

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4390963号  
(P4390963)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月16日(2009.10.16)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/531 (2006.01)  
GO 1 N 33/53 (2006.01)GO 1 N 33/531  
GO 1 N 33/53B  
L

請求項の数 3 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2000-103831 (P2000-103831)  
 (22) 出願日 平成12年4月5日 (2000.4.5)  
 (65) 公開番号 特開2001-289850 (P2001-289850A)  
 (43) 公開日 平成13年10月19日 (2001.10.19)  
 審査請求日 平成19年3月7日 (2007.3.7)

前置審査

(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 100088867  
 弁理士 西野 卓嗣  
 上村 八尋  
 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2  
 国際試薬株式会社 研究開発  
 センター内  
 (72) 発明者 梶田 忠宏  
 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2  
 国際試薬株式会社 研究開発  
 センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫測定方法及び試薬キット

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

トロンビン-アンチトロンビンIII複合体を免疫学的に測定する方法において、夾雜する交差反応物質であるアンチトロンビンIII及びプロトロンビンのジスルフィド結合を開裂する物質の存在下で測定のための免疫反応を行うことを特徴とする免疫測定方法。

## 【請求項 2】

夾雜する交差反応物質であるアンチトロンビンIII及びプロトロンビンのジスルフィド結合を開裂する物質が、少なくともジチオスレイトール、メルカプトエチルアミン、グルタチオン、メルカプトエタノール、モノチオリン酸、水素化ホウ素ナトリウム、ジチオエリスリトール、チオグリコール酸、亜ニチオン酸塩、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、亜硫酸塩、チオグリセロール、及び臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素塩から選ばれた1種または2種以上である請求項1に記載の免疫測定方法。 10

## 【請求項 3】

トロンビン-アンチトロンビンIII複合体を免疫学的に測定するための測定試薬キットであって、

トロンビン-アンチトロンビンIII複合体と結合する抗体と、

夾雜する交差反応物質であるアンチトロンビンIII及びプロトロンビンのジスルフィド結合を開裂する物質と、

を含む測定用試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、臨床検査分野において生体試料中の被検物質の免疫測定方法および測定用試薬キットに用いられる。

**【0002】****【従来の技術】**

免疫学的反応を利用する試料中の被検物質の測定は日常的に行なわれている。また該測定は、被検物質の濃度に応じて種々の測定原理で実施されている。その中でも免疫比濁法、ラテックス比濁法、酵素免疫測定法等が代表的な方法である。免疫学的反応に用いる抗体は、被検物質を抗原として調製され、一般にその抗原の類似物質に対して交差反応を示す。そのため、試料中に被検物質とその類似物質、すなわち交差反応物質、が共存している場合、免疫学的測定に使用する抗体の交差反応性が高いと正確な測定結果が得られない。従って一般に、交差反応性の低い抗体を選択して適切な測定系を構築する。

**【0003】**

トロンビンとアンチトロンビン - I I I 複合体 (TAT) 濃度を測定する場合、複合体を構成しているトロンビン及びアンチトロンビン - I I I (AT - I I I ) それぞれに特異的な抗体を用いてサンドイッチ酵素免疫測定法により測定する方法が知られている。このTATをラテックス免疫比濁法で測定しようとすると、TATに特異的で、かつトロンビン、プロトロンビン及びAT - I I I と交差反応しない抗体を調製する必要がある。しかしながら、通常血漿中のTAT濃度が約1～50ng/mL程度であるのに対して、AT - I I I の濃度は約250μg/mLと5,000～250,000倍も高い。従って、TAT特異的でかつAT - I I Iとの交差反応性が25万分の1以下のモノクローナル抗体を調製しなければならないが、そのようなモノクローナル抗体の調製は困難であり、現在ラテックス免疫比濁法によるTATの測定試薬は実用化されていない。

**【0004】**

一方、生体試料中に生成している病原体等に対する抗体価を血球凝集等の免疫凝集反応で測定する場合、その抗体がIgG型であるかIgM型であるかを調べるために、試料をジチオスレイトール等の還元剤で処理することによりIgM型の抗体の抗体活性を低下させ、得られる凝集の低下度合いからIgM型の存在を確認する方法が知られている。しかしながら、抗原を測定する方法においては、夾雑する交差反応物質を化学的に処理することにより被検物質を特異的に測定することは考えも及ばないことがあった。

**【0005】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、トロンビン - アンチトロンビンIII複合体を免疫学的に測定する方法において、試料中に交差反応物質であるアンチトロンビンIII及びプロトロンビンが共存していても、トロンビン - アンチトロンビンIII複合体を特異的に測定する方法及び測定試薬を提供することである。

**【0006】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、試料中に夾雑する交差反応物質のジスルフィド結合を開裂する物質を免疫反応系に存在させることにより、従来不可能であった、目的とするトロンビン - アンチトロンビンIII複合体を免疫学的に測定できることを見出し本発明を完成させるに至った。

**【0007】****【発明の実施の形態】**

本発明は、被検物質を免疫学的に測定する方法において、夾雑する交差反応物質の反応性を低減させる手段を導入する、詳しくは夾雑する交差反応物質の反応性を低減させる物質を存在させることを特徴とする免疫測定方法である。

**【0008】**

本発明において、交差反応性を低減できる物質としては、ジスルフィド結合を開裂する

10

20

30

40

50

物質または界面活性剤が有効である。具体的には、ジチオスレイトール、メルカプトエチルアミン、グルタチオン、メルカプトエタノール、モノチオリン酸、水素化ホウ素ナトリウム、ジチオエリスリトール、チオグリコール酸、亜ニチオン酸塩、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、亜硫酸塩、チオグリセロール、臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素塩等のジスルフィド結合を開裂させる物質の他、酸、アルカリ、カオトロピック化合物、水溶性有機溶媒、界面活性剤等を例示できるが、これらに限定されない。また、さらにEDTA等のキレート剤を用いてこれらジスルフィド結合開裂物質を安定化させてもよい。これらの物質は、1種または2種以上を適宜組み合わせて用いることができる。その使用濃度は、被検物質の測定に用いる抗体を使用して、これら物質の存在下でその交差反応を被検物質と交差反応物質とで比較実験することにより容易に決定できる。

10

#### 【0009】

また、夾雜する交差反応物質の反応性を低減させる手段は、上記のように好適には特定物質の添加により達成されるが、免疫学的反応性の知識に基づき、例えば反応液のイオン強度の調整、pHの調整、反応温度の調整等によっても可能である。すなわち、試料中の交差反応物質が既知であれば、当業者は該物質の免疫学的反応性(抗原抗体反応性)を低下させるために、免疫学的反応性に影響をもつ公知手段について簡単な実験的繰り返しにより、その物質の特異性のレベルを指標に容易に本発明への適用を可能とする。

#### 【0010】

本発明の免疫測定方法で測定しうる物質としては、試料中に夾雜する交差反応物質により測定が正確に行えない物質、例えば、トロンビン・トロンビン阻害物質複合体、プラスミン・プラスミンインヒビター複合体、トロンビンとヒルジン複合体、エラスターーゼと1-アンチトリプシン複合体、トリプシンとトリプシンインヒビター複合体、活性型X因子とAT-I II複合体、プロテインCとプロテインCインヒビター複合体、組織プラスミノゲンアクチベーターとプラスミノゲンアクチベーターインヒビター複合体、活性型VII因子と組織因子経路インヒビター(TFPI)、組織因子と凝固第VII因子複合体、プラスミノゲンとプラスミノゲンアクチベーター複合体、ヘモグロビンとハプトグロビン複合体、プロテインAまたはプロテインGと免疫グロブリン複合体等の複合体が例示できる。

20

#### 【0011】

また被検物質はこれらに限定されるものではなく、被験物質の免疫測定方法において試料中に交差反応物質が共存するあらゆる物質に利用できる。すなわち本発明の免疫測定方法は、これら複合体の測定に有用である他、交差反応により本来の測定目的とする物質の測定が正確に行えない場合に、交差反応を低減しうる物質を共存させる方法を採用できる物質に適用できる。

30

#### 【0012】

具体的には、被検物質としてトロンビン・トロンビン阻害物質複合体が好適に例示され、この場合、夾雜する交差反応物質はトロンビン阻害物質及び/またはプロトロンビンである。トロンビン阻害物質の代表的なものとしては、AT-I IIが挙げられる。

#### 【0013】

下記実施例に詳述するように、ラテックス粒子にAT-I IIとの交差反応性が100分の1程度のモノクロナール抗体を吸着させたラテックス試薬を調製し、該調製したラテックス試薬と血漿試料を混合してラテックスの凝集過程を光学的に測定する。血漿試料中には、AT-I IIが被検物質TATの5,000~250,000倍も多く存在するので、この試薬はAT-I IIとも反応し、TAT分子が存在しなくても、異常値上限(50ng/mL)の約5倍(250ng/mL)ものシグナルを与える。しかし本発明の夾雜する交差反応物質の免疫学的反応性を低減させる物質を添加することにより、その反応性を約100分の1以下に低減すれば、2.5ng/mL以下の測定値が得られ、臨床的に有用な検査測定方法を提供できる。

40

#### 【0014】

50

実施例にはトロンビン - トロンビン阻害物質複合体の測定において、A T - I I I の反応性を低減させる物質の一例としてジチオスレイトール ( D T T ) を用いているが、無論、上記の物質も適宜使用することができる。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明を適用することのできる免疫学的測定方法の例としては、酵素免疫測定法 ( E I A ) 、担体を用いる比濁法または担体を用いない免疫比濁法、イムノクロマト法、血球凝集等公知の免疫測定法が挙げられる。

#### 【 0 0 1 6 】

またさらに本発明は、上記の免疫測定方法において用いる測定試薬キットを提供する。

#### 【 0 0 1 7 】

10

#### 【実施例】

#### 【実施例 1 】

A T - I I I との交差反応が約 0 . 1 % 確認されている T A T 対するモノクロナール抗体 ( クローン N O . T A T 1 1 6 1 ) を E I A 用チューブに 1 0  $\mu$  g / m L の濃度で固定化した後、 1 w / v % の牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝食塩水 ( P B S 、 p H 7 . 2 ) でプロッキングした抗 T A T 抗体固定チューブを調製した。標識抗体には、市販キットの西洋わさび由来ペルオキシダーゼ標識抗ヒト A T - I I I 抗体 ( P O D 標識抗 A T - I I I 抗体 ) を用いて、サンドイッチ E I A 法により T A T を測定した。測定試料はヒト A T - I I I とヒトトロンビンを混合して調製した T A T 及び A T - I I I を 2 0 0  $\mu$  g / m L の濃度で加えた試料を用いた。通常の D I C ( 汎発性血管内凝固症候群 ) 患者血漿中においては、 T A T が形成されても過剰の A T - I I I が残存していることからこの人為的に調製した T A T と A T - I I I の混合物は、 D I C 患者血漿の代わりとみなすことができる。

20

#### 【 0 0 1 8 】

測定手順はすべて市販キットの取り扱い説明書に従って操作し、測定機器はエルジア F - 3 0 0 ( 国際試薬株式会社 ) を用いて、測定により得られたシグナルは相対蛍光強度として求めた。すなわち測定試料と反応用緩衝液を固相チューブに分注し、室温で 9 分間反応させた後、未反応物を吸引除去、洗浄後、 P O D 標識抗 A T - I I I 抗体液を添加し 9 分間反応させる。その後、 P O D 標識抗 A T - I I I 抗体液を吸引除去し洗浄後、基質液を分注し 9 分間反応後、酵素反応停止液を分注して蛍光強度を測定した。

30

#### 【 0 0 1 9 】

一方本発明の効果を確かめるために、反応用緩衝液及び P O D 標識抗 A T - I I I 抗体液にそれぞれ 1 0 m M のジチオスレイトール ( D T T ) を添加した試薬を用いて、上記の方法と同様操作し T A T を測定した。その結果を表 1 に示した。

#### 【 0 0 2 0 】

#### 【 表 1 】

#### T A T 測定結果

TAT濃度 (ng/mL)	DTT無添加試薬		10mM DTT添加試薬	
	TATのみ	TAT+AT-III	TATのみ	TAT+AT-III
0	3.2	350.8	2.9	3.4
5	12.3	352.2	13.7	14.1
10	22.5	348.3	24.3	25.9
20	41.6	351.9	42.1	42.9
30	65.3	357.9	66.8	66.1
50	124.9	347.5	129.4	128.4

40

#### 【 0 0 2 1 】

50

以上の結果、10 mMのDTTを無添加の試薬では試料にAT-I<sub>II</sub>Iが存在していると、AT-I<sub>II</sub>Iとの交差反応によるシグナルのため、TAT濃度依存性のTAT特異シグナルが得られないが、10 mMのDTTを添加した本発明の方法では、AT-I<sub>II</sub>Iが存在している試料においてもTAT濃度依存性のTAT特異シグナルが得られ、TATの測定が可能であることが判った。

## 【0022】

## 【実施例2】

実施例1で用いたTATに対するモノクロナール抗体とAT-I<sub>II</sub>Iとの交差反応が約0.3%ある別のTATに対するモノクロナール抗体(クローンNo.TAT1812)の二種類を等量混合して、0.35 μmのポリスチレンラテックス粒子に吸着させ、1w/v%の牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS緩衝液(pH7.2)に分散させ、波長660 nmにおける吸光度が約2.5となるようにラテックス粒子の濃度を調整した。

## 【0023】

上記BSAを含むPBS緩衝液に1w/v%のポリエチレングリコール6000を加えたラテックス反応用緩衝液に20 mMのDTTを添加したものとしないものの二種類の反応用緩衝液を調製した。実施例1で用いたTATのみの試料とTATにAT-I<sub>II</sub>Iを添加した試料をそれぞれ測定した。測定は、コアグレックス800型凝固自動分析器を用いて、試料20 μLと反応用緩衝液150 μLを37℃で5分間反応させて後、ラテックス試薬150 μLを添加して5分間の吸光度変化量を測定した。その結果を表2に示した。

## 【0024】

## 【表2】

TATラテックス試薬によるTAT測定におけるDTTの効果

TAT濃度 (ng/mL)	DTT無添加(A660 / 5分)		20 mM DTT添加(A660 / 5分)	
	TATのみ	TAT+AT-I <sub>II</sub> I	TATのみ	TAT+AT-I <sub>II</sub> I
0	0.005	0.412	0.006	0.005
5	0.034	0.422	0.029	0.033
10	0.072	0.437	0.070	0.070
20	0.151	0.429	0.148	0.152
30	0.216	0.449	0.223	0.219
50	0.321	0.428	0.318	0.327

## 【0025】

以上の結果より、DTT無添加の場合にはAT-I<sub>II</sub>Iでは試料にAT-I<sub>II</sub>Iが存在しているとTAT濃度依存性のシグナルが得られず、AT-I<sub>II</sub>Iによる凝集のため高値の吸光度変化が観測された。一方DTTを添加した場合にはいずれの試料もTAT濃度依存性の吸光度変化が求められ、TATを特異的に測定できることが判った。

## 【0026】

## 【発明の効果】

本発明は、トロンビン-アンチトロンビンIII複合体を免疫学的に測定する方法において、交差反応物質のジスルフィド結合を開裂する物質を存在させて測定することにより、トロンビン-アンチトロンビンIII複合体を特異的に測定する方法及び測定試薬を提供する。夾雜する交差反応物質のジスルフィド結合を開裂する物質を免疫反応系に存在させることにより、従来不可能であった目的とするトロンビン-アンチトロンビンIII複合体を免疫学的に測定できる。

---

フロントページの続き

(72)発明者 奥田 昌宏

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2

国際試薬株式会社 研究開発センター内

(72)発明者 日裏 久英

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2

国際試薬株式会社 研究開発センター内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第90/008320 (WO, A1)

特開平07-027764 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-579