

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 350442

(P2002 - 350442A)

(43)公開日 平成14年12月4日(2002.12.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	A
	33/53		33/53	D
	33/543	587	33/543	587

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16数)

(21)出願番号 特願2001 - 153774(P2001 - 153774)

(22)出願日 平成13年5月23日(2001.5.23)

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 飯嶋 裕己

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化成

工業株式会社医薬品研究所内

(72)発明者 澤崎 健

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化成

工業株式会社医薬品研究所内

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫測定試薬及び免疫測定方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】安価かつ簡便に調製可能な免疫測定試薬と、その試薬を用いた測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量できる免疫測定方法を提供する。

【解決手段】測定対象の抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得る卵黄抗体を含有してなる、検体中の抗原又は抗体の測定は、分子量140kDaを超えるタンパク質を実質的に含まない卵黄抗体を免疫測定試薬を用いて行うことができる。測定では、例えば、標識物で標識した卵黄抗体を不溶性担体に担持し、この抗体と検体中の測定対象の抗原又は抗体を反応させることによって、検出中の測定対象の抗原又は抗体を測定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定対象の抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得る卵黄抗体を含有してなる、分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まない免疫測定試薬。

【請求項2】 卵黄抗体が不溶性担体に担持されたものである請求項1記載の免疫測定試薬。

【請求項3】 不溶性担体の形状が粒子状、シート状又はウェル(穴)状である請求項2記載の免疫測定試薬。

【請求項4】 卵黄抗体が測定対象の抗原又は抗体で免疫したガンカモ科のトリの産する卵の卵黄から得られるものである請求項1～3いずれか記載の免疫測定試薬。

【請求項5】 卵黄抗体が標識物で標識されたものである請求項1～4いずれか記載の免疫測定試薬。

【請求項6】 a) 請求項1～5いずれかに記載の免疫測定試薬を用いて、検体中の測定対象の抗原又は抗体と当該免疫測定試薬中の卵黄抗体とを反応させる工程、ならびに

b) 前記反応の結果生じる免疫複合体を検出する工程、を含む、検体中の測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量する免疫測定方法。

【請求項7】 免疫複合体を免疫学的反応に伴って生ずる濁度の変化から検出する請求項6記載の免疫測定方法。

【請求項8】 a) 請求項2～5いずれかに記載の免疫測定試薬を用いて、検体中の測定対象の抗原又は抗体と当該免疫測定試薬中の不溶性担体に担持された卵黄抗体とを反応させる工程、

b) 検体中の測定対象の抗原又は抗体を、当該抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得る、標識物で標識された抗体と反応させる工程、ならびに

c) 標識物を検出する工程、を含む、検体中の測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量する免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫測定試薬及び免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】医療分野での種々の疾病等の診断において、検体中の微量物質を特異的に、迅速、簡便に、しかも精度良く検出又は定量し得る抗原抗体反応を利用した免疫測定試薬及び当該免疫測定試薬を利用する免疫測定方法が各種開発され、利用されてきている。

【0003】免疫測定方法としては、例えば、免疫比濁法、ラテックス凝集法、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA法)、蛍光免疫測定法(FIA)、免疫発光アッセイ(CLIA)、ウェスタンブロット法、イムノクロマト法等が挙げられる。

【0004】上記免疫測定方法に用いる免疫測定試薬には、一般に、測定対象の抗原又は抗体をヤギ、ウサギ、

ヒツジ、マウス、ニワトリ等の動物に免疫し、当該動物の血清から得られるポリクローナル抗体やマウスの脾臓由来の細胞から得られるモノクローナル抗体等が使用されている。

【0005】しかしながら、そのような従来の免疫測定試薬は、検体中の測定対象の目的の抗原又は抗体との特異的な反応のみならず、目的以外のリウマチ因子や補体成分等の成分とも非特異的な反応を起こし易いという問題がある。

【0006】かかる問題を解決する手段としては、前記動物から産生される完全体の抗体をプロテアーゼ(ペプシン、パパイン、トリプシン、プラスミン等)で限定分解すること(例えば、続生化学実験講座5免疫生化学研究法、第89～101頁)により、非特異的の原因の一つであるpFc又はFc等の画分を分解し、ゲル濾過クロマトグラフィー、プロテインA-アフィニティークロマトグラフィー、プロテインG-アフィニティークロマトグラフィー又は抗Fc抗体-アフィニティークロマトグラフィー等の精製方法(例えば、続生化学実験講座5免疫生化学研究法、第100頁)を単独で又は2種以上組合せて行うことにより、反応混合物中から特異的な抗原抗体反応に関与するF(ab)₂抗体画分又はFab抗体画分のみを分離精製した抗体を得、その抗体を免疫測定試薬として使用する方法が提案されている(特開昭54-119292号公報)。

【0007】上記の方法によれば、前記非特異的の反応の問題は改善される。しかし、上記の方法により得られる抗体を使用した免疫測定試薬は、もともとヤギ、ウサギ、ヒツジ、マウス、ニワトリ等の動物に由来する抗体やマウスの脾臓等からのモノクローナル抗体等の高価な抗体を使用し、さらに、煩雑で生産効率が低い酵素限定分解工程や煩雑で回収率が低い精製工程等を行うため、極めて高価な試薬になるという問題がある。

【0008】また、検体中の測定対象の抗原又は抗体と、それに対して抗原抗体反応を生ずることのできる抗体とを反応させる前に、予め熱変性-グロブリンや免疫グロブリンのFc画分等の成分を検体に添加し共存させることによって、検体中の非特異的の反応を引き起こす原因物質(リウマチ因子、補体成分等)の非特異的の反応部位をブロックする方法も提案されている(特公昭63-38668号公報、特公昭61-942号公報)。しかし、上記方法では、検体中のリウマチ因子や補体成分等の妨害物質の干渉による測定値への影響は完全には回避できず、特に、癌胎児性抗原(以下、CEAと略することがある)や-フェトプロテイン(-fetoprotein:以下、AFPと略することがある)等の血中濃度が低い微量成分の検出に適用する場合、非特異的の反応は、ほとんど改善できず、実用に耐え得るものではない。

【0009】また、免疫したニワトリが産する卵から得

られる卵黄抗体を免疫測定試薬に使用することにより、リウマチ因子や補体成分等の検体中の妨害物質による非特異的反応が抑制できることが報告〔「ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド、第108巻、第205-208頁、1988年(Journal of Immunological Methods, vol. 108, p. 205-208, 1988)」、特開平5-256850号公報、特開平5-34344号公報〕されている。しかしながら、上記ニワトリ由来の卵黄抗体を実際に使用しても、検体中の前記妨害物質の干渉による測定値への影響は完全には回避できるものではなかった。それゆえ、前記同様、特にCEAやAFP等の血中濃度が低い微量成分の検出に適用する場合、その非特異的反応は無視できるものではなく、実用に耐え得るものではない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、検体中のリウマチ因子や補体成分等の妨害物質の影響を実質的に受けることなく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量できる、安価かつ簡便に調製可能な免疫測定試薬、ならびに検体中の前記妨害物質の影響を実質的に受けることなく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量できる免疫測定方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まない卵黄抗体を用いることにより、前記妨害物質の影響を実質的に受けることなく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】すなわち、本発明は、〔1〕測定対象の抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得る卵黄抗体を含有してなる、分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まない免疫測定試薬、〔2〕卵黄抗体が不溶性担体に担持されたものである前記〔1〕記載の免疫測定試薬、〔3〕不溶性担体の形状が粒子状、シート状又はウェル(穴)状である前記〔2〕記載の免疫測定試薬、〔4〕卵黄抗体が測定対象の抗原又は抗体で免疫したガンカモ科のトリの産する卵の卵黄から得られるものである前記〔1〕～〔3〕いずれか記載の免疫測定試薬、〔5〕卵黄抗体が標識物で標識されたものである前記〔1〕～〔4〕いずれか記載の免疫測定試薬、〔6〕a)前記〔1〕～〔5〕いずれかに記載の免疫測定試薬を用いて、検体中の測定対象の抗原又は抗体と当該免疫測定試薬中の卵黄抗体とを反応させる工程、およびb)前記反応の結果生じる免疫複合体を検出する工程、を含む、検体中の測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量する免疫測定方法、〔7〕免疫複合体を免疫学的反応に伴って生ずる濁度の変化から検出する前

記〔6〕記載の免疫測定方法、ならびに〔8〕a)前記〔2〕～〔5〕いずれかに記載の免疫測定試薬を用いて、検体中の測定対象の抗原又は抗体と当該免疫測定試薬中の不溶性担体に担持された卵黄抗体とを反応させる工程、b)検体中の測定対象の抗原又は抗体を、当該抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得る、標識物で標識された抗体と反応させる工程、およびc)標識物を検出する工程、を含む、検体中の測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量する免疫測定方法、に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の免疫測定試薬は、分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まないことを1つの大きな特徴とする。すなわち、本発明の免疫測定試薬は、卵黄抗体自体も、卵黄抗体以外の任意のその他成分においても分子量が140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まない。

【0014】

一般にニワトリ等のトリ由来の卵黄抗体は、分子量140kDaを超える画分(高分子量画分)を含んでいる。卵黄抗体の高分子量画分は、検体中に含まれる測定対象の抗原又は抗体に対する抗体の他に、同様に当該検体中に含まれるリウマチ因子や補体成分等の妨害物質と反応する抗体を多く含む画分であり、当該画分を如何に精製しようとも妨害物質による測定への影響を回避することは困難である。一方、ガンカモ科等のトリ由来の卵黄抗体は上記高分子量画分に加え、分子量80kDaの画分(低分子量画分)を含んでいる。卵黄抗体の低分子量画分は、前記妨害物質と反応する抗体を実質的に含まない画分であり、それゆえ、当該画分は妨害物質との非特異的な反応を実質的に生じず、免疫学的反応を生じ得る測定対象の抗原又は抗体とのみ特異的に反応するという優れた性質を有する。このような、卵黄抗体に含まれる画分による反応の特異性の相違、ならびに低分子量画分を免疫測定に使用することの有用性は本発明において初めて明らかにされたことである。従って、本発明の免疫測定試薬によれば、前記妨害物質の影響を実質的に受けることなく、精度良く測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量することができる。特にCEAやAFP等の血中濃度が低い微量成分の検出又は定量に有用である。

【0015】また、本発明に係る卵黄抗体は、測定対象の抗原又は抗体で免疫した特定のトリが産する卵の卵黄より粗卵黄抗体を得、適宜、公知の精製方法により分子量140kDaを超える画分を除去することにより容易に調製でき、従って、本発明の免疫測定試薬は安価かつ簡便に調製することができる。測定時においては、従来の抗体を用いる場合のような、前記妨害物質の影響を抑制するための検体等の前処理はなくてもよい。

【0016】なお、本明細書において、「分子量」とは5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、S

DS-PAGEという)において、当該電気泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー(CBB)で染色し、市販の分子量マーカーに対し相対的に求められる分子量をいう。たとえば、分子量マーカーとしては、タンパク質分子量マーカー「第一」II(第一化学薬品株式会社製)を使用することができる。「分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まない」とは、本発明の所望の効果が発現される限り、当該タンパク質が多少含まれていても実質的に含まないと判断することを用いる。なお、本発明の所望の効果が発現は、たとえば、後述の実施例4に示す方法により確認することができる。また、「本発明の所望の効果が発現される限り」とは、後述の実施例4に示す方法により、分子量140kDaを超えるタンパク質成分を含まない免疫測定試薬を用いた場合に得られる定量結果と客観的に同等な定量結果が得られることをいう。「免疫学的反応」とは、免疫学の分野及び当該分野に関連するあらゆる分野において理解され得る免疫学的な反応をいうものであり、主として抗原抗体反応をいう。また、単に「反応」との記載は、特段の事情がない限り免疫学的反応をいう。

【0017】測定対象の抗原又は抗体としては、後述するトリを免疫可能であり、免疫されたトリの産する卵の卵黄から得られた卵黄抗体と免疫学的反応を生じ得るものであれば特に限定されるものではない。

【0018】測定対象の抗原としては特に限定されるものではないが、例えば、真菌、連鎖球菌等の種々の細菌、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、エイズウイルス等のウイルス、トキソプラズマ原虫、マラリア原虫等の原虫等そのものやそれらに由来する核酸、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド等が挙げられる。また、動植物に由来するDNA、RNA等の核酸、血清タンパク質(CRP、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、糖タンパク質、2-マイクログロブリン、TBG、糖脂質等)、腫瘍関連抗原〔癌胎児性抗原(CEA)、-フェトプロテイン(AFP)、フェリチン、神経特異エノラーゼ(NSE)、CA19-9、CA125等)、サイトカイン(インターフェロン、インターロイキン1、インターロイキン2等)、ホルモン(インシュリン、HCG、成長ホルモン、TSH、サイロキシン、トリヨードサイロニン、ガストリン、グルカゴン、ソマトスタチン等)、酵素(エラスターゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、リボヌクレアーゼ等)、DNA結合性タンパク質因子等の種々のタンパク質そのものやそれらに由来するポリペプチド、ペプチド等が挙げられる。

【0019】測定対象の抗体としては特に限定されるものではないが、例えば、本発明に係る卵黄抗体を産する後述のトリとは異種の動物由来のIgG、IgA、IgM、IgD、IgE等の抗体及びそれらの抗体フラグメント等が挙げられる。

【0020】本発明の免疫測定試薬を適用し得る検体としては、測定対象の抗原又は抗体を含む又は含む可能性のあるものであれば特に限定されるものではない。例えば、疾病の診断では、主に血液、血漿、血清、尿、涙、胆汁、唾液、髄液、関節液又は乳汁等が好適に用いられる。これらの中では採取の容易性の観点から、血液、血漿、血清、尿、涙が好ましい。

【0021】本発明に係る卵黄抗体は分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まないものである。当該卵黄抗体は、測定対象の抗原又は抗体で免疫した、後述するトリの産する卵の卵黄を公知の方法により精製すると共に分子量140kDaを超えるタンパク質成分を除去するか、或いは分子量140kDa以下の画分を分離等することにより得られる。本発明においては、当該卵黄抗体が分子量140kDaを超えるタンパク質成分を実質的に含まないものであるため、本発明の所望の効果をj得ることがjできる。特に卵黄抗体としては、好ましくは分子量80~140kDa、より好ましくは100~120kDaの画分を、好ましくは90重量%以上、より好ましくは95重量%以上、さらに好ましくは99重量%以上含む卵黄抗体が好適である。

【0022】なお、本発明の免疫測定試薬に含まれる卵黄抗体中の分子量分布及び分子量ごとの成分含有量は、例えば、免疫測定試薬を、当該卵黄抗体と免疫学的反応を生じ得る抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供して免疫測定試薬から当該卵黄抗体を分離し、得られた卵黄抗体をSDS-PAGEに供することにより分子量分布を把握することができ、一方、後述するような分取用電気泳動に供して分子量ごとに成分を分離することにより分子量ごとの成分含有量を把握することができる。

【0023】卵黄抗体を調製するためのトリとしては、低分子量画分の抗体の含有量が高い卵黄を産するという観点から、ガンカモ科のトリが好ましい。なお、本明細書において「ガンカモ科のトリ」とは、ガンカモ科のトリ及びガンカモ科のトリを交配することにより得られるトリをいう。

【0024】ガンカモ科のトリとしては、例えば、シジュウカラガン、コクガン、ハイイロガン、マガン、カリガネ、ヒシクイ、インドガン、ハクガン、ミカドガン、サカツラガン、コブハクチョウ、オオハクチョウ、コハクチョウ、リュウキュウガモ、アカツクシガモ、ツクシガモ、カンムリツクシガモ、オシドリ、マガモ、カルガモ、コガモ、トモエガモ、ヨシガモ、オカヨシガモ、ヒドリガモ、アメリカヒドリ、オナガガモ、ハシビロガモ、アカハシハジロ、アメリカホシアグロ、ホシハジロ、オオホシハジロ、クビワキンクロ、メジロガモ、アカハジロ、キンクロハジロ、スズガモ、コスズガモ、コケワタガモ、ケワタガモ、クロガモ、ピロードキンクロ、アラナミキンクロ、シノリガモ、コオリガモ、ホオ

ジリガモ、ヒメハジロ、ミコアイサ、ウミアイサ、コウライアイサ、カワアイサ、アヒルや、マガモとアヒルを交配して得られるアイガモ等が挙げられる。

【0025】上記ガンカモ科のトリの中では、入手の容易さ、飼育のし易さ、免疫のし易さ及び産する卵の量等に起因する経済効率等の観点から、マガモ、アヒル、マガモとアヒルを交配して得られるアイガモが好ましく、アヒルがより好ましい。

【0026】上記トリに対する免疫は、例えば、ニワトリ等の場合における公知の免疫法によって行うことができる（例えば、特開昭54-130995号公報等を参照）。例えば、所望により適当なアジュバントと共に、測定対象の抗原又は抗体をトリの皮下、皮内又は静脈に投与して免疫することができる。免疫されたトリが産する卵の卵黄の特異的な抗体力価は、例えば、酵素免疫測定（ELISA）法等によって測定することができ、卵黄からの所望の卵黄抗体の精製に先立ち、抗体力価の高い卵黄を選択することができる。

【0027】トリが産する卵の卵黄からの、本発明に係る卵黄抗体の調製方法は特に制限されるものではない。

【0028】例えば、卵黄をクロロホルム抽出に供し、残りの溶液から水溶性タンパク質を得る方法〔「イムノロジー」（Immunology）、第19巻、第1号、第157-167頁（1970）〕、卵黄にポリエチレングリコール等を添加して、卵黄リポタンパク質を沈澱させ、上清液から水溶性タンパク質を得る方法（特開昭54-130995号公報）、卵黄にカラギナンやペクチンを加えて卵黄リポタンパク質を沈澱させ、上清液から水溶性タンパク質を得る方法（特開昭64-38098号公報）、卵黄に水溶性セルロース誘導体等を加えて卵黄リポタンパク質を沈澱させ、上清液から水溶性タンパク質を得る方法（特開平2-188533号公報）、硫酸沈澱により得る方法等の公知のニワトリの卵黄抗体の調製方法に従って、卵黄から粗卵黄抗体を得る。

【0029】次いで、公知の精製方法により、得られた粗卵黄抗体から分子量140kDaを超える画分を除去する。

【0030】粗卵黄抗体の精製方法としては特に限定されるものではないが、例えば、分取用電気泳動法、疎水カラムクロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、本発明に係る卵黄抗体に対する抗体、例えば、抗アヒルIgY抗体等によるアフィニティークロマトグラフィー法等の公知の抗体精製法が挙げられる。上記精製方法は単独で又は二種以上組合わせて使用することができる。

【0031】より具体的に、上記精製方法の中では、1回の精製工程で容易に不要なタンパク質のみを除去でき、しかも分子量を指標に低分子量画分の卵黄抗体のみ

を100%の純度で精製できるという観点から、分取用電気泳動法が好ましい。例えば、プレパラティブ電気泳動装置（日本エイドー製、NA-1800型）や分取用電気泳動装置（バイオ-ラッド ラボラトリーズ製、モデル491プレップセル）等により、太い円柱状のSDS-ポリアクリルアミドゲル、ネイティブ-ポリアクリルアミドゲル又はアクリルアミド-アガロースゲルを用いて、粗卵黄抗体の電気泳動を行い、溶出してくる目的分子量のタンパク質のみを分取することにより、分子量140kDaを超える画分が除去された、低分子量画分を100%の純度で含む、所望の卵黄抗体を得ることができる。

【0032】なお、卵黄抗体の低分子量画分の分離精度の観点から、プレパラティブ電気泳動又は分取用電気泳動で使用するポリアクリルアミドゲルのゲル濃度は、4~15%が好ましく、4~10%がより好ましい。

【0033】また、上記精製法の中では、疎水カラムクロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、抗アヒルIgY抗体などによるアフィニティークロマトグラフィー法等の抗体精製法が、精製した卵黄抗体の結合活性を損なうことなく精製できるという観点から、より好ましく、これらの中では、前記観点に加えて、分子量140kDaを超えるタンパク質成分をより効率良く簡単に、しかも安価に除去できるという観点から、フェニルセファロース等の疎水吸着体を用いる疎水カラムクロマトグラフィー法が特に好ましい。

【0034】本発明で利用できる疎水吸着体としては、エチルアガロース、アミノエチルアガロース、ブチルアガロース、アミノブチルアガロース、ヘキシルアガロース、アミノヘキシルアガロース、オクチルアガロース、アミノオクチルアガロース、デシルアガロース、アミノデシルアガロース（以上、Miles Research Products Miles Laboratories, Inc.製）、アガロースエタン、アガロースエチルアミン、アガロースブタン、アガロースブチルアミン、アガロースヘキサン、アガロースヘキシルアミン、アガロースオクタン、アガロースオクチルアミン、アガロースデカン、アガロースデシルアミン（以上、P.L Biochemicals, Inc.製）、オクチルセファロース CL-4B、フェニルセファロース CL-4B（以上、ファルマシア バイオテック製）等が挙げられるが、卵黄抗体の疎水性の程度から、ヘキシルアガロース、アミノヘキシルアガロース、オクチルアガロース、アミノオクチルアガロース、デシルアガロース、アミノデシルアガロース、アガロースヘキサン、アガロースヘキシルアミン、アガロースオクタン、アガロースオクチルアミン、アガロースデカン、アガロースデシルアミン、オクチルセファロース、フェニルセファロースが好ましく、オクチルアガロース、アミノオクチルアガロース、デシルアガロース、アミノデシルアガロース、アガロースオクタン、

アガロースオクチルアミン、アガロースデカン、アガロースデシルアミン、オクチルセファロース、フェニルセファロースがより好ましく、デシルアガロース、アミノデシルアガロース、アガロースデカン、アガロースデシルアミン、フェニルセファロースがさらに好ましい。

【0035】上記疎水吸着体を用いる卵黄抗体の精製においては、上記疎水吸着体へのタンパク質成分の吸着及びその溶出に、硫酸アンモニウム、各種カオトロピックイオン、界面活性剤、グリセロール、ショ糖、尿素等の濃度勾配や、pH勾配を利用することができる。分離精度の観点から、硫酸アンモニウム、各種カオトロピックイオン、界面活性剤、グリセロール、ショ糖、尿素等の濃度勾配を利用することが好ましく、硫酸アンモニウム及び各種カオトロピックイオンの濃度勾配を利用することがより好ましい。

【0036】硫酸アンモニウムを利用する場合、吸着時は、通常1～3M程度のタンパク質成分を塩析させない程度の硫酸アンモニウムの濃度を用い、順次濃度を低下させて溶出させることができる。また、各種カオトロピックイオンを利用する場合、各種カオトロピックイオンを含まない緩衝液で吸着させ、順次各種カオトロピックイオンの濃度を上昇させることでタンパク質成分を溶出させることができる。

【0037】溶出液は、通常フラクションコレクターで回収する。どのフラクションに所望の卵黄抗体が存在するかは、各フラクションをSDS-PAGE等の各種電気泳動法を用いて、又は所望の卵黄抗体を検出できるELISA法等で測定することにより調べることができる。

【0038】得られた卵黄抗体の純度の確認は、公知のSDS-PAGEによる純度検定により行う。SDS-PAGE法の具体的な操作法については、例えば、「無敵のバイオテクニカルシリーズ タンパク質実験ノート 下巻 一次構造の決定まで、第14～23頁、株式会社羊土社発行」、「ネイチャー(Nature)」、第227巻、第680～685頁(1970)等の文献に詳しく記載されている。なお、本発明において「100%の純度」とは、例えば、所望の分子量範囲にあるタンパク質以外のタンパク質が、前記SDS-PAGE後のゲルをCBで染色した場合に当該ゲル上において認められないことをいう。

【0039】本発明に係る卵黄抗体は必ずしも低分子量画分を100%の純度で含むものでなくともよく、例えば、低分子量画分を前記好適な範囲で含むよう精製したものであっても、或いは低分子量画分を100%の純度で含む卵黄抗体を、本発明の所望の効果の発現を実質的に阻害しない任意の物質で希釈したものであってもよい。

【0040】本発明の免疫測定試薬は、所望の卵黄抗体を、測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量可能な範囲で含有するものであれば特に限定されるものではない。

例えば、本発明の免疫測定試薬の好適な態様としては、例えば、本発明に係る卵黄抗体そのものを含有する試薬(第1の態様)、本発明に係る卵黄抗体を不溶性担体に担持してなるものを含有する試薬(第2の態様)、或いは本発明に係る卵黄抗体を標識物で標識してなるものを含有する試薬(第3の態様)が挙げられる。

【0041】本発明の免疫測定試薬としては、例えば、従来の免疫測定試薬における、測定対象の抗原又は抗体に対して免疫学的反応を生じ得るヤギやウサギ等に由来する抗血清又は抗体に代えて、本発明に係る卵黄抗体を含有させたものを挙げることができ、その他の点では従来の免疫測定試薬の構成と変わるところはなく、特に限定されるものではない。本発明の免疫測定試薬に用いる卵黄抗体の抗体価や、その含有量等は、測定対象の抗原又は抗体の測定濃度範囲、測定方法等によって適宜選択することができる。

【0042】当該定量方法としては公知のタンパク質定量法を挙げることができる。タンパク質定量法については、例えば、「無敵のバイオテクニカルシリーズ タンパク質実験ノート 上巻 その抽出と分離精製、第27～31頁、株式会社羊土社発行」、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル、ケミストリー」(J. Biol. Chem.)、第193巻、第265～275頁(1951)等の文献に詳しく記載されている。また、市販の電気泳動法用キットやタンパク質定量キットを使用しても定量化することもできる。

【0043】なお、本発明の免疫測定試薬には、前記方法により得られる卵黄抗体に加え、さらに当該卵黄抗体と同等の反応の特異性を有する、公知の方法に従って得られ得る抗体フラグメント〔例えば、Fab、F(ab)₂〕を使用することも可能である。抗体フラグメントを用いる場合は、当該抗体等の抗体価を指標に、本発明の所望の効果が得られ得る範囲で免疫測定試薬に含有させればよい。

【0044】本発明の免疫測定試薬の第1の態様としては、例えば、免疫比濁法用試薬やレーザーネフェロメトリー用試薬が挙げられる。かかる態様における、本発明に係る卵黄抗体以外の成分としては、通常の免疫比濁法用試薬やレーザーネフェロメトリー用試薬に使用される緩衝液、増感剤、界面活性剤、防腐剤及び/又はその他の添加剤を挙げることができる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液又はグリシン緩衝液等が挙げられる。緩衝液のpHとしては、生理的なpHであって、例えば、好ましくは5～11、より好ましくは6～9である。増感剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン等が挙げられる。増感剤を含有させる場合、その増感剤の濃度としては、通常、好ましくは0.01～10重量%であり、より好ましくは0.01～5重量%である。界面活性剤としては、例えば、Tween-20、トリトン

X-100等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。防腐剤としては、一般に、例えば、アジ化ナトリウム、チメロサル等が挙げられる。その他の添加剤としては、ショ糖等の糖類、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の塩、アルブミン、グロブリン等の血清タンパク質等が挙げられる。

【0045】本発明の免疫測定試薬の第2の態様としては、ラテックス凝集免疫比濁法用試薬、赤血球凝集反応法用試薬、放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ELISA)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬、イムノクロマト法用試薬、ウエスタン
10 プロット法用試薬、蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等が挙げられる。

【0046】本態様において使用する不溶性担体の形状としては、測定方法や反応条件等によって適宜選択され得、特に制限されるものではないが、例えば、粒子状、シート状、ウェル(穴)状、糸状等が挙げられ、中でも、汎用性の観点から、粒子状、シート状又はウェル(穴)状が好ましい。

【0047】例えば、粒子状の不溶性担体の使用は、ラ
20 テックス凝集免疫比濁法用試薬、赤血球凝集反応法用試薬、放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ビーズ法)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬、イムノクロマト法用試薬及び蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等に好ましく、シート状の不溶性担体の使用は、イムノクロマト法用試薬等に好ましく、ウェル(穴)状の不溶性担体の使用は、放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ELISA)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬及び蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等に好ましく、糸状の不溶性
30 担体の使用は、放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ELISA)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬及び蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等に好ましい。

【0048】本発明において使用する粒子状の不溶性担体(以下、不溶性担体粒子という場合がある)としては、本発明に係る卵黄抗体を固定することができるものであれば特に制限されないが、例えば、赤血球、ポリスチレン粒子、スチレン-ブタジエン共重合体のような有機高分子のラテックス粒子、シリカ、アルミナのような
40 無機酸化物粒子、金コロイドのような金属粒子等が挙げられる。また、粒子状の不溶性担体としては、従来のラテックス凝集免疫比濁法用試薬、赤血球凝集反応法用試薬、放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ビーズ法)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬、イムノクロマト法用試薬及び蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等に用いられる不溶性担体粒子をそのまま使用することができる。

【0049】本発明において使用する粒子状の不溶性担体の平均粒径としては、通常、ラテックス凝集免疫比濁

法用試薬、赤血球凝集反応法用試薬等に使用されている不溶性担体粒子と同程度であればよく特に限定されるものではないが、本発明の免疫測定試薬を用いる任意の抗原又は抗体の測定方法における、本発明に係る卵黄抗体と当該抗原又は抗体との免疫学的反応の結果生ずる免疫複合体(卵黄抗体と測定対象の抗原又は抗体との凝集物)の検出手段に応じて適宜選択することができる。

【0050】より具体的に、例えば、不溶性担体粒子の凝集物を目視で検出する場合には、使用する不溶性担体粒子の平均粒径は0.2~2.0 μm の範囲から選択することが好ましく、検出感度の観点から0.8~2.0 μm の範囲から選択することがより好ましい。0.2 μm 以上であれば十分な検出感度が得られ、また、2.0 μm 以下であれば凝集反応が速やかに進行し、検出結果の再現性も良好である。

【0051】吸光度や散乱光等の光学的強度の変化として検出する場合には、使用する不溶性担体粒子の平均粒径としては0.05~1.0 μm の範囲から選択することが好ましく、検出感度と測定範囲の観点から0.01~0.5 μm の範囲から選択することがより好ましい。0.05 μm 以上であれば十分な検出感度が得られ、また、1.0 μm 以下であれば凝集反応が速やかに進行し、検出結果の再現性も良好であり、免疫測定試薬自体の光学的強度の影響により測定範囲が狭くなることもない。

【0052】また、本発明の免疫測定試薬を放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ビーズ法)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬、蛍光免疫測定法(FIA)用試薬として使用する場合、使用する不溶性担体粒子の平均粒径は1~10000 μm の範囲から選択することが好ましい。また、イムノクロマト法用試薬として使用する場合、使用する不溶性担体粒子の平均粒径は0.01~1.0 μm の範囲から選択することが好ましい。

【0053】なお、不溶性担体粒子の平均粒径は、走査型電子顕微鏡(SEM)等により測定できる。

【0054】本発明の免疫測定試薬をイムノクロマト法用試薬等として使用する場合に好適に使用されるシート状の不溶性担体としては、紙、セルロース、ニトロセルロース又はポリビニリデンジフルオライド(PVDF)等のシート(膜)が挙げられる。

【0055】本発明の免疫測定試薬を放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ELISA)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬及び蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等として使用する場合に好適に使用されるウェル(穴)状の不溶性担体としては、ポリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチック製又はガラス製の試験管や96穴マイクロタイタープレートのウェル等(本発明に係る卵黄抗体は、それらの内壁に担持される)が挙げられる。また、96穴マイクロタイ

プレートとしては、分割可能なセパレート型のマイクロタイタープレートが使用できる。ウェル(穴)状の不溶性担体としては、本発明の免疫測定試薬を放射免疫測定法(RIA)用試薬として使用する場合は前記試験管が好ましく、酵素免疫測定法(ELISA法)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬又は蛍光免疫測定法(FIA)用試薬として使用する場合は、多検体処理が容易で、検体及び試薬消費量が少ない観点から、96穴マイクロタイタープレートが好ましい。

【0056】また、本発明の免疫測定試薬を放射免疫測定法(RIA)用試薬、酵素免疫測定法(ELISA法)用試薬、化学発光免疫測定法(CLIA)用試薬及び蛍光免疫測定法(FIA)用試薬等として使用する場合に好適に使用される糸状の不溶性担体としては、セルロース、ニトロセルロース又はナイロン等の繊維材料が挙げられる。

【0057】本発明に係る卵黄抗体の前記不溶性担体の表面への固定化は、ヤギやウサギ等に由来する抗体の固定化と同様に公知の方法で行うことができる。固定化の方法としては、例えば、本発明に係る卵黄抗体を含有する溶液と前記不溶性担体とを接触(例えば、混合)させ、所定時間(例えば、4で24時間)インキュベートすることにより当該卵黄抗体の不溶性担体への担持を行う物理的吸着法、上記卵黄抗体を含有する溶液とカルボキシル基を有する不溶性担体及びカルボジミドを混合し、所定時間(例えば、4で24時間)インキュベートすることにより行うカルボジミド法や、公知のグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法等の化学的結合法が挙げられる。これらの物理的吸着法又は化学的結合法は単独で又は組み合わせて使用することもできる。

【0058】また、不溶性担体に本発明に係る卵黄抗体を担持後、検体中の目的以外の成分が不溶性担体に非特異に結合するのを防止する観点から、予め、ノンファットミルク、ウシ血清アルブミン、ウシ胎仔血清等で不溶性担体の表面をブロックすることが好ましい。

【0059】本発明の免疫測定試薬の第3の態様において使用する、本発明に係る卵黄抗体を標識するための好適な標識物としては、蛍光色素、酵素、金属コロイド、放射性同位体、アビジン、ビオチン、ストレプトアビジン等からなる群より選ばれる少なくとも1つを挙げることができる。なお、本発明の所望の効果が得られ得る限り、標識物はこれらのみに限定されるものではない。

【0060】具体的には、フルオレセイン、ローダミン、ウンベリフェロン等の蛍光色素、マレートデヒドロゲナーゼ(酵素番号1.1.1.37)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(酵素番号1.1.1.49)、グルコースオキシダーゼ(酵素番号1.1.3.4)、西洋ワサビパーオキシダーゼ(酵素番号1.11.1.7)、アセチルコリンエステラーゼ(酵素番号3.1.1.7)、アルカリフォスファターゼ

(酵素番号3.1.3.1)、グルコアミラーゼ(酵素番号3.2.1.3)、リゾチーム(酵素番号3.2.1.17)、-ガラクトシダーゼ(酵素番号3.2.1.23)等の酵素、金コロイド等の金属コロイド、¹²⁵I、¹⁴C等の放射性同位体、アビジン(Avidine)、ビオチン(Biotin)、ストレプトアビジン(Streptoavidin)等が挙げられる。

【0061】なお、本発明に係る卵黄抗体の標識物による標識は、公知の方法により行うことができる。

【0062】本発明の免疫測定試薬は、例えば、本発明に係る卵黄抗体そのもの、不溶性担体に担持した前記卵黄抗体、又は標識物で標識した前記卵黄抗体を、免疫測定試薬の各用途形態に応じた公知のその他の所望の成分と、公知の配合処方下、公知の方法に従って混合することにより製造することができる。本発明の免疫測定試薬によれば、前記妨害物質の影響を実質的に受けることなく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量することができる。

【0063】通常の免疫測定方法では、測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量するために、当該抗原又は抗体と反応し得る抗体との免疫複合体を検出することが行われるが、本発明の免疫測定試薬によれば、当該検出において、免疫複合体の形成に伴う反応液の濁度の変化による検出方法に加え、標識物の特性に応じた種々の検出方法(例えば、放射活性の検出)を採用することができる。

【0064】また、本発明の別の態様として、公知の免疫測定方法において好適に使用することができる免疫測定キットを提供することができる。かかるキットは、本発明の免疫測定試薬を少なくとも含んでなり、所望により測定対象の抗原又は抗体の標準品、さらに免疫測定方法の具体的態様に応じた所望の公知の酵素基質剤、蛍光基質剤、発光物質、反応停止剤、その他の試薬等を適宜選択し、構成試薬として組合せることができ、公知の方法により種々のキットを製造することができる。

【0065】本発明の免疫測定方法は、従来の免疫測定方法において、測定対象の抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得るヤギやウサギ等に由来する抗血清又は抗体に替えて、本発明に係る卵黄抗体を使用するものであり、その他の点では従来の免疫測定方法の構成と変わるところはなく、特に、測定の態様や、卵黄抗体と測定対象の抗原又は抗体との免疫学的反応の結果生ずる免疫複合体の検出手段等により制限されるものではない。

【0066】すなわち、本発明の免疫測定方法は、
a) 前記免疫測定試薬を用いて、検体中の測定対象の抗原又は抗体と当該免疫測定試薬中の卵黄抗体とを反応させる工程、ならびに
b) 前記反応の結果生じる免疫複合体を検出する工程、を含む、検体中の測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量する免疫測定方法である。

【0067】本発明の免疫測定方法の具体的態様として

は、例えば、赤血球凝集反応法、ラテックス凝集法、免疫比濁法、レーザーネフェロメトリー、ラテックス凝集免疫比濁法等が挙げられる。

【0068】工程b)における免疫複合体の検出は、定量的で客観的な結果が得られる観点から、光学的に濁度の変化として検出することが好ましい。かかる観点から、本発明の免疫測定方法の具体的な態様としては、免疫比濁法、レーザーネフェロメトリー、ラテックス凝集免疫比濁法等が好ましい。さらに、微量成分のより高感度な測定を可能にできるという観点から、卵黄抗体を不溶性担体(好ましくは粒子状の不溶性担体)に担持することが好ましく、ラテックス凝集免疫比濁法等がより好ましい。

【0069】より具体的には、工程a)において本発明に係る卵黄抗体と測定対象の抗原又は抗体とを、本発明の免疫測定試薬と検体の溶液とを混合することにより接触させ、反応の正確性の観点から、好ましくは3分~180分間程度反応させる。また、反応温度としては、恒温下において反応が行われることが好ましく、例えば、25~37が好適である。

【0070】次いで、工程b)において、前記反応の結果生ずる免疫複合体を検出する。検出方法としては、前記観点から、反応液中での免疫学的反応による免疫複合体の形成に伴って生ずる濁度の変化を指標とする方法が好ましく、濁度の変化は目視により又は吸光度変化量を測定することにより捉えることができる。目視の場合、反応液の濁りを確認することで、一方、吸光度変化量による場合は、免疫複合体の形成に伴う吸光度の増加量により、検体中における測定対象の抗原又は抗体の存在を検出することができる。また、特に吸光度変化量による場合は、吸光度変化量を測定し、既知量の測定対象の抗原又は抗体を用いて予め作成した検量線と照合することにより、測定対象の抗原又は抗体を定量することができる。

【0071】吸光度変化量による場合、例えば、吸光度変化量の測定の際の測定波長は、通常、340~1000nmの範囲から適切な波長を選択するのが好適である。吸光度変化量の測定に用いられる測定装置としては、経時的に反応液の吸光度を測定することができるものであれば特に限定されず、例えば、汎用の生化学自動分析装置等が挙げられる。実際の測定においては、測定波長、検体量、試薬量等は、使用する装置に合わせて適宜選択すればよい。

【0072】検量線と照合する具体的な方法としては、例えば、既知量の試料(例えば、測定対象の抗原又は抗体の標準品とその希釈系列等)について、吸光度変化量の測定を行い、その測定値とその物質質量とから検量線を作成しておき、濃度未知の試料について同一条件で測定した吸光度変化量の測定値から上記検量線において対応する物質質量を求める方法を挙げることができる。

【0073】免疫測定試薬に含まれる卵黄抗体が標識物で標識されたものである場合には、当該標識物の特性に応じ、例えば、酵素反応等を利用して、適宜、免疫複合体を検出し、測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量することも可能である。

【0074】さらに、本発明の免疫測定方法の別の態様として、従来、酵素免疫測定(ELISA)法等として知られる、いわゆるサンドイッチ型の免疫測定方法を提供する。

【0075】すなわち、当該免疫測定方法は、

a)前記免疫測定試薬を用いて、検体中の測定対象の抗原又は抗体と当該免疫測定試薬中の不溶性担体に担持された卵黄抗体とを反応させる工程、

b)検体中の測定対象の抗原又は抗体を、当該抗原又は抗体と免疫学的反応を生じ得る、標識物で標識された抗体と反応させる工程、ならびに

c)標識物を検出する工程、を含む、検体中の測定対象の抗原又は抗体を検出又は定量する免疫測定方法である。

【0076】本態様の免疫測定方法の具体例としては、例えば、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、化学発光免疫測定法(CLIA)、イムノクロマト法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫測定法(FIA)等が挙げられる。

【0077】具体的には、工程a)において、不溶性担体に担持された、本発明に係る卵黄抗体と測定対象の抗原又は抗体とを、本発明の免疫測定試薬と検体の溶液とを接触させ、反応の正確性の観点から、好ましくは5分~1000分間程度反応(免疫学的反応)させる。また、反応温度としては、恒温下において反応が行われることが好ましく、例えば、4~37が好適である。なお、工程a)における反応とは、〔不溶性担体に担持した卵黄抗体-測定対象の抗原又は抗体〕の形の免疫複合体を形成させる反応をいう。

【0078】工程b)において、前記反応の結果生ずる免疫複合体と標識抗体とをさらに反応させる。当該反応における好適な反応温度、時間は前記と同様である。なお、工程a)と工程b)は、工程a)の後に工程b)を行っても、両工程を同時に行ってもよい。

【0079】本工程の標識抗体の調製に使用される抗体は、本発明に係る卵黄抗体である必要は必ずしもなく、標識物で標識した状態において、測定対象の抗原又は抗体と反応し得るものであれば特に限定されるものではない。なお、前記した標識物で標識した、本発明に係る卵黄抗体を用いることもできる。

【0080】工程c)における標識物の検出は、当該標識物の特性に応じた公知の方法を適宜、選択して行うことができる。例えば、標識物が放射性同位元素であれば放射性により、酵素であれば酵素活性により検出することができる。

【0081】本免疫測定方法では、卵黄抗体を介して不溶性担体に結合した、測定対象の抗原又は抗体に対し、さらに標識抗体を反応させ、結合した標識物を検出することにより、結合標識抗体の存在を検出し、それにより、測定対象の抗原又は抗体の存在を検出する、或いは、結合した標識物を検出することにより、結合標識抗体量を定量し、その量から測定対象の抗原又は抗体の量を定量する。定量の際には、前記免疫測定方法と同様、既知量の測定対象の抗原又は抗体を用いて予め作成した検量線と照合することにより、測定対象の抗原又は抗体

【0082】本発明の免疫測定方法によれば、従来の抗体を用いる免疫測定方法に比べ、検体中の前記妨害物質の影響を実質的に受けることなく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量することができる。特にCEAやAFP等の血中濃度が低い微量成分の検出又は定量に有用である。なお、本発明の免疫測定方法にいう、検体、不溶性担体、標識物等は前記免疫測定試薬の場合と同様である。

【0083】また、本発明の免疫測定方法はいずれも、前記した本発明の一態様である免疫測定キットを用いて好適に実施し得、検体中の測定対象の抗原又は抗体を正確に測定することができる。

【0084】

【実施例】次に、本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。以下、特段の事情がない限り、%は重量%を意味する。

【0085】実施例1

1) 抗原の免疫
2mg のヒト - フェトプロテイン〔製造元：カナディア
ンバイオクリニカル (Canadian Bioclinical Ltd.) 社、
販売元：コスモ・バイオ (株) ; 以下、hAFP という〕を
1ml の 0.1M リン酸緩衝液 (以下、PBS という) に溶解し、
フロイント完全アジュバンドと等量混合した。次いで超音波
破砕機 [ブランソン社 (Branson) 製、Soni
fier250 型] を用いて目盛り1で10秒間処理し、氷冷下
に1分間静置する工程を4回繰り返して初回免疫用免疫
原を作製した。

【0086】2mg の hAFP を 1ml の PBS に溶解し、フロイ
ント不完全アジュバンドと等量混合した。次いで超音波
破砕機を用いて目盛り1で10秒間処理し、氷冷下に1分
間静置する工程を4回繰り返して追加免疫用免疫原を作
製した。

【0087】アヒル (*Anas platyrhynchos*) 1羽当たり0.4mL の初回免疫用免疫原を当該アヒルの皮下十数箇所
に注射した。10日後、アヒル1羽当たり0.2mL の追加免疫用
免疫原を当該アヒルの皮下十数箇所
に注射した。追加免疫は10日毎に4回実施した。

【0088】2) 抗hAFP・卵黄抗体 (分子量110kDa) の調製

最終免疫後10日目以降に産卵した卵を使用した。卵白と卵黄を分離し、卵黄に10倍量の蒸留水を加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。冷蔵庫 (4℃) に移し、一晚静置した後、上清を集め、20,000×g で10分間遠心分離した。得られた上清をろ紙 [ワットマン・インターナショナル・リミテッド (Whatman International Ltd.) 社製、ワットマンフィルターペーパー No.1] でろ過し、ろ液100mL に対して18.3g の硫酸アンモニウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×g で10分間遠心分離し、得られた沈殿にPBS を20mL加えて溶解した。次いで、3.6gの硫酸ナトリウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×g で10分間遠心分離し、得られた沈殿を2mL のPBS に溶解し、透析膜 [スペクトラム・メディカル・インダストリー社 (Spectrum Medical Industries Inc.) 製、スペクトラム/ポア (Spectrum / Pore) CE 透析用チューブ MW50,000] を用いてPBS に透析し、卵黄抗体2.1mL を得た (以下、アヒル卵黄抗体という)。

【0089】得られた上記アヒル卵黄抗体2.0mL のプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。Laemmli の方法に従い、非還元処理したアヒル卵黄抗体を7.5%ポリアクリルアミドゲル - プレパラティブ電気泳動装置 (日本エイドー製、NA - 1800型) にアプライし、100V定電圧で泳動した。フラクションコレクターを用い1フラクション当り3mL 回収した。アヒル卵黄抗体及び60番目のフラクション (以下、Fr.60 と略す) についてSDS - PAGEを実施した。すなわち、Laemmli の方法 [「ネイチャー」 (Nature)、第227巻、第680 - 685頁 (1970)] に従い、非還元処理した上記アヒル卵黄抗体及びFr.60 を5 - 20% ポリアクリルアミドグラジエントゲルにアプライし、20mA定電流で泳動した。染色はクイックCBB (販売元：和光純薬工業株式会社) を用いた。その結果、図1に示すように、Fr.60 では分子量110kDaに単一バンドが認められ、純度100%の卵黄抗体が得られた (以下、卵黄抗体 (分子量110kDa) という)。上記卵黄抗体 (分子量110kDa) を試料として、DCプロテインアッセイキットII (バイオラッド社製) によってタンパク質定量を行い (標準品はウシ血清アルブミン (BSA))、PBS で濃度0.2mg/mLに調製し、これを抗hAFP・卵黄抗体 (分子量110kDa) とした。

【0090】3) 試薬の調製

a) 抗hAFP・卵黄抗体 (分子量110kDa) 感作ラテックス液 (以下、MW110kDa100%R2試薬という)
2mL の抗hAFP・卵黄抗体 (分子量110kDa) と2mL の0.5% ラテックス懸濁液 (日本合成ゴム社製、平均粒径0.2 μm) とを混合し、37℃で2時間振とうした。20,000×g で20分間遠心分離し、沈殿に対し、0.1MNaClを含む0.2M

グリシン - NaOH (pH7.0) (以下、分散液という) を4mL 加え、ボルテックスミキサーで再懸濁後、20,000×g で20分間遠心分離した。得られた沈殿に1% BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、MW 110kDa100%R2試薬を得た。

【0091】b) R1試薬

3.0%ポリエチレングリコール(平均分子量7,500)、0.15MNaCl及び1%BSAを含有する0.1Mグリシン緩衝液(pH 8.0)を調製し、R1試薬とした。

【0092】4)測定方法

hAFPの測定は、日立7150形自動分析装置(日立製作所製)を用い、以下の測定パラメータで行った。

アッセイコード RATE-A: 32-40

検体容量 20μL

R1試薬容量 200μL

R2試薬容量 200μL

測定波長 570nm

測定温度 37

【0093】測定では、R2試薬としてMW110kDa100%R2試薬を添加してから約1分24秒後と約3分後における20波長570nmの吸光度を測定し、その差を吸光度変化量とした。予め既知濃度のhAFP標準品(100、200、300、500ng/mL:日本バイオテスト社製)を用い、上記と同様に測定し求めた吸光度変化量により検量線を作成し、検量線から検体中のhAFP濃度(ng/mL)を求めた。

【0094】5)結果

リウマチ因子(RF)陽性の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0095】実施例2

1)抗原の免疫

実施例1と同様に行った。

【0096】2)抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)の調製

最終免疫後10日目以降に産卵した卵を使用した。卵白と卵黄を分離し、卵黄に10倍量の蒸留水を加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。冷蔵庫に移し、一晚静置した後、上清を集め、20,000×gで10分間遠心分離した。得られた上清をろ紙(ワットマンフィルターペーパー No.1)でろ過し、ろ液100mLに対して18.3gの40硫酸アンモニウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×gで10分間遠心分離し、得られた沈殿にPBSを20mL加えて溶解した。次いで、3.6gの硫酸ナトリウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×gで10分間遠心分離し、得られた沈殿を2mLのPBSに溶解し、透析膜(スペクトラム/ポア CE透析用チューブ MW50,000)を用いてPBSに透析し、アヒル卵黄抗体2.1mLを得た。

【0097】得られたアヒル卵黄抗体2.0mLのプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。Laemmliの方法に従い、非還元処理したアヒル卵黄抗体を7.5%ポリアクリルアミドゲル-プレパラティブ電気泳動装置(日本エイドー製、NA-1800型)にアプライし、100V定電圧で泳動した。フラクションコレクターを用い1フラクション当り3mL回収した。上記アヒル卵黄抗体及び85番目のフラクション(以下、Fr.85という)についてSDS-PAGEを実施した。すなわち、Laemmliの方法に従い、非還元処理したアヒル卵黄抗体及びFr.85を5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにアプライし、20mA定電流で泳動した。染色はクイックCBBを用いた。その結果、図2に示すように、Fr.85は分子量160kDaに単一バンドが認められ、純度100%の卵黄抗体が得られた〔以下、卵黄抗体(分子量160kDa)という〕。上記卵黄抗体(分子量160kDa)を試料として、DCプロテインアッセイキットIIによってタンパク質量を行い(標準品はBSA)、PBSで濃度0.2mg/mLに調製し、これを抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)とした。

【0098】3)試薬の調製

a)抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)を96%と抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)を4%の重量で感作したラテックス液(以下、MW110kDa96%R2試薬という)

1.94mLの抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)(実施例1で得たもの)及び0.06mLの抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)の混合液と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム社製、平均粒径0.2μm)を混合し、37で2時間振とうした。20,000×gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ボルテックスミキサーで再懸濁後、20,000×gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、MW110kDa96%R2試薬を得た。

【0099】b)R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0100】4)測定方法

R2試薬としてMW110kDa96%R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0101】5)結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0102】実施例3

1)抗原の免疫

実施例1と同様に行った。

【0103】2)抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)及び抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)の調製

実施例1及び実施例2と同様に行った。

【0104】3)試薬の調製

a)抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)を90%と抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)を10%の重量で感作したラテックス液(以下、MW110kDa90%R2試薬という)

1.86mLの抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)及び0.14mLの抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)の混合液と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム製、平均粒径0.2 μ m)とを混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。20,000 \times gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ボルテックスミキサーで再懸濁後、20,000 \times gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、MW110kDa90%R2試薬を得た。

【0105】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0106】4)測定方法

R2試薬としてMW110kDa90%R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0107】5)結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0108】実施例4

1)抗原の免疫

実施例1と同様に行った。

【0109】2)フェニルセファロースハイパフォーマンスカラムを用いたフェニルセファロース精製抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)の調製

最終免疫後10日目以降に産卵した卵を使用した。卵白と卵黄を分離し、卵黄に10倍量の蒸留水を加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。冷蔵庫に移し、一晚静置した後、上清を集め、20,000 \times gで10分間遠心分離した。得られた上清をろ紙(ワットマンフィルターペーパー No.1)でろ過し、ろ液100mLに対して18.3gの硫酸アンモニウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000 \times gで10分間遠心分離し、得られた沈殿にPBSを20mL加えて溶解した。次いで、3.6gの硫酸ナトリウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000 \times gで10分間遠心分離し、得られた沈殿を2mLの1M硫酸アンモニウムを含むTris-HCl(pH7.5)(以下、緩衝液Aと略す)に溶解し、透析膜(スペクトラム/ポア CE透析用チューブ MW50,000)を用いて緩衝液Aに透析しアヒル卵黄抗体を得た。予め緩衝液Aで平衡化しておいたフェニルセファロースハイパフォーマンスカラム(ファルマシアバイオテック社製)に卵黄抗体を1分間に1mLづつ流し、5倍量の緩衝液Aで洗浄した。次に0.6M硫酸アンモニウムを含むTris-HCl(pH7.5)を1分間に1mLづつ流し、280nmの吸光度が0.1以上の溶出分画について回収し、透析膜(スペクトラム・ポア CE透析用チューブ MW50,000)を用いてPBSに対して透析した。さらに、PBSで0.2mg/mLに調製した。タンパク質量はBSAを標準品としたDCプロテインアッセイキットIIを用いて行った。

【0110】上記のようにして得た調製液(0.6M硫酸アンモニウム溶出画分)についてSDS-PAGEを実施した。すなわち、Laemmliの方法[「ネイチャー」(Nature)、第227巻、第680-685頁(1970)]に従い、非還元処理した上記調製液を5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにアプライし、20mA定電流で泳動した。染色はクイックCBBを用いて行った。結果を図3に示す。図3に示すように、調製液では分子量110kDaに単一バンドが認められ、純度100%の卵黄抗体が得られた。これを、フェニルセファロース精製抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)とした。

【0111】3)試薬の調製

a)フェニルセファロース精製抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)感作ラテックス液(以下、MW110kDa100%R2試薬(2)という)

2mLのフェニルセファロース精製抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム社製、平均粒径0.2 μ m)とを混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。20,000 \times gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ボルテックスミキサーで再懸濁後、20,000 \times gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、MW110kDa100%R2試薬(2)を得た。

【0112】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0113】4)測定方法

上記a)で得られたMW110kDa100%R2試薬(2)を用いた以外は、実施例1と同様に行った。

【0114】5)結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0115】比較例1

1)抗原の免疫

実施例1と同様に行った。

【0116】2)抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)及び抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)の調製
実施例1及び実施例2と同様に行った。

【0117】3)試薬の調製

a)抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)を80%と抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)を20%の重量で感作したラテックス液(以下、MW110kDa80%R2試薬という)

1.70mLの抗hAFP・卵黄抗体(分子量110kDa)及び0.30mLの抗hAFP・卵黄抗体(分子量160kDa)の混合液と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム製、平均粒径0.2 μ m)とを混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。20,000 \times gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ボルテックスミキサーで再懸濁後、20,000 \times gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、MW110kDa80%R2試薬を得た。

【0118】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0119】4)測定方法

R2試薬としてMW110kDa80%R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0120】5)結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0121】比較例2

1)抗原の免疫

実施例1と同様に行った。

【0122】2)抗hAFP・卵黄抗体の調製

最終免疫後10日目以降に産卵した卵を使用した。卵白と卵黄を分離し、卵黄に10倍量の蒸留水を加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。冷蔵庫に移し、一晚静置した後、上清を集め、20,000×gで10分間遠心分離した。得られた上清をろ紙(ワットマンフィルターペーパー No.1)でろ過し、ろ液100mLに対して18.3gの硫酸アンモニウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×gで10分間遠心分離し、得られた沈殿にPBSを20mL加えて溶解した。次いで、3.6gの硫酸ナトリウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×gで10分間遠心分離し、得られた沈殿を2mLのPBSに溶解し、透析膜(スペクトラム/ポア CE透析用チューブ MW50,000)を用いてPBSに透析しアヒル卵黄抗体を得た。

【0123】得られたアヒル卵黄抗体のSDS-PAGEを実施した。すなわち、Laemmliの方法に従い、非還元処理したアヒル卵黄抗体を5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにアプライし、20mA定電流で泳動した。染色はクイックCBBを用いた。その結果、図1及び2に示すのと同様、分子量160kDa及び110kDaの位置にバンドが認められた。また、予め別の実験で、上記と同様に行って得られたアヒル卵黄抗体2.0mLのプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。分子量160kDa及び110kDaに相当するそれぞれの分画を集め試料として、DCプロテインアッセイキットIIによってタンパク質定量を行い(標準品はBSA)、PBSで濃度0.2mg/mLに調製し、これを抗hAFP・卵黄抗体とした。なお、分子量160kDa及び110kDaの各抗体は、当該抗hAFP・卵黄抗体中、前者が30%、後者が70%であった。

【0124】3)試薬の調製

a)抗hAFP・卵黄抗体感作ラテックス液(以下、卵黄抗体R2試薬という)

2mLの抗hAFP・卵黄抗体と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム製、平均粒径0.2µm)とを混合し、37

で2時間振とうした。20,000×gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ボルテックスミキサーで

再懸濁後、20,000×gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、卵黄抗体R2試薬を得た。

【0125】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0126】4)測定方法

R2試薬として卵黄抗体R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0127】5)結果

10 実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0128】比較例3

1)抗原の免疫

2mgのhAFPを1mLのPBSに溶解し、フロイント完全アジュバンドと等量混合した。次いで超音波破砕機を用いて目盛り1で10秒間処理し、氷冷下に1分間静置する工程を4回繰り返して初回免疫用免疫原を作製した。

20 【0129】2mgのhAFPを1mLのPBSに溶解し、フロイント不完全アジュバンドと等量混合した。次いで超音波破砕機を用いて目盛り1で10秒間処理し、氷冷下に1分間静置する工程を4回繰り返して追加免疫用免疫原を作製した。

【0130】ニワトリ[Chicken (Leghorn); Gallus gallus]1羽当り0.4mLの初回免疫用免疫原を当該ニワトリの皮下十数箇所注射した。10日後、ニワトリ1羽当り0.2mLの追加免疫用免疫原を当該ニワトリの皮下十数箇所注射した。追加免疫は10日毎に4回実施した。

【0131】2)抗hAFP・ニワトリ卵黄抗体(分子量170kDa)の調製

最終免疫後10日目以降に産卵した卵を使用した。卵白と卵黄を分離し、卵黄に10倍量の蒸留水を加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。冷蔵庫に移し、一晚静置した後、上清を集め、20,000×gで10分間遠心分離した。得られた上清をろ紙(ワットマンフィルターペーパー No.1)でろ過し、ろ液100mLに対して18.3gの硫酸アンモニウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×gで10分間遠心分離し、得られた沈殿にPBSを20mL加えて溶解した。次いで、3.6gの硫酸ナトリウムを攪拌しながら少量づつゆっくりと加え、全量添加後そのまま30分間攪拌した。30分間静置後、20,000×gで10分間遠心分離し、得られた沈殿を2mLのPBSに溶解し、透析膜(スペクトラム/ポア CE透析用チューブ MW50,000)を用いてPBSに透析し、ニワトリ卵黄抗体2.1mLを得た。

【0132】得られた上記ニワトリ卵黄抗体2.0mLのプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。Laemmliの方法に従い、非還元処理したニワトリ卵黄抗体を7.5%ポリアクリルアミドゲル-プレパラティブ

電気泳動装置（日本エイドー製、NA - 1800型）にアプライし、100V定電圧で泳動した。フラクションコレクターを用い1フラクション当り3mL回収した。上記ニワトリ卵黄抗体及び92番目のフラクション（以下Fr.92という）についてSDS-PAGEを実施した。すなわち、Laemmliの方法[「ネイチャー」(Nature)、第227巻、第680-685頁(1970)]に従い、非還元処理したFr.92を5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにアプライし、20mA定電流で泳動した。染色はクイックCBBを用いた。その結果、図4に示すように、Fr.92では分子量170kDaに単一バンドが認められ、純度100%の卵黄抗体が得られた〔以下、ニワトリ卵黄抗体(分子量170kDa)という〕。上記ニワトリ卵黄抗体(分子量170kDa)を試料として、DCプロテインアッセイキットIIによってタンパク質定量を行い(標準品はBSA)、PBSで濃度0.2mg/mLに調製し、これを抗hAFP・ニワトリ卵黄抗体(分子量170kDa)とした。

【0133】3) 試薬の調製

a) 抗hAFP・ニワトリ卵黄抗体感作ラテックス液(以下、ニワトリMW170kDa100%R2試薬という)
2mLの抗hAFP・ニワトリ卵黄抗体と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム社製、平均粒径0.2 μ m)とを混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。20,000 \times gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ポルテックスミキサーで再懸濁後、20,000 \times gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ポルテックスミキサーで再分散し、ニワトリMW170kDa100%R2試薬を得た。

【0134】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0135】4) 測定方法

R2試薬としてニワトリMW170kDa100%R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0136】5) 結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0137】比較例4

1) 抗hAFP・ヤギ抗体(分子量150kDa)

アトランティック・アンチボディ-(ATAB: Atrant ic Antibody)社の抗hAFP抗体(IgGFr: ヤギ由来)2.1mLを透析膜(スペクトラム/ポアCE透析用チューブ MW50,000)を用いてPBSに透析し、抗hAFP抗体2.1mLを得た(以下、抗hAFP・ヤギ抗体という)。

【0138】上記抗hAFP・ヤギ抗体を試料として、DCプロテインアッセイキットIIによってタンパク質定量を行い(標準品はBSA)、PBSで濃度0.2mg/mLに調製し、これを抗hAFP・ヤギ抗体(分子量150kDa)とした。

【0139】2) 試薬の調製

a) 抗hAFP・ヤギ抗体(分子量150kDa)感作ラテックス

液(以下、ヤギMW150kDa100%R2試薬という)
2mLの抗hAFP・ヤギ抗体(分子量150kDa)と2mLの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム社製、平均粒径0.2 μ m)とを混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。20,000 \times gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ポルテックスミキサーで再懸濁後、20,000 \times gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ポルテックスミキサーで再分散し、ヤギMW150kDa100%R2試薬を得た。

【0140】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

【0141】3) 測定方法

R2試薬としてヤギMW150kDa100%R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0142】4) 結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0143】参考例1

抗hAFP・ヤギ抗体を酵素を用いて限定分解し、さらに精製することにより得られた、リユーマチ因子等の妨害物質と実質的に反応しない抗hAFP・ヤギ抗体F(ab')₂(分子量100kDa)を用いて血清検体中のhAFPを定量した。

【0144】1) 抗hAFP・ヤギ抗体F(ab')₂(分子量100kDa)

アトランティック・アンチボディ-(ATAB: Atrant ic Antibody)社の抗hAFP抗体(IgGFr: ヤギ由来)をニソノフ(A.Nisonoff)ら[Arch.Biochem.Bio phys., vol. 89, p230(1960)]の変法で処理した。即ち、上記抗hAFP抗体10mL(タンパク質濃度: 20mg/mL)を0.15MNaClを含む0.1M酢酸緩衝液(pH3.75)を用いて調製した。調製した抗hAFP抗体溶液(10mg/mL)にIgGの2重量%に相当するペプシン[ウォージントン社(Worthington, Inc.)製、生化学用]を加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。次いで、1N NaOHを滴下しpHを8に調整し、消化反応を停止した。上記抗hAFP抗体の反応液をセファクリルS200HR(ファルマシア社製)カラムにアプライし、PBSで溶出した。各溶出ピークの溶出液の一部をSDS-PAGEで確認し、分子量100kDaの分画[F(ab')₂抗体]を集めた。上記分子量100kDaの分画を試料として、DCプロテインアッセイキットIIによってタンパク質定量(標準品はBSA)を行った。結果、上記抗hAFP抗体200mgの出発原料から得られたF(ab')₂抗体は30mgであり、低い回収率であった。上記分子量100kDaの分画[F(ab')₂抗体]をPBSで濃度0.2mg/mLに調製し、これを抗hAFP・ヤギ抗体F(ab')₂(分子量100kDa)とした。

【0145】2) 試薬の調製

a) 抗hAFP・ヤギ抗体F(ab')₂(分子量100kDa)感作ラテックス液(以下、ヤギMW100kDa100%R2試薬という)
2mLの抗hAFP・ヤギ抗体F(ab')₂(分子量100kDa)と2mL

Lの0.5%ラテックス懸濁液(日本合成ゴム社製、平均粒径0.2 μm)とを混合し、37℃で2時間振とうした。20,000×gで20分間遠心分離し、沈殿に分散液を4mL加え、ボルテックスミキサーで再懸濁後、20,000×gで20分間遠心分離した。得られた沈殿に1%BSAを含む分散液16mLを加え、ボルテックスミキサーで再分散し、ヤギMW100kDa100%R2試薬を得た。

【0146】b) R1試薬

実施例1と同様の試薬を用いた。

*【0147】3)測定方法

R2試薬としてヤギMW100kDa100%R2試薬を用いた以外は実施例1と同様の条件で測定した。

【0148】4)結果

実施例1と同様の血清検体10例についてhAFPを定量した結果を表1に示す。

【0149】

【表1】

	参考例1	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	
血清検体	1	3	0	7	10	3	5	16	0	15
	2	6	10	10	9	5	10	14	10	13
	3	14	11	11	14	13	26	24	73	100
	4	16	15	14	23	16	29	30	31	49
	5	47	45	46	36	47	44	56	62	101
	6	66	63	67	43	68	102	139	417	620
	7	76	74	75	70	77	82	123	122	175
	8	105	100	102	107	108	145	208	351	526
	9	126	121	125	122	129	125	125	153	202
	10	137	127	130	158	135	145	160	194	305

単位：ng/mL

【0150】表1から、各血清検体につき実施例1~4のいずれの場合も、当該検体にリウマチ因子(RF)等の妨害物質が存在するにも関わらず、IgG分子のFc部分を除いたF(ab')₂フラクションを使用した参考例1の測定結果と同様に安定して精度良く測定対象物のhAFPを定量できることが分かる。特に、実施例4の場合、低濃度のhAFP濃度領域で高感度に精度良く測定できた。一方、比較例1~4では、実施例4の場合における各検体の定量結果と比べた場合、比較的大きな値となった。これは、前記妨害物質による影響であると考えられる。このように、本発明によれば、測定対象を、たとえそれが低濃度であったとしても特異的に精度良く定量することができる。

【0151】

【発明の効果】本発明によれば、検体中のリウマチ因子や補体成分等の妨害物質の影響を実質的に受けることなく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量できる、安価かつ簡便に調製可能な免疫測定試薬及び当該免疫測定試薬を用いる免疫測定方法が提供され、検体中の前記妨害物質の影響を実質的に受けること

なく、測定対象の抗原又は抗体を特異的に精度良く検出又は定量することができる。

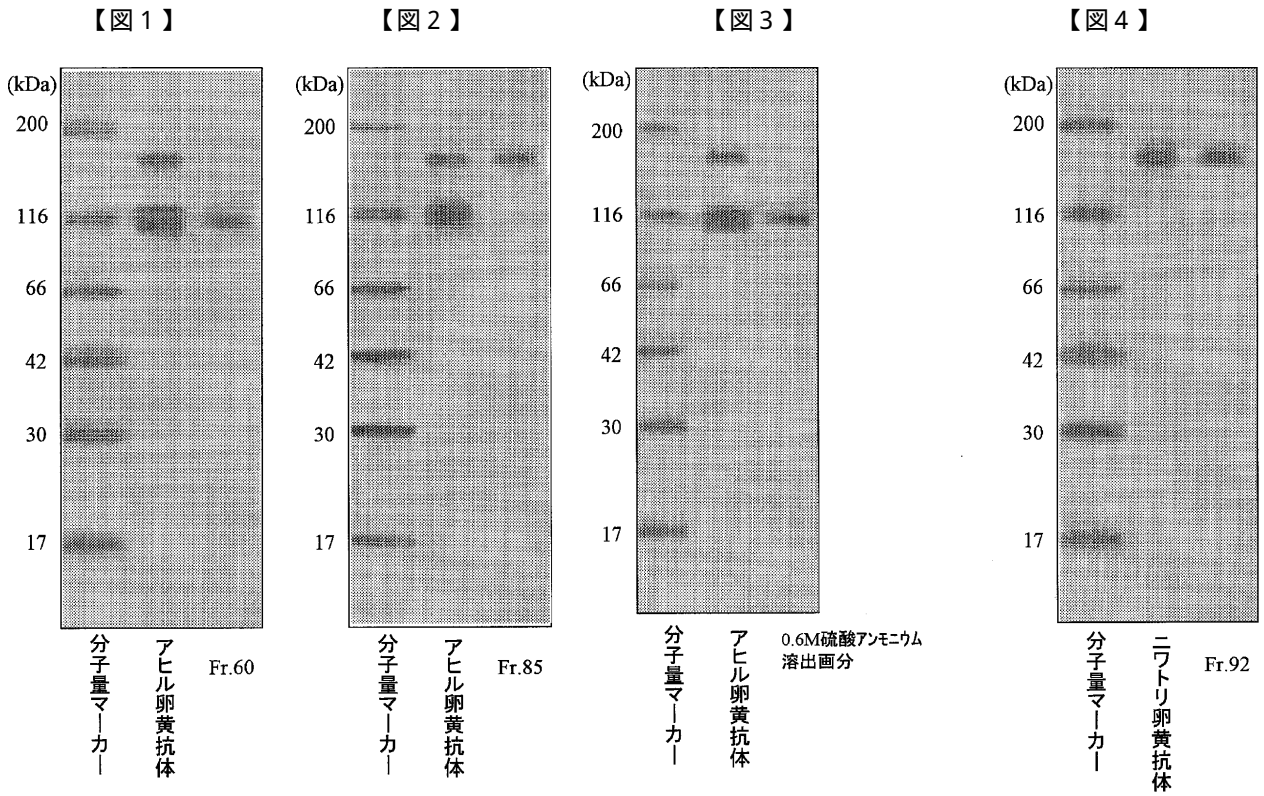
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、アヒル卵黄抗体及びアヒル卵黄抗体のプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動法による60番目のフラクションサンプル(Fr.60)のSDS-PAGEの結果を示す図である。

【図2】図2は、アヒル卵黄抗体及びアヒル卵黄抗体のプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動法による85番目のフラクションサンプル(Fr.85)のSDS-PAGEの結果を示す図である。

【図3】図3は、アヒル卵黄抗体及びアヒル卵黄抗体のフェニルセファロースハイパフォーマンスカラムを用いた疎水カラムクロマトグラフィー法による溶出画分サンプル(0.6M硫酸アンモニウム溶出画分)のSDS-PAGEの結果を示す図である。

【図4】図4は、ニワトリ卵黄抗体及びニワトリ卵黄抗体のプレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動法による92番目のフラクションサンプル(Fr.92)のSDS-PAGEの結果を示す図である。



フロントページの続き

(72)発明者 山木 光男

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化
成工業株式会社医薬品研究所内

专利名称(译)	免疫分析试剂和免疫分析方法		
公开(公告)号	JP2002350442A	公开(公告)日	2002-12-04
申请号	JP2001153774	申请日	2001-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社		
[标]发明人	飯嶋裕己 澤崎健 山木光男		
发明人	飯嶋 裕己 澤崎 健 山木 光男		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/53.D G01N33/543.587		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供廉价且易于制备的免疫测定试剂，以及能够使用该试剂特异性准确地检测或定量测定测定对象的抗原或抗体的免疫测定方法。解决方案：通过使用基本上不包含超过140kDa分子量的蛋白质的蛋黄抗体，可以测定包括能够与抗原或确定对象的抗体产生免疫反应的卵黄抗体的样品中的抗原或抗体的确定。免疫分析试剂。在该确定中，例如，检测确定对象的抗原或抗体可以通过使该蛋黄抗体与样品中的确定对象的抗原或抗体反应来确定，通过携带标记材料标记的卵黄抗体。不溶性载体

実施例1と同様の試薬を用いた。

*

	参考例1	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	
血清抗体	1	3	0	7	10	3	5	16	0	15
	2	6	10	10	9	5	10	14	10	13
	3	14	11	11	14	13	26	24	73	100
	4	16	15	14	23	16	29	30	31	49
	5	47	45	46	36	47	44	56	62	101
	6	66	63	67	43	68	102	139	417	620
	7	76	74	75	70	77	82	123	122	175
	8	105	100	102	107	108	145	208	351	526
	9	126	121	125	122	129	125	125	153	202
	10	137	127	130	158	135	145	160	194	305

単位：ng/mL