

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3779798号
(P3779798)

(45) 発行日 平成18年5月31日(2006.5.31)

(24) 登録日 平成18年3月10日(2006.3.10)

(51) Int.C1.

F 1

GO1N 33/53 (2006.01)
GO1N 33/543 (2006.01)
GO1N 33/577 (2006.01)

GO1N 33/53 V
 GO1N 33/543 581J
 GO1N 33/577 B

請求項の数 8 (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平9-170534

(22) 出願日

平成9年6月26日(1997.6.26)

(65) 公開番号

特開平11-14626

(43) 公開日

平成11年1月22日(1999.1.22)

審査請求日

平成16年6月9日(2004.6.9)

(73) 特許権者 390014960

シスメックス株式会社

兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番

1号

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人 100071124

弁理士 今井 庄亮

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74) 代理人 100075236

弁理士 栗田 忠彦

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CA125の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CA125と特異的に反応する免疫グロブリンの一価の抗体と二価の抗体を固相に固定化して使用することを特徴とするCA125の測定方法であって、CA125と特異的に反応する免疫グロブリンが、モノクローナル抗体OC125及びM11から選択されるCA125の測定方法。

【請求項2】

前記一価の抗体と前記二価の抗体の比が、1:9~9:1である請求項1記載のCA125の測定方法。

【請求項3】

前記抗体として、互いに異なるエピトープを認識する抗体を複数用いる請求項1または2記載のCA125の測定方法。 10

【請求項4】

前記固相として粒子を用い、粒子凝集法により測定を行う請求項1~3のいずれかに記載のCA125の測定方法。

【請求項5】

CA125と特異的に反応する免疫グロブリンの一価の抗体と二価の抗体を固相に固定化したことの特徴とするCA125の測定試薬であって、CA125と特異的に反応する免疫グロブリンが、モノクローナル抗体OC125及びM11から選択されるCA125の測定試薬。

【請求項6】

前記一価の抗体と前記二価の抗体の比が、1:9~9:1である請求項5記載のCA125の測定

試薬。

【請求項 7】

前記抗体として、互いに異なるエピトープを認識する抗体を複数用いる請求項5または6記載のCA125の測定試薬。

【請求項 8】

前記固相として粒子を用いる請求項の5～7のいずれかに記載のCA125の測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はCA125の測定において、非特異反応を抑制して感度よく測定を行なう方法に関する。 10

【0002】

【従来の技術】

CA125は、モノクローナル抗体OC125により認識される抗原で分子量約11万の糖蛋白であり、卵巣癌の腫瘍マーカーとして重要な検査項目である。特に卵巣癌の漿液性囊胞腺癌で高値である。また、その他の疾患としては、子宮癌、肺癌、胆のう胆管癌で高値となることから、CA125は婦人科系の癌と消化器癌のマーカーとして診断と予後判定の指標として有用である。

【0003】

CA125の測定方法としては、固相にOC125抗体を固定化して試料中のCA125と反応させ、さらに標識されたOC125抗体を反応させた後にB/F分離を行ない、固相に捕捉された標識量を測定する方法がある（特開平2-280061号）。 20

【0004】

ところが、測定試料中にOC125抗体とよく反応する物質が存在する場合、例えば測定試料中に抗マウス - グロブリン（HAMA）が存在する場合、それがOC125抗体と結合して、本来目的としているCA125との反応を阻害してしまい、正確な測定ができなくなってしまう。そこで、OC125抗体とは異なるCA125上のエピトープを認識するモノクローナル抗体M11等を標識抗体に用いて対策を行なっている。また、一般的には、測定試料にマウス - グロブリンを添加することによる前処理を行うことで対策している場合もある。

【0005】

30

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記のような方法を取ったとしても、抗マウス - グロブリン（HAMA）による干渉がなくなるわけではなく、対策方法としては不十分である。

【0006】

また、粒子凝集法により測定を行なう場合、たとえOC125とM11の二つの抗体を粒子上に感作して使用したとしても、粒子はOC125 - CA125 - M11という結合だけで凝集するのではなく、OC125 - CA125 - OC125といった結合によっても粒子が凝集を起こす。そういう場合、上述の場合と同じ問題が発生し、正確な測定ができなくなる。

【0007】

そこで本発明は、より正確にCA125の測定を行なう方法を提供することを目的とする。 40

【0008】

また、粒子凝集法を用いて、CA125の測定を行う方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明のCA125の測定方法は、CA125と特異的に反応する免疫グロブリンの一価の抗体と二価の抗体を固相に固定化して使用することを特徴とする。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明で使用するCA125と特異的に反応する免疫グロブリンには、モノクローナル抗体OC125とM11を含む。しかし、CA125と特異的に反応するものであれば、ポリクローナル抗体で 50

あってもよく、その由来は特に問わない。抗体の作製にあたっては、常法（例えば、新生化学実験講座、タンパク質 I、p.389-397, 1992参照）に従い、CA125を動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取することにより得ることができる。本発明では、1種類の抗体を用いるよりも、互いに異なるエピトープを認識する複数の抗体を組み合わせて用いる方が測定の特異性及び感度上昇の点から好ましい。

【0011】

本発明で使用するCA125と特異的に反応する免疫グロブリンの二価の抗体とは、分子内に抗原結合部位を2個もつ抗体をいい、例えばモノクローナル抗体OC125やM11等のモノクローナル抗体、またはポリクローナ抗体等の抗体そのもの、さらにはこれらの抗体に酵素処理等を施して得られるフラグメントであっても構わない。このようなフラグメントには、10 例えば抗体をペプシンで消化して得られるF(ab')₂を含む。

【0012】

CA125と特異的に反応する免疫グロブリンの一価の抗体とは、分子内に抗原結合部位を1個もつ抗体をいい、免疫グロブリンを還元したもの、あるいはそれらに酵素処理等を施したもの、例えばFabやFab'を含む。一価の抗体は上述の二価の抗体を還元してS-S結合を切断することによって得られる。抗体の還元方法は、従来より知られている方法を使用すればよく、例えば、1~100mMの2-メルカプトエタノールや2-メルカプトエチルアミン等中で1~5時間インキュベーションすることにより一価の抗体を回収することができる。

【0013】

本発明においては、一価の抗体と二価の抗体を固相に固定化して使用する。20 一価の抗体だけでは、非特異反応が減少するだけでなく、特異性も低くなるので、二価の抗体を組み合わせて使用することにより、特異性を維持したままHAMA等による非特異反応を抑制することができる。本発明では、二価の抗体を非特異反応による干渉が起きない程度に固相に感作して用いることができる。感作させる一価の抗体と、二価の抗体との好適な割合は、1:9~9:1、好ましくは1:1~1:5であり、リン酸緩衝溶液(PBS)等の緩衝液中に前記の割合で混合した抗体溶液を、固相に感作して用いることができる。感作させるのに好適なpHは3~8、より好適にはpH4~6である。

【0014】

本発明では、上記のようにして調製された一価の抗体と二価の抗体とを固相に固定化して使用するが、固相としては、通常当分野で使用されているものであれば使用することができ、30 例えば赤血球、ゼラチン粒子、ラテックス粒子、マイクロプレート、試験管等が使用できる。

【0015】

一価の抗体と二価の抗体とを固相に固定化するには、従来より二価の抗体を固定化するときに使用される方法をそのまま使用することができ、物理吸着法、共有結合法等により行なうことができる。特に物理吸着法は簡単な操作で行なうことができ、一般的な方法としては、例えば上記で得られた抗体溶液を固相と接触させ（固相が粒子の場合は粒子懸濁液と混合し）、4~25度で一晩または数時間反応させて行なうことができる。

【0016】

本発明の方法により測定することのできる生物学的試料には、血漿、血清等の血液成分を40 含む。

【0017】

本発明によりCA125の測定を行なうには、種々の態様のサンドイッチ法、ならびに競合法を含むどのような型のイムノアッセイを用いてもよい。さらには、粒子表面を固相として用いて一価の抗体と二価の抗体を感作し、粒子の凝集度を測定することによりCA125の量を測定することもできる。

【0018】

例えばサンドイッチ法では、抗体を固定化した反応容器にCA125を含む試料を入れ、所定温度で所定時間インキュベートする。次に、標識された抗体溶液を添加し、さらに所定温度で所定時間インキュベートして反応させる。抗体への標識方法は、通常抗体に対して行50

なうのと同じ方法により行なうことができる。なお、固相抗体として、OC125抗体及びOC125の一価の抗体を用いる場合は、標識抗体としてはOC125抗体あるいはOC125の一価の抗体を用いてもよいが、OC125とは異なるエピトープを認識するM11抗体あるいはM11の一価の抗体の方が好ましい。その後、B/F分離を行なって、固相に捕捉された標識物の量を測定する。そして、あらかじめ作成された検量線から測定試料中のCA125の量を決定する。

【0019】

粒子凝集法を用いて測定を行なう場合、一価の抗体と二価の抗体を感作した粒子懸濁液とCA125を含む試料とを混合し、30~50¹⁰、好ましくは37~45¹⁰の範囲で、5~30分、好ましくは10~20分インキュベートする。その後、目視あるいは粒子計数装置で凝集状態を確認する。粒子計数装置（例えば、東亞医用電子株式会社のPAMIAシリーズ）を用いて未凝集/凝集粒子を計数する場合には、使用する粒子は粒径のそろったものが好ましく、そういう点では、ラテックス粒子が最も好ましい。粒子の大きさについては、通常使用されているものが使用でき、0.5~1 μm が好適に使用される。材質についても、当分野で使用されているものならばとくに制限されないが、ポリスチレンラテックスが最も好ましい。

【0020】

粒子に感作する抗体は一種類の抗体でもよいが、それとは別のエピトープを認識する抗体を混合して感作して使用すれば、特異性及び感度を高める上で有利である。例えば、OC125の一価の抗体だけでなく、M11の一価の抗体を感作して使用することができる。二つの抗体の比は、1:9~9:1が好適であり、さらには1:1が好ましい。また、特異性を維持するために、HAMA等との非特異反応による干渉を起こさない程度に、それぞれの一価の抗体に対応する二価の抗体を感作して使用する。一価の抗体と二価の抗体との好ましい割合は、上述の通りである。例えば、OC125の一価の抗体及びOC125抗体と、M11の一価の抗体及びM11抗体の四つの抗体を同じ粒子上に感作して使用することができる。²⁰

【0021】

なお、粒子凝集法は、B/F分離を必要としないので、簡便な操作で、短時間で測定を行なえるので好ましい。

【0022】

【実施例】

実施例1：一価の抗体の調製

OC125抗体（セントコア社より入手）2.0mgを、10mM 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩及び0.5mM EDTA-4Naを含む10mMPBS(pH7.0)水溶液2mlに溶解し、37³⁰で2時間インキュベーションした後、氷冷する。その後、0.1Mモノヨードアセトアミドを含む10mMPBS(pH6.0)水溶液を、使用した2-メルカプトエチルアミン塩酸塩と等モルになるように添加してブロッケし、室温で2時間インキュベーションする。

【0023】

次に、Superdex 200pg（ファルマシア社）を使用し、10mMPBS (pH6.0)でゲルろ過を行ない、一価の抗体を回収する。

【0024】

M11抗体（セントコア社より入手）についても同様の操作を行ない、一価の抗体を回収する。⁴⁰

【0025】

実施例2：抗体感作ラテックスの調製

粒径0.8 μm のポリスチレンラテックスを0.1M PBS(pH6.0)中に0.5%(w/v)の濃度に調製し、そこに以下に記載するような種々の組み合わせで二価の抗体及び/又は実施例1で調製した一価の抗体をラテックス懸濁液1ml当たりTotalで300 μg (OC125抗体とその一価の抗体を合計で150 μg 、M11抗体とその一価の抗体を合計で150 μg) 添加し、4⁴⁰で24時間反応させた。その後遠心(12000rpm,10min.)を行い、5%BSAを含む10mM PBS(pH6.0)溶液を最初と同量添加し粒子を分散させた。もう1度遠心処理を行い同じ溶液中に分散させて抗体感作ラテックスとした。

下表に示す組み合わせの抗体で種々のラテックス試薬を調製した。

10

20

40

50

【0026】

【表1】

感作する抗体の比率(1ml ラテックス当たり)

抗体	①		②		③		④	
	OC125	M11	OC125	M11	OC125	M11	OC125	M11
二価 IgG(μg)	0	0	7.5	7.5	15	15	30	30
一価 IgG(μg)	150	150	142.5	142.5	135	135	120	120
Total (μg)	150	150	150	150	150	150	150	150
二価：一価	0:100	0:100	5:95	5:95	10:90	10:90	20:80	20:80

10

20

30

【0027】

【表2】

抗体	⑤		⑥	
	OC125	M11	OC125	M11
二価 IgG(μg)	45	45	60	60
一価 IgG(μg)	105	105	90	90
Total (μg)	150	150	150	150
二価：一価	30:70	30:70	40:60	40:60

40

【0028】

50

実施例 3 : CA125の測定

検体（血清） $10\mu l$ に5%のBSAを含む10mMPBS(pH6.0) $80\mu l$ を添加し、実施例2で調製した各種の抗体感作ラテックス粒子(0.5%) $10\mu l$ を加え45度で15分間反応させた後、ラテックス粒子の凝集率を測定した。この反応は東亞医用電子株式会社の全自动免疫測定装置PAMIA-30を用いた。

【0029】

凝集率(P/T%)はトータルの粒子カウント(T)に対する凝集した粒子のカウント(P)で示される。

【0030】

0~2665U/mlの既知濃度のCA125を含む試料について、ラテックスの凝集率を測定し、以下の結果を得て、それぞれ検量線を作成した。また、(0U/mlにおけるラテックスの凝集率) + 0.2%の凝集率を示すCA125の濃度をそれぞれの検量線から求め、そのラテックス試薬の感度とした。

【0031】**【表3】**

各ラテックス試薬の反応性 単位：%

	①	②	③	④	⑤	⑥
0U/ml	0.32	0.31	0.31	0.31	0.34	0.35
3.7	0.34	0.50	0.51	0.51	0.58	0.62
11.0	0.37	0.71	0.83	0.96	1.04	1.19
32.9	0.53	1.54	1.88	2.13	2.51	2.82
98.7	1.01	4.04	5.03	5.70	6.85	7.68
296	2.44	10.45	12.81	14.48	17.00	18.59
888	6.34	24.16	29.62	31.16	35.33	37.45
2665	15.40	41.05	43.53	45.59	46.43	48.37
感度 (U/ml)	31.9	5.6	4.3	3.3	3.3	2.7

【0032】

この結果から明らかなように、一価の抗体のみを感作した場合(1)と比べて、二価の抗体を組み合わせる(2 ~ 6)ことにより、感度が著しく向上した。

【0033】**非特異反応に対する効果**

上記 2 ~ 6 について、非特異反応を示す検体（粒子凝集反応で非特異的凝集反応を起こす因子を含む検体）3 検体を測定し、非特異反応に対する効果を調べた。対照としては、CA125IIIRMA（固相にOC125モノクローナル抗体を使用し、標識抗体としてM11モノクローナル抗体に放射線標識したものを使用するRIA法：株式会社ティ・エフ・ビー製）を用い、さらに比較法として 6 のラテックス試薬から一価の抗体を除いて感作したラテックス試薬を調製して同様の操作を行って、CA125を測定した。

得られた結果を下表に示す。

【0034】**【表4】**

10

20

30

40

非特異検体に対する効果

単位 : U/ml

	IRMA	②	③	④	⑤	⑥	比較法
No.1	5.4	7.3	9.5	7.7	14.4	19.1	55.7
No.2	5.0	7.8	9.7	9.6	15.8	19.4	57.6
No.3	9.6	10.5	13.0	14.8	28.2	48.8	74.9

【0035】

表から明らかなように、比較法においては、非特異反応により非特異凝集が起こるためデータが高値となるが、一価の抗体と二価の抗体を組み合わせることにより非特異反応が抑制される。

10

【0036】

従来法との相関

2 ~ 6 のラテックス試薬を用いて、患者血清41検体について測定を行ない、従来法であるCA125IIIRMA (RIA法) との相関を求めた。

回帰直線式と相関係数は以下の通りであり、従来法と良好な相関が認められた。

2 : $Y=1.006X+2.035$, $r=0.965$

3 : $Y=1.001X+3.166$, $r=0.974$

4 : $Y=1.063X+2.225$, $r=0.965$

20

5 : $Y=1.112X+4.872$, $r=0.960$

6 : $Y=1.147X+5.475$, $r=0.961$

【0037】

実施例4：二価の抗体のみを感作したラテックス試薬と本発明のラテックス試薬との比較OC125抗体150 μgとM11抗体150 μg(いずれもラテックス懸濁液1ml当たり)を感作したラテックス試薬を上述の方法により調製した。このラテックス試薬と本発明の実施例3に記載する4のラテックス試薬のそれぞれについてCA125IIIRMA (RIA法) との相関を求めた。非特異反応を示す検体を含む524検体(CA125濃度が500U/mlまで)について測定を行なった。

【0038】

30

とくに140U/mlまでの検体($n=503$)の相関では、二価の抗体のみのラテックス試薬では、相関係数 $r=0.610$ だったのに対し、本発明の4のラテックス試薬では、相関係数 $r=0.884$ となり、非特異反応が抑制され、RIA法との相関が極めて良くなつた。

【0039】

【発明の効果】

本発明によれば、測定試料中に存在する動物免疫グロブリンに対する抗体(例えばHAMA)等の干渉物質による干渉を効率よく減少させ、かつ特異性を維持できるので、より正確にCA125を測定することができる。

【0040】

40

また、粒子凝集法により測定を行うことによって、従来より簡単な操作で、短時間にCA125の測定を行うことができる。

フロントページの続き

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 井口 正明

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1 東亞医用電子株式会社内

(72)発明者 永井 慎也

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1 東亞医用電子株式会社内

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平05-018973(JP,A)

特開平09-049840(JP,A)

特開平05-018968(JP,A)

特開昭64-057169(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98