

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4438455号
(P4438455)

(45) 発行日 平成22年3月24日 (2010. 3. 24)

(24) 登録日 平成22年1月15日 (2010.1.15)

(51) Int. Cl. F 1
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/577 (2006.01) GO 1 N 33/577 B

請求項の数 8 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2004-60688 (P2004-60688) (22) 出願日 平成16年3月4日 (2004. 3. 4) (65) 公開番号 特開2005-249592 (P2005-249592A) (43) 公開日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15) 審査請求日 平成18年3月23日 (2006. 3. 23)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 000006770 ヤマサ醤油株式会社 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1</p> <p>(72) 発明者 中野 貴成 千葉県銚子市栄町2丁目2-2</p> <p>(72) 発明者 長田 篤雄 千葉県銚子市豊里台1-1044-734</p> <p>審査官 赤坂 祐樹</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖の測定法及びキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的に反応する2種類の抗体を使用し、免疫学的測定法により試料中に存在する遊離イムノグロブリン軽鎖を特異的に測定する方法であって、試料中の遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖を捕獲(トラップ)するための抗体として固相化された遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的であって、かつインタクトイムノグロブリンに結合する抗体を吸収、除去したポリクローナル抗体を使用し、トラップされた遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖を検出するための抗体として標識剤で標識された遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖の免疫学的測定法。

10

【請求項2】

遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的なポリクローナル抗体および遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的に反応するモノクローナル抗体が活性フラグメントの形で用いられる、請求項1の測定法。

【請求項3】

標識剤が酵素である請求項1に記載の測定法。

【請求項4】

遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖がベンスジョーンズ蛋白質(Bence Jones protein)である、請求項1に記載の測定法。

【請求項5】

20

遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的に反応する2種類の抗体を使用し、免疫学的測定法により試料中に存在する遊離イムノグロブリン軽鎖を特異的に測定するためのキットであって、試料中の遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖を捕獲(トラップ)するための抗体として固相化された遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的であって、かつインタクトイムノグロブリンに結合する抗体を吸収、除去したポリクローナル抗体を使用し、トラップされた遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖を検出するための抗体として標識剤で標識された遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖の免疫学的測定用キット。

【請求項6】

遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的なポリクローナル抗体および遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖に特異的に反応するモノクローナル抗体が活性フラグメントの形で用いられる、請求項5記載のキット。

10

【請求項7】

標識剤が酵素である請求項5に記載のキット。

【請求項8】

遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖がベンスジョーンズ蛋白質(Bence Jones protein)である、請求項5記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、遊離したヒトイムノグロブリンの軽鎖(遊離ヒトヒトイムノグロブリン軽鎖: FLC)の免疫学的測定方法及びそれに使用するキットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

遊離したイムノグロブリン軽鎖の型(free immunoglobulin light chain kappa: FLC)または型(free immunoglobulin light chain lambda: FLC)は、これまでの臨床検討において、多発性骨髄腫やアミロイドーシスなど免疫異常疾患の診断に有用であることが示され、臨床検査用マーカーとして期待されているものである。

【0003】

このFLCを測定するため、これまでFLCに特異的な抗体、特にポリクローナル抗体が広く用いられてきた。しかしながら、ヒト由来成分、特に血清中にはFLCの濃度の数千倍ものインタクトイムノグロブリンが含まれており、このインタクトイムノグロブリンの影響を回避するにはポリクローナル抗体の特異性では不十分であり、満足できる測定法とは言い難いものであった。また、蛋白尿を伴う患者などにおいては、血中のインタクトイムノグロブリンが糸球体を通り尿中に多量に排泄されるため、尿試料においてもインタクトイムノグロブリンの影響が懸念される。

30

【0004】

本発明者ら、固相化抗FLCモノクローナル抗体とヒトイムノグロブリンの軽鎖に特異的なモノクローナル抗体(この抗体は、インタクトイムノグロブリンの軽鎖とFLCに反応する)とを用いた測定系を開発したが(Journal of Immunological Methods, 275(2003), 9-17)、ポリクローナル抗体を用いた従来の測定系よりは優れたものであったが、この測定系であってもインタクトイムノグロブリンの影響を完全に回避することはできていない。

40

【0005】

【非特許文献1】Journal of Immunological Methods, 275(2003), 9-17

【特許文献1】特開昭53-44622号公報

【特許文献2】特公平2-39747号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

免疫学測定法において、測定上の特異性を向上させる1つの手段として、測定しようとする抗原をトラップする抗体としてモノクローナル抗体を用いるか（特開昭53-44622号公報参照）、トラップする抗体と検出する抗体の両方にモノクローナル抗体を用いる方法（特公平2-39747号公報）が常識とされている。

【0007】

本発明者らも、これらの方法を検討してみたが、FLCの測定においては、必ずしも効果的ではなく、より特異性の高い測定系の開発が切望されていた。

【0008】

本発明者らは、インタクトイムノグロブリンの影響を回避し、特異性の高いFLC測定法を開発すべく試行錯誤を繰り返した結果、試料中の遊離ヒトイムノグロブリン軽鎖を捕獲（トラップ）するための抗体としてFLCに特異的なポリクローナル抗体を使用し、トラップされたFLCを検出するための抗体としてFLCに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することにより、試料中に存在するFLCを特異的かつ高感度で測定できることを見いだした。このことは、上記した免疫学的測定における特異性向上のための常識からは、全く予想外のことであった。

【課題を解決するための手段】

【0009】

したがって、本発明は、FLCに特異的に反応する2種類の抗体を使用し、免疫学的測定法により試料中に存在するFLCを特異的に測定する方法であって、試料中のFLCを捕獲（トラップ）するための抗体としてFLCに特異的なポリクローナル抗体を使用し、トラップされたFLCを検出するための抗体としてFLCに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、FLCの免疫学的測定法に関するものである。

【0010】

また、FLCに特異的に反応する2種類の抗体を使用し、免疫学的測定法により試料中に存在するFLCを特異的に測定するためのキットであって、試料中のFLCを捕獲（トラップ）するための抗体としてFLCに特異的なポリクローナル抗体を使用し、トラップされたFLCを検出するための抗体としてFLCに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、FLCの免疫学的測定用キットに関するものである。

【発明の効果】

【0011】

試料中のFLCを捕獲（トラップ）するための抗体としてFLCに特異的なポリクローナル抗体を使用し、トラップされたFLCを検出するための抗体としてFLCに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用するという特殊な抗体の組み合わせによって、血清試料中のインタクトイムノグロブリンの影響を回避し、かつ高感度にFLCを測定することができることが可能となった。

また、蛋白尿を伴う患者などにおいては、尿試料においてもインタクトイムノグロブリンの影響が懸念されるが、本発明ではインタクトイムノグロブリンの影響を回避することが可能であるため、尿中のモノクローナルなFLCであるベンスジョーンズ蛋白質（Bence Jones protein: BJP）の測定にも適用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明で使用する試料は、FLCを含有するものであれば特に限定されず、具体的には血液自体または血清、血漿などの血液画分または尿などを試料として使用することができる。

【0013】

本発明で使用する抗体は、FLCに特異的に反応するモノクローナル抗体と、FLCに特異的に反応するポリクローナル抗体との2種類の抗体である。このような抗体は、抗体自体あるいはそれらの活性フラグメント〔F(ab')₂、Fab'など〕であってもかまわない。

【0014】

ここで、F L C に特異的に反応する抗体とは、インタクトイムノグロブリン中に存在する重鎖と結合した軽鎖に対する反応性が極めて弱いかまたは全く認識せず、重鎖に結合していない軽鎖には強く反応する抗体を意味する。

【 0 0 1 5 】

このような F L C に特異的に反応するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、常法により作製することができる。たとえば F L C を抗原とし、モノクローナル抗体を調製し、得られた抗体の中からインタクトイムノグロブリンとは結合せず、F L C と特異的に結合する抗体を選出すればよい。

【 0 0 1 6 】

また、F L C に特異的に反応するポリクローナル抗体は、常法により作製することができる。たとえば F L C を抗原とし、ポリクローナル抗体を調製し、得られた抗体成分のうちインタクトイムノグロブリンに結合する抗体を吸収、除去すればよい。さらに、このような抗体は既に市販されており、利用可能である。ただし F L C に対する特異性を確認する必要がある。

【 0 0 1 7 】

本発明は、上述のような抗体を用いた免疫測定法により試料中の F L C を定量しようとするにあたり、試料中の F L C を捕獲 (トラップ) するための抗体として F L C に特異的なポリクローナル抗体を使用し、トラップされた F L C を検出するための抗体として F L C に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用するものである。免疫測定法自体は、従来行われている方法、手順など何等変わるものではない。

【 0 0 1 8 】

試料中の F L C を捕獲 (トラップ) するための抗体としては、担体に結合した固相抗体を例示することができる。

固相抗体を調製する際に使用する担体としては、通常使用されているもの、たとえば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン - ジビニルベンゼン共重合体、スチレン - 無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導體 (セファデックスなど)、アガロースゲル (セファロース、バイオゲルなど)、セルロース (ペーパーディスク、濾紙など) などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコーンなどの無機高分子化合物を例示することができ、これらはアミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、水酸基、スルヒドリル基などの官能基が導入されたものであってもよい。

【 0 0 1 9 】

担体の形状は、平板状 (マイクロタイタープレート、ディスクなど)、粒子状 (ビーズなど)、管状 (試験管など)、繊維状、膜状、微粒子状 (ラテックス粒子など)、カプセル状、小胞体状などいずれの形状であってもよく、測定法に応じて好適な形状の担体を適宜選択すればよい。

担体と抗体の結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法 (たとえば、「固定化酵素」(千畑一郎編、昭和 50 年 3 月 20 日、(株)講談社発行)参照)を採用することができ、とりわけ、物理的吸着法は簡便である点で好ましい。また、上記結合は直接行ってもよく、両物質の間に他の物質を介して行ってもよい。

このようにして得られた固相試薬は、非特異的結合を抑制するため、ゼラチン、B S A などの通常のプロッキング剤を用いてプロッキング処理を施してもよい。

【 0 0 2 0 】

また、トラップされた F L C を検出するための抗体としては、標識剤で標識された抗体を例示することができる。

標識剤としては、放射性同位体 (たとえば ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I など)、酵素 (たとえば - ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼなど)、補酵素・補欠分子

10

20

30

40

50

族(たとえば、FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど)、フルオレセイン誘導体(たとえば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチオフルバミルなど)、ローダミン誘導体(たとえば、テトラメチルローダミンBイソチオシアネートなど)、ウンベリフェロンおよび1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸などの蛍光色素、ルミノール誘導体〔たとえば、ルミノール、イソルミノール、N-(6-アミノヘキシル)-N-エチルイソルミノールなど〕などを例示することができる。

抗体と標識剤との結合は、成書〔たとえば、「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、(1986年発行)第102~112頁〕に記載されているような公知の方法から適宜選択して実施すればよい。

【0021】

このような固相抗体と標識抗体を用いての測定手順は、通常の免疫測定法の手順をそのまま採用すればよい。すなわち、固相抗体と被検試料を反応させ、必要によりBF分離後、さらに標識抗体を反応させる(ツーステップ法)か、固相抗体、被検試料及び標識抗体を同時に反応させ(ワンステップ法)、以後のそれ自体公知の方法により試料中のFLCを検出または定量することができる。

【0022】

なお、免疫測定法の詳細に付いては、たとえば以下の文献を参照すればよい。

- (1)入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」((株)講談社、昭和54年5月1日発行)
- (2)石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)((株)医学書院、1982年12月15日発行)
- (3)臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ-技術と応用-」(臨床病理刊行会、1983年発行)
- (4)「バイオテクノロジー事典」((株)シーエムシー、1986年10月9日発行)

【0023】

- (5)「Methods in ENZYMOLOGY Vol.70」(Immunochemical techniques (Part A))
- (6)「Methods in ENZYMOLOGY Vol.73」(Immunochemical techniques (Part B))
- (7)「Methods in ENZYMOLOGY Vol.74」(Immunochemical techniques (Part C))
- (8)「Methods in ENZYMOLOGY Vol.84」(Immunochemical techniques (Part D: Selected Immunoassay))
- (9)「Methods in ENZYMOLOGY Vol.92」(Immunochemical techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))

[(5) ~ (9) はアカデミックプレス社発行]

【0024】

本発明のキットは、上述の測定法を実施するためのものであり、たとえば、下記の試薬から構成される。

- 1) 固相化FLC特異ポリクローナル抗体
- 2) 標識化FLC特異モノクローナル抗体

また、標識化FLC特異モノクローナル抗体の代わりに標識化してないFLC特異モノクローナル抗体と二次抗体を使用してもよく、その場合には次の試薬から構成される。

- 1) 固相化FLC特異ポリクローナル抗体
- 2) FLC特異モノクローナル抗体
- 3) 標識化抗イムノグロブリン抗体

上記各試薬のほかに、必要により、発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、試料前処理用試薬などの各試薬から測定法に応じた適当な試薬を適宜選択し、本発明のキットに添付すればよい。

【実施例】

【0025】

以下、本発明について実施例をあげて具体的に説明するが、本発明はこれらによって何等限定されるものではない。

【0026】

10

20

30

40

50

< 方法 >

(1) F L C 特異モノクローナル抗体

F L C 特異モノクローナル抗体は F L C (Bethyl laboratories 社, Montgomery, TX) を B A L B / c マウスに免疫し、作製した(J. Immunol. Methods, 275, 9-17. (2003))。得られた抗体の F (a b ')₂ フラグメントをホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 標識した(J. Histochem. Cytochem., 22, 1084-91. (1974))。

また、遊離型と結合型両方のイムノグロブリン軽鎖に反応する抗全軽鎖モノクローナル抗体(抗total light chain 抗体)も同様に作製し、本実験に用いた(J. Immunol. Methods, 275, 9-17. (2003))。

【 0 0 2 7 】

10

(2) F L C 特異ポリクローナル抗体

F L C 並びに F L C 特異ポリクローナル抗体は Dakopatts 社 (Stockholm, Sweden) より購入した。

なお、F L C 特異ポリクローナル抗体は、I g G を結合した C N B r - S e p h a r o s e カラムにて I g G と交差反応する抗体を除去したのち使用し、F L C 特異ポリクローナル抗体は F L C を結合した C N B r - S e p h a r o s e カラムに供試し、F L C に特異的に反応する抗体を回収して使用した。また、これらの抗体についても F (a b ')₂ を作製し、H R P 標識した。

【 0 0 2 8 】

(3) 免疫測定法

20

F L C 測定法

F L C 特異抗体 1 0 μ g / m l 溶液を 9 6 穴マイクロプレート (N u n c 社, I m m u n o p l a t e I) に 1 0 0 μ l 毎分注し、4 で 1 晩反応させた。抗体液を吸引除去後、P B S で洗浄し、3 0 0 μ l の 0 . 5 % スキムミルクを含む P B S にてブロッキング (4 、一晩) を行った。反応後、ブロッキング液を吸引除去し、プレートを乾燥した。

この 9 6 穴マイクロプレートの各ウェルに標準濃度溶液、適宜希釈した I g G、ならびに検体試料などを 1 0 0 μ l 毎加え、室温で反応させた。0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む 2 0 m M H E P E S 溶液で洗浄した後、H R P 標識 F L C 特異抗体または抗全軽鎖モノクローナル抗体を 1 0 0 μ l 加え室温で反応させた。

30

未反応の H R P 標識抗体を洗浄除去後、ウェル内に残っている H R P 活性をその基質であるテトラメチルベンジジン (T M B) により検出し、得られた色素の吸光度をマイクロプレートリーダー (TECAN Spectra) で測定した。なおアッセイバッファとして 0 . 1 % T w e e n 2 0 ならびに 1 % ウシ血清アルブミンを含む 5 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5 を用いた。

【 0 0 2 9 】

F L C 測定法

F L C 測定法と同様の手順で行った。ただし洗浄液として 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を、またアッセイバッファとして 1 % ウシ血清アルブミンを含む P B S を用いた。

40

【 0 0 3 0 】

(4) 血清検体

本実験に使用した血清検体は健常ボランティア 4 3 例より得た。

【 0 0 3 1 】

< 結果 >

(1) 各種抗体を用いた免疫測定法における F L C に対する特異性の比較

F L C 定量のための免疫測定法において、以下 4 種の抗体の組み合わせを検討した。

(測定法 1)

固相 F L C 特異ポリクローナル抗体と H R P 標識 F L C 特異モノクローナル抗体

(測定法 2)

50

固相 F L C 特異ポリクローナル抗体と H R P 標識抗全軽鎖モノクローナル抗体
(測定法 3)

固相 F L C 特異モノクローナル抗体と H R P 標識 F L C 特異ポリクローナル抗体
(測定法 4)

固相 F L C 特異モノクローナル抗体と H R P 標識 F L C 特異モノクローナル抗体
【 0 0 3 2 】

図 1 は測定法 1 ~ 3 の結果を示したものである。測定法 2 または 3 では I g G に対する F L C の特異性が約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍であるのに対し、測定法 1 は F L C に対しては 1 0 万倍、F L C に対しては 1 万倍と高い特異性を示した。

なお、測定法 4 については、得られた抗 F L C モノクローナル抗体 9 種、抗 F L C
モノクローナル抗体 8 種を用い、可能なすべての組み合わせについて F L C または F L
C 測定の有用性を評価したが、F L C を検出可能な組み合わせは見いだせなかった。

これらの結果より、F L C に対し高い特異性を示した測定法 1 ならびに測定法 2 につい
て、血清中インタクトイムノグロブリンの影響を続けて評価した。なお、測定法 3 は特異
性が低いこと、測定法 4 については検出可能な組み合わせがなかったことから以後の実験
には用いなかった。

【 0 0 3 3 】

(2) 血清中インタクトイムノグロブリンの影響

測定法 1 ならびに 2 を用いて血清 4 3 検体中の F L C 濃度を測定した (図 2) 。また、
それらの測定値へのインタクトイムノグロブリンの影響を確認するため、血清中インタク
トイムノグロブリンを、サブクラス特異抗体カラムを用い吸収除去した検体についても同
様に測定を行った。なお、吸収前の I g G , I g A ならびに I g M の濃度は平均 1 2 . 0
m g / d l , 2 . 1 m g / d l , 1 . 3 m g / d l で、吸収後は 0 . 0 2 m g / d l , 0
. 0 0 5 m g / d l , 0 . 0 0 4 m g / d l であった。

【 0 0 3 4 】

吸収後の検体の測定値は F L C を添加したウシ血清を用いて得られた回収率により補正
した。測定の結果、測定法 1 では吸収前後においてその値はほぼ一致していたが、測定法
2 ではインタクトイムノグロブリン吸収前の血清で値が非常に高くなっており、インタク
トイムノグロブリンが交差反応していることがわかった。

これらの結果から、F L C を特異的に検出するには、固相化 F L C 特異ポリクローナル
抗体と F L C 特異標識モノクローナル抗体の組み合わせがもっとも有用であることが示さ
れた。また、この組み合わせによる測定では血清中インタクトイムノグロブリンの明ら
かな影響は見られなかった。

【 図面の簡単な説明 】

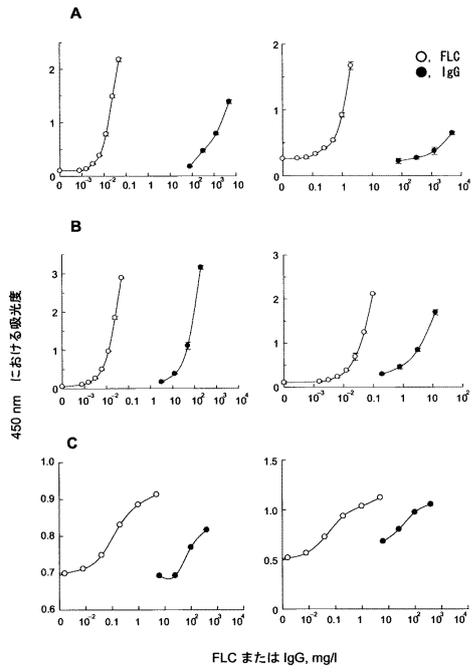
【 0 0 3 5 】

【 図 1 】 図 1 A は、測定法 1 (固相 F L C 特異ポリクローナル抗体と H R P 標識 F L C 特
異モノクローナル抗体を用いた免疫測定法) による F L C と I g G の測定結果を示す。

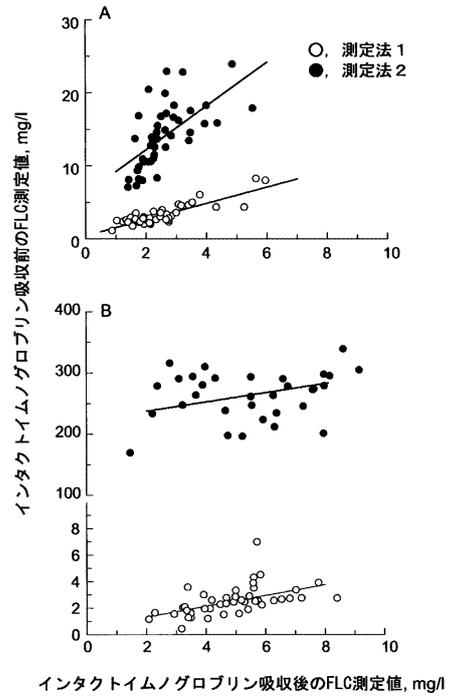
図 1 B は、測定法 2 (固相 F L C 特異ポリクローナル抗体と H R P 標識抗全軽鎖モノク
ローナル抗体を用いた免疫測定法) による F L C と I g G の測定結果を示す。 図 1 C は、
測定法 3 (固相 F L C 特異モノクローナル抗体と H R P 標識 F L C 特異ポリクローナル抗
体を用いた免疫測定法) による F L C と I g G の測定結果を示す。 なお、左の図は F L
C の測定結果を、右の図は F L C の測定結果を示す。

【 図 2 】 図 2 は、測定法 1 ならび測定法 2 における血清 4 3 検体またはそれらのインタク
トイムノグロブリン吸収後の測定結果を示す。 A と B はそれぞれ F L C と F L C の測
定結果を示す。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2002-202309(JP, A)

ELISAs for free light chains of human immunoglobulins using monoclonal antibodies: comparison of their specificity with available polyclonal antibodies, Journal of Immunological Methods, 2003年 4月 1日, Volume 275, 第9-17頁

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53 - 33/577