抗原の測定試薬。

(2) 所定のモル反応性が等モル反応性である請求項1に記載の抗原の測定試薬。

(3) 抗体が3種類である前記(2)に記載の抗原の測定試薬。

(4) 抗体が全て担体に感作されている前記(1)~(3)のいずれかに記載の抗原の測定試薬。

(5) 1種類の抗体が感作された担体と、他の1種類の抗体が感作された担体の粒径が異なる前記(1)~(4)のいずれかに記載の抗原の測定試薬。

(6) 共存物質が蛋白質である前記(1)~(5)のいずれかに記載の測定試薬。

(7) 蛋白質が、遊離型の抗原と複合体を形成することにより該遊離型の抗原が有する活性を阻害するもの、又はアルブミンである、前記(6)に記載の測定試薬。

20

(8) 遊離型の抗原と複合体を形成することにより該遊離型の抗原が有する活性を阻害するものが、プロテアーゼインヒビター、又は遊離型の抗原の輸送蛋白である前記(7)に記載の測定試薬。

(9) 遊離型の抗原が、プロテアーゼ、ホルモン、又は薬物である前記(1)~(8)のいずれかに記載の測定試薬。

(10) 抗体がモノクローナル抗体である前記(1)~(9)のいずれかに記載の抗原の測定試薬。

(11) 免疫凝集反応によりPSAを測定するための試薬において、

PSA-AC T及びfPSAの両方に反応し、認識部位の異なる3種類のモノクローナル抗体を感作したラテックスを含み、

30

そのうち2種類の抗体をそれぞれ感作したラテックスが、他の1種類の抗体を感作したラテックスよりもその粒径が大きく、

各抗体の混合比率が、該両抗原と等モル反応性を示すように調製されている、PSAの測定試薬。

(12) 抗体をそれぞれ感作した担体が1の試薬に含まれている前記(11)に記載のPSAの測定試薬。

(13) 他の1種類の抗体を感作したラテックスの粒径が0.02~0.22 μ mである前記(11)又は(12)に記載のPSAの測定試薬。

(14) 免疫凝集反応によるPSA測定試薬の製造方法において、

40

PSA-AC T抗原及びfPSA抗原の両方に反応し認識部位の異なる3種類の抗体を感作した担体を用意し、

あらかじめ3種類の抗体のうち2種類の抗体をそれぞれ感作した担体の混合比率を所定の範囲に設定し、

次に、他の1種類の抗体を感作した担体を前記2種類の抗体の混合物に添加し、両抗原と抗体が所定のモル反応性を示すように調整することを特徴とするPSA測定試薬の製造方法。

(15) 所定のモル反応性が等モル反応性である前記(14)に記載のPSA測定試薬の製造方法。

(16) 免疫凝集反応によるPSAの測定方法において、

50

PSA - ACT及びfPSAの両方に反応し、認識部位の異なる3種類の抗体を感作した担体を含み、

そのうち2種類の抗体を感作した担体が、他の1種類の抗体を感作した担体よりもその粒径が大きく、かつ

3種類の画抗体の混合比率が、該両抗原と抗体が所定のモル反応性を示すように調整されている測定試薬を用いて検体中のPSAを測定する方法。

(17) 所定のモル反応性が等モル反応性である前記(16)に記載の検体中のPSAを測定する方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明の抗原の測定試薬は、特殊な反応性を有する抗体を用いることなく、常法により得られる抗体を適宜組み合わせることにより簡便かつ安価に試薬を調整することができる。また、抗体を全て担体に感作させた場合には、試薬としての安定性に優れ、品質管理も簡便になり、安定した試薬の供給が期待できる。さらに、この場合、抗体を感作させた試薬を1試薬として用いることができ、測定も1段階の反応で行わせることができ、測定が簡便で、測定時間の短縮を図ることもできる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】各抗体のfPSA、PSA - ACTに対する反応性(Western Blot法)を示す画像である。

【図2 - 1】c/f比に対する#16Lx添加の効果を示すグラフである(試験例1 - 1)。

【図2 - 2】c/f比に対する#16Lx添加の効果を示すグラフである(試験例1 - 2)。

【図3】c/f比に対するフリーの抗体#16添加の効果を示すグラフである。

【図4】#16Lxのラテックスサイズによるc/f比の改善効果を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(対象試料)

本発明の抗原測定試薬の対象試料としては、抗原が含まれている試料であり、例えば血液、血清、血漿、リンパ球培養上清、尿、髄液、唾液、汗、腹水、又は細胞あるいは臓器の抽出液等が挙げられる。抗原がPSAの場合、PSA - ACT複合体が含まれる可能性のある前記生体試料であればいずれも対象となる。

【0011】

(抗原)

本発明で測定の対象とする抗原とは、免疫凝集法により測定できるものであれば、いずれも対象とできる。例えば、対象試料となる検体中で、遊離型及び共存物質と複合体を生成する複合体型の両者の存在形態を有するような抗原を対象とする。共存物質としては、遊離型の抗原と複合体を形成することにより該遊離型の抗原が有する活性を阻害するような、プロテアーゼインヒビター、遊離型の抗原の輸送蛋白、アルブミン等の蛋白質が挙げられる。より具体的には、遊離型の抗原として、プロテアーゼ(PSA、MMP(マトリックスメタロプロテイナーゼ)、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、カテプシン)、ホルモン(T3(トリヨードサイロニン)及びT4(サイロキシン)等)、薬物等が挙げられる。例えば、PSAでは、前記の如くfPSAとPSA - ACTが存在し、T3及びT4では、サイロキシン結合グロブリン(輸送蛋白)と結合した複合体型と遊離型とが存在し、血中薬物についても、アルブミンと結合した複合体型と遊離型とが存在する。

【0012】

(抗体)

本発明で用いる抗体は、測定対象の抗原の遊離型と複合体型の両方に反応する抗体を少

10

20

30

40

50

なくとも2種類用いる。抗体は、ウサギ、ヒツジ、ヤギ等に免疫して得られるポリクローナルな抗体やモノクローナルな抗体を用いることができる。そのうちでもモノクローナル抗体が特に望ましい。また、抗体全体でもかまわないが、常法に従い酵素で切断したフラグメントであってもよい。なお、使用するモノクローナル抗体は、常法により得ることができる。

本発明ではモノクローナル抗体を用いる場合、サンドイッチ法、競合法などによりその組み合わせに適した抗体を適宜選択することができる。

本発明で用いる抗体は抗原との反応性が異なる必要がある。ここで反応性が異なるとは、抗原に対する抗体の親和性、結合力、エピトープ等が異なることをいう。エピトープが異なるとは、認識部位が一部重複したり、近接するような場合も含むものとする。

10

【0013】

(担体)

本発明で使用する抗体を感作する担体は、特に限定されないが、ラテックスが好ましい。ラテックスとしては、免疫学的測定法で用いられる物理的吸着法で使用されるポリスチレンからなる一般的なラテックスが使用可能であり、材質は感作方法に適したのなら特にこだわらない。材質は他に、スチレン-ブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステル類ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。ラテックスに抗体を感作する方法は一般的に使用されている物理的吸着法が採用できるが、化学結合法も採用できる。

20

本発明で用いるラテックスは同一種類、あるいは2種類以上を用いることができ、粒径の異なる2種類以上を用いることが望ましい。さらに、異なる粒子径を混合したラテックスを用いることもできる。

【0014】

(抗体の選択)

抗体は次のようにして選択する。抗原がPSAであり、抗体を3種類選択する場合を例に説明する。抗体は、まずELISA法などにより、PSA-ACTとfPSAとの反応性が高い、つまり力価の高い抗体を選択することが望ましく、また、担体は、十分な測定感度が得られるものを選択することが望ましい。次に、選択された力価の高い抗体から、2種類の抗体を適当に選んでそれぞれ担体に感作し、PSA-ACTとfPSAを試料

30

として測定したとき、両試料との反応性の差が小さく、かつ十分な測定感度の得られる抗体の組み合わせを選択する。これらの抗体を主反作用の抗体とする。次に、別の抗体を主反応中に共存させたときに、主反応に用いる抗体のPSA-ACT及びfPSAとの反応性を調整することができる抗体を選択する。これを反応調整用の抗体とする。なお、反応調整用の抗体は担体に感作させてもよいが、感作させる場合の担体は、主反作用の抗体を感作させる担体よりも小さいサイズが好ましい。

反応調整用の抗体は、PSA-ACTとfPSAとの反応性に差があるものが好ましい。

【0015】

(抗体の混合比率)

40

抗体の混合比率は、遊離型の抗原及び複合体型の抗原の両抗原に対し所定のモル反応性を示すように調整することが必要である。本発明では抗体の混合比率を調整することで、抗原のモル反応性を調整することに特徴があり、測定の目的、必要精度に応じて所定の範囲に調整することができる。このうちでも等モル反応性を示すように調整すれば、遊離型および複合体型の抗原濃度を等しく測定することができる。

ここで、等モル反応性とは、抗原と抗体とを反応させ、抗体を感作させた担体同士が凝集反応を起こすことによって凝集する反応性が、遊離型と複合体型とで実質的に等しくなることをいう。具体的には、抗原がPSAの場合、PSAとして同濃度のfPSAとPSA-ACTが存在する場合、凝集反応により測定されるPSA濃度が実質的に等しくなることをいう。また、実質的に等しいとは、両抗原の凝集シグナルの比が80-120%、

50

好ましくは90 - 110%となることをいう。

【0016】

本発明では、両抗原の免疫凝集反応において、抗体の混合比率を適宜調整することにより、抗原と抗体の反応が所定のモル反応性を示すことを見出した。例えば、PSA - ACT抗原及びfPSA抗原の両方に反応する認識部位の異なる3種類の抗体をそれぞれ担体に感作させ、等モル反応性を示す試薬を得る場合、各抗体の混合比率は、次のようにして調整することになる。まず、2種類の抗体をそれぞれ感作した担体を用い、両抗原が示す等モルあたりの凝集シグナルの比(PSA - ACT / fPSA比、以下単にc / f比ということがある)を求め、次に、該c / f比が80 - 120%、好ましくは90 - 110%となるように別の1種類の抗体を感作した担体を添加することにより行う。

10

【0017】

c / f比の調整は、担体に感作させた抗体を用いることもでき、また、担体に感作しないフリーの抗体を用いて行うこともできる。また、調整用の抗体は1種類でもよく、2種類以上であってもよい。なお、フリーの抗体を用いる場合は、必要に応じて他の抗体を感作した担体と凝集反応を起こさないように試薬を別にする必要がある。

【0018】

調整用の抗体を担体に感作させる場合は、主反応に用いた抗体を感作させた担体よりも粒径の小さな担体を用いることが望ましい。その方が調整しやすいからである。具体的には0.02 ~ 0.22 μm の範囲が望ましく、より好ましくは、0.05 ~ 0.09 μm の範囲が望ましい。また、主反応に用いた抗体を感作させた担体の粒径は0.1 ~ 0.5 μm であることが好ましい。更に好ましくは、調整用の抗体を感作させる担体の粒径は、主反応の抗体を感作させる担体の粒径の2 / 3 ~ 1 / 10、好ましくは1 / 5 ~ 1 / 8である。

20

ここでいう、抗体の混合比率とは、抗体の濃度比率でもあり、また、抗体を一定割合で担体に感作させた場合は、担体の濃度比率がこれに相当する。

【0019】

(緩衝液)

本発明における抗原抗体反応は緩衝液中で行われ、その緩衝液は、抗原抗体反応が最適に行われる種類、濃度、pHが選択され、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、炭酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッドの緩衝液等を用いる事ができる。その測定液中の緩衝剤の濃度は10 mM ~ 500 mM程度で用いられ、また、そのpHは中性域から塩基性域で用いられることが多く、通常7.0 ~ 9.5の範囲で用いられる。

30

【0020】

(凝集シグナルの測定方法)

凝集シグナルの測定は、通常凝集反応測定に用いられる測定方法であればいずれでもよく、吸光度、粒子数、粒子サイズ測定、散乱光測定などがあげられる。

例えば、PSAの測定方法は、次の様に行われる。測定試薬には少なくとも3種類以上の抗体が含まれ、そのうち2種類以上はラテックス等の担体に結合し、かつfPSA及びPSA - ACTの両方に反応する抗体である。従って、このような抗体と抗原とを反応させると、fPSA及びPSA - ACTは担体に感作させた抗体と反応することで凝集することになる。これは、担体に感作した抗体を用いる凝集反応の場合、抗原1分子に対して2つ以上の担体に感作した抗体が結合すれば、原理上、凝集として観察することができるからである。従って、その凝集の程度を測定し、PSA濃度の判っている標準液の凝集の程度と比較することで、試料中の総PSA濃度を定量することができる。

40

【0021】

凝集シグナルの検出は、種々の方法があるが、汎用の生化学分析装置を用いる方法が便利である。例えば、抗原を含む試料に試薬を加え一定温度で一定時間放置し、この間の吸光度を測定し、吸光度の変化量を検出し、標準液の検量線から被検体液の濃度を算出することができる。ラテックス凝集法では、通常500 ~ 900 nmの波長の吸光度が用いられ、反応の吸光度の変化量を定量に用いるのが一般的である。

50

【0022】

(試薬の製造方法)

本発明のPSA測定試薬の製造は、以下のように行う。

PSA-ACT抗原及びfPSA抗原の両方に反応し認識部位の異なる3種類の抗体を感作した担体を用意し、あらかじめ3種類の抗体のうち2種類の抗体をそれぞれ感作した担体の混合比率を所定の範囲に設定し、次に、他の1種類の抗体を感作した担体を前記2種類の抗体の混合物に添加し、両抗原と抗体が所定のモル反応性を示すように調整することにより製造することができる。

【実施例】

【0023】

10

[モノクローナル抗体の作成]

1. 免疫

(1) 免疫原

免疫原としてヒト精液由来精製PSA(SCIPAC社製 Code No. P117-7 精製度96%)を用いた。精製PSAは、PBSで透析後に使用した。

(2) 免疫方法

上記PSA溶液とCFA(完全フロイントアジュバント:GIBCO社製)とを1対1で混和乳化し、6週齢の雌Balb/Cマウスの背部皮下に25µgPSA/匹となるように投与した。2週間間隔で追加免疫を3回行い、更に細胞融合の3日前にPSA溶液(25µg/匹)をマウスの腹腔内に投与した。

20

【0024】

2. 細胞融合

上記PSAを免疫した後のマウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞を取り出した。この脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞SP2/O-Ag14とを6対1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール1540(和光純薬社製)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 個となるようにHAT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2週間培養した。

【0025】

3. スクリーニング

30

融合細胞を分注した培養プレートの各ウェルの培養上清を用い、次に示すELISA法にてfPSA及びPSA-ACTの両者と反応するウェルを選択した。

(1) 材料: 抗原

1) PSA(PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN): SCIPAC、Code No. P117-7

2) PSA-ACT Complex(PSA-1-ANTICHYMOTRYPSIN): SCIPAC、Code No. P192-3

(2) 方法

1) ヤギ抗マウスIgG(Fc)抗体(Jackson社製)5µg/mlをELISA用プレート(Nunc)にコートし(50µl/well)、4で一夜静置した。

40

2) 洗浄液(0.05%Tween20-PBS)で3回洗浄後(400µl/well)、ブロッキング液(0.05%Tween20-PBS)を各ウェルに200µlとなるように分注し、室温で1時間静置した。

3) ブロッキング液を除去した後、融合細胞を分注したプレートの各ウェルの培養上清をELISA用プレートの各ウェルに50µlずつ分注し、室温で1時間静置した。

4) 洗浄液(0.05%Tween20-PBS)で3回洗浄後、0.05%Tween20-PBSで5ng/mlに希釈したfPSA、またはPSA-ACTを各ウェルに50µlずつ分注し、室温で1時間静置した。

5) 洗浄液で3回洗浄後、HRP-ウサギ抗ヒトPSA抗体(x500)を各ウェルに50µlずつ分注し、室温で1時間静置した。なお、HRP-ウサギ抗ヒトPSA抗体は、

50

ウサギ抗ヒトPSA抗体(DAKO社)及びペルオキシダーゼ(東洋紡社製)を用い、過ヨウ素酸法にて作製した。

6) 3回洗浄後、OPD発色液を各ウェルに50 μ lずつ分注し、室温で10分間静置した。

7) 停止液(1.5N硫酸)を各ウェルに50 μ lずつ分注し、反応を停止した後、プレートリーダーを用い492nmの波長で吸光度を測定した。

【0026】

4. クローニング

上記スクリーニングにより、fPSAとPSA-ACTの両者に反応したウェルの細胞株を限界希釈法によりクローン化を行い、ハイブリドーマを樹立した。この結果、樹立したハイブリドーマは20種類得られた。

【0027】

5. モノクローナル抗体の調製

予め2週間前にプリスタン0.5mlを腹腔内に注射しておいた8週齢の雌Balb/Cマウスに、前記クローニングにより得られた各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。2週間後腹水を採取し、プロテインAカラム(アマシャム社製)にてIgG画分を精製した。この結果20種類の各モノクローナル抗体の精製画分が得られた。

【0028】

[モノクローナル抗体および担体の選択]

上記で得られた20種類のモノクローナル抗体について、抗体をラテックスに感作してラテックス凝集の検討を以下の通り行い、シグナルが大きい3種類の抗体#14MoAb、#16MoAb、#17MoAb(各々の定義は後記)、及びそれらのラテックスとの組合せを得た。1. 抗体の一次選択

(1) 20mM Tris HCl (pH 8.5)で希釈した1%の0.312 μ mラテックス溶液と20種のMoAb溶液(0.6Abs)を1vol:1volで混合し、4、2hr攪拌した。

(2) 0.4% BSA in 20mM Tris HCl (pH 8.5)を2vol添加し、4、1hr攪拌した。

(3) 遠心分離にて上清を除去し、5mM MOPS (pH 7.0)でけん濁し、Abs 600nmで2Absに調整した。

(4) 20種類から選ばれた2種類のMoAb-Lx(抗体感作ラテックス)を1vol:1volで混合し試薬2とする(全組合せについて同様に調製し検討した)。

(5) 試薬1(30mM HEPES pH 7.0、0.1%BSA、0.5M NaCl)と試薬2を用い、26ng/mlのfree-PSA、PSA-ACTを日立7170形自動分析装置で測定した。

(6) 凝集するMoAbの組合わせ(吸光度の高いもの)12種類、MoAbとしては8種類を選択した。

【0029】

2. 抗体の二次選択

(7) 2.9、8.7、26ng/mlのfPSA、PSA-ACTを日立7170形自動分析装置で測定し、吸光度が高く、各濃度でのPSA-ACT/fPSA比が1に近くなる組合せを主反作用の抗体として選択した(#14MoAb、#17MoAb)。

なお、二次選択した組合わせの抗体のそれぞれとの組合せにおいて、反応に強弱があるモノクローナル抗体を反応調整用の抗体として選択した(#16MoAb)。

【0030】

3. ラテックスの選択

(8) ラテックスの種類: 0.39、0.31、0.30、0.23 μ m(高反応性用: 吸光度が高くなるラテックス)、0.22、0.087、0.055 μ m(反応調整用)を用い、上記(1)~(4)に準じて抗体感作ラテックスを調製した。

10

20

30

40

50

(9) 2.9、8.7、26 ng/ml の fPSA、PSA-ACT を日立 7170 形自動分析装置で測定し、吸光度が高く、各濃度での PSA-ACT / fPSA 比が 1 に近くなる組合わせを選択した。

(10) #14 MoAb - 0.229 μm、#17 MoAb - 0.385 μm、#16 MoAb - 0.055 μm を選択した。

(11) それぞれの組合わせで MoAb 濃度、ラテックス濃度、抗体感作ラテックス濃度、感作条件 (緩衝液、pH、時間)、抗体感作ラテックス混合比率の至適条件を設定し、以下の試験例に用いた。

【0031】

[ウエスタンブロット法による各モノクローナル抗体の解析]

10

前記で得られた 3 種類のモノクローナル抗体 (#14 MoAb、#16 MoAb、#17 MoAb) の fPSA 及び PSA-ACT に対する反応性について次に示すウエスタンブロット法による解析を行った。

【0032】

1. 材料

(1) 抗原

1) PSA (PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN) : SCIPAC、Code No. P117-7

2) PSA-ACT Complex (PSA-1-ANTICHYMOTRYPSIN) : SCIPAC、Code No. P192-3

20

【0033】

(2) 抗体

1) Anti-PSA MoAb (63214 (#14 と略す)) : 上記「モノクローナル抗体の作成」に従って得られた抗体

2) Anti-PSA MoAb (63216 (#16 と略す)) : 同上

3) Anti-PSA MoAb (63217 (#17 と略す)) : 同上

4) Anti-PSA MoAb (No. 56) : (株)日本医学臨床検査研究所製、lot. 031-02-003

5) Anti-PSA MoAb (4D10) : (株)日本医学臨床検査研究所製、lot. 031-01-004

30

6) Normal mouse IgG : (自社調製)

7) Rabbit Anti-Human PSA (Rb抗PSA PoAb) : DAKO社製、Code No. A0562

8) Rabbit Anti-Human ACT (Rb抗ACT PoAb) : DAKO社製、Code No. A0022

(3) 標識抗体

1) Goat Anti-Rabbit Ig' s HRP Conjugate : BioSource、ALI3404、lot. 5701

2) Goat (Fab' 2) Anti-Mouse Ig' s HRP Conjugate : BioSource、AMI4404

40

(4) その他

3) ブロッキング液、希釈液 : 1% BSA - PBS - Tween (0.05% - Tween 20)

洗浄液 : PBS - Tween (0.05% - Tween 20)

4) OPD 発色液、停止液 (ELISA) : 常法

5) DAB 染色液 (Western Blot 法) : 常法

【0034】

2. 方法

1) 各抗原 (fPSA または PSA-ACT) を SDS 処理液 (2-メルカプトエタノールフリー) と混和し、5 分間煮沸処理した。

50

- 2) これをPAGミニ10/20に添加し(2 μ g/レーン)、SDS-PAGEを行った(40mA, 1hr.)。
- 3) 泳動後、セミドライプロッターを用い定法に従い、ゲルからPVDF膜へ蛋白質を転写した。
- 4) 転写後の膜を5% Skim Milk - PBS - Tweenでブロッキングした(4/overnight)。
- 5) 5 μ g/ml濃度に希釈した各MoAbを室温で2時間反応させた。
- 6) 3回洗浄後、Goat(Fab'2) Anti-Mouse Ig's HRP Conjugate(5000倍希釈)を室温で1時間反応させた。
- 7) 3回洗浄後、DAB染色液を用い定法で染色した。
- 8) 適度な染色像が得られた時点で洗浄し、乾燥させた。

【0035】

3. 結果

ウエスタンブロッティング法による染色画像を図1に示す。図1によれば、本発明のモノクローナル抗体#14、#16、#17のいずれもfPSA及びPSA-ACTと反応することが確認できた。

【0036】

抗体感作ラテックスの調製方法

前記で得られた3種類のモノクローナル抗体(#14、#16、#17)を次に示す材料、方法により担体に感作させた。

1. 材料

(1) 抗PSAモノクローナル抗体

63214(#14)

63217(#17)

63216(#16)

(上記モノクローナル抗体は全てPBS溶液である)

(2) ラテックス

#14用: ポリスチレンラテックス 平均粒子径0.23 μ m(積水化学社製)

#17用: ポリスチレンラテックス 平均粒子径0.39 μ m(積水化学社製)

#16用: ポリスチレンラテックス 平均粒子径0.05 μ m(積水化学社製)

【0037】

2. 抗体-ラテックス複合体含有液の調整方法

(1) #14抗体-ラテックス複合体(#14Lx)含有液の調製方法

1) ラテックス、抗体をそれぞれ20mM グリシン pH9で希釈し、1%ラテックス液、0.4mg/ml #14抗体液を調製した。これらを1:1(1容+1容)で混合し、約1時間攪拌した。

2) 上記混合液2容に、ブロッキング液(10% BSA)を0.1容添加し、約1時間攪拌した。

3) 5mM MOPS(pH7.0)溶液に透析後、3Abs/ml(600nm)となるように希釈して#14抗体-ラテックス複合体(#14Lx)含有液を得た。

(2) #17抗体-ラテックス複合体(#17Lx)含有液の調製方法

1) ラテックス、抗体をそれぞれ20mM トリス pH8.0で希釈し、0.3%ラテックス液、0.1mg/ml #17抗体液を調製した。これらを1:1(1容+1容)で混合し、約1時間攪拌した。

2) 上記混合液2容に、ブロッキング液(10% BSA)を0.03容添加し、約1時間攪拌した。

3) 5mM MOPS(pH7.0)溶液に透析後、2.7Abs/ml(600nm)となるように希釈して#17抗体-ラテックス複合体(#17Lx)含有液を得た。

(3) #16抗体-ラテックス複合体(#16Lx)含有液の調製方法

1) ラテックス、抗体をそれぞれ20mM トリス pH8.5で希釈し、5%ラテック

10

20

30

40

50

ス液、 0.6 mg/ml #16 抗体液を調製した。これらを1:1(1容+1容)で混合し、約二時間攪拌した。

2) 上記混合液2容に、ブロッキング液(10% BSA)を0.4容添加し、約一時間攪拌した。

3) 5 mM MOPS (pH 7.0) 溶液に透析後、 3 Abs/ml (600 nm) となるように希釈して#16抗体-ラテックス複合体(#16Lx)含有液を得た。

【0038】

〔試験例1〕

#16抗体-ラテックス複合体(#16Lx)添加によるc/f比の調整(1-1)

同濃度(40 ng/ml)のfPSAとPSA-ACTを測定試料とし、下記PSA測定試薬の基本処方に第二試薬として#14Lx及び#17Lxのみを用いて、凝集反応を行い、fPSA及びPSA-ACTの濃度を測定し、その濃度比PSA-ACT/fPSA(c/f比)を求めたところ、約80%であった。ここで、#14Lxと#17Lxの混合比を変動させても、c/f比にあまり変化は無かったため、至適条件として、#14Lx含有液:#17Lx含有液=2:1を選択し、これに#16Lxを0、0.24、0.32、0.41、0.49、0.57 mg/mlとなるように添加して#16Lxの各添加量におけるc/f比を測定した。結果を図2-1に示す。

これによれば、#16Lxの添加量に伴って、c/f比は約80%から110%へと増加した。c/f比が100%となる条件、すなわち、fPSAとPSA-ACTが等モル反応性を示す条件を選択したところ、担体の混合比率は、計算上、#14Lx含有液:#17Lx含有液:#16Lx含有液=2:1:約0.27であった。

【0039】

(1) PSA測定試薬の基本処方

第一試薬(緩衝液)

0.5 M KCl、
 0.1% BSA(プロリアント)、
 30 mM HEPES 緩衝液 pH 7.0

第二試薬(抗体感作ラテックス液)

抗PSA・マウスモノクローナル抗体感作ラテックス粒子(*)、
 5 mM MOPS pH 7.0

* 3種類の抗体感作ラテックス粒子の混合比

#14Lx含有液:#17Lx含有液:#16Lx含有液=2:1:約0.27

(2) 測定条件

測定装置: H7170

パラメータ:

分析法 2ポイントエンド(測定ポイント19-34)

液量 8/100/100

測定波長 570(主)/800(副)

キャリブレーション スプライン

(3) 測定試料

fPSA、PSA-ACT(ともにFitzgerald社製)を、1%BSA、0.1%NaN₃/PBSに溶解して試料とした。

【0040】

〔試験例1-2〕

#16抗体-ラテックス複合体(#16Lx)添加によるc/f比の調整(1-2)

上記試験例1-1の#16Lx添加によるc/f比の調整に関し、#16Lx添加量が低い場合について水準を増やし試験を行った。

試験例1-1の測定試料の濃度(40 ng/ml)を 36 ng/ml とし、#16Lxの添加量の水準を0、0.16、0.24、0.32、0.40 mg/mlとした以外は試験例1と同様にし、#16Lxの各添加量におけるc/f比を測定した。結果を図2

- 2 に示す。

図 2 - 1 及び図 2 - 2 より、# 1 6 L x の添加量を適宜調整することにより、c / f 比は 9 0 ~ 1 1 0 % 間で調整可能であることが明らかとなった。

【 0 0 4 1 】

[試験例 2]

保存安定性

試験例 1 で求められた c / f 比が 1 0 0 % となる条件下、4 で保存し c / f 比の経時変化を測定したところ、7 ヶ月以上の保存期間中 c / f 比 9 0 - 1 1 0 % を持続した。

【 0 0 4 2 】

[試験例 3]

フリーの抗体 # 1 6 添加の効果

1 6 を担体に感作させずにフリーの状態に添加した場合以外は、試験例 1 と同様に c / f 比を測定した。結果を図 3 に示す。試験例 1 に挙げられた P S A 測定試薬の基本処方を用い、第二試薬として # 1 4 L x、# 1 7 L x とともに、# 1 6 (0 . 4 3 m g / m l) を加えた。

同濃度 (各 8 . 7 n g / m l) の f P S A、P S A - A C T をサンプルとして、f P S A と P S A - A C T の示すシグナルの比、c / f 比を求めた。この結果、担体に感作していないフリーの抗体 # 1 6 も、c / f 比を 1 0 0 % 付近に改善する効果があることがわかった。

【 0 0 4 3 】

[試験例 4]

他のモノクローナル抗体の組み合わせ

モノクローナル抗体 # 1 4 と # 1 7 の組み合わせに代わり、モノクローナル抗体 # 1 7 と # 3 6 の組み合わせを用い体外は試験例 1 と同様に、c / f 比を求めた。同濃度 (各 3 0 n g / m l) の f P S A、P S A - A C T をサンプルとして、これに抗体 # 1 6 (0 . 4 3 m g / m l) を添加した。結果、本試験例の抗体の組み合わせを用いた場合も c / f 比を増加させることが確認された。

【 0 0 4 4 】

[試験例 5]

ラテックスの粒径サイズによる c / f 比への影響

モノクローナル抗体 # 1 6 を下記サイズのラテックスに感作したものを 0、0 . 5 m g / m l、1 . 2 5 m g / m l となるように添加し、それぞれについて試験例 1 と同様に c / f 比を測定した。結果を図 4 に示す。

この結果より、0 . 0 5 5 ~ 0 . 2 2 μ m のラテックスに感作したものは、いずれも濃度依存的に c / f 比は改善され、1 0 0 % とする効果があった。

ラテックスのサイズ：0 . 0 5 5、0 . 0 8 6、0 . 0 8 7、0 . 2 2 μ m

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 4 5 】

本発明の抗原の測定試薬は、特殊な抗体を用いることなく、常法により得られる抗体を適宜組み合わせることによる得ることができる。従って、本発明の測定試薬を用いれば、簡便かつ正確に抗原を測定することが可能であり、また、汎用の自動分析装置に適用可能であることから、検査における患者の経済的、時間的、身体的負担の軽減に大いに貢献できる。

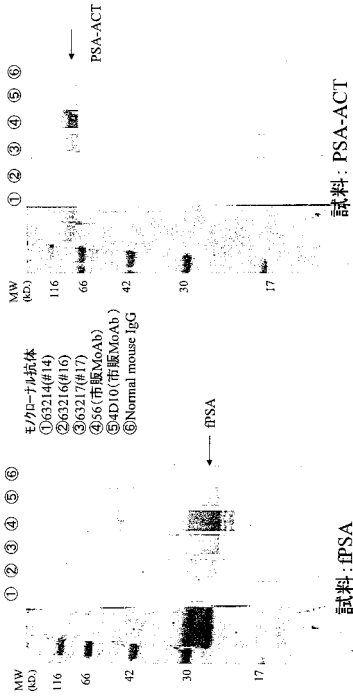
10

20

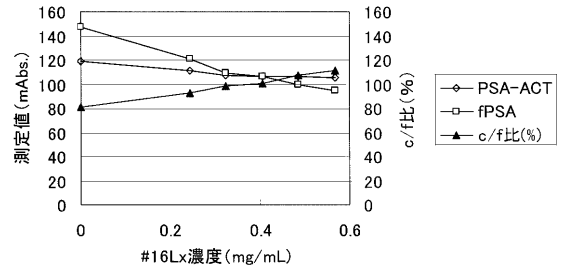
30

40

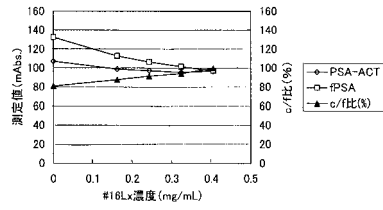
【 図 1 】



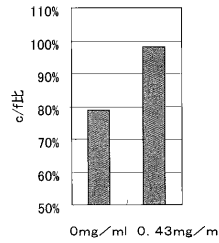
【 図 2 - 1 】



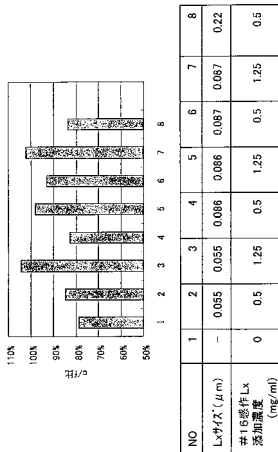
【 図 2 - 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/574 A

- (72)発明者 秋元 優夏
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内
- (72)発明者 小谷 一夫
東京都中央区日本橋三丁目13番5号 第一化学薬品株式会社内
- (72)発明者 矢後 弘和
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内
- (72)発明者 松尾 正直
茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内
- (72)発明者 宮崎 修
茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内
- (72)発明者 齋藤 和典
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 第一化学薬品株式会社つくば工場内

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開2001-108681(JP,A)
特開2001-289853(JP,A)
特開2001-311733(JP,A)
特開2000-002704(JP,A)
特開2005-326150(JP,A)
特開2005-106609(JP,A)
WANG, T.J. et al., Generation of PSA-ACT-Specific Monoclonal Antibodies and Their Application in a Sandwich Immunoassay., Hybridoma, 1999年, Vol.18 No.6, Page.535-541
荻原貴裕, PSA検査の現状と将来 Complexed PSAについて, 生物試料分析, 2004年, Vol.27 No.4, Page.259-264

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

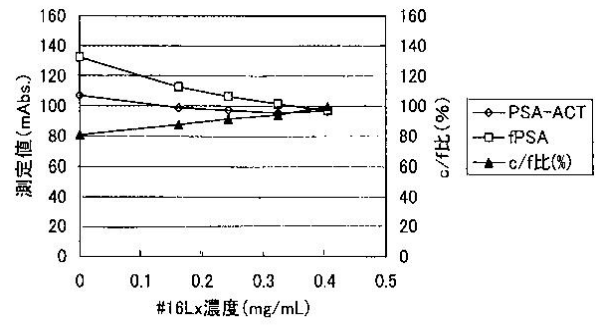
G01N 33/543
G01N 33/53
G01N 33/574
G01N 33/577
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于测量抗原的试剂和用于测量抗原的方法		
公开(公告)号	JP4755112B2	公开(公告)日	2011-08-24
申请号	JP2006549047	申请日	2005-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学薬品株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	本庄由紀 秋元優夏 小谷一夫 矢後弘和 松尾正直 宮崎修 齋藤和典		
发明人	本庄 由紀 秋元 優夏 小谷 一夫 矢後 弘和 松尾 正直 宮崎 修 齋藤 和典		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N33/54313 G01N33/57434		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/53.F G01N33/53.S G01N33/543.581.G G01N33/577.B G01N33/574.A		
代理人(译)	石井雄 后藤早苗		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	2004373382 2004-12-24 JP		
其他公开文献	JPWO2006068206A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种在不使用特殊抗体的情况下简单且准确地测量抗原的试剂和测量方法。 三种类型的单克隆抗体中的至少一种，其分别与游离型抗原和复合型抗原具有反应性并且具有不同的识别位点，以及具有不同粒径的两种或更多种载体的粒径。提供一种测量试剂和方法，用于通过使较小的载体敏化并使剩余的单克隆抗体对较大粒径的载体敏感来调节游离抗原和复合型抗原的反应性。

【 図 2 - 2 】



【 図 3 】