

(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 - 71691

(P2002 - 71691A)

(43)公開日 平成14年3月12日(2002.3.12)

(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 33/53			G 0 1 N 33/53	Z
	33/536		33/536	F

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 4 数)

(21)出願番号 特願2000 - 257198(P2000 - 257198)

(22)出願日 平成12年8月28日(2000.8.28)

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 江口 聡

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 白波瀬 泰史

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

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆 (外 1 名)

(54)【発明の名称】 免疫分析方法および試薬

(57)【要約】

【課題】免疫比濁法や免疫比ろろ法等の免疫測定方法において、検量線の形状がシグモイド状となり、直線性の良い検量線が得られないか、或いは全体的に傾きの小さい検量線となる等により感度不足になり、該免疫測定に用いる試薬のロットの違いにより測定値がばらつく等の問題がしばしば起こっていた。本発明の課題は、免疫測定方法において、上記のような感度不足を解消する方法および測定試薬を提供することである。

【解決手段】測定に用いる抗体に、I g M型抗体のような多量体を構成する免疫グロブリンを含むことにより、被検物質の量による測定範囲に影響することなく、シグモイド状の検量線は取らず、直線性が良く、更に傾きも大きい感度の良い測定方法および測定試薬が提供できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検物質に対する抗体を用いて、試料に含まれる被検物質の分析を行う場合において、該抗体に多量体を構成する免疫グロブリンを含むことを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 2】 多量体を構成する免疫グロブリンが I g M 型抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 3】 I g M 型抗体および他のクラスの抗体を含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の免疫測定方法。

【請求項 4】 被検物質の分析を行う場合において、多量体を構成する免疫グロブリンを、検量線が原点を通る直線を描くのに十分量に、含むことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 5】 多量体を構成する免疫グロブリンの抗体力価が、全抗体力価の少なくとも 2 % であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 6】 免疫測定方法が免疫比濁法または免疫比濁ろう法である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 7】 被検物質が、C 反応性蛋白質 (C R P)、免疫グロブリン (I g G , I g A , I g M)、トランスフェリン、セルロプラスミン、ヘモペキシン、1 - 酸性糖蛋白質、2 - マクログロブリン、2 - ミクログロブリン、アポ A I、アポ A I I、アポ B、アポ C I I、アポ C I I I、アポ E、C₃、C₄、アルブミン、L p (a)、シスタチン C のいずれかであることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 8】 請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 に記載の抗体を含む免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、臨床検査診断薬の分野でとりわけ免疫測定方法および測定試薬に利用される。

【0002】

【従来の技術】臨床検査等の分野では、試料中の被検物質を、免疫比濁法または比濁ろう法等の免疫測定方法により測定することは日常的に行なわれている。該免疫比濁法および免疫比濁ろう法では、通常被検物質に対する抗血清または抗体を適当な濃度に希釈したものを該被検物と反応させることにより、生じる濁りを光学的に測定している (「臨床検査法提要」、金原出版株式会社)。

【0003】免疫測定法、とりわけ免疫比濁法または比濁ろう法で被検物質を測定する場合には、用いる抗体の力価や親和性が測定感度、測定範囲に影響することは知られており、被検物質に対する抗体力価が低い抗体では測

定範囲が狭くかつ感度の低い試薬となり、親和性の低い抗体では感度が低くなる (石川栄治、河合忠、宮井潔「酵素免疫測定法」：医学書院、P. 62 (1978))。

【0004】しかしながら、抗血清または抗体の力価を同一に調整しても、被検物質の量に対する検量線の形状がシグモイド状となり、直線性の良い検量線が得られないか、或いは全体的に傾きの小さい検量線となる等により感度不足になり、該免疫測定に用いる試薬のロットの違いにより測定値がばらつく等の問題がしばしば起こっていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、免疫測定法において、上記のような感度不足を解消する方法およ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、免疫測定方法において、測定に用いる抗体に多量体を構成する免疫グロブリンを含むことにより、本発明の課題を解決できることを見出し、本発明を完成させた。

【0007】免疫学的測定方法においてシグモイド状の検量線を形成するのは、この検量線の形状から被検物質の低値領域での試薬の感度不足が原因であることが考えられた。そこで、本発明者らはその原因を追求したところ、試薬の抗体中に含まれる I g M 画分の差によって、検量線の形状に違いが生じることを見出した。すなわち測定に使用する抗体に I g M 型抗体のような多量体を構成する免疫グロブリンを含むことにより、被検物質の量による測定範囲に影響することなく、シグモイド状の検量線は取らず、原点を通過し、直線性が良く、更に傾きも大きい検量線を描き、感度の良い測定方法を提供できることを見出し、本発明を完成させた。更に、本発明は上記の免疫測定方法に用いる測定用試薬にも及ぶ。

【0008】すなわち本発明は、以下の通りである。

1. 被検物質に対する抗体を用いて、試料に含まれる被検物質の分析を行う場合において、該抗体に多量体を構成する免疫グロブリンを含むことを特徴とする免疫測定方法、

2. 多量体を構成する免疫グロブリンが I g M 型抗体であることを特徴とする前項 1 に記載の免疫測定方法、

3. I g M 型抗体および他のクラスの抗体を含むことを特徴とする前項 1 または 2 に記載の免疫測定方法、

4. 被検物質の分析を行う場合において、多量体を構成する免疫グロブリンを、検量線が原点を通る直線を描くのに十分量に、含むことを特徴とする前項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の免疫測定方法、

5. 多量体を構成する免疫グロブリンの抗体力価が、全抗体力価の少なくとも 2 % であることを特徴とする前項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の免疫測定方法、

6. 免疫測定方法が免疫比濁法または免疫比ろろ法である前項1～5のいずれか1に記載の免疫測定方法、

7. 被検物質が、C反応性蛋白質(以下、CRPという)、免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)、トランスフェリン、セルロプラスミン、ヘモペキシン、1-酸性糖蛋白質、2-マクログロブリン、2-ミクログロブリン、アポAI、アポAII、アポB、アポCII、アポCIII、アポE、C₃、C₄、アルブミン、Lp(a)、シスタチンCのいずれかであることを特徴とする前項1～6のいずれか1に記載の免疫測定方法、8. 前項1～7のいずれか1に記載の抗体を含む免疫測定試薬、である。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施するための条件について詳細に説明するが、本発明は以下の記載により何ら制限されるものではない。

【0010】本発明において、免疫測定方法とは、試料中の被検物質に対する抗体を被検物質反応させることによって、その結果生じた反応生成物について光学的、またはその他の方法により測定する測定方法をいい、具体的には例えば免疫比濁法、免疫比ろろ法、免疫拡散法(SRID法)等が挙げられる。

【0011】被検物質は、特に限定されないが、例えばCRP、免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM等)、トランスフェリン、セルロプラスミン、ヘモペキシン、1-酸性糖蛋白質、2-マクログロブリン、2-ミクログロブリン、アポAI、アポAII、アポB、アポCII、アポCIII、アポE、C₃、C₄、アルブミン、Lp(a)、シスタチンC等が例示される。

【0012】多量体を構成する免疫グロブリンは特に限定されないが、例えばIgM型抗体あるいはIgA型抗体が使用される。より好適にはIgM型抗体が使用される。

【0013】本発明の測定に用いられる抗体の由来は特に限定されないが、一般的にウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、モルモット、マウス、ウマ、ロバ等に抗原を免疫して得られた抗血清または抗体が用いられる。また、一般的な方法によって調製されたモノクローナル抗体であっても良い。抗体のクラスはIgMの他にIgG、IgA、IgD、IgE等が知られている。

【0014】上記抗体は、市販の抗血清または抗体、さらには自家調製した抗血清または抗体を使用することができる。抗体の組み合わせは、特に限定されないが、例えば以下のような組み合わせが例示される。IgM型モノクローナル抗体とIgG型ポリクローナル抗体、IgM型モノクローナル抗体とIgG型モノクローナル抗体、IgM型ポリクローナル抗体とIgG型モノクローナル抗体、IgM型ポリクローナル抗体とIgG型モノクローナル抗体。また、上記の組み合わせのうち、Ig

M型抗体の代わりにIgA型抗体を組み合わせても良い。さらに、クラスの異なる抗体の組み合わせに、IgM型抗体および/またはIgA型抗体を含有しても良い。

【0015】多量体を構成する免疫グロブリンの量は、測定に用いる抗体の全抗体力価の少なくとも2%以上であればよく、好適には2%～50%、より好適には5～20%であれば良い。

【0016】上記の抗体力価を求める方法は特に限定されないが、酵素免疫測定法、SRID法等の測定方法、またはHPLCによって得られた分布の面積比等によって求められる。

【0017】このような分析によって得た総抗体力価の少なくとも2%、好適には2%～50%、より好適には5～20%のIgM型抗体を含む画分を選択して用いることができる。さらにポリクローナル抗体で調製する場合には、免疫スケジュールを調整してIgM型抗体の力価が高い抗血清を得、IgG型抗体の力価の高い抗血清と混合して用いることにより調製することができる。他の方法として、通常のIgG型抗体にIgM型のモノクローナル抗体を加えて調製することも可能である。この例は、モノクローナル抗体を組み合わせても同様に調製できる。

【0018】免疫測定法のうち、特に免疫比濁法、または免疫比ろろ法について、自動分析機を用いて測定する場合は、試薬としてリン酸緩衝液またはトリス緩衝液等の適当な緩衝液に凝集促進剤、例えばポリエチレングリコール類等を加えたものを調製する。さらに必要に応じて他の化合物等を加えて第一試薬を調製する。

【0019】被検物質に対する抗体、例えば抗CRP抗体(ヤギ由来)を適当な力価となるようにリン酸緩衝液またはトリス緩衝液等の適当な緩衝液で希釈し、第二試薬を調製する。ここで用いる抗体は、抗血清をそのまま用いてもよいし、また塩析等の操作を加えて免疫グロブリン画分を分画して用いてもよい。さらにクロマトグラフィ操作によって精製した画分を用いることも可能である。第二試薬の全抗体力価は、通常0.1～3.0mg/mL、好適には0.5～2.5mg/mL、さらに好適には1.0～2.0mg/mLとなるように調整される。

【0020】測定条件としては、反応温度は特に限定されないが、好ましくは約25～40であり、反応時間は目的により自由に定められる。第二試薬分注後の吸光度変化を測定することにより、検量線より算出して被検物質の濃度を求める。

【0021】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明を更に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0022】

【実施例1】ヒトCRP測定用試薬を次のように調製し

た。第一試薬として、50mMのHEPES緩衝液(pH=7.2)に0.15Mの塩化ナトリウムと3%(W/V)のポリエチレングリコール6000を加えて調製した。

【0023】第二試薬として、抗ヒトCRPヤギ抗体を総力価1.5mg/mLとなるように0.15Mの塩化ナトリウムを含む50mMのHEPES緩衝液(pH=7.2)に添加して調製した。第二試薬について、抗ヒトCRPヤギ抗体の総力価の中でIgM型抗体の占める力価を0、0.5、1、2、5、10、15%と変化させた。

【0024】試料液は、被検物質であるCRPの濃度が、0、0.45、2.35、4.7、9.2、19.3mg/dLとなるよう調製した。

【0025】測定は日立7170型自動分析装置を用いて行った。具体的には、各試料液15μLを測定用チューブにとり、そのうえに第一試薬250μLを加えた。37℃で5分間インキュベートした後、第二試薬50μL*

*Lを加えて37℃で5分間反応させた。反応液について、波長340nmで5分間の吸光度変化量を求めた。その結果を表1及び図1に示した。

【0026】第一試薬組成

- 50mM HEPES
- 0.15M 塩化ナトリウム
- 1mM EDTA
- 0.1% アジ化ナトリウム
- 3% PEG6000

【0027】第二試薬試薬組成

- 50mM HEPES
- 0.15M 塩化ナトリウム
- 1mM EDTA
- 0.1% アジ化ナトリウム
- 1.5mg/mL 抗ヒトCRP抗体ヤギ血清

【0028】

【表1】

	IgM力価/総力価×100(%)							
	0	0.5	1	2	5	10	15	
CRP (mg/dL)	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.45	0.0000	0.0002	0.0004	0.0047	0.0121	0.0122	0.0149	
2.35	0.0012	0.0067	0.0119	0.0405	0.0566	0.0561	0.0643	
4.7	0.0095	0.0685	0.0782	0.0967	0.1148	0.1149	0.1248	
9.2	0.1651	0.1823	0.1857	0.2078	0.2237	0.2231	0.2336	
19.3	0.3094	0.3264	0.3414	0.3513	0.3971	0.3952	0.4028	

【0029】以上の結果よりIgM型体の力価が総力価の2%以上の場合にはCRP濃度2.35mg/mL以下でも感度が上昇し、検量線が直線的に改善されることがわかった。

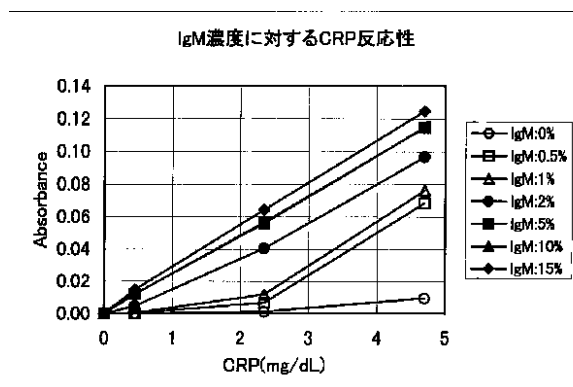
【発明の効果】本発明によれば、測定に使用する抗体にIgM型抗体のような多量体を構成する免疫グロブリンを含むことにより、被検物質の量による測定範囲に影響することなく、シグモイド状の検量線は取らず、直線性

が良く、更に傾きも大きい感度の良い測定方法を提供できることを見出し、本発明を完成させた。

【図面の簡単な説明】

30 【図1】実施例1におけるCRP濃度と吸光度の関係を示す図である。図中、○-○はIgM型抗体の含量が0%、-は同0.5%、-は同1%、-は同2%、-は同5%、-は同10%、-は同15%をそれぞれ示す。

【図1】



专利名称(译)	免疫测定方法和试剂		
公开(公告)号	JP2002071691A	公开(公告)日	2002-03-12
申请号	JP2000257198	申请日	2000-08-28
申请(专利权)人(译)	国际试剂有限公司		
[标]发明人	江口 聡 白波瀬 泰史		
发明人	江口 聡 白波瀬 泰史		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536		
FI分类号	G01N33/53.Z G01N33/536.F		
其他公开文献	JP2002071691A5 JP4488460B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：由于校准曲线的配置变为S形，因此无法获得良好线性的校准曲线或获得整体上小倾角的校准曲线，因此提供免疫测定和测量试剂解决了缺乏灵敏度的问题 - 例如，通过比浊法或比浊法进行免疫测定，并进一步解决由用于免疫测定的试剂的批次差异引起的测量值的频繁发生的分散等。解决方案：构成聚合物例如IgM型抗体的免疫球蛋白包括在用于测量的抗体中。结果，样品的量对测量范围没有影响，校准曲线也不会变成S形。由此可以提供具有良好线性，大倾角和高灵敏度的测量方法和测量试剂。

	IgM力価/総力価×100(%)						
	0	0.5	1	2	5	10	15
CRP	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(mg/dL)	0.45	0.0000	0.0002	0.0004	0.0047	0.0121	0.0149
	2.35	0.0012	0.0067	0.0119	0.0405	0.0566	0.0643
	4.7	0.0095	0.0685	0.0782	0.0967	0.1148	0.1248
	9.2	0.1651	0.1823	0.1857	0.2078	0.2237	0.2336
	19.3	0.3094	0.3264	0.3414	0.3513	0.3971	0.4028