

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4264199号
(P4264199)

(45) 発行日 平成21年5月13日(2009.5.13)

(24) 登録日 平成21年2月20日(2009.2.20)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78	B
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 21/78	Z

請求項の数 10 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-561500 (P2000-561500)	(73) 特許権者	507229021
(86) (22) 出願日	平成11年7月8日(1999.7.8)		ニコメッド ゲゼルシャフト ミット ベ
(65) 公表番号	特表2002-521667 (P2002-521667A)		シュレンクテル ハフツング
(43) 公表日	平成14年7月16日(2002.7.16)		Nycomed GmbH
(86) 国際出願番号	PCT/EP1999/004796		ドイツ連邦共和国 コンスタンツ ビイク
(87) 国際公開番号	W02000/005585		ーグルデンーシュトラーセ 2
(87) 国際公開日	平成12年2月3日(2000.2.3)		Byk-Gulden-Str. 2,
審査請求日	平成18年4月27日(2006.4.27)		D-78467 Konstanz, G
(31) 優先権主張番号	98113872.0		ermany
(32) 優先日	平成10年7月24日(1998.7.24)	(74) 代理人	100061815
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 矢野 敏雄
		(74) 代理人	100094798
			弁理士 山崎 利臣
		(74) 代理人	100099483
			弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疎水性の肺界面活性剤タンパク質SP-Cの測定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺界面活性剤タンパク質SP-Cの測定方法において、免疫学的方法によって測定を実施することを特徴とする肺界面活性剤タンパク質SP-Cの測定方法。

【請求項 2】

免疫学的方法が酵素イムノアッセイである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

酵素イムノアッセイを適当な固相上で実施する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

酵素イムノアッセイにおいて、試料をSP-Cに結合する一次抗体に曝し、結合した抗体の量を酵素標識を有する二次抗体を使用して測定し、その際、測定を酵素触媒による呈色反応または化学発光によって実施する、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

固相がクロマトグラフィープレートであり、試料をクロマトグラフィープレート上に分離して酵素イムノアッセイを実施する、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

固相がマイクロタイタープレートであり、酵素イムノアッセイをELISA技術を使用して実施する、請求項 3 記載の方法。

【請求項 7】

肺界面活性剤タンパク質SP-Cに特異的な抗体。

10

20

【請求項 8】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 7 記載の抗体。

【請求項 9】

r S P - C を抗原成分として使用し、抗体がヒトの肺界面活性剤中に存在する S P - C に特異的である免疫化法によって得られる抗体。

【請求項 10】

S P - C 特異抗体を含む、請求項 1 記載の方法を実施するための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は肺界面活性剤タンパク質 S P - C の測定方法、S P - C 特異的抗体ならびに該方法を実施するための試薬キットの供給に関する。

10

【0002】

全ての脊椎動物の肺は“肺界面活性剤”と呼ばれる物質混合物を含んでいる。該混合物は界面活性特性を有し、かつ肺の肺胞の領域における表面張力を低減させる。リン脂質、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C) およびホスファチジルグリセロール (P G) の他に、肺界面活性剤は他の必須の成分としてタンパク質を含有する。最近では、4 種の異なる界面活性剤タンパク質が記載されており、これらは発見された順序に応じて S P - A、S P - B、S P - C および S P - D と称される (Possmayer, F.: A Proposed Nomenclature for Pulmonary Surfactant-associated Proteins. Am. Rev. Respir. Dis. 1988, 138, 990-998)。用語 S P は界面活性剤タンパク質 (界面活性剤関連タンパク質、S P) を意味する。

20

【0003】

S P - B および、特に S P - C は強度に疎水性のタンパク質である。肺界面活性剤中の疎水性タンパク質の割合は約 1 % である (Curstedt, T., Joernvall, H., Robertson, B., Bergmann, T., Bergren, P.: Two Hydrophobic Low-Molecular-Mass Protein Fractions of Pulmonary Surfactant. Characterization and Biophysical Activity. Eur. J. Biochem. 1987, 168, 255-262)。

【0004】

肺界面活性剤の試料 (例えば肺洗浄から) 中のこれらの疎水性タンパク質の測定 (検出および、特に定量) はしばしば、全く可能であれば親水性タンパク質のために使用される技術を使用すると不十分な結果が得られる。親水性タンパク質の分離および測定のために慣用で使用される方法、例えば“ウェスタンブロッティング”または E L I S A (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 技術はある一定の条件下でのみ疎水性タンパク質に適用できる。それというの一方では“ウェスタンブロッティング”自体は半定量的であり、かつ他方では E L I S A の使用は、一般に水性系に可溶性のタンパク質を使用するのみ実施できるので非常に問題があるからである。殆どの場合には、定量されるべきほんの微量の分析物が存在するに過ぎない。更に、分析されるべき試料において S P - B および S P - C はしばしば、慣用の方法による定量をより困難にさえもする他の疎水性物質 (例えば脂質) と会合している。E L I S A において、試験されるべき物質を通常、混合物中に含まれる他の成分から測定前に分離しない。

30

40

【0005】

V a n E i j k とその助手 (Van Eijk, M., De Haas, C.G.M. and Haagsman, H.P.: Quantitative Analysis of Pulmonary Surfactant Proteins B and C. Analytical Biochemistry 1995, 232, 231-237) は肺界面活性剤の試料中の S P - C および S P - B の定量のための方法を記載している。界面活性剤タンパク質を含有する抽出物を高圧液体クロマトグラフィーによって分離し、かつ S P - B および S P - C を 228 nm の吸収によって検出および定量する (検出限界は 1 μg の S P - B および 4 μg の S P - C である)。

【0006】

S P - B に関しては、E L I S A 技術による定量的検出が記載されている (Kraemer, H.J., Schmidt, R., Guenther, A., Becher, G., Suzuki, Y., Seeger, W.: ELISA Techniqu

50

e for Quantification of Surfactant Protein B(SP-B) in Bronchoalveolar Lavage Fluid. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995, 152, 1540-1544)。S P - Cの測定のためのイムノアッセイは従来記載されていない。それというのも明らかにS P - C特異的抗体の調製がうまくいかなかったからである(Beers, M.F., Wali, A., Eckenhoff, M.F., Feinstein, S.L., Fisher, J.H. and Fisher, A.B.: Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1992, 7, 368-378)。

【0007】

本発明の課題は、試料中の肺界面活性剤タンパク質S P - Cの測定法を簡単な方法で、かつ高い感度で可能にする方法を提供することである。

【0008】

意外にもS P - Cに特異的であり、従って免疫学的方法でS P - Cを測定することを可能にする抗体を提供することに成功した。

【0009】

従って、本発明は、測定を免疫学的方法で実施して試料中のS P - Cを測定するための方法を提供する。

【0010】

他の内容は従属請求項から理解される。

【0011】

本発明の内容において、S P - Cの測定とはS P - Cの検出および、特に定量であると解されるべきである。

【0012】

本発明の内容において、用語“S P - C”とはP o s s m a y e r (Possmayer, F.: A Proposed Nomenclature for Pulmonary Surfactant-associated Proteins. Am. Rev. Respir. Dis. 1988, 138, 990-998)によって提案された命名に類似して、S P - Cと称される天然の肺界面活性剤またはホニユウ類の羊水中に存在する界面活性剤タンパク質の“ファミリー”と解されるべきである。

【0013】

更に用語“S P - C”は化学合成されたS P - Cまたは組み換えによって製造されたS P - CおよびS P - Cの変異体、例えば1種以上のアミノ酸を欠失しているか、または他のアミノ酸によって置換されているこれらの変異体も含む。化学合成されたS P - Cまたは組み換えによって製造したS P - CおよびS P - Cの変異体は、例えばW O 9 1 / 1 8 0 1 5号、W O 9 1 / 0 0 8 7 1号、W O 8 9 / 0 4 3 2 6号、W O 9 3 / 2 1 2 2 5号およびW O 9 5 / 3 2 9 9 2号に記載されている。

【0014】

有利にはS P - Cはヒトの肺界面活性剤またはヒトの羊水中に存在する界面活性剤タンパク質S P - Cを意味すると解される。

【0015】

本発明の内容において、“免疫学的方法”は免疫化学、特に抗原-抗体反応に基づく分析方法を意味すると解される。免疫学的方法の例はイムノアッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(R I A)、エンザイムイムノアッセイ(E I A、固相技術と組み合わせて: E L I S A)あるいは免疫蛍光測定法を含む。イムノアッセイは調査されるべき試料をS P - C結合抗体に曝し、かつS P - Cに結合する抗体の量を検出および定量することによって実施する。これらのアッセイにおいて、検出および定量は直接または間接的に公知法において実施される。このように、抗原-抗体複合体の検出および定量はS P - Cに対する抗体および/または一次抗体に対する二次抗体によって運ばれてよい適当な標識を使用することによって可能にする。前記のイムノアッセイの種類によって、標識は、例えば放射性標識、蛍光色素あるいは適当な基質を使用して検出および定量できるホスファターゼまたはペルオキシダーゼのような酵素である。

【0016】

本発明の1つの実施態様において、免疫学的方法は適当な固相を使用して実施する。挙げ

10

20

30

40

50

られる適当な固相は、慣用にE L I S A技術のために使用されるポリスチレン製の慣用の市販されているマイクロタイプレートまたはメンブレン（例えばポリビニリデンジフルオリド製、P V D F）を含む。意想外にも、本発明による方法においてはクロマトグラフィープレートも固相として使用するのに適当であることが判明した。クロマトグラフィープレートを使用する本発明による方法の遂行は以下にイムノ - T L Cと称する。

【 0 0 1 7 】

本発明による方法を実施するために、試料を固相に施与する。有利には試料は適当な溶剤中のS P - Cの溶液であり、かつ溶剤は試料を固相に施与した後に蒸発させる。調査されるべき試料の適当な溶剤中の溶液を調製するために、疎水性タンパク質を可溶化させるのに適当であると判明している有機溶剤または溶剤混合物を使用するのが有利である。挙げられる例は短鎖アルコール、特にメタノール、エタノール、2 - プロパノール（イソプロパノール）またはn - プロパノールである。更にイムノ - T L Cに関しては、非極性溶剤および極性溶剤が有用であると判明しており、その際、適当な非極性溶剤は、特にクロロホルム、メチレンクロリドおよびトルエンであり、適当な極性溶剤は短鎖アルコールである。クロロホルム / メタノール混合物が特に有利であると挙げられる。

10

【 0 0 1 8 】

所望であれば、少量の水および / または酸または塩基を前記の溶剤または溶剤混合物中に添加して、溶剤特性を改善してもよい。

【 0 0 1 9 】

気管支肺胞洗浄（B A L）試料または羊水試料のS P - C含有量をイムノ - T L Cによって測定する場合、S P - Cを固相への施与の前に水相（B A L試料、羊水）から適当な溶剤または溶剤混合物に移すのが有利である。これは便宜的に適当な有機溶剤または溶剤混合物による抽出、例えばブライ - ダイアー抽出法（Can. J. Biochem. Physiol. 1959, 37, 911-917）およびその後のフォルチ洗浄（Folch washing）（J. Biol. Chem. 1957, 226, 497-509）によって実施される。

20

【 0 0 2 0 】

気管支肺胞洗浄（B A L）試料または羊水試料のS P - C含量をE L I S A技術によって測定する場合、試料を適当な水に混和性の溶剤または溶剤混合物で希釈するのが有利である。挙げられる適当な水に混和性の溶剤または溶剤混合物は、特に短鎖アルコール、例えばエタノールおよびイソプロパノール、またはそれらの混合物である。

30

【 0 0 2 1 】

更に、本発明による方法に関しては調査されるべき試料中の妨害成分を試料中のS P - Cの免疫学的検出の前に固相上で分離または除去することが有利であると判明した。これは、調査されるべき試料中に他の成分、例えば他の界面活性剤タンパク質あるいは脂質がS P - Cの他に存在する場合に特に有利である。

【 0 0 2 2 】

クロマトグラフィープレートを本発明による方法において固相として使用する場合、試料は薄層クロマトグラフィーによって分離してよい。この目的のために溶剤の施与および蒸発の後に試料の薄層クロマトグラフィーを実施する。適当なクロマトグラフィープレートはそのコーティングが有機媒体中の疎水性混合物の分離のために適当である全てのプレートである。商標名D i o lでメルク・ダルムシュタットによって市販されている、変性シリカ基体を有するH P T L Cプレートが本明細書においては特に適当であると判明している。疎水性タンパク質の薄層クロマトグラフィーのために適当な溶剤は有機溶剤および溶剤混合物である。非極性溶剤および極性溶剤の混合物の使用が特に有利であり、その際、適当な非極性溶剤は、特にクロロホルム、メチレンクロリドおよびトルエンであり、かつ適当な非極性溶剤は短鎖アルコール、特にメタノール、エタノールおよびイソプロパノールである。所望であれば、少量の水および / または酸または塩基を添加してもよい。少量の水およびアンモニアを添加したクロロホルムおよびメタノールの混合物が有利である。試料のプレートへの施与ならびに分離の実施は慣用の方法で、例えば市販の装置を使用して実施する。施与されるべき試料は、有利には有機溶剤中のS P - Cの溶液である。免疫

40

50

学的検出のための準備において、クロマトグラフィープレートで薄層クロマトグラフィーによる分離後に乾燥させる。

【0023】

意想外にも、使用される固相がELISA技術において慣用に使用されるポリスチレン製マイクロタイタープレートである場合、試料中の妨害成分を試料の施与の後に1回以上の選択的な洗浄工程によって除去できることが判明した。この目的のために、調査されるべきBAL試料を有利には施与の前に水溶性有機溶剤（例えばアルコール、例えばイソプロパノール）で希釈し、かつpHを7未満（有利にはpH3~4）に調整する。所望であれば生物学的試料の不均質性によって引き起こされるプレート表面上へのSP-Cの不定の吸着量を最少化できる。これは、例えば試料の施与および乾燥の後（かつ洗浄の前に）に
10 適当な溶剤、例えばトリフルオロエタノール中に再溶解させ、引き続き乾燥させることによって実施できる。妨害成分は試料の施与および溶剤の蒸発後に適当な溶剤での洗浄によって除去できる。こうして妨害脂質を、例えばメタノールでの1回以上の洗浄によっ除去できる。

【0024】

免疫学的検出のための準備において、所望であれば固相を適当な方法で前処理する。例えば固相上の非特異的結合部位を適当なブロッキング溶液、例えばゼラチンまたはタンパク質溶液で飽和させてもよい。引き続き固相をSP-C特異的抗体の溶液と一緒にインキュベートする。該抗体が標識されていない場合、検出および定量は一次抗体を認識する標識された二次抗体を使用して実施できる。この目的のために、過剰の一次抗体を洗浄によっ
20 除去し、次いでプレートを標識された二次抗体と一緒にインキュベートする。洗浄によって過剰の抗体を除去した後に抗原-抗体複合体の検出および定量を標識によって実施する。

【0025】

検出および定量工程のために適当であり、かつ一次抗体または二次抗体によって運ばれてよい標識は当業者に公知である。挙げられる例は、放射性標識、蛍光色素および、有利には比色検出または化学発光検出を可能にする酵素、例えばホスファターゼまたはペルオキシダーゼを含む。使用される標識によって引き続きの検出または定量を公知法で実施する。
。

【0026】

本発明による方法をELISA技術を使用して実施する場合、有利には抗原-抗体複合体を、ペルオキシダーゼ-標識抗体および基質としてABTS(2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート])を使用する酵素触媒による呈色反応によって検出および定量する。しかしながら、検出に関して当業者に公知の他の発色法、化学発光法または蛍光法を使用してもよい。
30

【0027】

本発明による方法をイムノ-TLCを使用して実施する場合、抗原-抗体複合体を、有利にはルミノール^(R)(Luminol^(R))を基質として使用する酵素触媒による化学発光反応を介して検出および定量する。しかしながら、検出に関して当業者に公知の他の発色法、化学発光法または蛍光法を使用してもよい。
40

【0028】

既に記載したように、意想外にもSP-C、特にヒトの肺界面活性剤または羊水中に存在するSP-Cに特異的な抗体を提供することに成功した。従って本発明はSP-C、特にヒトの肺界面活性剤または羊水中に存在するSP-Cに特異的な抗体を提供する。更に該抗体は、有利には他の界面活性剤タンパク質、例えばSP-AおよびSP-Bといかなる交差反応性を示さないことを特徴としている。

【0029】

有利にはSP-C特異的抗体はポリクローナル抗体である。

【0030】

SP-C特異的抗体は当業者に公知の方法（例えばAntibodies: A Laboratory Manual. E
50

ds. E. Harlow and D. Lane. Cold Spring Harbor Laboratory 1987記載されているような)と類似に製造される。

【0031】

S P - C に対するポリクローナル抗体の製造は公知の免疫化法によって有利に実施される。本明細書においては、免疫化法における抗原として組み換え S P - C (以下に r S P - C と称する)を使用し、かつ通常使用するより大量の抗原を使用し、かつ抗原投与の回数を増加させることが有利であると判明している。免疫化法において、0.5 mg ~ 2 mg (有利には 1 mg) の r S P - C を有利には抗原投与あたりに使用し、その際、抗原投与の回数は、有利には 3 ~ 6 週間 (有利には 4 週間) の間隔において、有利には 5 ~ 7 回である。更に r S P - C は不溶性粒子の形 (凝集物または沈殿物) でか、またはキャリア分子とカップリング (例えばタンパク質またはビーズ) させて使用することが有利であると判明している。凝集体および沈殿物は、有利には “実施例” において記載されるように慣用の方法で得ることができる。

10

【0032】

挙げられる免疫化法での使用のために適当な r S P - C はヒューマンアイデンティカルなジパルミトイル化された組み換え S P - C (r h S P - C 2 P a m) または S P - C の組み換え変異体 (modification) を含む。挙げられる S P - C の組み換え変異体は、例えば国際特許出願 W O 9 5 / 3 2 9 9 2 号に記載される 3 4 アミノ酸を有するパルミトイル化されていないヒューマンアイデンティカルな組み換え S P - C (r h S P - C) または S P - C 変異体を含み、その際、該アミノ酸配列の位置 4 および 5 のアミノ酸はフェニルアラニンであり、かつ該アミノ酸配列の位置 3 2 のアミノ酸はイソロイシンである (該アミノ酸配列内に規定された位置は W O 9 5 / 3 2 9 9 2 号に記載される式 I のペプチドのためのアミノ酸配列に基づく)。 r S P - C 3 4 (F F / I) と称されるペプチドの遺伝子工学による製造は同様に W O 9 5 / 3 2 9 9 2 号に記載されている。

20

【0033】

また従って本発明は S P - C 、特にヒトの S P - C に対するポリクローナル抗体を免疫化によって製造するための方法に関し、その際、免疫化のために使用される抗原成分は組み換え S P - C である。

【0034】

例によって、S P - C に特異的な抗体の製造ならびに試料中の S P - C の免疫学的測定を以下に記載する。

30

【0035】

実施例

1. ポリクローナル抗体の調製

1.1 r S P - C に対する抗血清の調製

イソプロパノール / 水 (9 5 : 5) 中に溶解させた r S P - C [r h S P - C 2 P a m 、 r h S P - C または r S P - C 3 4 (F F / I)] 1 m g (p H 4) を真空濃縮器 (スピードヴァク^(R)) (Speedvac^(R)) 中で蒸発させ、かつ燐酸緩衝させた生理食塩水 (P B S) 0 . 5 m l 中で超音波浴中で超音波 (5 分間) でインキュベーションすることによって再懸濁させた。該工程によって抗原として使用される凝集 r S P - C が得られた。次いで該懸濁液を基本的な免疫化のためにフロイント完全アジュバント 0 . 2 m l と混合し、追加抗原注射のためにフロイント不完全アジュバント 0 . 5 m l と混合した。この目的のために、溶液を挿管によって連結された 2 つのシリンジ間で前後に 5 ~ 1 0 回押し動かした。次いでエマルジョン 0 . 2 m l 部をウサギに皮下注射した。免疫化計画は標準的なプロトコールによって実施した：一次免疫化の後に、5 回の追加抗原注射を 4 週間の間隔で投与した。その都度、血液試料を採取し、最後の注射の 1 0 日後に力価の展開を観測した。力価が十分になったらすぐに、血液 5 0 m l を採取し、かつ血清を標準的方法で調製した。

40

【0036】

また基本的な免疫化のために A B M - S (アンチボディマルチプライアースペシャル) を

50

使用でき、かつ追加抗原注射のためにAMB-N(アンチボディマルチプライアーノーマル)を使用できるか、または他の公知のアジュバントを免疫化のために使用できる。フロイントアジュバントの使用によって、一方ではABMアジュバントを使用する場合よりかなり高い抗体価が得られ、他方ではフロイントアジュバントは動物100%において免疫応答を誘発し、かつABMが使用される場合には、僅か約50%の動物だけが誘発されるに過ぎない。更にrSP-Cを適当な担体材料、例えば活性化CHセファロースにカップリングさせ、次いでアジュバント、有利にはフロイントアジュバントを使用するか、または使用しないでウサギに皮下で投与してよい。

【0037】

全ての適当な動物種を抗体の調製のために使用できる。従ってウサギの他にニワトリを使用してもよい。

10

【0038】

1.2 力価の測定

個々の血清において、力価を異なる希釈でウェスタンブロット分析を使用して標準的な方法によって測定した。ゲル電気泳動のために、シェガーおよびジャゴウ(Schaegger and Jagow(Analyt. Biochem. 1987, 166:368-379))によるSDS/トリシン法を使用した。

本明細書においては、0.1μgの適当なrSP-Cを15%濃度のポリアクリルアミドゲル中で分離し、PVDf(ポリビニリデンジフルオリド)メンブレンにトランスファーし、1:1000、1:5000、1:10000および1:25000、1:50000、1:100000および1:200000の希釈で血清と一緒にインキュベートした。結合した一次抗体をペルオキシダーゼをカップリングさせた二次抗体(抗ウサギIgGまたは抗ニワトリIgY)によってアマシャム(Brunswick)からのECL(Enhanced Chemiluminescence)系を使用する化学発光を介して検出した。力価は1:10000~>1:200000で変化した。ウェスタンブロットティングでの検出限度は<10~100ngで変化した。

20

【0039】

1.3 得られた抗体の特異性：他の肺界面活性剤タンパク質との相互反応

全ての抗血清/抗体をその都度抗原として使用されるrSP-Cと反応させた。意外にもこれらは天然のジパルミトイル化されたSP-C(hSP-C2Pam;ヒトまたは動物の肺洗浄から単離した)ならびにまた他の天然もしくは変異rSP-Cとも相互反応した。

30

【0040】

抗血清/抗体は他の肺界面活性剤タンパク質、例えばSP-AまたはSP-Bと反応しない。従って抗血清はSP-C、特にヒトのSP-CをSP-Cの未知の含有量を有する溶液、例えば肺洗浄または羊水中で検出するため、または免疫組織化学および免疫細胞化学を使用して組織切片上で検出を実施するために適当である。

【0041】

2. イムノ-TLC

2.1 試料調製：気管支肺胞洗浄(BAL)からのSP-Cの抽出

0.8mlのBAL、2.0mlのメタノールおよび1.0mlのクロロホルムを遠心分離管中にピペティングし、ヴォルテックス(Vortex)を使用して完全に混合した。もう1.0mlのクロロホルムの添加によって相分離が生じた。繰り返し混合した後に、1.0mlの超純水を添加し、かつ試料を再度ヴォルテックスを使用して約30秒間混合した。試料を2400rpmで5分間遠心分離した。下相を(所望であれば2工程)エッペンドルフキャップ(Eppendorf cap)中に移し、スピードヴァクを組み合わせて使用して蒸発乾涸させた。その間に、上相を2.0mlのクロロホルム/メタノール/水(86/14/1、容量)で洗浄した。第2の下相をその都度、第1の相の同一のエッペンドルフキャップ中に移し、前記のように遠心分離し、また蒸発乾涸させた。上相を廃棄した。抽出物をクロロホルム/メタノール70:30(v/v)中に取った。

40

【0042】

50

2.2 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層クロマトグラフィーのために、変性シリカマトリックスを有するメルクダルムシュタットによって商標名 Diol として市販されている HPTLC プレートを使用した。試料を自動的に HPTLC プレート上にリングメート IV (Lingmat IV) (Camag, Berlin) を使用して施与した。試料を施与した後に、プレートを空気乾燥させ、かつそのクロマトグラフィーを CHCl_3 : MeOH 混合物 [CHCl_3 / MeOH / 25% 濃度 $\text{NH}_4\text{OH} / \text{H}_2\text{O} = 32.5 / 15 / 1 / 2$ (容量)] を液相として使用して実施した。クロマトグラフィー後にプレートを乾燥させた。

【0043】

2.3 免疫学的検出および定量

非特異的結合部位を飽和させるために、乾燥させた HPTLC プレートを 3% 濃度の PBS 中の魚のゼラチン (これは 150 mM の NaCl、12 mM の Na_2HPO_4 および 3 mM の NaH_2PO_4 (pH 7.4) を含有する) と一緒に 4 時間インキュベートした。次いで該プレートを一晩インキュベートし、通常 1 : 10000 の希釈で SP-C 特異的の一次抗体の存在下に緩慢に振盪させた。結合していない抗体を TBS/T での繰り返しの洗浄によって 4 mM のトリス塩酸、100 mM の NaCl、0.05% の Tween-20 (pH 7.4) から分離した。一次抗体とのハイブリダイゼーションのために、プレートをセイヨウワサビのペルオキシダーゼ標識された二次抗体と一緒に TBS/T 中 1 : 100000 の希釈で 2 時間インキュベートした。結合していない抗体を前記のように TBS/T でのプレートの繰り返しの洗浄によって分離し、免疫反応性の複合体をアマシャム ブラー (Amarsham Buchler) からの ECL 検出システム (ルミノール[®]) およびエンハンサーからなる) を使用して可視化した。プレートを X 線フィルム (ハイパーフィルム アマシャム) に 1 ~ 10 分間曝した。

【0044】

2.4 X 線フィルムのビデオイメージングおよびコンピュータによる評価

免疫複合体を定量するために、X 線フィルムをビデオイメージャー (サイバーテック、ベルリン、ドイツ) を使用してデジタル化した。X 線フィルム上のシグナル強度をデンストメーターソフトウェア Diana を使用してコンピュータによって評価した (Raytest)。

【0045】

2.5 SP-C の定量

肺界面活性剤タンパク質 SP-C を測定するために、BAL フラクシオンを抽出した。少量の SP-C を定量するために、標的タンパク質を高率の脂質から分離する必要がある。このことは薄層クロマトグラフィーによって達成される。使用されるフラクション中の SP-C はスタンダードを使用して定量した。

【0046】

3. ELISA 技術

3.1.1 試料調製および PBS 緩衝液を使用するマイクロタイタープレートの被覆

ELISA のために使用される担体材料はポリスチレン製の 96 ウェルを有するマイクロタイタープレート (ポリソープ[®]) F96 (Polysorp[®]) F96) 証明書付、Nunc, Wiesbaden) である。スタンダード (ヒューマンアイデンティカル rSP-C、 $c = 300 \mu\text{g} / \text{mL}$) をイソプロパノール/水 (80 : 20, pH 3.0) と $40 \text{ ng} / \text{ウェル} \sim 312.5 \text{ pg} / \text{ウェル}$ ($v = 100 \mu\text{l} / \text{ウェル}$, $c = 0.4 \sim 0.003125 \mu\text{g} / \text{rSP-C}$ の mL に相当する) の一連の濃度で希釈した。測定されるべき試料 (気管支肺胞洗浄、BAL) をイソプロパノール/水 (80 : 20, pH 3.0) で希釈した。通常、全容量 $100 \mu\text{l}$ 中の BAL $10 \mu\text{l}$ または $20 \mu\text{l}$ をウェルにピペティングした。各プレートは内部標準 (定義された SP-C 濃度を有する BAL) を有する。全ての試料およびスタンダードを一双で測定した。全ての希釈をポリプロピレン製の 2 mL の反応容器 (エッペンドルフ、ハンブルク) 中で実施した。

【0047】

10

20

30

40

50

試料およびスタンダードのピペティングの後に、マイクロタイタープレートを通気された乾燥キャビネット中で37℃で6時間乾燥するまでインキュベートした。生物学的試料の不均一性によって惹起されるプレート表面におけるSP-Cの可変的吸着を100μlのトリフルオロエタノール中に再び吸収させることによって最少化させた。更なる乾燥工程(37℃、3時間)後に、SP-Cに対して約50~100倍過剰に存在するリン脂質を2回の連続的な洗浄工程によって選択的に除去した。第1工程においては、200μlのメタノールを添加し、かつプレートを室温で攪拌しながら(20分間)インキュベートした。溶剤をデカンテーションで除去し、次いでプレートを200μlのメタノールでもう一度洗浄し、メタノールを直ちにデカンテーションで除去した。次いでプレートを200μlのPBS/0.5%のTween 20で3回洗浄した。

10

【0048】

3.2.1 試料調製およびトリス塩酸緩衝液を使用するマイクロタイタープレートの被覆

全てのスタンダード溶液およびSP-Cの水性試料を80%の2-プロパノール/20%の水(v/v) pH3.5と混合した。SP-Cスタンダード(ヒトのrSP-C、c=300μg/ml)を0.4~0.003125μg/mlの最終濃度に希釈した。水性試料(気管支肺胞洗浄液、BALF)を80%の2-プロパノール/20%の水(v/v) pH3.5と1:5(v/v)で混合した。全ての希釈を20mlのポリプロピレンバイアル(エペンドルフ、ハンブルク、ドイツ)中で実施して容器壁にSP-Cが吸着するのを防ぎ、次いで各試料またはスタンダード100μlの容量をポリスチロールのマイクロタイタープレート(ポリソープ^(R)F96、保証書付、Nunc, Wiesbaden, Germany)に移した。公知のSP-C含量を有するBALF試料を各マイクロタイタープレート上で同時に処理した。全てのスタンダードおよび試料を一双に処理した。

20

【0049】

液体の除去は37℃で一晩の蒸発によって達成した。引き続きの100μl/ウェルの1,1,1-トリフルオロエタノールの添加に引き続いて、再び37℃(3時間)での蒸発によって生物学的試料のプレートへの吸着を最適化した。リン脂質をメタノールでの2回の引き続いての洗浄工程によって選択的に除去した。この目的のために、200μl/ウェルのメタノールをプレートに施与し、かつ周囲温度下に緩慢に振盪させながら20分間インキュベートした。有機溶剤のデカンテーションの後に、該工程を更にインキュベートせずに繰り返した。デカンテーション後直ちに、ウェルを50mMのトリス塩酸pH7.6+0.5%のTween 20(シグマ、ディーゼンホフェン、ドイツ)で3回洗浄した。

30

【0050】

3.2.1 PBS緩衝液を使用する免疫学的検出および定量

以下のELISAシステムはラインケ他(Reinke et al)によって開発された方法(Prostaglandins 1989, 37:577-586)に基づいている。過剰の結合部位をブロッキングするために、試料をPBS/1%のウシ血清アルブミン(BSA)と一緒に2時間インキュベートした。PBS/0.5%のTween 20で3回すすいだ後に、SP-C抗血清を施与した。この目的のために、抗血清をPBS/1%のBSA中で1:2000で希釈し、この溶液の200μlを各ウェルにピペティングし、プレートを室温で12~15時間インキュベートし、かつ引き続きもう一度3回洗浄した(前記参照)。200μlのピオチニル化した抗ウサギ抗体(ロバ、アマシャム-ブフラー、ブルンスウィック)のPBS/1%BSA中での1:1000希釈を次いで施与し、プレートを室温で2時間インキュベートした。過剰の抗体を除去するために、プレートを3回洗浄した。次いで試験の感度をアビジン/ピオチンペルオキシダーゼ技術(AB複合体、ダコ、ハンブルク)を使用して向上させた。この目的のために、1滴のアビジン溶液および1滴のピオチニル化したセイヨウワサビペルオキシダーゼ溶液を5mlのPBSに添加し、混合物を30分間平衡化させた。200μlのこのストック溶液のPBS/1%BSA中での1:50希釈をプレート上で2時間インキュベートし、かつ引き続きプレートをもう一度3回洗浄した(前記参

40

50

照)。

【0051】

酵素的顯色は基質、2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート] (ABTS) [NGO, T.T.: Chromogenic substrates for enzyme immunoassay in nonisotopic immunoassay, New York: Plenum Publishing Corporation, 1988, p. 57-84]の添加によって開始する。この目的のために、20mgのABTSおよび10 μ lの30%のH₂O₂を30mlの基質緩衝液(60mMの酢酸ナトリウム三水和物、50mMのリン酸二水素ナトリウム一水和物pH4.2)[PETERS, H. J.; BAUMGARTEN, H.; SCHULZE, M.: Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung. Berlin: Springer Verlag, 1985]中に溶解させ、かつこの溶液200 μ lをウェル中にピペティングした。顯色後(2時間、室温または一晩4 $^{\circ}$ Cで)に、試料をELISA測光器(リーダー400V.1.1(Reader 400V.1.1), SLT, Crailsheim)中で405または450nmで分光光度的に評価した。

10

【0052】

3.2.2 トリス塩酸緩衝液(Tris/Cl buffer)を使用する免疫学的検出および定量ウェルへの非特異的なタンパク質の結合を1%(w/v)のウシ血清アルブミン(BSA, Paesel and Lorei, Frankfurt/Main, Germany)を含有する50mMのトリス塩酸(pH7.6)緩衝液200 μ lでブロックした。周囲温度での2時間のインキュベーション後に、ウェルを50mMのトリス塩酸(pH7.6)+0.5%のTween20で3回洗浄し、かつ抗SP-C抗血清の50mMのトリス塩酸(pH7.6)+1%BSA中の1:2000希釈を添加した。12~15時間室温でインキュベートした後に、ウェルを前記のように大規模に洗浄し、かつ200 μ lのビオチニル化した抗ウサギ抗体(アマシャム-ブフラー、ブラウンシュバイク、ドイツ; 50mMのトリス塩酸(pH7.6)+1%BSA中1:1000)と一緒に2時間インキュベートした。遊離抗体の除去後に、200 μ lのアビジン-ビオチン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ複合体(AB複合体、ダコ、Glostrup, Denmark; 提供者の説明書によるストック溶液、作業溶液 トリス塩酸pH7.6+1%BSA中1:50)とのインキュベーションを更に2時間実施して引き続き洗浄した。酵素的色素変換は200 μ lの2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート](ABTS、ベーリンガー、マンハイム、ドイツ; 基質緩衝液30ml(60mMの酢酸ナトリウム+50mMのNaH₂PO₄(pH4.2))+10 μ lの30%のH₂O₂中の20mg)でウェルを充填することによって開始した。4 $^{\circ}$ Cで一晩のインキュベーション後に、吸光度を450nmで測定した。

20

30

【0053】

3.3 SP-Cの定量

BAL試料中のSP-Cをコンピュータ支援の三次スプライン補間によって所有しているrSP-Cスタンダードを使用して検量線を作成することにより定量した。

【0054】

商業的利用

本発明による方法は試料中のSP-C含量の定量的測定を有利に可能にする。例えばヒトの肺界面活性剤または羊水中のSP-C含量を測定でき、あるいは組織切片中のSP-Cを免疫組織化学および免疫細胞化学によって検出できる。このように本発明による方法は有利には肺界面活性剤不足または肺界面活性剤の組成の変化に関連する疾患状態を診断するために使用される(Guenther et al.: Surfactant Alternations in Severe Pneumonia Acute Respiratory Distress Syndrome and Cardiogenic Lung Edema. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996, 153, 176-184; Seeger et al.: Alveolar Surfactant and Adult Respiratory Distress Syndrome. Clin. Investig. 1993, 71, 177-190; Cosmi et al.: Respiratory Distress Syndrome: Requirements of Perinatal Diagnosis, Prevention and Treatment. In Lachmann B. Ed.: Surfactant Replacement Therapy in Neonatal and Adult Respiratory Distress Syndrome, Springer Verlag 1988)。例として挙げられる疾患状態は新生児呼吸困難症候群(IRDS)または成人呼吸困難症候群(ARDS)

40

50

である。

【 0 0 5 5 】

また本発明はヒトの肺界面活性剤または羊水中の S P - C 含量を免疫学的方法によって測定することを含む I R D S または A R D S の診断方法を提供している。

【 0 0 5 6 】

また本発明は本発明による方法を実施するための試薬キットに関し、その際、該試薬キットは S P - C 特異抗体を含む。どのように方法を実施するかに依存して、該キットは他の成分を含む。例として挙げられる他の成分は標識された二次抗体、緩衝溶液、洗浄溶液、検出工程に必要な試薬、クロマトグラフィープレートまたはマイクロタイタープレートおよび有機溶剤または溶剤混合物である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/543 5 5 5 P

- (74)代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (74)代理人 230100044
弁護士 ラインハルト・アインゼル
- (72)発明者 ヴォルフガング イーゼ
ドイツ連邦共和国 コンスタンツ テーゲルモスシュトラッセ 1 2
- (72)発明者 ヴォルフラム シュタインヒルバー
ドイツ連邦共和国 シュトックアッハ ヘルツォーク - エルヒアンガー - シュトラッセ 1 6
- (72)発明者 アンドレアス ギュンター
ドイツ連邦共和国 ポールハイム - ヴァーツェンボルン パーンホフシュトラッセ 3 1
- (72)発明者 ラインホルト シュミット
ドイツ連邦共和国 ブゼック ウンターストルート 6 9

審査官 竹中 靖典

- (56)参考文献 特許第 2 5 2 3 1 7 1 (J P , B 2)
特表昭 6 2 - 5 0 1 0 0 1 (J P , A)
特表 2 0 0 0 - 5 1 2 7 4 2 (J P , A)
特表平 0 4 - 5 0 6 8 0 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53
C07K 16/18
C12P 21/08
G01N 21/78
G01N 33/543