

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 354700

(P2001 - 354700A)

(43)公開日 平成13年12月25日(2001.12.25)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ト* (参考) |
|--------------------------|------|---------------|---------------|
| C 0 7 K 16/36 | | C 0 7 K 16/36 | 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 P 21/08 | | C 1 2 P 21/08 | 4 B 0 6 4 |
| G 0 1 N 33/53 | | G 0 1 N 33/53 | L 4 B 0 6 5 |
| 33/577 | | 33/577 | B 4 H 0 4 5 |
| // C 1 2 N 5/10 | | C 1 2 N 5/00 | B |

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 175127(P2000 - 175127)

(22)出願日 平成12年6月12日(2000.6.12)

(71)出願人 595155510

バイオリンクス株式会社

東京都多摩市貝取1 - 15 - 10

(72)発明者 藤澤宗駿

神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎南1 - 8 - 1

(72)発明者 山口祐治

東京都多摩市貝取1丁目15番地の10

(72)発明者 目黒 嵩

茨城県那珂郡瓜連町大字平野1800 - 431

(74)代理人 100076358

弁理士 池田 宏

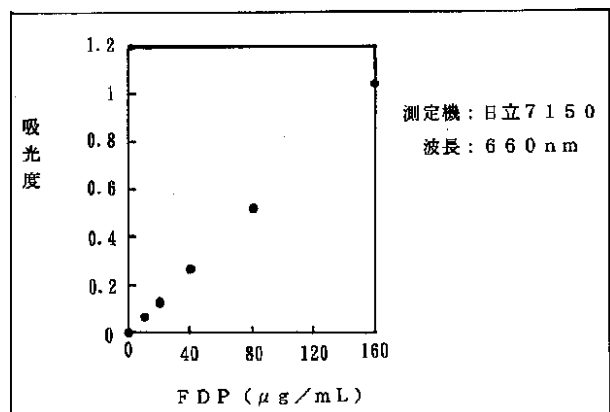
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体及びヒトフィブリン分解産物の測定方法

(57)【要約】

【構成】 Soluble Fibrin monomer Complex (以下SFと記載する)ヒトフィブリン分解産物及び測定しようとするヒトフィブリン分解産物に対するモノクローナル抗体を製する。不溶性担体に固定した当該抗体感作試薬と、測定しようとする抗原(ヒトフィブリン分解産物)を反応容器の液体媒体中で反応させる。次いで当該不溶性担体に固定した当該抗体感作試薬と凝集反応の吸光度変化を測定する。

【効果】 不溶性担体に固定した当該抗体感作試薬は、フィブリン分解産物に反応し、フィブリン分解産物には反応しない、二次線溶の場合に反応を示すので、特にDIC(血管内凝固症候群)の診断に大きく効果が得られる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 SF、ヒトフィブリノゲンのプラスミン分解産物(X分画、Y分画、D分画、E分画、XD、YD)及びヒトフィブリンのプラスミン分解産物(D monomer、E fragment、FDP関連高分子複合体、DD/E複合体、D dimer、late D dimer)に反応し、ヒトフィブリノゲンには反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】 不溶性担体に固定化された、請求項1記載のモノクローナル抗体を使用して、凝集反応を観察することにより、被検試料中のヒトフィブリノゲン分解産物に影響を受けずにヒトフィブリン分解産物を測定する方法。

【請求項3】 免疫学的凝集反応による測定方法が、ラテックス凝集反応である請求項2記載の方法。

【請求項4】 分光学的に測定する、請求項3記載の方法。

【請求項5】 目視的に測定する、請求項3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なモノクローナル抗体、フィブリン分解産物の測定に係り、さらに詳しくは、被測定物質を短時間且つ高精度に測定・検出できる凝集反応及び抗原抗体反応の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生体における線溶には、一次線溶と二次線溶があり、これらの鑑別が重要である。FDPではフィブリノゲン由来かフィブリン由来かは判別できないため、二次線溶の判定はFDPとD-Dダイマーの結果から間接的に行っていた。我が国で定められているDIC(血管内凝固症候群)の診断・経過観察においてフィブリン分解産物(二次線溶)の測定は必須であり、見極める為にはFDPとD-Dダイマーを測定する必要があった。そしてFDPを測定する際には、他の凝固関連測定に用いる血漿検体とは別に、FDP専用の血清検体を患者から採血しなければならず、測定時のコストはもちろん患者負担も大きな問題であった。従来のD-Dダイマーの測定試薬はE fragment、SFには反応を示さず、Dダイマー分画を反映している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、血漿検体などの生体試料中に含まれるフィブリノゲンやフィブリノゲン分解産物の有無に影響されずに、ヒトフィブリン分解産物測定する方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決する為の手段】前記目的はヒトフィブリノゲン分解産物及びヒトフィブリン分解産物と反応するが、ヒトフィブリノゲンとは反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体を用いる。又、不溶性担体に固定

した当該抗体感作試薬は、ヒトフィブリノゲン分解産物には影響を受けず、ヒトフィブリン分解産物を測定されることにより達成される。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明のモノクローナル抗体は細胞融合法により作製されたハイブリドマによるモノクローナル抗体産生法により得られたモノクローナル抗体である。本発明の好ましいモノクローナル抗体はヒトフィブリノゲン分解産物及びヒトフィブリン分解産物と反応し、ヒトフィブリノゲンとは反応しない。本発明のモノクローナル抗体を用いたフィブリン分解産物の測定方法は、抗原と抗体との凝集反応、抗原抗体反応、本発明のモノクローナル抗体に不溶性担体感作又は持たせさせて被測定物質との凝集反応、抗原抗体反応の測定を実施するものである。そして、前記凝集反応、抗原抗体反応の測定を、その測定が終了するまで攪拌又は揺動下のもとで実施してもよい。本発明の凝集反応、抗原抗体反応の測定方法によって行われる測定・検出方法としては、特に限定されず、凝集反応及び/又は抗原抗体反応を利用して測定する様々な方法が可能であり、免疫比濁法(TIA)、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ラテックス凝集反応法、蛍光免疫測定法等が利用される。また、凝集反応、特に、ラテックス凝集反応法が好適に用いられる。

【0006】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0007】実施例1

フィブリン分解産物の調製：免疫源として用いるヒトフィブリン分解産物は、次の様な方法で調製することが出来る。即ち、ヒトフィブリノゲン(10mg/mL)1mLにFXIII(Fibrogamin P:ヘキスト社 用法・用量に従い調製する)を0.3mL、1M塩化カルシウム0.1mL、トロンピン(200U/mL)0.5mL、プラスミン(1U/mL)0.1mLを添加し、それぞれ30秒、1分、3分、10分、30分、1時間、3時間、12時間後にアプロチニン25,000U/mL)2mLで反応を停止する。DEAEセファロス(イオン交換クロマトグラフ)によって各分画を精製した。Fibrin monomerの調製：Fibrin monomer(可溶性フィブリンモノマー)はLargoらの方法[Blood(1976)47:991-1002]に従って調製した。即ち、ヒトフィブリノゲン1gを10mMのEDTAを含む生理食塩液1000mLに溶解し、100NIHのトロンピンを添加した後、37℃で120分間保温した。生じたフィブリンクロットを生理食塩液250mLで3回遠心洗浄した。洗浄後のフィブリンクロットを6M尿素液50mLに溶解し、使用した。

【0008】免疫化脾細胞の調製：ヒトフィブリン分解

産物(Fib-P) ($A_{280nm} = 0.3$)を等量のフロイド完全アジュバンドと乳化するまで混合し、その混合液100 μ LをBALB/c系マウス腹腔内に投与することにより免疫を行った。約30日経過後、Fib-P ($A_{280nm} = 0.3$)を等量の生理食塩液で希釈して調製したFib-P液100 μ Lを、前記のマウスの腹腔内に投与し、3日後、脾臓を無菌的にマウスから取り出し、次の細胞融合工程に用いた。細胞融合: 15%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle (DME)培地5mLを入れたペトリ皿に前記の脾臓を入れた。次に15%ウシ胎児血清を含むDME培地12mLで前記脾臓より還流法で脾細胞を流出し50mLの遠心管に集める。遠心後、上清を捨て、ペレットに溶血促進溶液(160mM-NH₄Cl, 10mM-KHCO₃, 1mM-Na₂EDTA, pH7.0)5mLを加え、懸濁した。5分間氷冷後、遠心分離し、脾細胞数を数えた。一方、予め培養しておいたマウスミエロ-マ細胞NS1の約 1×10^7 個に前記脾細胞 1×10^8 個を加え、遠心分離した。その上清を捨て、ペレットに4.5%ポリエチレングリコール1500溶液(37℃に保温)1.0mLを加え良く混合する。次に、37℃に保温しておいたDME培地を10mL加え、遠心分離する。上清を除去後、ペレットを15%ウシ胎児血清を含むHAT培地(DME培地にアミノプテリン 4×10^{-7} M, チミジン 1.6×10^{-5} M, ヒポキサンチン 1×10^{-4} Mになるように添加したもの)で懸濁し、次いで上記の培地で3回遠心洗浄する。HAT培地20mLに懸濁した細胞懸濁液を96穴細胞培養プレートの各ウェルに200 μ Lずつ分注し、5%CO₂A含むCO₂培養器で培養し、7日後に後述のELISA法により、抗フィブリン分解産物抗体産生ハイブリド-マをスクリーニングした。

【0009】ハイブリド-マの確立: ハイブリド-マ培養液の上清中の抗体の有無は、ELISA法により測定した。96穴ELISA用プレート(住友化学)の各ウェルに前記のフィブリン分解産物(Fib=P)溶液($A_{280nm} = 0.3$)100 μ Lずつ分注し、4℃で16時間放置した。次に、0.01%ウシ血清アルブミン(BSA)-生理食塩液で3回洗浄した後、核ウェルに培養上清100 μ Lを加え、25℃で1時間反応させ

た。次に、Tween80-生理食塩液で1000倍に希釈したペルオキシダ-ゼ結合抗マウス抗体(DAKO社、デンマ-ク)100 μ Lを各ウェルに加えた。反応終了後、0.01%BSA-生理食塩液で各ウェルを3回洗浄し、ペルオキシダ-ゼの基質を加えた。その結果、96穴中、10ウェルに抗体産生が認められた。その10ウェルのハイブリド-マを20ウェルのプレートに移し、5日間培養後、再度ELISA法により、抗Fib-P抗体の産生の有無を確認し、次に、フィブリノゲン、フィブリノゲン分解産物、フィブリン分解産物、D-dimerとの反応性を上記と同様のELISA法によって検討した。その結果、フィブリノゲンには反応しないで、フィブリノゲン分解産物及びフィブリン分解産物に反応するクロ-ン1種(Fib-P-1)を確立した。他の9種は全てフィブリノゲンとも反応したので以下の研究から削除した。ハイブリド-マFib-P-1が産生するモノクローナル抗体Fib-P-1のフィブリノゲン分解産物、フィブリン分解産物の詳細な反応も、上記と同様のELISA法によって検討した。

【0010】実施例2

モノクローナル抗体の製造: プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)0.5mLを10週令以上のBALB/c系雄マウスの腹腔内に投与し、それからマウスの腹腔内にハイブリド-マFib-P-1をマウス一匹当たり細胞数、 2×10^8 個になるように接種した。一匹のマウスから約5~12mLの腹水が得られた。その抗体濃度は5~10mg/mLであった。腹水中モノクローナル抗体の精製は、プロテインAセファロ-ス4Bカラム(Pharmacia, スウェ-デン)により行なった。

【0011】実施例3

モノクローナル抗体Fib-P-1のイソタイプ及び特異性: フィブリン分解産物モノクローナル抗体Fib-P-1のイソタイプ及び特異性の同定は、それぞれイムノブロットング法及びELISA法により行った。イソタイプはIgG_{2a}()であった。また、特異性は表1に示すとおりであった。

【0012】

【表1】

| 抗原 | 抗体特異性 | 試薬特異性 | 従来FDP | 従来DD |
|--------------------|-------|-------|-------|------|
| Fibrinogen | - | - | + | - |
| 中間産物 (フィブリノゲン分解産物) | + | - | + | - |
| XD | + | + | + | + |
| YD | + | + | + | + |
| D monomer | + | - | + | - |
| E fragment | + | - | + | - |
| FDP関連高分子複合体 | + | + | + | + |
| DD/E complex | + | + | + | ± |
| D dimer | + | + | + | - |
| late D dimer | + | + | + | - |
| SF | + | + | + | - |

【0013】実施例4

不溶性担体に固定した当該抗体感作試薬の製造：モノクローナル抗体Fib-P-1のF(ab')₂分画(1mg/mL)を含む溶液5mLと、ラテックス溶液(2%、日本合成ゴム社：212nm)5mLとを混合し約1時間強く攪拌した。遠心後、ペレットをBSA溶液(2mg/mL)に懸濁して、約1時間強く攪拌した。かくして、モノクローナル抗体Fib-P-1のF(ab')₂感作ラテックス液を得た。

【0014】実施例5

分光学的の方法によるFDPの定量：実施例4で調製したFib-P-1のF(ab')₂感作ラテックス液と、調製したFDPとの凝集反応の速度を分光学的方法で測定した。その結果は図1のように、FDP0~160μg/mLまで測定可能であった。

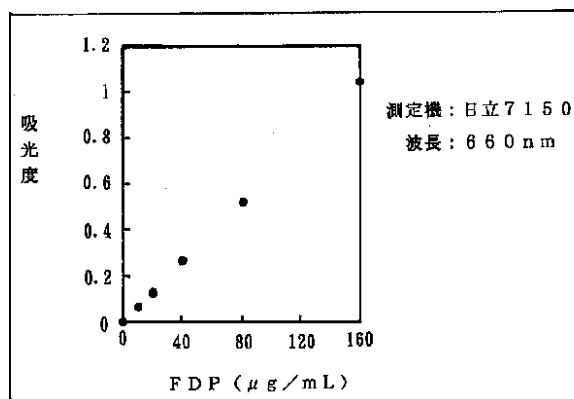
*【0015】

【発明の効果】以上詳述した如く、本発明によると次のような効果を奏する。本発明のモノクローナル抗体により、ヒトフィブリン分解産物(二次線溶)を測定することにより、血漿検体などの生体試料中のヒトフィブリノゲンやヒトフィブリノゲン分解産物の有無に影響されずに測定する方法を提供することができる。また、DIC(血管内凝固症候群)の診断・経過観察において、測定時のコストはもちろん患者負担も軽減される。

10【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例4で調製したFib-P-1のF(ab')₂感作ラテックス液と、調製したFDPとの凝集反応の速度を分光学的方法で測定した結果を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C12N 15/02

識別記号

FI

C12N 15/00

テ-マコード(参考)

C

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA44 GA03 GA18 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12
DA13
4B065 AA91X AA92X AB05 AC14
BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA30 CA42 DA76 EA50
FA72 GA26

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 测量单克隆抗体和人纤维蛋白降解产物的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2001354700A | 公开(公告)日 | 2001-12-25 |
| 申请号 | JP2000175127 | 申请日 | 2000-06-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 生物链接 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 生物链接有限公司 | | |
| [标]发明人 | 藤澤宗駿 山口祐治 目黒嵩 | | |
| 发明人 | 藤澤宗駿 山口祐治 目黒嵩 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C07K16/36 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577 | | |
| FI分类号 | C07K16/36 C12P21/08 G01N33/53.L G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26 | | |
| 代理人(译) | 池田 宏 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

[组成]可溶性纤维蛋白单体复合物(以下称为SF)产生人纤维蛋白原降解产物和针对待测定的人纤维蛋白降解产物的单克隆抗体。固定在不溶性载体上的抗体敏化试剂在反应容器的液体介质中与待测抗原(人纤维蛋白降解产物)反应。然后,测定固定在不溶性载体上的抗体敏化剂的凝集反应的吸光度变化。[效果]固定在不溶性载体上的抗体敏化剂与纤维蛋白降解产物反应,不与纤维蛋白原降解产物反应,在继发性纤维蛋白溶解的情况下显示反应,因此特别是DIC(血管内凝血综合征)在诊断上非常有效。

