

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-163319

(P2007-163319A)

(43) 公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 8 1 D
<b>GO 1 N 33/577 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/577	A
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2005-360785 (P2005-360785)	(71) 出願人	000002288
(22) 出願日	平成17年12月14日 (2005.12.14)		三洋化成工業株式会社 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
		(72) 発明者	園近 誠 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内

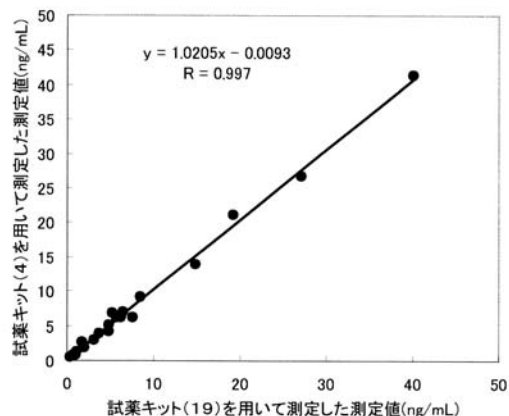
(54) 【発明の名称】 免疫測定法及び免疫測定用試薬キット

(57) 【要約】

【課題】 検体中に遊離体及び結合体で存在する物質を高精度かつ簡便に定量できる方法並びに試薬キットを適用すること。

【解決手段】 測定対象物質が遊離体及び結合体で存在する検体と、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1を固定化したラテックス1とを反応させて反応体1を得る工程(1)、並びに抗体1と測定対象物質に対する認識部位の異なるモノクローナル抗体2を固定化したラテックス2と、反応体1とを反応させて反応体2を得る工程(2)を含むことを特徴とする免疫測定法、また検体中の遊離体及び結合体で存在する測定対象物質を定量するための試薬キットであって、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1を固定化したラテックス1を含む試薬(1)と、抗体1と測定対象物質に対する認識部位の異なるモノクローナル抗体2を固定化したラテックス2を含む試薬(2)とを必須構成試薬として含有することを特徴とする免疫測定用試薬キットを用いる。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

測定対象物質が遊離体及び結合体で存在する検体と、測定対象物質に対するモノクローナル抗体 1 を固定化したラテックス 1 とを反応させて反応体 1 を得る工程 ( 1 )、並びに抗体 1 と測定対象物質に対する認識部位の異なるモノクローナル抗体 2 を固定化したラテックス 2 と、反応体 1 とを反応させて反応体 2 を得る工程 ( 2 ) を含むことを特徴とする免疫測定法。

## 【請求項 2】

工程 ( 1 ) 及び工程 ( 2 ) の反応時間の合計が 2 ~ 60 分であり、かつ工程 ( 1 ) の反応時間 ( 1 ) が工程 ( 2 ) の反応時間 ( 2 ) の 0.2 ~ 5 倍である請求項 1 に記載の免疫測定法。

10

## 【請求項 3】

ラテックス 1 の体積平均粒子径 ( a ) とラテックス 2 の体積平均粒子径 ( b ) との比 ( a / b ) が 0.9 ~ 1.1 である請求項 1 又は 2 に記載の免疫測定法。

## 【請求項 4】

測定対象物質が前立腺特異抗原である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の免疫測定法。

## 【請求項 5】

検体中の遊離体及び結合体で存在する測定対象物質を定量するための試薬キットであって、測定対象物質に対するモノクローナル抗体 1 を固定化したラテックス 1 を含む試薬 ( 1 ) と、抗体 1 と測定対象物質に対する認識部位の異なるモノクローナル抗体 2 を固定化したラテックス 2 を含む試薬 ( 2 ) とを必須構成試薬として含有することを特徴とする免疫測定用試薬キット。

20

## 【請求項 6】

試薬 ( 1 ) 及び / 又は試薬 ( 2 ) に凝集促進剤を含んでなる請求項 4 に記載の免疫測定用試薬キット。

## 【請求項 7】

ラテックス 1 の体積平均粒子径 ( a ) とラテックス 2 の体積平均粒子径 ( b ) との比 ( a / b ) が 0.9 ~ 1.1 である請求項 5 又は 6 に記載の免疫測定用試薬キット。

30

## 【請求項 8】

測定対象物質が前立腺特異抗原である請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の免疫測定用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、免疫測定法及び免疫測定用試薬キットに関する。詳しくは測定対象物が検体中の遊離体及び結合体で存在する測定対象物質を定量するために好適な免疫測定法、並びにこれに好適に用いられる測定用試薬キットに関する。

## 【背景技術】

40

## 【0002】

生体中の物質には、遊離体及び結合体で存在するものがあることは従来から知られている (たとえば、前立腺特異抗原 ( P S A ) は、遊離体である P S A 自体以外に、 P S A と 1 - アンチキモトリプシン ( A C T ) 等との結合体で血中に存在する)。そしてこのような物質を定量する方法として、 ( 1 ) 遊離体と結合体と等モル反応させる E L I S A ( Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay ) 法用測定試薬及びこれを用いた測定方法が提案されている (特許文献 1 )。

また、 ( 2 ) 2 種類のモノクローナル抗体を平均粒子径が異なる 2 種の不溶性担体 (ラテックス等) にそれぞれ担持させたものを用いて定量する方法が知られている (特許文献 2 )。

50

【特許文献1】特開平9 - 234068号公報

【特許文献2】特開2005 - 106609号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、前者の方法(1)は、特殊な装置を必要とし、汎用の自動分析装置には適用できないという問題がある。

また、後者の方法(2)では、高感度で定量できないという問題がある。

本発明の目的は、このような現状に鑑み、検体中に遊離体及び結合体で存在する物質を高精度でかつ簡便に定量する方法、並びにこの方法に適した試薬キットを適用することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の免疫測定法の特徴は、測定対象物質が遊離体及び結合体で存在する検体と、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1を固定化したラテックス1とを反応させて反応体1を得る工程(1)、並びに抗体1と測定対象物質に対する認識部位の異なるモノクローナル抗体2を固定化したラテックス2と、反応体1とを反応させて反応体2を得る工程(2)を含む点を要旨とする。

また、本発明の免疫測定用試薬キットの特徴は、検体中の遊離体及び結合体で存在する測定対象物質を定量するための試薬キットであって、

20

測定対象物質に対するモノクローナル抗体1を固定化したラテックス1を含む試薬(1)と、

抗体1と測定対象物質に対する認識部位の異なるモノクローナル抗体2を固定化したラテックス2を含む試薬(2)とを必須構成試薬として含有する点を要旨とする。

【発明の効果】

【0005】

本発明の免疫測定法は、検体中に遊離体及び結合体で存在する物質を高精度でかつ簡便に定量することができる。

また、本発明の試薬キットは、検体中に遊離体及び結合体で存在する物質を高精度でかつ簡便に定量することができる。

30

したがって、本発明によると、特殊な装置を必要とせず、汎用の自動分析装置を用いて、高感度で定量できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

測定対象物質としては、遊離体と結合体とで存在し得るものであれば特に限定されないが、本発明は検体中に遊離体及び結合体で存在するものに好適である(これらのいずれかの状態で存在する場合は従来の方法でも、簡便に定量できるが、高精度ではない。)。なお、遊離体とは、測定対象物質が遊離状態であること(測定対象物質が親和性物質と結合していないこと)を意味する。また、結合体とは、測定対象物質と、親和性物質(結合物)とが結合しているものを意味する。

40

測定対象物質としては、前立腺特異抗原(PSA)、プロテインC、エラスターゼ、カテプシンG、トロンピン、C1-エステラーゼ、プラスミン及び組織型プロスミノゲン・アクチベータ等が挙げられる。これらのうち、PSAが好ましい。

親和性物質としては、測定対象物質に対して親和性を有し結合(水素結合やファンデルワールス力による結合等)し得る物質であれば特に限定はされないが、たとえば、以下の物質が挙げられる。

測定対象物質がPSAの場合、1-アンチキモトリプシン又はプロテインCインヒビター等；同様にプロテインCの場合、プロテインCインヒビター等；エラスターゼの場合、1-プロテアーゼインヒビター等；カテプシンGの場合、1-アンチキモトリプシ

50

ン等；トロンビンの場合、抗トロンピンIII等；C1-エステラーゼの場合、C1-インヒビター等；プラスミンの場合、2-抗プラスミン等；組織型プロスミノゲン・アクチベータの場合、プロスミノゲン・アクチベータ・インヒビター1等が挙げられる。

【0007】

測定対象物質に対するモノクローナル抗体1としては、測定対象物質（遊離体と結合体の両者を含む）との反応性を有するものであれば特に限定されない。

測定対象物質に対するモノクローナル抗体2としては、測定対象物質（遊離体と結合体の両者を含む）との反応性を有し、かつ抗体1と測定対象物質に対する認識部位（エピトープ）の異なるモノクローナル抗体であれば特に制限されない。

なお、2種の抗体の認識部位が異なることは、抗体及び抗原のエピトープマッピング等により確認できるが、より簡便には、抗原及び2種の抗体を用いて、通常の2部位サンドイッチ免疫測定できるかどうかをによっても確認できる。

これらのモノクローナル抗体の由来も特に限定されず、市販品（例えば、メディックスバイオメカ；Anti-hPSA Clone code 8301, 8311、日本臨床検査研究所；anti-PSA Clone No.68, 4D10等）、或いは細胞融合技術や遺伝子組換え技術等を利用した自体公知の方法〔Eur.J immunol, 6, 511 (1976)〕等によって産生されたもの等が使用できる。

【0008】

モノクローナル抗体1及びモノクローナル抗体2は、パパイン等で部分分解して得られるFabフラグメント、ペプシン等で部分分解して得られるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント及び/又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを還元処理して得られるFab'フラグメント等を含んでいてもよい。

【0009】

モノクローナル抗体1又はモノクローナル抗体2は、単独のモノクローナル抗体であってもよく、複数のモノクローナル抗体の混合物であってもよい。

【0010】

ラテックス1及びラテックス2に使用されるラテックスとしては、免疫測定分野で用いられているものであれば特に限定はされないが、スチレンラテックス（ポリスチレンラテックス等）、アクリルラテックス（メタクリル酸エステルラテックス等）、変性ラテックス（ポリスチレンラテックスにカルボキシル基を導入したカルボキシ変性ラテックス等）、磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス等）等が挙げられる。これらのラテックスのうち、スチレンラテックス及び変性ラテックスが好ましく、さらに好ましくはソープフリー乳化重合によって得られるポリスチレンラテックス及びカルボキシ変性ラテックス、特に好ましくはカルボキシ変性ラテックスである。

【0011】

ラテックスの粒子径は測定対象物及び必要とする測定感度等により適宜選択することができ、ラテックスの体積平均粒子径（ $\mu\text{m}$ ）は、0.05～2.4が好ましく、さらに好ましくは0.05～1、特に好ましくは0.05～0.3である。これらの範囲であると、測定感度がさらに良好となる。

ラテックス粒子の粒子径は、測定感度の観点等から、バラツキが小さい方が好ましく、粒子径の変動係数が10%以下が好ましく、さらに好ましくは5%以下、特に好ましくは3%以下である。

【0012】

ラテックス1又はラテックス2は、ラテックスにモノクローナル抗体1又はモノクローナル抗体2を固定化して調製される。

ラテックスにモノクローナル抗体を固定化する方法としては、従来公知の方法（物理吸着法及び化学結合法）に準じて行うことができる。

物理吸着法としては、モノクローナル抗体とラテックスとを適当な緩衝液（リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液、グリシン緩衝液及びホウ酸緩衝液等）中で懸濁させ、たとえば、20～30で2～3時間反応させた後、遠心分離し、上清を除き、適当なブロッキング剤を含む緩衝液（1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液等）に再分散す

ること（ブロッキング処理）により固定化する方法等が適用できる。

化学結合法としては、カルボキシ変性ラテックスに可溶性カルボジイミド〔例えば、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride等〕等を反応させて、表面のカルボキシル基を活性化した後、モノクローナル抗体を反応させることにより固定化する方法等が適用できる（モノクローナル抗体のアミノ基が活性化されたカルボキシル基と結合する）。なお、結合後のブロッキング処理等は物理吸着法と同様に行うことができる。

#### 【0013】

ラテックスにモノクローナル抗体を固定化する時の抗体量は、抗体の力価、測定対象物、測定感度等により適宜設定できるが、ラテックス固形分（約100における揮発分を含まない）1mg当たり、2～100 $\mu$ g程度である。 10

#### 【0014】

ラテックス1及びラテックス2は、同一の平均粒子径をもつラテックスから作成されることが好ましく、ラテックス1の体積平均粒子径（a）とラテックス2の体積平均粒子径（b）との比（a/b）は、0.9～1.1が好ましく、さらに好ましくは0.93～1.07、特に好ましくは0.95～1.05、最も好ましくは0.97～1.02である。この範囲であると、測定感度がさらに良好となる。

#### 【0015】

測定感度、測定レンジ等の改善のため、ラテックス1は、平均粒子径の異なる2種以上のラテックスにそれぞれモノクローナル抗体1を結合した後、混合して使用することもできる。なお、平均粒子径の異なる2種以上のラテックスを用いる場合、ラテックスの粒子径の変動係数は、それぞれ10%以下が好ましく、さらに好ましくは5%以下、特に好ましくは3%以下である。 20

また、同様の理由から、ラテックス2についても同様である。

これらの場合でも、ラテックス1の体積平均粒子径（a）とラテックス2の体積平均粒子径（b）との比（a/b）は上記の範囲であることが好ましい。

#### 【0016】

ラテックス1及びラテックス2は、それぞれ、適当な緩衝液に分散して試薬1及び試薬2として調製され、保存及び測定に使用される。

試薬1及び試薬2を調製するために用いられる緩衝液としては、上記モノクローナル抗体と測定対象物質とが反応することを妨げるものでなければよく、pH5.0～10.0（好ましくは6.5～8.5）に緩衝作用を有する緩衝液〔リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液、グリシン緩衝液及びホウ酸緩衝液等〕等が使用できる。なお、これらの緩衝液中の緩衝剤の濃度（mM）としては、1～500が好ましく、さらに好ましくは5～300、特に好ましくは10～200である。この範囲であると、測定感度がさらに良好となる。 30

#### 【0017】

試薬1中のラテックス1の含有量は、測定対象物、ラテックスの平均粒子径、要求される測定感度等により適宜設定できるが、試薬100ml当たり、0.01～1gが好ましく、さらに好ましくは0.02～0.5g、特に好ましくは0.05～0.3gである。 40

また、試薬2についても同様である。これらの範囲であると、測定感度がさらに良好となる。

なお、ラテックスの含有量を試薬1と試薬2とで異なる設定としてもよく、異なる場合、試薬1中のラテックス1の含有量（g/100ml）と試薬2中のラテックス2の含有量（g/100ml）との比（ラテックス1/ラテックス2）は、10/1～1/10が好ましく、さらに好ましくは5/1～1/5、特に好ましくは3/1～1/3である。この範囲であると、測定感度がさらに良好となる。

#### 【0018】

この試薬1及び/又は試薬2には、測定感度や測定操作の簡便性の観点等から、凝集促進剤を含有させることが好ましく、さらに好ましくは試薬1に凝集促進剤を含有させるこ 50

とである。なお、凝集促進剤は、試薬 1 及び試薬 2 とは別の試薬として構成することもできる。

【0019】

凝集促進剤としては、抗原抗体反応によるラテックスの凝集を促進させる作用を有するものであればよく、従来公知のものが使用でき、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルピロリドン及びポリ塩化ビニル等が挙げられる。これらのうち、ポリエチレングリコール及びポリビニルピロリドン、さらに好ましくはポリエチレングリコールである。なお、複数の凝集促進剤を組み合わせて使用することもできる。

【0020】

凝集促進剤の数平均分子量は、3,000~1,000,000が好ましく、さらに好ましくは5,000~100,000、特に好ましくは5,000~50,000である。この範囲であると、測定感度がさらに良好となる。

10

【0021】

試薬 1 及び / 又は 2 に凝集促進剤を含有させる場合、凝集促進剤の含有量（重量％）は、試薬 1 又は試薬 2 の重量に基づいて、0.1~10が好ましく、さらに好ましくは0.2~8、特に好ましくは0.5~5である。この範囲であると、測定感度がさらに良好となる。

【0022】

この試薬 1 及び / 又は試薬 2 には、上記モノクローナル抗体と測定対象物質とが反応することを妨げない範囲で、糖類（グルコース、シュークロース等）、無機塩（塩化ナトリウム等）、界面活性剤（モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン等）、防腐剤（アジ化ナトリウム等）及び / 又は非特異反応防止剤等（正常動物由来の IgG 抗体等）を含有させてもよい。

20

糖類、無機塩、界面活性剤、防腐剤及び / 又は非特異反応防止剤を含む場合、試薬 1 又は試薬 2 の重量に基づいて、糖類の含有量は0.1~10重量％程度、無機塩の含有量は0.01~5重量％程度、界面活性剤の含有量は0.02~5重量％程度、防腐剤の含有量は0.001~0.1重量％程度、非特異反応防止剤の含有量は0.001~5重量％程度である。

【0023】

本発明のキットは、さらに構成試薬として、標準試薬（濃度既知の測定対象物溶液等）、希釈用試薬（高濃度検体の希釈用試薬等）、洗浄試薬（反応容器の洗浄用試薬等）等を含み、さらに取り扱い説明書、測定に必要な治具等（例えば検体容器等）を含んでもよい。

30

【0024】

本発明のキットは例えば、以下のようにして免疫測定に適用できる。

1) 検体の準備工程；たとえば、血液からの血漿、血清等の分離処理等を行う。必要により希釈等を実施する。

2) 工程(1)；反応容器に、試薬(1)及び検体を分注し、一定時間反応(免疫反応)させる。

3) 工程(2)；工程(1)の反応体に試薬(2)を分注し、濁度 $x$ を計測し、一定時間反応(免疫反応)させる。そして、反応後の濁度 $y$ を計測し、濁度変化( $y-x$ )を求める。

40

4) 測定対象物質の濃度算出；あらかじめ濃度既知の検体を測定し、それぞれの濁度を計測し、この濁度から検量線を作成しておく。そして、この検量線から、濁度変化( $y-x$ )を濃度に換算する。

【0025】

工程(1)及び工程(2)の反応時間は、測定対象物、反応性及び要求される測定感度の観点等から適宜設定可能であるが、測定感度及び測定時間の短縮の観点等から、工程(1)及び工程(2)の合計反応時間は2~60分が好ましく、さらに好ましくは3~30分、特に好ましくは4~20分である。また、同様の観点等から、工程(1)の反応時間

50

(1)は、工程(2)の反応時間(2)の0.2~5倍であることが好ましく、さらに好ましくは0.5~2.5倍、特に好ましくは1~2倍である。

【0026】

工程(1)及び工程(2)によって、ラテックス1及びラテックス2が凝集するので、この凝集を従来公知の方法(濁度の変化、凝集粒子の計測等)で計測することにより、測定対象物質を定量できる。

濁度変化の計測は、例えば、分光光度計{測定波長:340~1000nm(好ましくは500~900nm)}で、工程(2)の始めと終わりの時間ポイント(例えば、1ポイント目は試薬2の分注・混合の30秒後等、2ポイント目は工程(2)の終了直前等)で濁度をそれぞれ計測し、その濁度の差を濁度変化として求めることができる。

10

【0027】

検体、試薬1及び試薬2の分注量、反応温度等の条件は自由に設定できる。例えば、検体量としては、通常1~100 $\mu$ Lであり、好ましくは2~20 $\mu$ L、さらに好ましくは5~10 $\mu$ Lである。試薬1及び試薬2の分注量は、通常20~500 $\mu$ Lであり、好ましくは50~200 $\mu$ L、さらに好ましくは50~100 $\mu$ Lである。反応温度は、通常25~45であり、好ましくは35~39、さらに好ましくは36~38である。なお、市販されている臨床検査用の生化学自動分析機{たとえば、日立ハイテクノロジーズ製、自動分析機7180等}を用いると、検体、試薬1及び試薬2の分注量、工程(1)及び工程(2)の反応時間、濁度の計測の条件等を設定することができ、自動分析が可能である。

20

【0028】

以上のように、本発明の免疫測定キットを用いれば、遊離体及び結合体を等モル反応させることができるため(等モル反応性に優れている)、高精度に測定対象物質を定量できる。

なお、遊離体及び結合体の等モル反応とは、モノクローナル抗体への遊離体の結合量(モル数)とモノクローナル抗体への結合体の結合量(モル数)との比が、ほぼ1:1である反応を意味する。

等モル反応性とは、遊離体との反応性及び結合体との反応性が同程度であることを意味し、遊離体及び結合体のいずれの免疫測定においても、質量分析で測定された濃度とほぼ同じ値が得られるという性質を意味する。

30

具体的には、例えばPSAでの等モル反応とは以下の様に定義できる。即ち、スタンフォード大学より入手した精製PSA{遊離体PSA(以下fPSA)及びACT-PSA結合体(PSAと1-アンチキモトリプシンとの結合体、以下cPSA)}をそれぞれ段階希釈して測定し、X軸に理論濃度値{精製PSAの表示濃度値と希釈倍率とから算出した値}、Y軸に実際の測定値をプロットしたとき、その希釈直線の傾きを回帰式から求め、両者{fPSA及びcPSAについて}の傾きの比(fPSA傾き/cPSAの傾き)を偏り度と表す。その範囲が0.9<1.1のときに等モル反応しているとみなされ、0.8<0.9、1.1<1.2のときにほぼ等モル反応しているとみなされる[第65回日本泌尿器科学会東部総会シンポジウム]。

【実施例】

40

【0029】

以下、実施例により本発明を更に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

<作成例1>抗PSAモノクローナル抗体の作成

1.免疫用抗原の調製とマウスへの免疫

コンプリートフロイントアジュバント(ディフコ社製)1gと100 $\mu$ gの精製遊離PSA(カルピオケム社製)を含む0.85重量%塩化ナトリウム水溶液1gをホモジナイザーで混合・乳化し、免疫抗原エマルジョンとした。免疫抗原エマルジョンの0.2gをマウス(Balb/c)1頭の腹腔内に投与した。そして1ヶ月間隔で3回同様に投与した(合計4回投与)。

50

## 【0030】

## 2. ハイブリドーマの作成

免疫したマウスから脾臓を摘出し、以下の通り常法に従い抗PSAモノクローナル抗体を作成した。

すなわち、脾臓から脾臓細胞  $2 \times 10^8$  個を採取し、RPMI 1640 培地 15 mL で4回洗浄した後、この洗浄後の脾臓細胞と、 $2 \times 10^7$  個のミエローマ細胞 (P3-NS1/1-Ag4.1) とを、37 °C の 42.5 重量% (培地の重量に対する濃度) のポリエチレングリコール 4000 [数平均分子量 4000、(株)ナカライテスク] 及び 7.5 重量% (培地の重量に対する濃度) のジメチルスルフォキシドを含む RPMI 1640 培地 1 mL 中で、1 分間混合 (細胞融合) させ、融合細胞懸濁液を得た。この融合細胞懸濁液を RPMI 1640 培地 5 mL で徐々に希釈し、融合細胞を遠心分離し、洗浄した後、HAT 培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、10 重量% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地) 20 mL を加えて融合細胞液を得た。次いで、この融合細胞液を 96 ウェルマイクロプレートに 0.2 mL ずつ分注して 2 週間培養した後、融合細胞 (ハイブリドーマ) が増殖したウェル中の培養上清の抗体価を下記の方法で測定した。

10

## 【0031】

## 3. 抗体価の測定法

## 1) 抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズの調製

抗PSAポリクローナルウサギ抗体 (ダコ社製) を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.0) に  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度に溶解し、この溶液 500 mL に直径 6.35 mm ポリスチレンビーズ (商品名: イムノビーズ、イムノケミカル社製) 500 個を浸漬し、2 ~ 10 °C で 10 時間放置した。その後、溶液をアスピレーターで吸引除去し、ポリスチレンビーズを 0.1 重量% 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH 7.0) に浸漬して、抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズとした。作成した抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズは使用時まで 4 ~ 10 °C で保存した。

20

## 【0032】

## 2) 標識抗マウスIgG抗体液の調製

ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGウサギ抗体 (ダコ社製) を 0.1 重量% 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 2000 倍に希釈し、標識抗体液とした。使用時まで -20 °C で凍結保存した。

30

## 【0033】

## 3) 発色液の調製

0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.8) 100 mL に o-フェニレンジアミン 300 mg 及び 30 重量% 過酸化水素水  $70 \mu\text{L}$  を加え溶解し、発色液を調製した。使用時まで遮光冷蔵保存した (作成当日のみ使用可能)。

## 【0034】

## 4) 測定操作

試験管 (内径 1.2 cm、長さ 10 cm) に抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズ 1 個、1 重量% ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH 7.0)  $300 \mu\text{L}$  及び精製遊離PSA抗原液 (免疫に使用した精製遊離PSA抗原の濃度を 0.1 重量% 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH 7.0) で  $50 \text{ ng}/\text{mL}$  としたもの)  $50 \mu\text{L}$  を加え、37 °C、1 時間静置下で反応させた。反応液をアスピレーターで吸引除去し、0.85 重量% 塩化ナトリウム水溶液 1 mL を加えた後、塩化ナトリウム水溶液をアスピレーターで吸引除去することによりビーズを洗浄した。この洗浄操作をさらに 2 回行った後、1 重量% ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH 7.0)  $250 \mu\text{L}$  及び上記で培養したウェルの上清  $50 \mu\text{L}$  を加え、37 °C、1 時間静置下で反応させた。上述と同様にビーズの洗浄を 3 回行った後、標識抗体液  $300 \mu\text{L}$  を加え、37 °C、1 時間静置下で反応させた。上述と同様にビーズの洗浄を 3 回行った後、発色液  $500 \mu\text{L}$  を加え、37 °C、30 分間静置下で反応させた。1.5 N 硫酸 1 mL を加えて反応を停止させ、測定波長 492 nm で吸光度 (光路長 10 mm) を測定した。なお、上記で培養した 96 ウェルについて、そ

40

50

れぞれ測定した。

【0035】

4. 抗PSAモノクローナル抗体の選択

上記、抗体価の測定でブランク吸光度（培養上清を加えない場合の測定吸光度）の10倍以上の吸光度を示したハイブリド-マを限界希釈法によりクローン化し、12クローンを得た。12クローンの培養上清について、上記の抗体価の測定法に準じて遊離体PSA及び結合体PSAとの反応性を確認した。ただし、精製遊離PSA抗原液に換えて、スタンフォード大学メディカルセンターの泌尿器学科から入手したPSA抗原液{遊離体PSA(fPSA)からなる抗原液及び結合体PSA(cPSA)からなる抗原液}を0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.0)で50ng/mLの濃度に希釈したものを使用した。

10

以上の結果、12クローンの全てが抗体価を示し、その内7クローンが遊離体及び結合体の両方に反応性を示した。これらの内、結合体との反応性の高い3クローンを抗PSAモノクローナル抗体(No.1~3)として選択した。

【0036】

5. 抗PSAモノクローナル抗体の精製

抗PSAモノクローナル抗体(No.1)を産生するハイブリド-マを無血清培地(ASF培地104,味の素株式会社)1Lで1週間培養(37)し、培養上清を限外ろ過膜(ウルトラフィルターUK-50,東洋濾紙製)で100分の1容量にそれぞれ濃縮した。これらの濃縮液を0.85重量%塩化ナトリウム含有0.02Mリン酸緩衝液pH7.0を移動相としてゲル濾過カラム(スーパーデックス200プレップカラム,ファルマシア製)にかけ、各フラクションにそれぞれ分画した。各フラクションの抗体価を測定し、抗体価を示したフラクションをプールした。プールしたフラクションを限外ろ過膜(ウルトラフィルターUK-50,東洋濾紙製)でタンパク濃度1mg/mLとなるよう濃縮し、抗PSAモノクローナル抗体の緩衝溶液(1)を得た。なお、抗PSAモノクローナル抗体(No.2及び3)について同様に精製をおこない、抗PSAモノクローナル抗体の緩衝溶液{(2)(3)}を得た。

20

【0037】

6. 抗PSAモノクローナル抗体の認識部位の確認

「3.抗体価の測定法 1)抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズの調製」の記載に準じて、抗PSAモノクローナル抗体(No.1)結合ビーズ、抗PSAモノクローナル抗体(No.2)結合ビーズ、及び抗PSAモノクローナル抗体(No.3)結合ビーズをそれぞれ作成した。

30

ジャーナルオブモレキュラアンドセルイムノロジー(J.Mol.Cell.Immunol)2,191(1986)に記載の方法で、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオネート{N-Succinimidyl3-(2-pyridyldithio)propionate}[商品名:SPDP、同仁化学(株)製]と、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(東洋紡製)とを反応させ、ペルオキシターゼにメルカプト基を導入した。

次いで、メルカプト基導入ペルオキシダーゼと抗PSAモノクローナル抗体(No.1)とをジャーナルオブバイオケミストリー(J.Biochem),92,1413(1982)に記載の方法で、二架橋性試薬N-(4-マレイミドブチリルオキシ)サクシニイミド{N-(4-Maleimido butyryloxy)succinimide}[GMB S、同仁化学製]で結合し、ペルオキシダーゼ標識抗PSAモノクローナル抗体(No.1)を調製し、冷凍(-30)保存した。同様にして、ペルオキシダーゼ標識抗PSAモノクローナル抗体(No.2)、ペルオキシダーゼ標識抗PSAモノクローナル抗体(No.3)を調製した。

40

そして、3種の結合ビーズと3種のペルオキシターゼ標識抗PSAモノクローナル抗体とを用いて、表1に記載した組み合わせで次の通り測定した。

すなわち、試験管(内径1.2cm、長さ10cm)に抗PSAモノクローナル抗体結合ビーズ1個、1重量%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.0)300μL及び検体50μLを加え、37、1時間静置下で反応させた。反応液をアスピレーター

50

で吸引除去し、0.85重量%塩化ナトリウム水溶液1 mLを加えた後、塩化ナトリウム水溶液をアスピレーターで吸引除去することによりビーズを洗浄した。この洗浄操作をさらに2回行った後、標識抗体液300  $\mu$ Lを加え、37℃、1時間静置下で反応させた。引き続き、上述と同様にビーズの洗浄を3回行った後、発色液500  $\mu$ Lを加え、37℃、30分間静置下で反応させた。1.5 N硫酸1 mLを加えて反応を停止させ、測定波長492 nmで吸光度(光路長10 mm)を測定した。ただし、検体は、「4.抗PSAモノクローナル抗体の選択」記載のcPSAの50 ng/mL溶液及びcPSAの0 ng/mL {0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH 7.0)}を測定した。

吸光度の測定結果を表1に示した。異種のモノクローナル抗体間の組み合わせの吸光度は高かったが、同種のモノクローナル抗体間の組合せの吸光度は著しく低かった。すなわち、3種のモノクローナル抗体は各々認識部位が異なることが証明された。なお、表中数値はcPSAの測定吸光度で、上段はcPSA 0 ng/mL、下段はcPSA 50 ng/mLの場合である。

10

【0038】

【表1】

		ペルオキシターゼ標識抗PSAモノクローナル抗体の調製に用いたモノクローナル抗体		
		No. 1	No. 2	No. 3
結合ビーズの調製に用いたモノクローナル抗体	No. 1	0.004	0.018	0.010
		0.008	1.326	0.837
	No. 2	0.006	0.016	0.007
		0.368	0.017	0.763
	No. 3	0.009	0.014	0.008
		0.397	0.568	0.010

20

【0039】

<実施例1>免疫測定用試薬キット(1)の作成

1.抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス[(試薬(1))]の作成

30

カルボキシ変性ラテックス分散液(JSR社製、体積平均粒子径0.2  $\mu$ m、ラテックス含有量10重量%)100  $\mu$ L、HEPPE緩衝液(0.1 M、pH 7.4)900  $\mu$ L、WSC溶液(可溶性カルボジイミド、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide,hydrochlorideの1 M水溶液)500  $\mu$ Lを、遠心管に加え、室温(20~30℃)で1時間、攪拌させた(カルボキシ変性ラテックスと可溶性カルボジイミドとを反応させた)。次いで、この遠心管を15000 rpm、15分間遠心した後、上清をアスピレーターで吸引除去し、沈殿に純水1500  $\mu$ Lを加え、ボルテックスミキサーを用いて再分散し、再度15000 rpm、15分間遠心し、上清をアスピレーターで吸引除去し、この沈殿にHEPPE緩衝液(0.1 M、pH 7.4)900  $\mu$ Lを加え、超音波破碎機(トミー社製、品番UD-201)で2分間処理し再分散した。この分散液に、抗PSAモノクローナル抗体(No. 1)を蛋白量として0.3 mg加え、室温(20~30℃)で2時間、攪拌しながら反応させた。反応後、8000 rpm、10分遠心した後、上清をアスピレーターで吸引除去し、沈殿に1%牛血清アルブミン含有HEPPE緩衝液(0.1 M、pH 7.4)2000  $\mu$ Lを加え、超音波破碎機(トミー社製、品番UD-201)で2分間処理し再分散することにより、抗PSAモノクローナル抗体(No. 1)結合ラテックス分散液を調製した。

40

この抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス分散液を、1%牛血清アルブミン含有HEPPE緩衝液(0.1 M、pH 7.4)で、ラテックスの含有量が0.1重量%となるように希釈して、試薬(1A)(モノクローナル抗体No. 1結合)を得た。

【0040】

50

## 2. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス〔(試薬(2))〕の作成

抗PSAモノクローナル抗体(No. 1)に換えて、抗PSAモノクローナル抗体(No. 2)を使用すること以外、「1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス〔(試薬(1))〕の作成」と同様に、抗PSAモノクローナル抗体(No. 2)結合ラテックス分散液を調製した。この抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス分散液を、1%牛血清アルブミン含有HEPES緩衝液(0.1M、pH7.4)で、ラテックスの含有量が0.1重量%となるように希釈して、試薬(2A)(モノクローナル抗体No. 2結合)を得た。

### 【0041】

## 3. 凝集促進剤含有試薬の作成

ポリエチレングリコール(商品名:PEG-6000S、三洋化成工業社製)1gを1%牛血清アルブミン含有HEPES緩衝液(0.1M、pH7.4)100mLに溶解し、凝集促進剤含有試薬を得た。

### 【0042】

## 4. 試薬キットの調製

試薬(1A)、試薬(2A)及び凝集促進剤含有試薬を試薬キット(1)とし、使用時まで冷蔵(2~10)で保存した。

### 【0043】

## <実施例2>免疫測定用試薬キット(2)の作成

### 1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス〔(試薬(2))〕の作成

実施例1の抗PSAモノクローナル抗体(No. 1)を、抗PSAモノクローナル抗体(No. 3)に変更すること以外、実施例1と同様に、試薬(2B)(モノクローナル抗体No. 3結合)を得た。

### 2. 試薬キットの調製

実施例1で調製した試薬(1A)及び凝集促進剤含有試薬と、試薬(2B)とを試薬キット(2)とし、使用時まで冷蔵(2~10)で保存した。

### 【0044】

## <実施例3>免疫測定用試薬キット(3)の作成

### 1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス〔(試薬(2))〕の作成

実施例1で調製した試薬(2A)と、実施例2で調製した試薬(2B)とを等容量で混合し、試薬(2C)を調製した。

### 2. 試薬キットの調製

実施例1で調製した試薬(1A)及び凝集促進剤含有試薬と、試薬(2C)とを試薬キット(3)とし、使用時まで冷蔵(2~10)で保存した。

### 【0045】

## <実施例4>免疫測定用試薬キット(4)の作成

### 1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックス〔(試薬(1))〕の作成

実施例1で調製した試薬(1A)と凝集促進剤含有試薬とを1:2の容量で混合し、試薬(1B)とした。

### 2. 試薬キットの調製

試薬(1B)と、実施例1で調製した試薬(2A)とを試薬キット(4)とし、使用時まで冷蔵(2~10)で保存した。

### 【0046】

## <比較例1>免疫測定用試薬キット(5)の作成

### 1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックスの作成

実施例1で調製した試薬(1A)と試薬(2A)を等容量で混合し、試薬(H1)とした。

### 2. 試薬キットの調製

実施例1で調製した凝集促進剤含有試薬と試薬(H1)を試薬キット(5)とし、使用時まで冷蔵(2~10)で保存した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 7 】

## &lt; 実施例 5 &gt;

本実施例 5 は、試薬キット ( 1 ) を用いた場合の感度及び P S A 等モル反応性を評価するものである。

分光光度計測定セル ( 島津製作所製、マイクロブラックセル L、光路長 1 0 m m ) に、凝集促進剤含有試薬 1 0 0  $\mu$  L、試薬 ( 1 A ) 5 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した後、検体 1 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した後、2、3、3、5、6 又は 8 分間反応させた ( 工程 1 )。

引き続き、試薬 ( 2 A ) 5 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌し、8、6、7、5、4 又は 2 分間 { ( 工程 1 ) の反応時間と併せて 1 0 分間となる時間 } 反応させた ( 工程 2 )。

( 工程 2 ) の試薬 ( 2 A ) 5 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した直後と、( 工程 2 ) の終了時に、濁度を計測して ( 島津製作所製、U V m i n - 1 2 4 0、測定波長 : 5 7 0 n m )、濁度の差を求め、この差を濁度変化量とした。 10

なお、検体として、スタンフォード大学から入手した P S A 抗原液をそれぞれ 5 0 n g / m L に希釈したもの ( 上記のものと同じ ) を使用した。また、全ての操作は、3 7  $^{\circ}$  C に管理された恒温槽で実施した ( 以下、同じ )。

## 【 0 0 4 8 】

得られた濁度変化量から、ブランク値 ( P S A 抗原の希釈に使用した、0 . 1 重量 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 ( p H 7 . 0 ) を用いて同様に測定した濁度変化量 ) を減算し、さらに 1 0 0 0 0 を乗じた計算値を表 2 に示した。

また、偏り度 { f P S A の濁度変化量から算出した計算値 ( f ) と、c P S A の濁度変化量から算出した計算値 ( c ) との比を表 2 に示した。この偏り度 は 1 に近いほど等モル反応性が良好であることを表す。 20

## 【 0 0 4 9 】

## &lt; 実施例 6 &gt;

本実施例は、試薬キット ( 2 ) を用いた場合の感度及び P S A 等モル反応性を評価するものである。

分光光度計測定セル ( 島津製作所製、マイクロブラックセル L、光路長 1 0 m m ) に、凝集促進剤含有試薬 1 0 0  $\mu$  L、試薬 ( 1 A ) 5 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した後、検体 1 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した後、5 分間反応させた ( 工程 1 )。

引き続き試薬 ( 2 B ) 5 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌し、5 分間反応させた ( 工程 2 )。 30

( 工程 2 ) の試薬 ( 2 B ) 5 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した直後と、( 工程 2 ) の終了時、濁度を計測して ( 島津製作所製、U V m i n - 1 2 4 0、測定波長 : 5 7 0 n m )、濁度の差を求め、この差を濁度変化量とした。

そして、実施例 5 と同様に、計算値及び偏り度 を表 2 に示した。

なお、検体として、実施例 5 と同じものを使用した。

## 【 0 0 5 0 】

## &lt; 実施例 7 &gt;

本実施例は、試薬キット ( 3 ) を用いた場合の感度及び P S A 等モル反応性を評価するものである。

試薬 ( 2 B ) 5 0  $\mu$  L を試薬 ( 2 C ) 5 0  $\mu$  L に変更した以外、実施例 6 と同様にして濁度の差を求め、計算値及び偏り度 を算出し、これらを表 2 に示した。 40

## 【 0 0 5 1 】

## &lt; 比較例 2 &gt;

本比較例は、試薬キット ( 5 ) を用いた場合の感度、等モル反応性を評価するものである。

分光光度計測定セル ( 島津製作所製、マイクロブラックセル L、光路長 1 0 m m ) に、凝集促進剤含有試薬 1 0 0  $\mu$  L 及び検体 1 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した後、試薬 ( H 1 ) 1 0 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌し、5 分間反応させた。試薬 ( H 1 ) 1 0 0  $\mu$  L を加えて均一攪拌した直後と、5 分間反応終了時に濁度を計測した ( 島津製作所製、U V m i n - 1 2 4 0、測定波長 : 5 7 0 n m )。そして、実施例 5 と同様にして濁度の差を求め、計算値 50

及び偏り度 を算出し、これらを表 2 に示した。

【 0 0 5 2 】

【表 2】

	試薬 キット	工程 1 時間 (分)	工程 2 時間 (分)	反応時間 の比	計算値		偏り度 $\gamma$
					f P S A	c P S A	
					実施例 5	(1)	
		3.3	6.7	0.5	2248	2046	1.10
		5	5	1	2421	2469	0.98
		6	4	1.5	2345	2556	0.92
		8	2	4	2114	2368	0.89
	6 (2)	5	5	1	2033	1865	1.09
	7 (3)	5	5	1	2687	2641	1.02
比較例 2	(5)	5	5	—	1621	1003	1.62

10

【 0 0 5 3 】

試薬キット (1) (実施例 5) は、どの反応時間においても、偏り度が、0.8 ~ 1.2 となり、等モル反応性が優れていた。また、計算値も大きく、高感度であった。特に工程 1 と工程 2 との反応時間の比が 0.5 ~ 1.5 の範囲では、偏り度が 0.9 ~ 1.1 であり、等モル反応性が極めて優れていた。さらに、計算値も大きく、極めて高感度であった。

20

試薬キット (2) (実施例 6) は、試薬キット (1) よりも、計算値が小さく、やや感度が低かったが、偏り度は 1.09 であり、等モル反応性が優れていた。

試薬キット (3) (実施例 7) についての偏り度は 1.02 であり、等モル反応が優れていた。また、計算値が極めて大きく、試薬キット (1) ~ (3) 及び (5) の中で最も高感度であった。

試薬キット (5) (比較例 2) の 1.62 と大きな値であり、等モル反応性を示さなかった (すなわち、実施例 1 と同じ抗体を使用しても従来の方法では精度良く測定できなかった)。また、計算値が著しく小さく、低感度であった。

30

【 0 0 5 4 】

< 実施例 8 >

本実施例は、試薬キット (4) を用いて、f P S A 及び c P S A の反応性を詳細に確認した例である。

分光光度計測定セル (島津製作所製、マイクロブラックセル L、光路長 10 mm) に、試薬 (1 B) 150  $\mu$ L 及び検体 10  $\mu$ L を加えて均一攪拌した後 5 分間反応させた (工程 1)。

引き続き、試薬 (2 A) 50  $\mu$ L を加えて均一攪拌した後 5 分間反応させた (工程 2)。

40

そして、実施例 5 と同様にして濁度の差を求め、これを濁度変化量とした。

なお、検体は、f P S A 及び c P S A の各 50 ng/mL 溶液 (実施例 5 と同じ) と、さらにこれらを 1 重量% B S A 含有リン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) で希釈して調製した希釈液 {各 25、10 又は 5 ng/mL の f P S A 及び c P S A 溶液} を用いた。尚、全ての操作は、37 に管理された恒温室で実施した (以下、同じ)。

f P S A の理論濃度値と測定した濁度変化量とから検量線を作成し、この検量線と、f P S A 及び c P S A の各濃度の濁度変化量とから、それぞれの濃度測定値を算出した。

そして、c P S A の各濃度測定値を X、f P S A の各濃度測定値を Y として、回帰分析し、その相関式 {  $y = X +$  } の傾きを偏り度とし、表 3 に示した。

【 0 0 5 5 】

50

## &lt; 比較例 3 &gt;

本比較例は、試薬キット(5)を用いて、fPSA及びcPSAの反応性を詳細に確認した例である。

分光光度計測定セル(島津製作所製、マイクロブラックセルL、光路長10mm)に、凝集促進剤含有試薬100 $\mu$ L及び検体10 $\mu$ Lを加えて均一撈拌した後試薬(H1)100 $\mu$ Lを加えて均一撈拌した後5分間反応させた。

そして、実施例5と同様にして濁度の差を求め、これを濁度変化量とし、実施例8と同様にして偏り度を求め、表3に示した。

【0056】

【表3】

	試薬 キット	工程1 時間 (分)	工程2 時間 (分)	反応 時間 の比	理論濃度 (ng/mL)	濃度測定値 (ng/mL)		偏り度 $\gamma$
						fPSA	cPSA	
						実施例8	(4)	
					10	10	9.7	
					25	25	25.3	
					50	50	52.6	
比較例3	(5)	5	5	1	5	5	3.5	1.49
					10	10	6.7	
					25	25	16.4	
					50	50	33.6	

10

20

【0057】

試薬キット(4)(実施例8)の偏り度は0.94であり、等モル反応性が優れていた。一方、試薬キット(5)(比較例3)の偏り度は1.49と大きく、等モル反応性を示さなかった。

【0058】

## &lt; 実施例 9 ~ 15 &gt;

本実施例は、試薬キット(1)を用いて、試薬(1A)と試薬(2A)の使用量を変化させた場合の性能を確認したものである。

分光光度計測定セル(島津製作所製、マイクロブラックセルL、光路長10mm)に、凝集促進剤含有試薬100 $\mu$ L及び試薬(1A){表4に記載した使用量}を加えて均一撈拌した後、検体10 $\mu$ Lを加えて均一撈拌した後5分間反応させた(工程1)。

引き続き、試薬(2A){表4に記載した使用量}を加えて均一撈拌した後5分間反応させた(工程2)。実施例6と同様にして濁度の差を求め、計算値及び偏り度を算出し、これらを表4に示した。

【0059】

## &lt; 比較例 4 ~ 10 &gt; 免疫測定用試薬キット(6 ~ 12)の作成

実施例1で調製した試薬(1A)と試薬(2A)を表4に記載した容量で均一混合して、試薬(H2)~(H7)を調製した。

実施例1で調製した凝集促進剤含有試薬と、試薬(H2)を試薬キット(6)とした。

同様に、実施例1で調製した凝集促進剤含有試薬と、試薬(H3)~(H7)を用いて、試薬キット(7)~(12)とし、これらの試薬キットを使用時まで冷蔵(2~10)で保存した。

【0060】

## &lt; 比較例 11 ~ 17 &gt;

本比較例は、試薬キット(6)~(12)の感度、等モル反応性を確認したものである。

30

40

50

試薬(H1)を、試薬(H2)～(H7)のいずれかを使用した以外、比較例1と同様に、計算値及び偏り度を求め、表4に示した。

【0061】

【表4】

	試薬キット	試薬(1A)の使用量(μL)	試薬(2A)の使用量(μL)	試薬(1A)と試薬(2A)との使用量比(1A/2A)	計算値		偏り度γ
					fPSA	cPSA	
実施例	9	9.1	90.9	0.1	1431	1203	1.19
	10	16.7	83.3	0.2	1825	1588	1.15
	11	25	75	0.3	2103	1932	1.09
	12	50	50	1	2421	2469	0.98
	13	75	25	3	2979	3109	0.96
	14	83.3	16.7	5	2134	2461	0.87
	15	90.9	9.1	10	1932	2348	0.82
比較例	11(6)	9.1	90.9	0.1	632	363	1.74
	12(7)	16.7	83.3	0.2	819	485	1.69
	13(8)	25	75	0.3	1264	771	1.64
	14(9)	50	50	1	1621	1003	1.62
	15(10)	75	25	3	1834	1215	1.51
	16(11)	83.3	16.7	5	1127	777	1.45
	17(12)	90.9	9.1	10	731	515	1.42

10

20

【0062】

試薬キット(1)を用いた実施例9～15において、偏り度は、すべて0.8～1.2であり、等モル反応性が優れていた。また、計算値が高く、感度が優れていた。特に、実施例11～13について、偏り度及び計算値が最も優れていた。

一方、比較例11～17について、偏り度は大きく、等モル反応性を示さなかった。また、計算値も著しく小さく、感度が悪かった。

30

【0063】

<実施例16>免疫測定用試薬キット(13)の作成

1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックスの作成

カルボキシ変性ラテックス分散液(JSR社製、体積平均粒子径0.2μm、ラテックス含有量10重量%)を、カルボキシ変性ラテックス分散液(JSR社製、体積平均粒子径0.15μm、ラテックス含有量10重量%)に変更したこと、及び抗PSAモノクローナル抗体(No.1)を、抗PSAモノクローナル抗体(No.2)に変更したこと以外実施例1と同様に、抗PSAモノクローナル抗体(No.2)結合ラテックス(粒子径0.15nm)分散液を調製した。

この抗PSAモノクローナル抗体(No.2)結合ラテックス(粒子径0.15nm)分散液を、実施例1と同様に希釈し、試薬(2D)(モノクローナル抗体No.2結合)を得た。

40

2. 試薬キットの調製

実施例1で調製した試薬(1A)、凝集促進剤含有試薬及び試薬(2D)を試薬キット(13)とし、使用時まで冷蔵(2～10)で保存した。

【0064】

<実施例17>免疫測定用試薬キット(14)の作成

1. 抗PSAモノクローナル抗体結合ラテックスの作成

カルボキシ変性ラテックス分散液(JSR社製、体積平均粒子径0.2μm、ラテックス含有量10重量%)を、カルボキシ変性ラテックス分散液(JSR社製、体積平均粒子

50

径 0.15 μm、ラテックス含有量 10 重量%) に変更したこと以外実施例 1 と同様にし、抗 P S A モノクローナル抗体 (No. 1) 結合ラテックス (粒子径 0.15 nm) 分散液を調製した。

この抗 P S A モノクローナル抗体 (No. 1) 結合ラテックス (粒子径 0.15 nm) 分散液を、実施例 1 と同様に希釈し、試薬 (1 C) (モノクローナル抗体 No. 1 結合) を得た。

## 2. 試薬キットの調製

実施例 1 で調製した凝集促進剤含有試薬、試薬 (2 A) 及び試薬 (1 C) を試薬キット (1 4) とし、使用時まで冷蔵 (2 ~ 10 ) で保存した。

### 【0065】

< 実施例 1 8 > 免疫測定用試薬キット (1 5) の作成

#### 1. 抗 P S A モノクローナル抗体結合ラテックスの作成

実施例 1 で作成した試薬 (2 A) と実施例 1 6 で作成した試薬 (2 D) とを、体積平均粒子径が 0.18 μm になるように混合して、試薬 (2 E) を調製した。尚、本発明において、体積平均粒子径は、レーザー回折散乱式粒径分布測定装置 (堀場製作所製、Partic a LA-950、試薬 (2 E) を希釈なしにそのまま 2 5 で測定した) で計測した。

#### 2. 試薬キットの調製

実施例 1 で調製した試薬 (1 A)、凝集促進剤含有試薬及び試薬 (2 E) を試薬キット (1 5) とし、使用時まで冷蔵 (2 ~ 10 ) で保存した。

### 【0066】

< 実施例 1 9 > 免疫測定用試薬キット (1 6) の作成

#### 1. 抗 P S A モノクローナル抗体結合ラテックスの作成

実施例 1 で作成した試薬 (1 A) と実施例 1 7 で作成した試薬 (1 C) とを、体積平均粒子径が 0.18 μm になるように混合して、試薬 (1 D) を調製した。

#### 2. 試薬キットの調製

実施例 1 で調製した凝集促進剤含有試薬、試薬 (2 A) 及び試薬 (1 D) を試薬キット (1 6) とし、使用時まで冷蔵 (2 ~ 10 ) で保存した。

### 【0067】

< 比較例 1 8 > 免疫測定用試薬キット (1 7) の作成

#### 1. 抗 P S A モノクローナル抗体結合ラテックスの作成

実施例 1 で作成した試薬 (1 A) と実施例 1 6 で作成した試薬 (2 D) とを等容量で混合し、試薬 (H 8) を調製した。

#### 2. 試薬キットの調製

実施例 1 で調製した凝集促進剤含有試薬及び試薬 (H 8) を試薬キット (1 7) とし、使用時まで冷蔵 (2 ~ 10 ) で保存した。

### 【0068】

< 比較例 1 9 > 免疫測定用試薬キット (1 8) の作成

#### 1. 抗 P S A モノクローナル抗体結合ラテックスの作成

実施例 4 で作成した試薬 (1 B) と実施例 1 で作成した試薬 (2 A) とを等容量で混合し、試薬 (H 9) を調製した。

#### 2. 試薬キットの調製

実施例 1 で調製した凝集促進剤含有試薬及び試薬 (H 9) を試薬キット (1 8) とし、使用時まで冷蔵 (2 ~ 10 ) で保存した。

### 【0069】

< 実施例 2 0 ~ 2 3 >

本測定例は、本発明による試薬キット (1 3 ~ 1 6) を用いた場合の性能を確認したものである。

試薬キット (1) を試薬キット (1 3 ~ 1 6) に変更した以外、実施例 5 と同様にして濁度の差を求め、計算値及び偏り度を算出し、これらを表 5 に示した。参考のため実施例 5 の結果も表 5 に記載した。

10

20

30

40

50

## 【0070】

< 比較例 20、21 >

本測定例は、従来の技術で調製した試薬キット(17、18)を用いた場合の性能を確認したものである。

試薬キット(5)を試薬キット(17、18)に変更した以外、比較例2と同様に実施し、濁度の差を求め、計算値及び偏り度を算出し、これらを表5に示した。参考のため比較例2の結果も表5に記載した。

## 【0071】

## 【表5】

	試薬キット	試薬(1)の体積平均粒子径(a)( $\mu\text{m}$ )	試薬(2)の体積平均粒子径(b)( $\mu\text{m}$ )	比(a/b)	計算値		偏り度 $\gamma$	
					fPSA	cPSA		
実施例	5	1	0.2	0.2	1.0	2421	2469	0.98
	20	13	0.2	0.15	1.33	2763	2322	1.19
	21	14	0.15	0.2	0.75	2204	2688	0.82
	22	15	0.2	0.18	1.1	2549	2360	1.08
	23	16	0.18	0.2	0.9	2342	2518	0.93
比較例	2	5	—	0.2+0.2	—	1621	1003	1.62
	20	17	—	0.2+0.15	—	1136	1247	0.91
	21	18	—	0.15+0.2	—	1460	946	1.54

10

20

## 【0072】

試薬キット(13~16)を用いた実施例20~23において、偏り度はすべて0.8~1.2であり等モル反応性に優れていた。また、計算値が高く、感度が優れていた。特に、比(a/b)が0.9~1.1の範囲である実施例6、22及び23において等モル反応性及び感度がいづれも著しく優れていた。

一方、試薬キット(17、18)を用いた比較例25~26において、比較例25では偏り度は0.91で等モル反応性を示したが、計算値は著しく低く、感度は劣っていた。また、比較例26は等モル反応性、感度とも著しく劣っていた。

30

## 【0073】

< 実施例 24 >

本実施例は、本発明による試薬キット(4)で血清検体を測定した例を示すものである。

健康診断において、前立腺癌、前立腺肥大等の前立腺疾患の疑いのあった患者10名を含む20名の肘正中静脈から採血用注射器を用いて、全血約2mLをそれぞれ採取した。肘正中静脈より採取した全血のそれぞれを、室温(約25℃)で1~3時間静置した後、冷却遠心機にて(1500G、10分間、10℃)遠心分離し、上清部分(血清)を分取した。この血清を検体とすべく、測定時まで凍結(-20~-30℃)保存した。

40

測定は、検体を上記の血清に変更する以外、実施例8と同様に行った。

なお、fPSA及びcPSAの各50ng/mL溶液(実施例5と同じ)と、さらにこれらを1重量%BSA含有リン酸緩衝液(0.1M, pH7.0)で希釈して調製した希釈液{各50、25、10又は5ng/mLのfPSA及びcPSA溶液}及び0ng/mL溶液{1重量%BSA含有リン酸緩衝液(0.1M, pH7.0)}を用いて、実施例8と同様にして検量線を作成した。

この検量線と、血清検体の濁度変化量とから、それぞれの濃度測定値を算出し、この結果を表6に示した。

一方、試薬キット(19){商品名:Eテスト「TOSH」II(PA)、東ソー株式会

50

社製}、及び専用装置{A I A 1 2 0 0、東ソー株式会社製}を用い、試薬キット(19)及び専用装置の取扱説明書に従って、上記血清を自動分析(定量)し、この結果を表6に示した。

また、試薬キット(4)による測定結果をy軸に、試薬キット(19)による測定結果をx軸に、それぞれの血清についてプロットした(図1)。

なお、本試薬(19)は体外診断薬として認可を受けており、等モル反応性が確認されている[Stamey, Urology : 45, 173-184(1995)]。また、専用装置は、この試薬キット(19)専用の測定装置である。

【0074】

【表6】

血清 No	試薬キット(4)	試薬キット(19)
	濃度測定値 (ng/mL)	
1	0.8	1.0
2	5.6	5.3
3	13.9	14.9
4	1.2	1.1
5	1.8	2.0
6	6.1	6.3
7	26.7	27.1
8	4.2	4.9
9	6.9	6.5
10	5.1	4.9
11	41.3	40.1
12	2.1	1.8
13	2.9	3.1
14	3.9	3.7
15	7.9	7.6
16	9.1	8.5
17	18.3	19.2
18	6.2	5.7
19	0.7	0.8
20	0.5	0.4

【0075】

試薬キット(4)による測定結果と、試薬キット(19)による測定結果とは、相関係数  $R = 0.997$  { 相関式  $y = 1.0205x + 0.0093$  } で良好な相関を示した。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】血清中のPSA濃度の相関を表すグラフである(実施例24)。

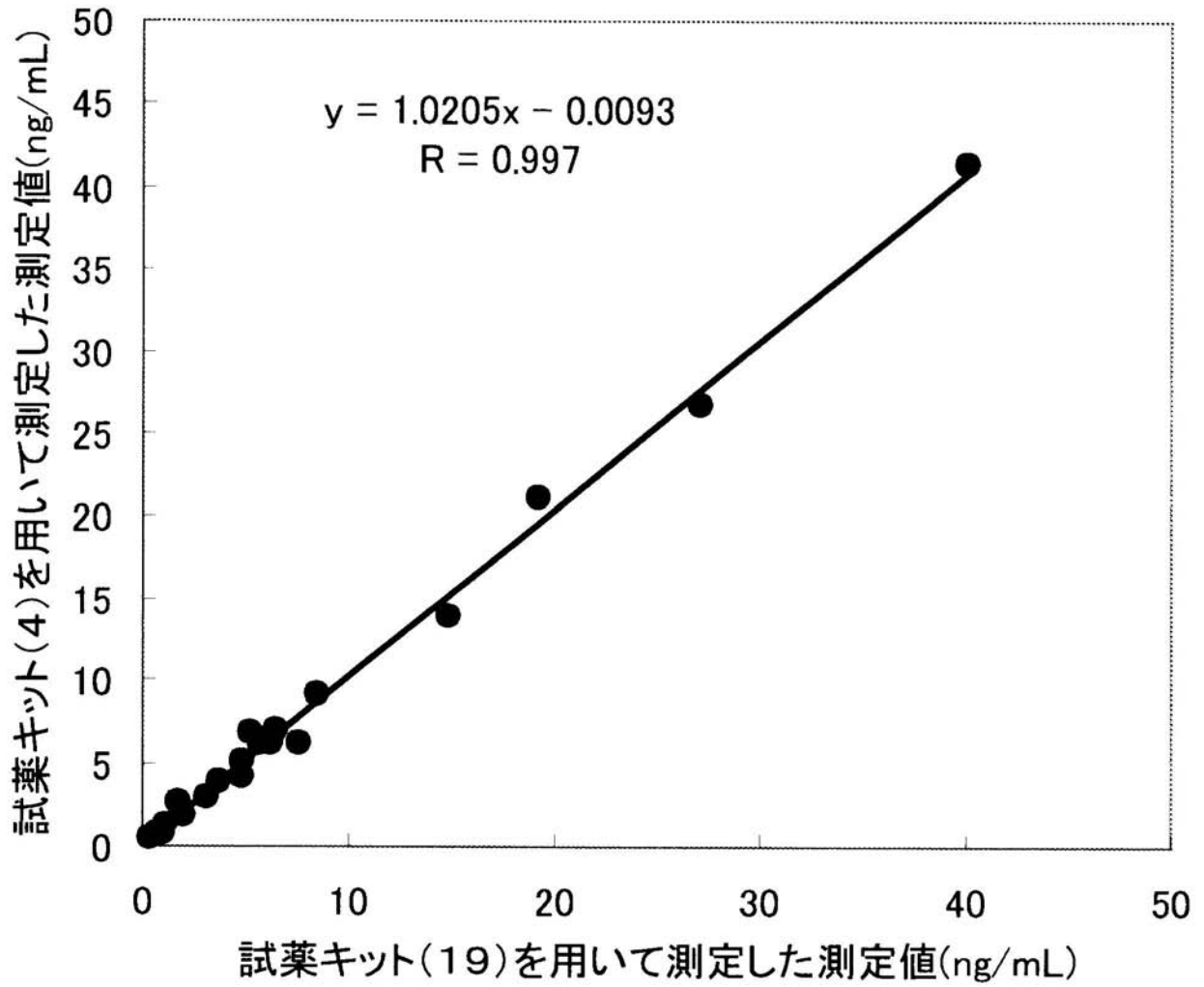
10

20

30

40

【 図 1 】



专利名称(译)	用于免疫测定的免疫测定和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007163319A</a>	公开(公告)日	2007-06-28
申请号	JP2005360785	申请日	2005-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	國近誠		
发明人	國近 誠		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/577.A G01N33/53.D		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：应用一种方法和试剂盒，该方法和试剂盒能够高度准确，轻松地定量测定样品中以游离形式和结合形式存在的物质。 解决方案：步骤（1）：使要测量物质以游离形式或结合形式存在的样品与胶乳1反应，在该胶乳上固定有针对要测量物质的单克隆抗体1，以获得反应物1和抗体1 然后，将固定有对被测定物质具有不同识别位点的单克隆抗体2的乳胶2固定，并进行免疫测定，其特征在于，包括使反应物1反应以获得反应物2的步骤（2）和样品。 用于定量以游离形式存在于介质中的被测物质和结合的物质的试剂盒，包括试剂盒（1），其中包含固定有针对被测物质的单克隆抗体1的胶乳1，抗体1和被测物质。 一种用于免疫测定的试剂盒，其特征在于，其含有固定有胶乳2的试剂（2），该胶乳2被固定有对物质具有不同识别位点的单克隆抗体2作为必需成分试剂。 [选图]图1

