(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3858277号
(P3858277)
(45)発行日　平成18年12月13日(2006.12.13)　(24)登録日　平成18年9月29日(2006.9.29)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/531 (2006.01)　G01N 33/531 A
G01N 33/536 (2006.01)　G01N 33/536 F

請求項の数 1　(全 7 頁)

(21)出願番号　特願平5-205340
(22)出願日　平成5年8月19日(1993.8.19)
(65)公開番号　特開平7-53405
(43)公開日　平成7年2月28日(1995.2.28)
審査請求日　平成12年7月25日(2000.7.25)

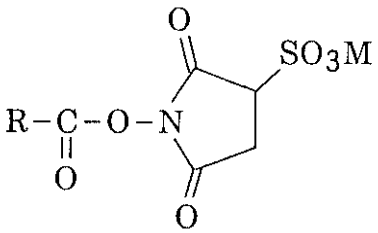
(73)特許権者　000004341
日本油脂株式会社
東京都渋谷区恵比寿四丁目２０番３号
(74)代理人　100067839
弁理士　柳原　成
(72)発明者　宮崎　剛
茨城県つくば市梅園２－１５－５
(72)発明者　榊　秀次郎
茨城県つくば市春日２－２０－３
(72)発明者　鯉沼　康美
茨城県つくば市東新井３２－１６

審査官　上條　のぶよ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫学的診断薬の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体を水系媒体中で、下記一般式（１）で表される化合物と反応させることを特徴とする抗原抗体反応により抗原を検出あるいは定量するための免疫学的診断薬の製造方法。
【化１】



…(１)

（式中、Ｒはアルキル基またはアリール基、Ｍはアルカリ金属を示し、ＲＣ（＝Ｏ）－で示されるアシル基のカルボニル基を含めた炭素数は３～３０である。）
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は免疫学的診断薬の製造方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】

抗原抗体反応を利用した免疫学的診断薬は、臨床検査分野で広く利用されている。この免疫学的診断薬は抗体を含む試薬であり、抗原と反応することにより凝集が起こるので、凝集物を濁度として測定することにより、抗原を検出し、あるいは定量するために用いられる。

【０００３】

このような免疫学的診断薬はとして、例えば特開昭５９－２２４５６５号には、アシル化した抗体を担体に吸着させた抗原検出用試薬が記載されている。この公報では、モノカルボン酸無水物、ジカルボン酸無水物、ポリカルボン酸無水物、これらのカルボン酸のハライド、酸エステルなどのアシル化剤を用い、これらのアシル化剤と抗体とを水系媒体中で直接反応させて抗体をアシル化している。

【０００４】

しかし、上記公報では短鎖のアシル化剤を使用しているため、疎水化抗体は得られず、診断の精度は低い。また上記の方法では、水系媒体中でのアシル化は可能であるが、長鎖のアシル化剤を使用して抗体を疎水化しようとする場合は、長鎖の脂肪酸残基を持つアシル化剤が水溶性でないため、抗体が安定に存在する水系媒体中でアシル化することは困難である。

従って、上記公報の方法を利用して、水系媒体中で抗体をアシル化することにより抗体を疎水化することはできない。

【０００５】

一方、長鎖の脂肪酸の溶解性を増加させるために有機溶媒中で反応を行うこともできるが、この方法では抗体の凝集や失活が起こるので、このような方法でアシル化した抗体を診断薬に用いることは困難である。

【０００６】

ところで、Ｓｔａｒｏｓ，Ｊ．Ｖ．らは、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド－３－スルホン酸ナトリウムで活性化したペプチドとタンパク質中のアミノ基とを水中で反応させることにより、容易にペプチド結合が形成され、これにより、蛋白質の高分子量化が容易に行えることを報告している（Ａｎａｌ．Ｂｏｉｃｈｅｍ．，１５６，２２０（１９８６））。しかし、この報告には、抗体をアシル化して疎水化抗体を得ることは示唆されていない。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

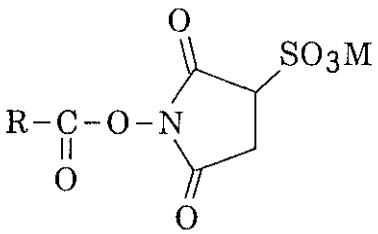
本発明の目的は、抗体の変性が少ない水系媒体中で容易に抗体の疎水化が可能な抗水化抗体を含む免疫学的診断薬の製造方法を提供することである。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

本発明は、抗体を水系媒体中で、下記一般式（１）で表される化合物と反応させることを特徴とする抗原抗体反応により抗原を検出あるいは定量するための免疫学的診断薬の製造方法である。

【化２】



…（１）

（式中、Ｒはアルキル基またはアリール基、Ｍはアルカリ金属を示し、ＲＣ（＝Ｏ）－で示されるアシル基のカルボニル基を含めた炭素数は３～３０である。）

【０００９】

一般式（１）のＲはアルキル基またはアリール基を示し、ＲＣ（＝Ｏ）－で示されるアシル基としては、カルボニル基を含めた炭素数が３～３０、好ましくは４～１８の直鎖もし

くは分岐した飽和または不飽和のアシル基があげられ、具体的にはプロピオン酸、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、モンタン酸、メリシン酸等の飽和脂肪酸のアシル基；オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エルカ酸等の不飽和脂肪酸のアシル基；イソステアリン酸等の分岐脂肪酸のアシル基；リシノール酸、１２－ヒドロキシステアリン酸等のアルキル基中に水酸基を有した脂肪酸のアシル基；安息香酸、ヒドロキシ安息香酸等の芳香族カルボン酸のアシル基などがあげられる。これらの中では、炭素数が４～１８の直鎖脂肪酸のアシル基が、一般式（１）で表される化合物の水溶性が大きくなり、かつ疎水性の高い疎水化抗体が得られるため好ましい。

一般式（１）のＭはナトリウム原子またはカリウム原子などのアルカリ金属である。

【００１０】

一般式（１）で表される化合物であるＮ－アシルオキシコハク酸イミド－３－スルホン酸のアルカリ金属塩は一般に水溶性であり、抗体のアシル化剤として作用し、抗体中に存在するアミノ基、主にリジン残基のアミノ基と反応する。これにより〔ＲＣ（＝Ｏ）－ＮＨ－抗体〕の結合を介して、抗体中にアシル基が導入され、抗体が疎水化して、疎水化抗体が得られる。

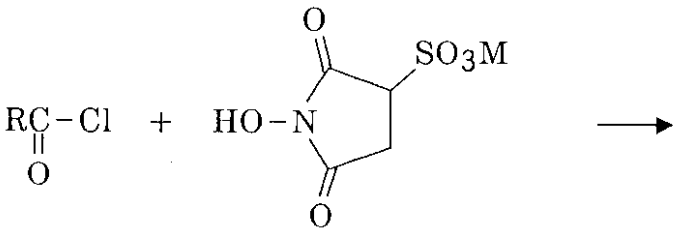
【００１１】

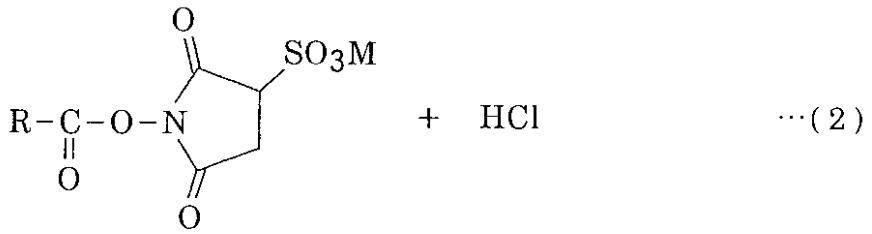
本発明において用いられる抗体は、主に牛、ヤギ、ウサギ、マウス、ニワトリ、ヒト等のあらゆる動物種に由来のＩｇＧであるが、この他にもＩｇＡ，ＩｇＭ，ＩｇＤ，ＩｇＥなどいずれのクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、またポリクローナルあるいはモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また、Ｆａｂ，Ｆｃ，Ｆ（ａｂ）′など抗体由来の種々のセグメントであってもよい。

【００１２】

一般式（１）で表されるＮ－アシルオキシコハク酸イミド－３－スルホン酸のアルカリ金属塩は、脂肪酸または芳香族カルボン酸のハロゲン化物と、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド－３－スルホン酸のアルカリ金属塩とを反応させる方法などにより得られる。脂肪酸クロリドとＮ－ヒドロキシコハク酸イミド－３－スルホン酸ナトリウムとの反応を次式（２）に示す。

【化５】





…(２)

【００１３】

本発明において前記一般式（１）で表される化合物は、抗体の疎水化剤として用いるものであって、水系媒体中で容易に抗体と反応させることができ、このため抗体の変性が抑制される。このような抗体の疎水化剤を用いて抗体を疎水化するには、水系媒体中で疎水

化剤と抗体とを反応させ、抗体をアシル化することにより行うことができる。
水系媒体としては、水または緩衝液のほか、水または緩衝液とジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の有機溶媒との混合液なども使用できる。有機溶媒を混合する場合は、抗体の失活を抑えるために、混合液中の有機溶媒の濃度は、２０重量％以下であることが好ましい。
【００１４】
反応条件は、温度が０～８０℃、好ましくは４～４０℃、時間が１０分間～７２時間、好ましくは１～２４時間とするのが望ましい。このような条件で、上記のような水系媒体中で反応を行うことにより、抗体の失活を最低限に抑えることができる。
【００１５】
疎水化剤の使用量は、抗体１モルに対して０．０１～１０００００モル、好ましくは１～１００００モルとするのが望ましい。疎水化剤の使用量が０．０１モル未満の場合には疎水化が不十分であり、１０００００を超える場合はアシル化された抗体が修飾抗体自身のみで沈澱を生じる場合がある。
【００１６】
このようにして得られた疎水化抗体は、凝集や変性がなく、疎水性で活性が高いため、そのままで、あるいは透析、限外ろ過、ゲルろ過等により精製して免疫学的診断薬として使用することができ、精度の高い診断が可能となる。また凍結乾燥等により、乾燥させて免疫学的診断薬として用いることもできる。短鎖のアシル化剤でアシル化した従来のアシル化抗体は疎水化されておらず、凝集が起こりにくいため、抗原の検出精度は低いが、本発明のように疎水化した抗体は、抗原抗体反応により凝集が起こりやすいので、抗原の検出精度は高くなる。
【００１７】
【発明の効果】
本発明の免疫学的診断薬の製造方法では、水溶性のＮ－アシルオキシコハク酸イミド－３－スルホン酸のアルカリ金属塩からなる一般式（１）で表される化合物を抗体の疎水化剤として用いるので、抗体の変性が少ない水系媒体中で、抗体を容易に疎水化することができる。
【００１８】
また本発明の免疫学的診断薬の製造方法によれば、上記一般式（１）で表される化合物を疎水化剤として用いることにより、抗体の変性が少ない水系媒体中で、抗体を容易に疎水化して、活性の高い疎水化抗体を含む免疫学的診断薬を製造することができる。
【００１９】
本発明で製造される免疫学的診断薬は、上記一般式（１）で表される化合物と反応させて得られた疎水化抗体を含むため、凝集や変性が少なく、活性の高い疎水化抗体を含む免疫学的診断薬が得られ、抗原の検出精度は高い。
【００２０】
【実施例】
以下実施例によりさらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。
実施例１
ウサギに免疫して得られた抗ヒトＣＲＰ抗体を０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．５）にて１０ｍｇ／ｍｌ（６．２５×10^{-5}ｍｍｏｌ／ｍｌ）に調整した。このうちの１ｍｌに、５０ｍｇ／ｍｌ（１．３×10^{-1}ｍｍｏｌ／ｍｌ）のＮ－（ラウロイルオキシ）コハク酸イミド－３－スルホン酸ナトリウム塩水溶液の０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．５）溶液１ｍｌを添加し、４０℃で４時間反応させて疎水化した。反応終了後、０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝７．４）中、４℃で一晩透析を行い、さらにフィルター（孔径０．４５μｍ）により不溶物をろ過除去し、ラウロイル化抗体を得た。
【００２１】
得られたラウロイル化抗体（０．５ｍｇ／ｍｌ）１ｍｌに、内部標準としてヘプタデカン

酸（ｎ－Ｈｅｐｔａｄｅｃａｎｏｉｃ　ａｃｉｄ）１０μｌを加え、さらにｃｏｎｃ．ＨＣｌ　１．０ｍｌおよびプロピオン酸１．０ｍｌを加え、３時間還流し、抗体を完全に加水分解した。室温まで冷却した後、ヘキサン１．０ｍｌで３回抽出を行い、さらに有機層を蒸留水１ｍｌで３回洗浄した。得られた有機層にメタノール１．０ｍｌおよび濃塩酸５００μｌを加え、１時間還流した。これを、ヘキサン１ｍｌを３回抽出を行い、脂肪酸のメチルエステルのヘキサン溶液を得た。ガスクロマトグラフィーを用いて、ラウリン酸メチルの含量を、内部標準に用いたヘプタデカン酸のメチルエステルとの面積比より求めた。抗体１分子当りのアシル基を構成しているアルキル基のモル数を表１に示す。

【００２２】

また得られたラウロイル化抗体を、ベッカー法にて力価を測定し、０．０５ＭＮａＣｌ－０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝８．２）にて０．５ｍｇ／ｍｌに調整して試薬とし、以下の評価に用いた。

上記試薬の５０μｌと、１～１００ｍｇ／ｍｌのヒトＣＲＰの２０μｌと、０．５％ポリエチレングリコール／０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝７．４）の３００μｌとを混合し、抗原抗体反応を行った。５分間の後、吸光後（使用機器；日立７１５０型自動分析機、主波長３４０ｎｍ、副波長７００ｎｍ）を測定した。表１に測定値を示す。

【００２３】

【表１】

表　１

	アルキル基またはアリール基のモル数　＊１	吸光度　×１０$^{-4}$ ＣＲＰ濃度（ｍｇ／ｍｌ）					
		０	３	６	１２	２５	１００
実施例１	１４．６	０	２０３	４９５	９７２	1,631	4,238
実施例２	１０．５	０	１９５	３９１	７８８	1,388	3,634
実施例３	５．３	０	２１７	５１２	９６６	1,642	4,239
実施例４	１８．５	０	６８	１１０	３３２	998	2.311
実施例５	１４．８	０	８１	１３４	４２５	1,017	2,435
比較例１	０．０	０	４	６９	２３５	532	1,616

＊１　抗体１分子当りのアシル基を構成しているアルキル基またはアリール基のモル数（mol）

【００２４】

実施例２

ウサギに免疫して得られた抗ヒトＣＲＰ抗体を０．１０Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．５）にて１０ｍｇ／ｍｌ（６．２５×１０$^{-5}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）に調整した。このうちの１ｍｌに、５０ｍｇ／ｍｌ（１．２×１０$^{-1}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）のＮ－（ミリストイルオキシ）コハク酸イミド－３－スルホン酸ナトリウム塩水溶液１ｍｌを添加し、４０℃で４時間反応させて疎水化した。反応終了後、０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝７．４）中、４℃で一晩透析を行い、さらにフィルター（孔径０．４５μｍ）により不溶物をろ過除去し、ミリストイル化抗体を得た。

【００２５】

上記ミリストイル化抗体の抗体１分子当りのアルキル基のモル数を実施例１と同様にして求めた。結果を表１に示す。

また上記ミルストイル化抗体をラウロイル化抗体の代わりに用いて、実施例１と同様にして抗原抗体反応後の吸光度を測定した。結果を表１に示す。

【００２６】

実施例３

ウサギに免疫して得られた抗ヒトＣＲＰ抗体を０．１０Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．５）にて１０ｍｇ／ｍｌ（６．２５×１０$^{-5}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）に調整した。このうちの１ｍｌに、５ｍｇ／ｍｌ（１．１×１０$^{-2}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）のＮ－（ステアロイルオキシ）コハク酸イミド－３－スルホン酸ナトリウム塩水溶液１ｍｌを添加し、４０℃で４時間反応させて疎水化した。反応終了後、０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝７．４）中、４℃で一晩透析を行い、さらにフィルター（孔径０．４５μｍ）により不溶物をろ過除去し、ステアロイル化抗体を得た。

【００２７】

上記ステアロイル化抗体の抗体１分子当りのアルキル基のモル数を実施例１と同様にして求めた。結果を表１に示す。

また上記ステアロイル化抗体をラウロイル化抗体の代わりに用いて、実施例１と同様にして抗原抗体反応後の吸光度を測定した。結果を表１に示す。

【００２８】

実施例４

ウサギに免疫して得られた抗ヒトＣＲＰ抗体を０．１０Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．５）にて１０ｍｇ／ｍｌ（６．２５×１０$^{-5}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）に調整した。このうちの１ｍｌに、５０ｍｇ／ｍｌ（１．８×１０$^{-1}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）のＮ－（ブチリルオキシ）コハク酸イミド－３－スルホン酸カリウム塩水溶液１ｍｌを添加し、４０℃で４時間反応させて疎水化した。反応終了後、０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝７．４）中、４℃で一晩透析を行い、さらにフィルター（孔径０．４５μｍ）により不溶物をろ過除去し、ブチリル化抗体を得た。

【００２９】

上記ブチリル化抗体の抗体１分子当りのアルキル基のモル数を実施例１と同様にして求めた。結果を表１に示す。

また上記ブチリル化抗体をラウロイル化抗体の代わりに用いて、実施例１と同様にして抗原抗体反応後の吸光度を測定した。結果を表１に示す。

【００３０】

実施例５

ウサギに免疫して得られた抗ヒトＣＲＰ抗体を０．１０Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．５）にて１０ｍｇ／ｍｌ（６．２５×１０$^{-5}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）に調整した。このうちの１ｍｌに、５０ｍｇ／ｍｌ（１．６×１０$^{-1}$ｍｍｏｌ／ｍｌ）のＮ－（ベンゾイルオキシ）コハク酸イミド－３－スルホン酸カリウム塩水溶液１ｍｌを添加し、４０℃で４時間反応させて疎水化した。反応終了後、０．０１Ｍ燐酸緩衝液（ｐＨ＝７．４）中、４℃で一晩透析を行い、さらにフィルター（孔径０．４５μｍ）により不溶物をろ過除去し、ベンゾイル化抗体を得た。

【００３１】

上記ベンゾイル化抗体の抗体１分子当りのアリール基のモル数を実施例１と同様にして求めた。結果を表１に示す。

また上記ベンゾイル化抗体をラウロイル化抗体の代わりに用いて、実施例１と同様にして抗原抗体反応後の吸光度を測定した。結果を表１に示す。

【００３２】

比較例１

疎水化剤と反応させていない抗ヒトＣＲＰ抗体１分子当りのアルキル基のモル数を実施例１と同様にして求めた。結果を表１に示す。

また疎水化剤と反応させていない抗ヒトＣＲＰ抗体をラウリル化抗体の代わりに用いて、実施例１と同様にして抗原抗体反応後の吸光度を測定した。結果を表１に示す。

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０６－０８２４４９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５９－２２４５６５（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１００６６０（ＪＰ，Ａ）
特開昭５６－１４７７２４（ＪＰ，Ａ）
特開昭４９－００６１１９（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０４９０８３２２（ＵＳ，Ａ）
Staros, James V. et al., Analytical Biochemistry, １９８６年, Ｖｏｌ．１５６, ｐ．２２０－２２２
Anjaneyulu, P. S. R. et al., International Journal of Peptide & Protein Research, １９８７年, Ｖｏｌ．３０, Ｎｏ．１, ｐ．１１７－１２４

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/531
G01N 33/536
C07K 1/113
C07K 16/18
CA(STN)
REGISTRY(STN)