

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年6月7日 (07.06.2007)

PCT

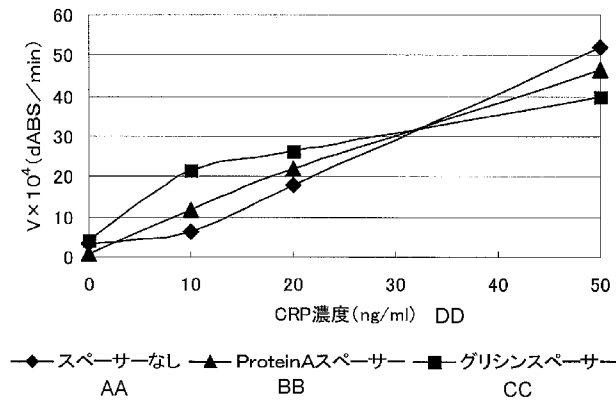
(10) 国際公開番号  
WO 2007/063616 A1

- (51) 国際特許分類:  
*G01N 33/53* (2006.01) *G01N 33/545* (2006.01)  
*G01N 33/543* (2006.01) *G01N 33/547* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/311129
- (22) 国際出願日: 2006年6月2日 (02.06.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2005-345713  
 2005年11月30日 (30.11.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人  
 日本大学 (NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275  
 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 神野 英毅  
 (KOHNO, Hideki) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田  
 区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内  
 Tokyo (JP). 小川 眞広 (OGAWA, Masahiro) [JP/JP]; 〒
- 1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学  
 校法人日本大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE  
 PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT  
 OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町  
 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
 可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
 BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
 DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
 ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,  
 LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
 MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,  
 RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,  
 TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
 能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
 SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
 KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

[ 続葉有 ]

(54) Title: ULTRAHIGHLY SENSITIVE DETERMINATION REAGENT FOR C-REACTIVE PROTEIN AND DETERMINATION METHOD

(54) 発明の名称: 超高感度 C-反応性タンパク質測定試薬及び測定方法



AA WITHOUT SPACER  
 BB WITH PROTEIN A SPACER  
 CC WITH GLYCINE SPACER  
 DD CRP CONCENTRATION (ng/ml)

(57) Abstract: Disclosed are: an ultrahighly sensitive determination reagent for a C-reactive protein (CRP) for use in the determination of the CRP in a test sample with high sensitivity; and a CRP determination method using the reagent. A reagent for use in the determination of a C-reactive protein, comprising an insoluble carrier particle and an antibody directed against the C-reactive protein which is carried on the carrier particle via an amino acid; and a method for the determination of a C-reactive protein comprising the steps of reacting the reagent with an antigenic substance in the test sample to produce an aggregate and determining the aggregate.

[ 続葉有 ]



WO 2007/063616 A1



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IS, IT, LI, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

---

(57) 要約: 本発明は、高い感度で被検試料中のC-反応性タンパク質 (CRP) を測定するための超高感度CRP  
測定試薬及びそれを用いたCRP測定方法に関する。 C-反応性タンパク質に対する抗体がアミノ酸類を介して  
担持された不溶性担体粒子を含有するC-反応性タンパク質測定試薬; 該測定試薬を被検試料中の抗原物質と反応  
させ、生じる凝集を測定するC-反応性タンパク質の測定方法。

## 明 細 書

### 超高感度C－反応性タンパク質測定試薬及び測定方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、高い感度で被検試料中のC－反応性タンパク質(CRP)を測定するための超高感度CRP測定試薬及びそれを用いたCRP測定方法に関する。

#### 背景技術

[0002] C－反応性タンパク(CRP)は、肺炎双球菌のC多糖体と沈降反応を示す血清タンパク質で、通常正常ヒト血清中に微量(平均580ng/ml)に存在する。CRPは、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じると急速に血中に増加し、病状の回復に伴い速やかに減少する特徴をもつ。従って、血中CRP濃度の測定は、細菌性感染症、心筋梗塞、悪性腫瘍等の疾患の重症度、経過、予後、あるいは治療効果の判定に広く臨床的に利用されている(非特許文献1参照)。

従来のCRP測定は、急性炎症時における通常時からの大幅な濃度上昇を測定していたため、感度に優れた測定法はあまり必要とされていなかった。しかし、近年、例えばラテックス粒子に抗体を担持させた免疫測定試薬等を用いたラテックス凝集法などの高感度CRP測定法が開発され、CRP濃度を低濃度域で測定することが、心筋梗塞や新生児感染症等の予知マーカーとして、また歯周病等の様々な疾患との関連性からも注目されている(特許文献1、非特許文献2参照)。

[0003] ラテックス凝集法は、CRP抗体感作ラテックス試薬と検体中のCRP抗原が、抗原抗体反応により結合し凝集体となることを利用して、この凝集を検出することによりCRP濃度を定量するものである。低濃度域での抗原量の少ない場合でも大きな凝集として現れ、感度良く測定できる。しかしながら、現在、臨床で使用されているラテックス凝集法によるCRPの定量は、感度が500ng/ml程度であるため、局所的炎症や小部位の病変を捉えることはできない。従って、より多くの炎症・病変を捉えるようにするために、従来よりも微量なCRP検出が必要であり、そのために、CRP測定試薬の感度をさらに高めることが求められている。

特許文献1:特開2001-330615号公報

非特許文献1:福岡良男ら、臨床免疫学、医歯薬出版、1997年

非特許文献2:高橋伯夫、「高感度CRP測定法の病態診断的有用性」、臨床病理、2002年、第50巻、p30-39

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明は、被検試料中のCRPを高い感度で、迅速且つ簡便に測定できる手段を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者は、ラテックス粒子表面に化学修飾を行い、スペーサー分子を導入して抗CRP抗体を感作したラテックス試薬を作製し、高感度化を検討したところ、前記特許文献1のようにポリペプチド(ポリグルタミン酸)等をスペーサーとした場合には、抗体を一定の配向性のもとで安定に固定化することができず、高い感度は得られないものの、スペーサー分子としてアミノ酸を導入し、このアミノ酸を介してラテックス粒子に抗CRP抗体を担持させれば、抗体に配向性を持たせることができ、極めて高感度で被検試料中のCRPを測定できることを見出し、本発明を完成した。

- [0006] すなわち、本発明は、C-反応性タンパク質に対する抗体がアミノ酸類を介して担持された不溶性担体粒子を含有することを特徴とするC-反応性タンパク質測定試薬を提供するものである。

また、本発明は、上記測定試薬を被検試料中の抗原物質と反応させ、生じる凝集を測定することを特徴とするC-反応性タンパク質の測定方法を提供するものである。

。

## 発明の効果

- [0007] 本発明のCRP測定試薬は、被検試料中のCRPを極めて感度良く検出できるため、これを用いれば、局所的炎症や小部位の病変等、体内の極小さい炎症も捉えることができ、臨床検査において疾患患者と正常者との判別、治療経過観察等に極めて有用である。

## 図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、各アミノ酸をスペーサー分子として用いたラテックス試薬の反応性の結果を示す図である。

[図2]図2は、アミノ酸をスペーサー分子として用いたラテックス試薬、スペーサー分子のないラテックス試薬及びプロテインAをスペーサー分子として用いたラテックス試薬の反応性の結果を示す図である。

[図3]図3は、肝疾患患者の血中CRP濃度を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明のCRP測定用試薬は、CRPに対する抗体がアミノ酸類を介して不溶性担体粒子に担持されている。

本発明における不溶性担体粒子としては、不溶性で、非特異的な反応を起こさず、かつ安定である限り、いかなる担体を使用してもよい。例えば、ラテックス粒子、ベントナイト、コロジオン、カオリン、固定羊赤血球等を使用することができ、特にラテックス粒子を使用するのが好ましい。

[0010] ラテックス粒子としては、特に限定されないが、粒径が比較的一定であり、一定の品質及び性能を有し、工業的に大量生産できる有機系微粒子が好ましい。前記有機系微粒子としては特に限定されず、例えばスチレン、塩化ビニル、アクリロニトリル、酢酸ビニル、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル等のビニル系モノマーの単一重合体及び／又は共重合体；スチレン-ブタジエン共重合体、メチルメタクリレート-ブタジエン共重合体等のブタジエン系共重合体等が挙げられる。これらのうち、生物学的活性を長期間安定に保持できる点で、ポリスチレン系のラテックス粒子が好ましい。

また、ラテックス粒子は、その粒子表面に官能基を有していてもよい。官能基は、スペーサー分子として用いられるアミノ酸類を固定化できるものであればよく、例えばカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、チオール基、グリシジル基、ハロゲン化アシル基、イソシアナート基、イソチオシアナート基、活性エステル基、酸無水物基等が挙げられる。このうち、特にカルボキシル基修飾のラテックス粒子を用いるのが好ましい。市販品としては、例えば「Immutex」(JSR(株)製)等を用いることができる。

[0011] ラテックス粒子の粒径は、0.01~1 $\mu$ mであるのが好ましい。粒径が0.01 $\mu$ mより小さいと微凝集が多発し、見かけの粒径が不均一となり、同時再現性等に悪影響が

及ぶことがあり、また抗体の数に対して十分な凝集が見られないことがある。他方、粒径が $1\mu\text{m}$ を超えると、自己凝集が進み、分散性が低下し易い。

[0012] 本発明におけるアミノ酸類は、アミノ酸、その塩又はそれらの水和物を包含する。また、アミノ酸類は、L-体、D-体いずれでもよく、ラセミ体も許容される。アミノ酸としては、特に限定されず、中性アミノ酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Cys-Cys、Asn、Gln、Leu、Ile、Val、Met、Phe、Tyr、Trp、Pro)、酸性アミノ酸(Asp、Glu)あるいは塩基性アミノ酸(His、Lys、Arg)のいずれも用いることができる。アミノ酸の塩としては、特に制限されず、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩；マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属塩；塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸塩；酢酸、クエン酸、p-トールエンスルホン酸等の有機酸塩等が挙げられる。このうち、反応性の点から、塩基性アミノ酸(His、Lys、Arg)、含硫アミノ酸(Cys、Met)、オキシアミノ酸(Ser、Thr)、脂肪族アミノ酸(Gly、Val、Leu)、酸性アミノ酸(Asp、Glu)、酸性アミノ酸アミド(Gln)その塩又はそれらの水和物が好ましく、特にアミノ酸の化学的性状よりArg、Glnが好ましい。

不溶性担体に担持されるアミノ酸類は、1つの不溶性担体に複数個固定化されているのが好ましい。

[0013] 本発明におけるCRPに対する抗体(抗CRP抗体)は、CRPに特異的に結合すればよく、その由来、種類(モノクローナル、ポリクローナル)および形状は限定されない。抗体の由来としては、特に限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、サル等が挙げられる。抗体の純度としては特に限定されず、例えばグロブリン画分であってもアフィニティ精製画分であってもよい。抗体は、公知の方法により調製した抗体、あるいは市販品を用いることができる。

また、本発明で用いられる抗体は、抗体の全体分子に限られず、CRPに結合する限り、抗体の断片またはその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。

[0014] 本発明において、アミノ酸類を不溶性担体に結合させる手段、及び抗CRP抗体を

アミノ酸類に結合させる手段としては、不可分に結合させることができれば特に制限されず、例えば共有結合等の化学的結合による結合が挙げられる。

[0015] 不溶性担体としてカルボキシル基修飾のラテックス粒子を用いた場合、本発明のCRP測定試薬の一部は、次の一般式(1)で表され、例えば以下の方法で作成できる。

[0016] [化1]



[0017] (式中、X-CO-はカルボキシル基修飾ラテックス粒子由来の残基を示し、NHCH(R<sub>1</sub>)CO-はアミノ酸由来の残基を示し、NH-Yは抗CRP抗体由来の残基を示す。)

すなわち、ラテックス粒子表面のカルボキシル基とアミノ酸のN末端アミノ基とを、例えば活性エステル法、混合酸無水物法等の公知の方法により脱水縮合してペプチド結合を形成させる。次いで、抗CRP抗体溶液を加え、公知のカップリング方法によりアミノ酸と結合させることで、本発明のラテックス試薬を得ることができる。

[0018] ラテックス粒子表面のカルボキシル基とアミノ酸のN末端アミノ基とを縮合させる方法は、特に制限されないが、例えば、0.5～2.0% (w/v) のラテックス粒子を緩衝液に懸濁し、この懸濁液に、ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WSC)等の水溶性カルボジイミドと、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール等を添加して、0℃～還流温度、好ましくは室温で20分～1時間反応させることによりカルボキシル基を活性エステル化する。次いで、0.1～10×10<sup>-4</sup> mol/mL、好ましくは0.5～5×10<sup>-4</sup> mol/mLに濃度調整したアミノ酸を添加して、室温～溶媒の沸点付近で加熱し、30分～2時間反応させればよい。ここで、反応に用いられる緩衝液としては、例えば、MES緩衝液、リン酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液等が挙げられ、反応におけるpHは、pH5～10、特にpH6～9が好ましい。

[0019] ラテックス粒子に担持されたアミノ酸に、抗CRP抗体をカップリングさせるには、上記緩衝液中で、アミノ酸のC末端カルボキシル基を上記と同様に活性エステル化した

後、50～400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CRP抗体を加えて4℃～40℃で、20分～1時間反応させればよい。反応後、遠心分離、ブロッキング処理等の通常の後処理を行うことにより本発明のラテックス試薬を得ることができる。

[0020] このように本発明のCRP測定試薬は、不溶性担体にアミノ酸類を介して抗CRP抗体を担持させることで、抗CRP抗体に配向性を持たせ、安定に保持させることができるため、例えば従来のLPIA法を利用したCRP定量法は、感度が500ng/mL程度であり、局所的炎症や小部位の病変を捉えることはできなかったが、本発明においては、感度が10ng/mLと云う約50倍の感度にまで上昇し、体内の極小さい炎症までも捉えることが可能である。従って、本発明のCRP測定試薬は、各種の感染症、炎症性疾患及び組織破壊をきたす疾患の診断や治療経過観察等に好適に用いられる。

そのような疾患の例としては、リウマチ、ウィルス性肝炎、肺炎、黄斑変性症、尿路感染症などの炎症、組織破壊性疾患、感染症、口蓋扁桃腺の炎症悪化等が挙げられる。

[0021] 本発明のCRP測定試薬中のCRPに対する抗体の濃度としては、被検試料中のCRPを測定できる濃度であれば特に制限されないが、50～400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とするのが好ましく、特に100～200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とするのが好ましい。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であると、感度が低いため、低濃度域での正確な定量ができにくく、他方400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えると、非特異的な凝集を生じ易い。

[0022] 本発明のCRP測定試薬には、抗CRP抗体を担持させた担体以外に、非特異性反応の防止、保存安定性の点から、ウシ血清アルブミン、ショ糖等を適宜溶解させてもよく、また塩濃度調整のために塩化ナトリウム等を溶解させてもよい。

さらに、本発明のCRP測定試薬は、抗CRP抗体がアミノ酸を介して担持された不溶性担体を分散及び溶解させた1液型試薬であってもよく、2液型又は3液型試薬として使用してもよい。また、試薬には、キットも含まれ、該キットは、適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

[0023] 本発明のCRP測定試薬を用いたCRPの測定方法の態様としては、LPIA法に代表される凝集反応を利用した測定方法を挙げることができる。ここで、測定とは、定量的又は非定量的な測定を含み、例えば、非定量的な測定としては、生成した凝集物



の度合いを目視で陰性(-)か陽性(+)かを判定する定性法が挙げられ、定量的な測定としては、CRPの濃度の測定、CRPの量の測定などを挙げることができる。

- [0024] CRP測定試薬と被検体試料との反応は、抗原抗体反応及びそれに伴う凝集反応であり、該反応が起こり得る条件であれば、その反応条件は特に限定されないが、例えば、恒温(20~37℃)で5秒~15分間行うのが好ましい。
- [0025] CRP測定用試薬と被検体試料との反応は、通常緩衝液中で行われる。緩衝液としては、抗原抗体反応が起こり得る溶液であれば特に制限されないが、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等が好ましく、反応におけるpHは、pH7~9の範囲が好ましい。また、上記反応液に、感度向上、反応促進又は安定化を目的に、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プルラン等の水溶性高分子；ウシ血清アルブミン、シヨ糖等の安定剤；アジ化ナトリウム等の防腐剤；塩化ナトリウム等の添加剤等を適宜添加してもよい。
- [0026] CRP測定用試薬を被検体試料中の抗原物質と反応させる際、抗CRP抗体を担持させた不溶性担体の反応液中における濃度としては、例えば不溶性担体がラテックス粒子である場合、0.01~5%(w/v)とするのが好ましい。0.01%(w/v)未満であると凝集塊の形成が不十分で必要な感度が得られにくく、他方5%(w/v)を超えるとバックグラウンドとしての吸光度が高すぎ、正確な定量が行えないことがある。
- [0027] 被検試料としては、CRPが含まれる可能性のある試料であれば特に制限されない。被検試料の具体的な例としては、例えば、血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、尿などを挙げることができる。また、生物の体から採取された細胞の培養液などの、被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。
- [0028] 生成した凝集の程度を定性する場合は肉眼で観察すればよく、凝集の程度を定量する場合は凝集体を光学的に測定すれば良い。光学的な測定方法は、通常行われている方法であれば特に制限されず、汎用の分光光度計、分光光度測定を測定原理とした生化学用自動分析装置、近赤外を測定波長とした装置、積分球濁度を測定原理とした装置、散乱光強度を測定する装置等の光学的測定機器などを用いることができる。

このうち、生成した凝集に近赤外光を照射して得られた単位時間当たりの吸光度変化から、CRP濃度を定量する方法が好ましい。測定波長は、400～1000nm、好ましくは500～800nmである。CRPの定量を行うには、例えば標準血清とその希釈系列等の既知量の測定試料について、本発明のCRP測定試薬を用いたCRP測定を行い、その測定値と既知濃度とから検量線を作成しておき、未知量の測定試料について同一条件で測定した測定値から予め作成しておいた検量線において対応する量を求めることによって行うことができる。

### 実施例

[0029] 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。

[0030] 実施例で使用した試薬及び材料は以下の通りである。

ラテックス粒子;平均粒径0.25～0.37 $\mu$ mの表面にカルボキシル基が修飾されたポリスチレンラテックス(「Immutex」JSR(株)製)を用いた。

ラテックス懸濁用緩衝液、抗CRP抗体希釈用緩衝液、抗CRP抗体、抗原CRP標準液;Dako社製のCRP測定用の試薬を用いた。

[0031] 実施例1 ラテックス試薬(1)の作製

1%カルボキシル基修飾ラテックス粒子懸濁液1.0mLに、20mg/mL濃度WSC溶液2.0mLと50mg/mL濃度NHS溶液0.23mLを攪拌しながら順に加え、25°Cで30分間攪拌しラテックス表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後、0.05M MES緩衝液(pH6.5)で洗浄し、次いで同MES緩衝液で $1.33 \times 10^{-4}$ mol/mLに調製した各スペーサー分子(Arg、His、Lys、Glu、Asp、Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、Leu、Ile、Val、Met、Phe、Tyr、Trp、Pro)2mLを加え、37°Cで1時間攪拌し、ラテックス粒子に結合させた。得られた溶液に、上記WSC溶液2mLとNHS溶液0.23mLを順に加えて攪拌し、スペーサー分子のカルボキシル基を活性化させた。攪拌後遠心分離(16000rpm、4°C、20min)し、上澄みと沈殿に分けた。沈殿は上記MES緩衝液で洗浄した。これに5.0mg/mLの抗CRP抗体溶液30 $\mu$ Lを加え、37°Cで30分間攪拌しスペーサー分子に結合させた。結合後遠心分離(16000rpm、4°C、20min)し、上澄みと沈殿に分けた。上澄みは後の操作でラ

テックス粒子への抗CRP抗体結合量の定量に使用した。

沈殿を、上記MES緩衝液2mLに懸濁し、粒子洗浄のため、1回結合後遠心分離(16000rpm、4°C、20min)した。遠心分離後、同MES緩衝液1.0mLに懸濁し、変性BSAを1mL加え、25°Cで30分間攪拌し、ラテックス粒子表面の抗CRP抗体結合部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.2)2.0mLに懸濁し、未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため、同Tris-HCl緩衝液2.0mLに懸濁して2回遠心分離(16000rpm、4°C、20min)した。最終的にTris-HCl緩衝液2.0mLに懸濁したものを、ラテックス試薬(1)とした。

[0032] 比較例1 ラテックス試薬(2)の作製

比較例として用いるため、スペーサー分子を介さずに抗CRP抗体を担持させたラテックス試薬を作製した。

1%カルボキシル基修飾ラテックス懸濁液1.0mLに、20mg/mL濃度WSC溶液2.0mLと50mg/mL濃度NHS溶液0.23mLを攪拌しながら順に加え、25°Cで30分間攪拌しラテックス表面のカルボキシル基を活性化させた。これに5.0mg/mLの抗CRP抗体溶液30 $\mu$ lを加え、37°Cで30分間攪拌しラテックス粒子に結合させた。結合後遠心分離(16000rpm、4°C、20min)し、上澄みと沈殿に分けた。上清は後の操作でラテックス粒子への抗CRP抗体結合量の定量に使用した。

沈殿を、上記MES緩衝液2.0mLに懸濁し、1.5%変性BSAを1.0mL加え、25°Cで30分間攪拌し、ラテックス粒子表面の抗CRP抗体結合部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.2)2.0mLに懸濁し、未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。最終的にTris-HCl緩衝液2.0mLに懸濁したものを、ラテックス試薬(2)とした。

[0033] 比較例2 ラテックス試薬(3)の作製

スペーサー分子としてプロテインA(SIGMA社製)0.5mgを1mLの0.05M MES緩衝液(pH6.5)に溶解したものを、ラテックス粒子に結合させた以外は、実施例1と同様にしてラテックス試薬(3)を作製した。

[0034] 試験例1 ラテックス粒子への抗CRP抗体結合量の測定

上記実施例1及び比較例1で得られた上清を用いて、BCA法によりラテックス粒子への抗CRP抗体結合量を測定した。すなわち、サンプル溶液とビスニコニン酸試薬をよく混和して、波長562nmにおける吸光度測定を行い結合量を算出した。

その結果、ラテックス試薬(1)における結合量は、抗体添加量に対し、平均で約65～75%結合していることが確認された。また、ラテックス試薬(2)における結合量は、抗体添加量に対し、約70%であった。

[0035] 試験例2 標準液を用いたラテックス試薬の評価

実施例1及び比較例1で作製したラテックス試薬(1)及び(2)をそれぞれCRPと反応させ、近赤外比濁法(LPIA法)でその凝集反応速度を測定した。測定には、全自動免疫血清検査システムLPIA-200((株)ダイアヤトロン製)を用いた。すなわち、測定キュベット内に、抗原CRP標準液30 $\mu$ L、Tris-HCl-BSA緩衝液(pH8.2)230 $\mu$ L、各ラテックス試薬30 $\mu$ Lを分注し、12秒毎に10分間波長950nmの吸光度変化を測定した。CRP定量と検出限界の測定は、スパーサーの異なるラテックス試薬の平均反応速度から検量線を作成し、それをもとに行った。図1に実施例1で得られた各ラテックス試薬の反応性の結果を示す。

その結果、実施例1で得られたラテックス試薬(1)では、CRP抗原濃度10ng/mLまで反応する高感度で安定した測定値を示した。一方、比較例1で得られたラテックス試薬(2)では、500ng/mLであった。よって、ラテックス粒子表面にスパーサー分子としてアミノ酸を介して抗体を結合させた試薬は、極めて高感度でCRPを測定できることが確認された。スパーサー分子としては、Arg>Gln>Met>Thr>His>Cys>Trp>Glu>Ile>Lys>Gly>Asp>Asn>Phe>Pro>Tyr>Ala>Leu>Val>Serの順で感度が優れていた。同じオキシアミノ酸であるThrとSerに反応性に差があることからヒドロキシル基の位置が反応性に影響を与えると考えられた。また、同じ含硫アミノ酸であるMetとCysでも差が認められたことから、スパーサー自身の性質と側鎖の長さが反応性に影響を与えると考えられた。

[0036] 試験例3 標準液を用いたラテックス試薬の評価

実施例1で作製したラテックス試薬(1)のうち、スパーサー分子としてグリシン(Gly)を用いた試薬、比較例1及び2で作製したラテックス試薬(2)、(3)をそれぞれCRPと

反応させ、試験例2と同様にして、近赤外比濁法(LPIA法)でその凝集反応速度を測定した。図2に各ラテックス試薬の反応性の結果を示す。

その結果、スペーサー分子としてグリシン(Gly)を用いたラテックス試薬(1)は、低濃度領域において、比較例1及び2で得られたラテックス試薬(2)及び(3)に比して約5倍の高感度で安定した測定値を示した。

[0037] 試験例4 ヒト血清中CRP測定

上記試験例2の抗原CRP標準液に代えて、正常者及び加齢(老年性)黄斑変性患者から採血して得られた血清0.5 $\mu$ Lを用い、血清中のCRP濃度を測定した。

[0038] その結果、実施例1で得られたラテックス試薬(1)では、CRP抗原濃度は、正常者検体数30で平均値422ng/mL(最大値1825ng/mL、最小値199ng/mL)で、老年性黄斑変性患者検体数32で平均値867ng/mL(最大値2694ng/mL、最小値327ng/mL)であり黄斑変性症患者と正常者を判別できた。よって、本発明の測定試薬を用いれば、体内の極小さい炎症までも捉えられることができることが確認された。

[0039] 試験例5 肝疾患患者血液中CRP測定

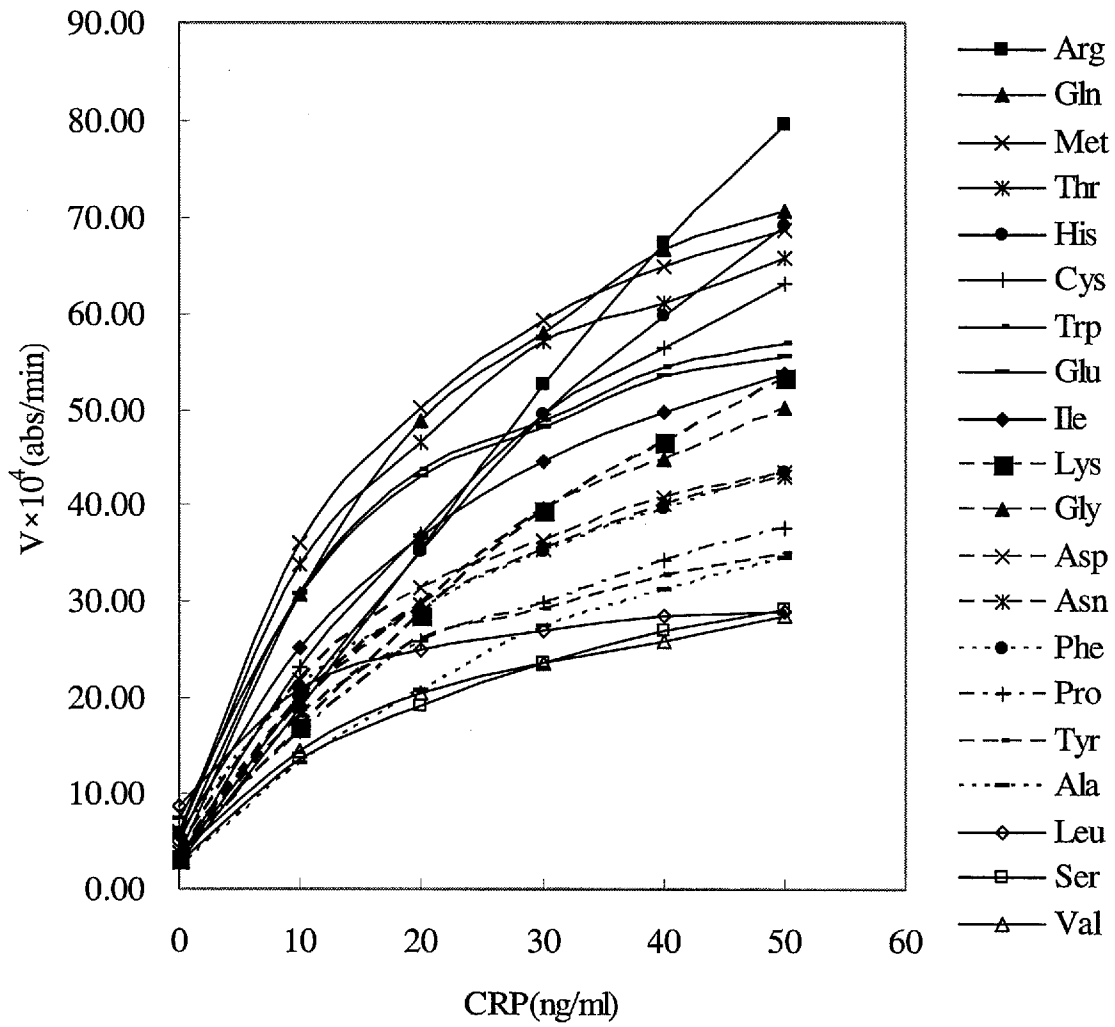
上記試験例2の抗原CRP標準液に代えて、各種肝疾患患者から採血をした血液0.5 $\mu$ Lを用い、血中CRP濃度を測定した。ラテックス試薬は、スペーサー分子としてグリシン(Gly)を用いた試薬を用いた。その結果を図3に示す。

測定の結果、CRP抗原濃度は、検体数514で平均値1106ng/mL、最高値14419ng/mL、最低値157ng/mLであった。肝臓疾患ではCRPは肝臓で生産されるため、CRP産生能の低下が示唆されている。しかし、本発明のラテックス試薬を用いることにより、疾患によるこのような高い値のCRPが確認された。このデータから、肝臓疾患がある人にも肝臓の炎症からCRPが産生されていることが明らかとなった。従って、本発明の測定試薬を用いて血清中CRP濃度を測定することにより、肝疾患患者等における合併症や治療経過観察に役立つことが期待出来る。

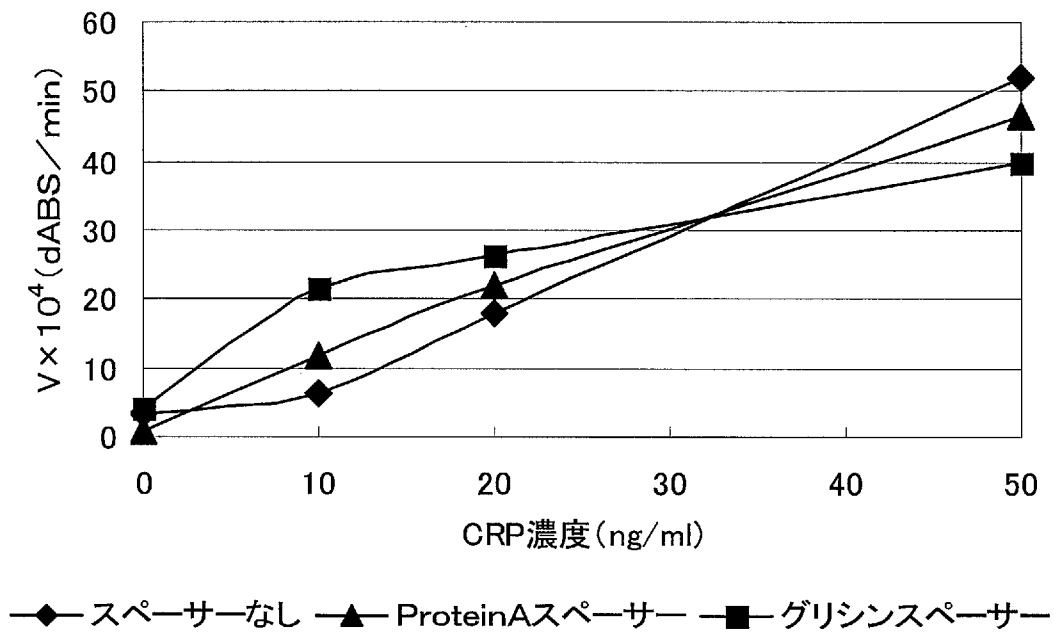
### 請求の範囲

- [1] C-反応性タンパク質に対する抗体がアミノ酸類を介して担持された不溶性担体粒子を含有することを特徴とするC-反応性タンパク質測定試薬。
- [2] アミノ酸類が、Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、Leu、Ile、Val、Met、Phe、Tyr、Trp、Pro、Asp、Glu、His、Lys及びArgから選ばれるアミノ酸、その塩又はそれらの水和物である請求項1記載のC-反応性タンパク質測定試薬。
- [3] 不溶性担体粒子が、カルボキシル基修飾ポリスチレンラテックス粒子である請求項1又は2記載のC-反応性タンパク質測定試薬。
- [4] 請求項1～3のいずれか1項記載のC-反応性タンパク質測定試薬を被検試料中の抗原物質と反応させ、生じる凝集を測定することを特徴とするC-反応性タンパク質の測定方法。
- [5] 被検試料が、血液、血清又は血漿である請求項4記載の測定方法。
- [6] 生じる凝集に近赤外光を照射して、得られた単位時間当たりの吸光度変化からC-反応性タンパク質濃度を定量するものである請求項4又は5記載の測定方法。

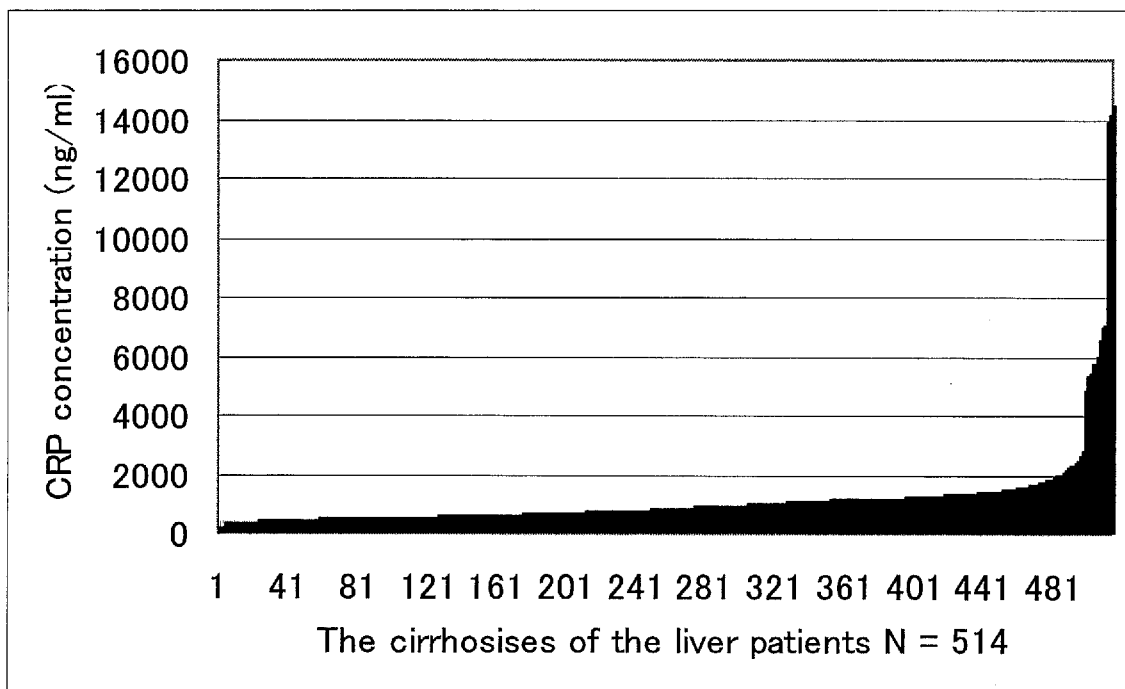
[図1]



[図2]



[図3]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <b>G01N33/53</b> (2006.01), <b>G01N33/543</b> (2006.01), <b>G01N33/545</b> (2006.01), <b>G01N33/547</b> (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>G01N33/53</b> (2006.01), <b>G01N33/543</b> (2006.01), <b>G01N33/545</b> (2006.01), <b>G01N33/547</b> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2000-121640 A (Nitto Denko Corp.), 28 April, 2000 (28.04.00), Claims; Par. Nos. [0020], [0022], [0025], [0038], [0066] & EP 0982590 A1	1-5/6
Y	JP 63-273060 A (Nitto Denko Corp.), 10 November, 1988 (10.11.88), Page 3, lower left column, lines 5 to 12 & US 5166077 A1 & EP 0295402 A2	6
A	JP 01-266111 A (Daikin Industries, Ltd.), 24 October, 1989 (24.10.89), (Family: none)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 June, 2006 (27.06.06)		Date of mailing of the international search report 04 July, 2006 (04.07.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/311129

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 07-229900 A (Nitto Denko Corp.), 29 August, 1995 (29.08.95), (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01), G01N33/543(2006.01), G01N33/545(2006.01), G01N33/547(2006.01)									
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01), G01N33/543(2006.01), G01N33/545(2006.01), G01N33/547(2006.01)									
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>		日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年								
日本国公開実用新案公報	1971-2006年								
日本国実用新案登録公報	1996-2006年								
日本国登録実用新案公報	1994-2006年								
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)									
C. 関連すると認められる文献									
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号							
X/Y	JP 2000-121640 A (日東電工株式会社) 2000.04.28、【特許請求の範囲】、【0020】、【0022】、【0025】、【0038】、【0066】 & EP 0982590 A1	1-5/6							
Y	JP 63-273060 A (日東電工株式会社) 1988.11.10、第3頁、左下欄、第5行~12行 & US 5166077 A1 & EP 0295402 A2	6							
A	JP 01-266111 A (ダイキン工業株式会社) 1989.10.24 (ファミリーなし)	1-6							
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。							
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 27.06.2006	国際調査報告の発送日 04.07.2006								
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3496							

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 07-229900 A (日東電工株式会社) 1995.08.29 (ファミリーなし)	1-6