

(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2008-170377

(P2008-170377A)

(43) 公開日 平成20年7月24日(2008.7.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	
GO 1 N 33/00 (2006.01)	GO 1 N 33/00 D	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 11 頁)		

(21) 出願番号 特願2007-5896 (P2007-5896)  
 (22) 出願日 平成19年1月15日 (2007.1.15)

(71) 出願人 000002174  
 積水化学工業株式会社  
 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
 (74) 代理人 100086586  
 弁理士 安富 康男  
 (74) 代理人 100119529  
 弁理士 諸田 勝保  
 (72) 発明者 岡 孝之  
 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学  
 工業株式会社内  
 (72) 発明者 齊木 秀和  
 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学  
 工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法及び免疫測定用キット

(57) 【要約】

【課題】 複数の測定対象物質の濃度の総和を高感度で検出時間が短く、かつ、簡便な操作で測定することが可能な免疫測定方法及び免疫測定用キットを提供する。

【解決手段】 複数の異なる測定対象物質と、前記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体を共通する標識物質で標識した複数の異なる標識抗体とを用い、前記標識物質量を測定することにより前記複数の測定対象物質の濃度の総和を測定する免疫測定方法。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

複数の異なる測定対象物質と、前記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体を共通する標識物質で標識した複数の異なる標識抗体とを用い、前記標識物質量を測定することにより前記複数の測定対象物質の濃度の総和を測定することを特徴とする免疫測定方法。

**【請求項 2】**

複数の異なる測定対象物質と、前記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体を共通する標識物質で標識した複数の異なる標識抗体とを混合して混合液を調製する工程と、

前記混合液を、捕捉物質が固定化された固定相上に展開させる工程と、

前記固定相上に固定された前記標識物質量を測定することにより前記複数の測定対象物質の濃度の総和を測定する工程を有する

ことを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定方法。

**【請求項 3】**

捕捉物質は、複数の異なる測定対象物質、又は、複数の測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体と結合する 1 種の化学物質であることを特徴とする請求項 2 記載の免疫測定方法。

**【請求項 4】**

複数の異なる測定対象物質は、それぞれ異性体であることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の免疫測定方法。

**【請求項 5】**

複数の異なる測定対象物質は、ダイオキシン類及び / 又は P C B 類であることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 記載の免疫測定方法。

**【請求項 6】**

免疫クロマト法を用いて分析を行うことを特徴とする請求項 1、2、3、4 又は 5 記載の免疫測定方法。

**【請求項 7】**

標識物質は、磁性粒子であることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載の免疫測定方法。

**【請求項 8】**

請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載の方法を実施するために用いることを特徴とする免疫測定用キット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、複数の測定対象物質の濃度の総和を高感度で検出時間が短く、かつ、簡便な操作で測定することが可能な免疫測定方法及び免疫測定用キットに関する。

**【背景技術】****【0002】**

近年、ダイオキシン類、P C B 類や、その他の環境汚染物質による汚染が深刻化し、人体及び生体への影響が懸念されている。これまでダイオキシン類等の環境汚染物質の検出方法としては、ガス・クロマトグラフ質量分析法 ( G C - M S 法 ) を中心とした分析法が用いられてきた。G C - M S 法は、公定分析法として用いられており、その感度、精度ともに非常に優れた方法であるが、特殊な装置を必要とするため、分析コストが高く、分析の手順自体も煩雑で、分析に長時間要する等の問題点があった。

**【0003】**

このような問題に対して、G C - M S 法よりも簡便な方法として、ダイオキシン類等の環境汚染物質に対する抗体を用いる E L I S A 法を用いた測定が一般的に行われている。

しかしながら、E L I S A 法は、定量性に優れ、高感度であるという特徴を有するものの

10

20

30

40

50

、通常、サンプルの検出に特殊な機器を必要とし、このような機器を必要としない場合であっても、検出するまでの時間が1時間以上かかるという欠点があった。

【0004】

従って、これらの欠点を補うため、高感度で検出時間が短く、操作が簡単な免疫クロマト法が近年注目されている。例えば、特許文献1には、競合反応を利用した免疫クロマト法が開示されている。

【0005】

このような免疫クロマト法では、例えば、ダイオキシン類やPCB類等のように、塩素化量の異なる異性体からなる混合物を測定対象物質とする場合、主に1種類の異性体に対してのみの測定が行われる。一方、環境の汚染度等の評価においては、ダイオキシン類やPCB類の各異性体個々の濃度ではなく、各異性体の濃度の総和が必要となるが、ダイオキシン類やPCB類の総濃度を一括して測定できなかった。従って、従来の免疫クロマト法を用いた場合、ダイオキシン類やPCB類の濃度が同じ試料を測定した場合であっても、異性体の分布が異なる場合は、違った分析結果になるという問題があった。

10

【0006】

これに対して、代表的な異性体に対する抗体を利用した免疫測定を、複数の異性体について別々に行い、それら個々の分析結果を足しあわせることで、各異性体の総量を求める方法が行われているが、一つの分析試料に対する分析回数が増加するため、分析作業が煩雑になり、また、複数の免疫測定試薬やキットを用いるため分析コストが増大する問題点があった。

20

従って、複数の測定対象物質の濃度の総和を高感度で検出時間が短く、かつ、簡便な操作で測定することが可能な免疫測定方法が必要とされていた。

【特許文献1】特開2004-138550号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、上記現状に鑑み、複数の測定対象物質の濃度の総和を高感度で検出時間が短く、かつ、簡便な操作で測定することが可能な免疫測定方法及び免疫測定用キット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】

30

【0008】

本発明は、複数の異なる測定対象物質と、前記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体を共通する標識物質で標識した複数の異なる標識抗体とを用い、前記標識物質量を測定することにより前記複数の測定対象物質の濃度の総和を測定する免疫測定方法ある。

以下に本発明を詳述する。

【0009】

本発明は、複数の測定対象物質の濃度の総和を一度に測定する免疫測定方法である。

本発明において、複数の異なる測定対象物質としては、特に限定されないが、測定対象物質のそれぞれが共通の特徴を有し、かつ、複数の測定対象物質の濃度の総和が測定結果として重要となるものであることが好ましく、具体的には例えば、上記複数の異なる測定対象物質がダイオキシン類である場合、PCB類である場合、アレルゲン特異的IgEである場合等が挙げられる。また、例えば、野菜など食品の禁止物質（農薬）やスポーツ選手のドーピング薬物等や、病態のスクリーニング的な検査として複数の病原体ウイルス等のように、検出対象物質が複数存在する場合が挙げられる。なかでも、ダイオキシン類やPCB類が好ましい。また、複数の異なる測定対象物質は、それぞれ異性体同士であることが好ましい。

40

【0010】

上記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体としては特に限定されず、測定対象物質に応じて適宜決定することができる。具体的には、測定対象物質がPCB類

50

の場合、低塩素化PCBに対する標識抗体、及び、中塩素化PCBに対する標識抗体を用いる。これにより、塩素化量の異なる異性体の分布によらず、広く検出できるようになる。

**【0011】**

上記標識物質としては、複数の抗体を各々標識することが可能な標識物質であれば、特に限定されず、例えば、色素含有ラテックス、金、銀、セレン等の金属コロイド、又は炭素コロイド等の色素粒子；ユーロピウム、フルオロセインイソシアネート、ジクロロトリアジニルフルオロセイン、又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質を含有する蛍光粒子、磁性粒子等が挙げられる。これらのなかでは、退色の影響がない磁性粒子が好ましい。

10

ただし、本発明において、上記標識物質は全て共通のものを用いる。

**【0012】**

上記磁性粒子としては、磁性を有するものであれば特に限定されず、例えば、磁性体を内包した有機粒子、磁性体をマイクロカプセル化した粒子、磁性体と金等を複合化した無機粒子等が挙げられる。

**【0013】**

上記磁性体としては特に限定されず、残留磁気がない超常磁性を有するものが好ましい。残留磁気を有すると自己凝集しやすくなり、例えば、免疫クロマト法に用いる場合、クロマト担体の孔を通過しにくくなり、クロマト展開性が劣るものとなることがある。

**【0014】**

上記超常磁性を有する磁性体としては特に限定されず、例えば、四三酸化鉄( $Fe_3O_4$ )、 $\gamma$ -重三二酸化鉄( $\gamma-Fe_2O_3$ )等の各種フェライト類；鉄、マンガン、コバルト等の金属又はこれらの合金等が挙げられる。なかでもフェライト類が好ましく、なかでも四三酸化鉄( $Fe_3O_4$ )が好ましい。

20

**【0015】**

上記磁性粒子は、平均粒子径の好ましい下限が50nm、好ましい上限が500nmである。50nm未満であると、媒体中に懸濁させたときの分散安定性が悪くなって自己凝集しやすくなることがあり、500nmを超えると、例えば、免疫クロマト法の場合、クロマト担体の孔を通過しにくくなり、クロマト展開性が劣ることがある。より好ましい下限は100nm、より好ましい上限は400nmである。

30

**【0016】**

上記磁性粒子は、粒子径のCV値が50%未満であることが好ましい。50%以上であると、粒子径の大きい粒子がクロマト担体の孔を通過しにくくなり、クロマト担体中に残存することがある。

**【0017】**

上記複数の異なる測定対象物質に特異的に結合する抗体と、標識物質とは物理結合等によって、結合又は吸着されていることが好ましい。具体的には例えば、静電結合、疎水結合又は配位結合等による結合等が挙げられる。

**【0018】**

本発明では、特に複数の異なる測定対象物質と、前記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体を共通する標識物質で標識した複数の異なる標識抗体とを混合して混合液を調製する工程と、前記混合液を、捕捉物質が固定化された固定相上に展開させる工程と、前記固定相上に固定された前記標識物質を測定することにより前記複数の測定対象物質の濃度の総和を測定する工程を有する方法を用いることが好ましい。

40

**【0019】**

上述の方法では、通常移動相として、複数の異なる測定対象物質と、前記複数の異なる測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体を共通する標識物質で標識した複数の異なる標識抗体とを含有する混合液等を用いるが、上記移動相の展開を補助するために展開液を用いてもよい。上記展開液としては、通常の免疫アッセイ法に使用されるような、少量の蛋白質、塩、界面活性剤等を含む緩衝液が望ましい。

50

## 【 0 0 2 0 】

上記捕捉物質としては、標識抗体を捕捉可能な物質又は標識抗体が結合した測定対象物質を捕捉可能な物質等を用いることができる。具体的には例えば、測定対象物質と疑似的な物質や、測定対象物質と特異的に結合する抗体等を用いることができる。なお、測定対象物質の種類によって、単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

なかでも、上記捕捉物質は、複数の異なる測定対象物質、又は、複数の測定対象物質の各々と特異的に結合する抗体と結合する1種の化学物質であることが好ましい。

## 【 0 0 2 1 】

上記捕捉物質は、各測定対象物質の量に応じて各標識抗体が検出部位に捕捉されるように、固定化する。例えば、測定試料が測定対象物質A、Bの2種を含有し、測定対象物質Aの試料中濃度がXである場合、Aと特異的に結合する標識抗体が検出部位に標識量xだけ捕捉されるように捕捉物質を固定化し、測定対象物質Bの試料中濃度がXの場合、Bと特異的に結合する標識抗体が標識量xだけ捕捉されるように捕捉物質を固定化する。この場合、A及びBの試料中濃度がX/2であれば、標識量はxとなる。つまり、AとBの試料中濃度の総和Xは、AとBの存在比(A = X : B = 0、A = X - Y : B = Y、A = 0 : B = X)に関わらず、標識量xとして測定される。

10

## 【 0 0 2 2 】

本発明の免疫測定法としては、特に限定されないが、なかでも、高感度で検出時間が短く、操作が簡単な免疫クロマト法が好適に用いられる。本発明の免疫測定方法を用いた免疫クロマト法による検査試薬の一例を図1に示す。図1は検査試薬の上面図であり、図2は横断面図である。

20

図1、2に示すように、検査試薬6は、試料導入部位1、吸収部位3、試験片4及び薄膜5からなり、細長い形状の薄膜5の上面に、試料導入部位1、吸収部位3及び試験片4の全部又は一部が接着している。また、検出部位2は、試験片4上の捕捉物質に固定化した部分である。

また、薄膜5の一端には、試料導入部位1の一端側が接着されており、試料導入部位1の他端側は、その全面が薄膜5に接着している試験片4の一端側の上面に被さった状態で試験片4と接触している。更に、薄膜5の他端側には、吸収部位3の一端側が接着されており、この吸収部位3の他端側は、試験片4の他端側の上面に被さった状態で試験片4と接触している。

30

## 【 0 0 2 3 】

本発明では、まず、複数の異なる測定対象物質と、上記測定対象物質に特異的に結合する標識抗体とを混合した後、得られた混合物(移動相)を試料導入部位1に接触させる。試料導入部位1中の移動相は、毛細管現象によって吸収部位3に向けて移動するが、その際に検出部位2を通過する。このとき、測定対象物質の量に応じて、検出部位2に標識抗体が補足される。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の免疫測定方法を用いて、測定対象物質がA、Bの2種類である測定試料について測定する場合を示す概略図を図3に示す。図3中、11は測定対象物質A(以下、単にAともいう)、11'はA疑似物質、12は測定対象物質B(以下、単にBともいう)、12'はB疑似物質、13は抗A抗体、14は抗B抗体、15は標識物質、16は抗A標識抗体、17は抗B標識抗体、2は検出部位を表す。なお、図3aは測定試料がAのみを含有する場合であり、図3bは測定試料がBのみを含有する場合であり、図3cはA、Bの濃度が同じで濃度の総和が図3a、図3bの場合のA、Bの濃度と同じである場合を示す。即ち、図3の何れの場合も測定対象物質の濃度の総和は同じである。

40

## 【 0 0 2 5 】

図3a~図3cでは、各測定対象物質の量に応じて各標識抗体が検出部位2に捕捉されるように固定化されている。

図3aでは、測定対象物質Aと抗A標識抗体6とが特異的に結合しており、これらを含む移動相を、捕捉物質としてA疑似物質11'、B疑似物質12'が捕捉物質として固定化

50

された検出部位 2 に展開すると、測定対象物質 A と結合していない抗 A 標識抗体 1 6 及び抗 B 標識抗体 1 7 が捕捉物質に捕捉され、捕捉されなかった測定対象物質 A と結合した抗 A 標識抗体 1 6 は排出される。この際、検出部位 2 の標識量を測定することにより、測定対象物質 A の濃度を求めることができる。

また、図 3 b では同様にして、測定対象物質 B の濃度を求めることができる。

#### 【 0 0 2 6 】

一方、図 3 c では、測定対象物質 A と抗 A 標識抗体 1 6、及び、測定対象物質 B と抗 B 標識抗体 1 7 が特異的に結合しており、これらを含む移動相を、捕捉物質として A 疑似物質 1 1'、B 疑似物質 1 2' が捕捉物質として固定化された検出部位 2 に展開すると、測定対象物質 A と結合していない抗 A 標識抗体 1 6、及び、測定対象物質 B と結合していない抗 B 標識抗体 1 7 が捕捉物質に捕捉され、捕捉されなかった測定対象物質 A と結合した抗 A 標識抗体 1 6、及び、測定対象物質 B と結合した抗 B 標識抗体 1 7 は排出される。この際、検出部位 2 の標識量を測定すると、図 3 a、図 3 b の場合と標識量が同じとなり、測定対象物質 A 及び測定対象物質 B の濃度の総和を求めることができる。

10

#### 【 0 0 2 7 】

なお、図 1 ~ 3 に示した検査試薬では、複数の異なる測定対象物質を含有する測定試料と、上記複数の異なる測定対象物質と特異的に結合する標識抗体とを予め接触させた後、試料導入部位 1 に接触させることにより測定を行うものであるが、測定試料を、直接特異的に結合する標識抗体を有する試料導入部位に接触させた後、測定を行う従来の免疫クロマト法の形態を用いてもよい。

20

#### 【 0 0 2 8 】

上記試料導入部位 1 は、移動相の展開速度や展開量等を制御することを目的として用いられるものであり、移動相を適度な速度で展開することができるものであれば特に限定されず、例えば、メンブランフィルターや、ニトロセルロース、ガラス濾紙等の多孔質体からなるもの等が挙げられる。

#### 【 0 0 2 9 】

本発明では、検出部位 2 に捕捉された標識抗体に由来する信号を測定することにより、測定試料中の測定対象物質の濃度を測定することができる。

標識抗体に由来する信号を測定する方法としては、用いる標識物質の種類に応じて、公知の分析手段を用いることができる。例えば、標識物質として色素体を用いる場合には、目視又は色計測機器により測定することができ、標識物質として放射性同位体を用いる場合には、放射線測定機器により測定することができ、標識物質として蛍光物質を用いる場合には、蛍光分析器により測定することができる。

30

また、標識物質として磁性粒子を用いる場合は、ホールセンサーや GMR センサ等の磁気センサや、磁気緩和測定を用いることにより、磁性量（磁性粒子量）を測定する。

#### 【 0 0 3 0 】

上記検出部位 2 の形状については、特に限定されず、例えば、帯状、ドット状等が挙げられる。

#### 【 0 0 3 1 】

上記吸水部位 3 は、過剰の試料を迅速に吸収することを目的として用いられるものであり、毛細管現象により、多孔質の担体を展開した測定試料液を吸収するものであれば特に限定されず、例えば、セルロースやコットン等の吸水性材料からなるものが挙げられる。

40

#### 【 0 0 3 2 】

上記試験片 4 としては、例えば、多孔質の担体に捕捉物質が固定化された固定層に、試料導入材料や吸収材料等が組み合わされもの等を用いることができる。

上記多孔質の担体としては、移動相を適度な速度で展開することができるものであれば特に限定されず、例えば、メンブランフィルターや、ニトロセルロース、ガラス濾紙等の多孔質体が挙げられる。本発明では移動相を展開した後に、磁性量を測定するため、非磁性材料からなる担体を用いることが好ましい。

#### 【 0 0 3 3 】

50

本発明の免疫測定方法を実施するために用いる免疫測定用キットもまた、本発明の1つである。このような免疫測定用キットを用いることで、複数の測定対象物質の濃度の総和を高感度で検出時間が短く、かつ、簡便な操作で測定することが可能となる。

【発明の効果】

【0034】

本発明によれば、例えば、ダイオキシン類やPCB類等のように、複数の異性体同士からなる一群の測定対象物を、個々に測定して総和を算出する等の煩雑な作業を行うことなく、一回の測定により、簡便かつ高精度に測定することが可能な免疫測定方法及び免疫測定用キットを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0036】

(実施例1)

(1-1) 試験片1の作製

PCB#28擬似物質(エンバイオテックス・ラボラトリーズ社製)をウシ血清アルブミン(BSA)と結合させた化合物A及びPCB#118擬似物質(エンバイオテックス・ラボラトリーズ社製)をウシ血清アルブミン(BSA)と結合させた化合物Bを作製した。

ニトロセルロースメンブレン(SRHF P70、日本ミリポア社製)を幅20cm×長さ6cmに裁断し、長さ方向の上端より2cmの部位(反応部位)に、化合物Aを1.0mg/mL及び化合物Bを0.5mg/mLの濃度となるようにトリス塩酸緩衝液(10mmol/L、pH7.4)に溶解した溶液を幅0.7mmの直線状に塗布した。その後、室温で一晩乾燥した。

【0037】

次いで、化合物A及び化合物Bを固定化したメンブレンの長さ方向上端に幅5mm×長さ20mmの吸水パッド(AP22、日本ミリポア社製)を、下端に幅5mm×長さ20mmのコンジュゲートパッド(グラスファイバー、日本ミリポア社製)を重ね、透明なテープで固定した後、幅5mmに裁断し、試験片1とした。

【0038】

(1-2) 試験片2の作製

試験片1の作製で用いた化合物Aを1.0mg/mLの濃度となるようにトリス塩酸緩衝液(10mmol/L、pH7.4)に溶解した溶液を、試験片1と同様の材料、方法で塗布した。その後、室温で一晩乾燥した。次いで、試験片1と同様の材料、方法を用いることにより、試験片2とした。

【0039】

(2) 磁性粒子標識抗PCB#28抗体の作製

磁性体含有粒子(ポリスチレン系、磁性体量60%、平均粒子径0.3μm、積水化学工業社製)10mgに、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)10mLを加え、15000RPMにて20分間遠心分離を行った。得られた沈渣に、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に抗PCB#28モノクローナル抗体(エンバイオテックス・ラボラトリーズ社製)を0.5mg/mLの濃度になるように溶解した溶液を2mL加え、十分に混和して、室温にて1時間攪拌した。

【0040】

その後、未反応の抗PCB#28モノクローナル抗体を除去するため、15000RPMにて20分間遠心分離を行い、沈渣を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)3mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。その沈渣を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミンを1%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液3mLに懸濁させ、室温で1時間攪拌し、ブロッキング処理を行った。その後、15000RPMにて20分間遠心

10

20

30

40

50

分離を行い、沈渣を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミンを1%(w/v)の濃度になるように溶解し、更にアジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液2mLに懸濁させて磁性粒子標識抗PCB#28モノクローナル抗体の懸濁液を調製し、使用までこれを冷蔵保存した。

【0041】

(3) 磁性粒子標識抗PCB#118抗体の作製

抗PCB#118モノクローナル抗体(エンバイオテックス・ラボラトリーズ社製)を用いて、0.3mg/mLの濃度になるように溶解した溶液を2mL加えたこと以外は、(2)磁性粒子標識抗PCB#28抗体の作製と同様の操作を行い、磁性粒子標識抗PCB#118モノクローナル抗体の懸濁液を調製した。

10

【0042】

(4) 試験液の調製

試験液として、カネクロールKC-300、KC-400、KC-500(クロマトサイエンス社製)を用い、表1に示す濃度のジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を調整した。

【0043】

【表1】

	KC300 (ppm)	KC400 (ppm)	KC500 (ppm)	PCB総量 (ppm)
試験液1	1	0	0	1
試験液2	0	1	0	1
試験液3	0	0	1	1
試験液4	0.5	0	0.5	1
試験液5	4	0	1	5
試験液6	2	0	3	5
試験液7	2	1	2	5

20

【0044】

(5) 評価1

磁性粒子標識抗PCB#28モノクローナル抗体の懸濁液200μL及び磁性粒子標識抗PCB#118モノクローナル抗体の懸濁液100μLを混合した試験液に、調製した各試験液20μLを混合した後、試験片1のコンジュゲートパッド部位にキャピラリーを用いて100μL滴下した。滴下20分後、試験片1の検出部位の磁性量を、市販のGMRセンサ(差動磁界センサ、NVE社製)を用いて測定した。測定結果を表2に示した。

30

【0045】

【表2】

試験液	PCB総量 (ppm)	磁性量 (mV)
試験液1	1	245
試験液2	1	251
試験液3	1	242
試験液4	1	247
試験液5	5	162
試験液6	5	167
試験液7	5	163

40

【0046】

(6) 評価2

50

磁性粒子標識抗PCB#28モノクローナル抗体の懸濁液100 $\mu$ L及び磁性粒子標識抗PCB#118モノクローナル抗体の懸濁液100 $\mu$ Lを混合した試薬液に、調製した各試験液20 $\mu$ Lを混合した後、試験片2のコンジュゲートパッド部位にキャピラリーを用いて100 $\mu$ L滴下した。滴下20分後、試験片2の検出部位の磁性量を、市販のGMRセンサ(差動磁界センサ、NVE社製)を用いて測定した。測定結果を表3に示した。

【0047】

【表3】

試験液	PCB総量 (ppm)	磁性量 (mV)
試験液1	1	144
試験液2	1	148
試験液3	1	141
試験液4	1	146
試験液5	5	79
試験液6	5	82
試験液7	5	77

10

【0048】

表2、3に示すように、PCB濃度が1ppmである試験液1~4は、カネクロールの種類(異性体の存在比)に関わらず、同等の標識量(磁性量)となることが確認された。また、PCB濃度が更に高い5ppmの試験液5~7については、カネクロールの種類(異性体の存在比)に関わらず、試験液1~4よりも磁性量が低く、かつ、同等の標識量(磁性量)となることが確認された。

20

即ち、PCB濃度にかかわらず、何れの試験液もPCB総量に応じた磁性量を示す結果が得られた。これにより、実施例1の方法では、予め検量線を作成することにより、検出部位の磁性量でPCBの総和を測定可能であることがわかる。

【0049】

(実施例2)

(1)磁性粒子標識抗体の作製

30

磁性体含有粒子(ポリスチレン系、磁性体量60%、平均粒子径0.3 $\mu$ m、積水化学工業社製)10mgに、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)10mLを加え、15000RPMにて20分間遠心分離を行った。得られた沈渣に、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に抗-hCG抗体(コスモバイオ社より購入)が0.8mg/mL、及び、抗-LH抗体(コスモバイオ社より購入)が1.1mg/mLの濃度になるように溶解した溶液を2mL加え、十分に混和して、室温にて1時間攪拌した。

その後、未反応の抗体を除去するため、15000RPMにて20分間遠心分離を行い、沈渣を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)3mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。その沈渣を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミンを1%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液3mLに懸濁させ、室温で1時間攪拌し、ブロッキング処理を行った。その後、15000RPMにて20分間遠心分離を行い、沈渣を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミンを1%(w/v)の濃度になるように溶解し、更にアジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液2mLに懸濁させて磁性粒子標識抗体の懸濁液を調製し、使用までこれを冷蔵保存した。

40

【0050】

(2)試験片3の作製

コンジュゲートパッド(グラスファイバー、日本ミリポア社製)を幅5mm $\times$ 長さ20mmに裁断し、(1)で作製した磁性粒子標識抗体懸濁液に、ショ糖が2%(w/v)の濃度になるように調整した20mMリン酸緩衝液(pH7.5)を等量混合した懸濁液を磁性粒子量が100 $\mu$ gになるように塗布し、デシケーターで一晩乾燥した。

50

ニトロセルロースメンブレン（SRHF P70、日本ミリポア社製）を幅6mm×長さ20mmに裁断し、長さ方向の上端より2cmの部位（反応部位）に、抗-hCB抗体を1.0mg/mLの濃度となるように、ショ糖が2%（w/v）の濃度になるように添加したトリス塩酸緩衝液（10mmol/L、pH7.4）に溶解した溶液を幅0.7mmの直線状に塗布した。その後、室温で一晩乾燥した。

次いで、抗-hCB抗体を固定化したメンブレンの長さ方向上端に幅5mm×長さ20mmの吸水パッド（AP22、日本ミリポア社製）を、下端に磁性粒子標識抗体を固定化したコンジュゲートパッド、更にその下端に、幅5mm×長さ15mmに裁断しサンプルパッド（グラスファイバー、日本ミリポア社製）を重ね、透明なテープで固定した後、幅5mmに裁断し、試験片3とした。

【0051】

（3）評価

測定試料として、牛血清アルブミン1%（w/v）、及び、hCG又はLHが、各々、濃度0mIU/mL、50mIU/mL、100mIU/mLになるように生理食塩水に溶解した試験液を調製し、各試験液を試験片3のサンプルパッド部位にキャピラリーを用いて75μL滴下した。

滴下20分後、試験片3の検出部位の磁性量を、市販のGMRセンサ（差動磁界センサ、NVE社製）を用いて測定した。測定結果を表4に示した。

【0052】

【表4】

試験液	hCG (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	磁性量 (mV)
試験液1	0	0	20
試験液2	50	0	370
試験液3	100	0	750
試験液4	0	50	390
試験液5	0	100	770

【0053】

表4に示すように、hCG又はLHが同程度の場合、同等の標識量（磁性量）となることが確認された。また、ホルモンの量に応じて標識量（磁性量）が高くなることが確認された。即ち、ホルモンの種類にかかわらず、何れの試験液もホルモンの量に応じた磁性量を示す結果が得られた。これにより、実施例2の方法では、予め検量線を作成することにより、検出部位の磁性量でホルモンの総量を測定可能であることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明によれば、複数の測定対象物質の濃度の総和を高感度で検出時間が短く、かつ、簡便な操作で測定することが可能な免疫測定方法及び免疫測定用キットを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】本発明を用いた検査試薬の一実施態様を示した図（上面図）である。

【図2】本発明を用いた検査試薬の一実施態様を示した図（横断面図）である。

【図3】本発明を用いて、測定対象物質が2種類の測定試料を測定した場合を示す概略図である。

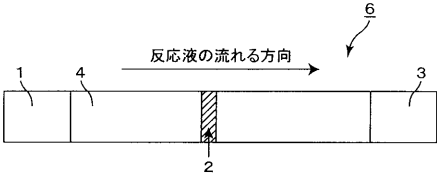
10

20

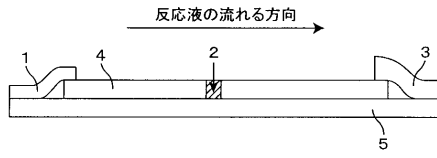
30

40

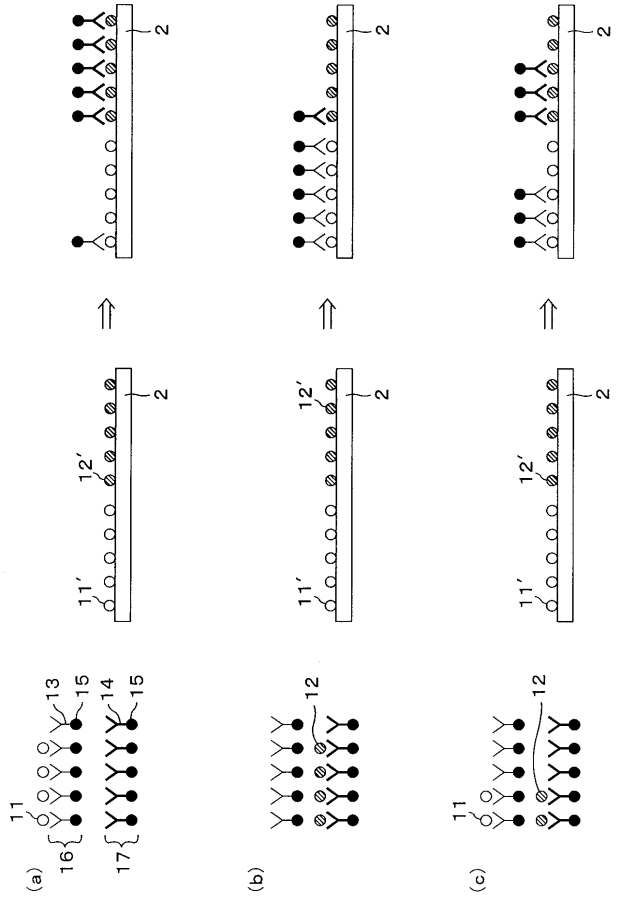
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



专利名称(译)	免疫测定法和免疫测定试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008170377A</a>	公开(公告)日	2008-07-24
申请号	JP2007005896	申请日	2007-01-15
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	岡孝之 齊木秀和		
发明人	岡 孝之 齊木 秀和		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/00 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/00.D G01N33/53.S G01N33/543.521 G01N33/543.541.A		
代理人(译)	诸田 胜保		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供免疫测定和免疫测定试剂盒，能够通过简单的操作在短时间内高灵敏度地测量多种测量目标物质的总浓度。解决方案：在该免疫测定中，通过使用多种测量目标物质测量标记物质量，并使用通过标记与多个特异性结合的抗体标记提供的多种不同标记抗体来测量多种测量目标物质的总浓度。各种测量目标物质与普通标记物质的比较。

之

	KC300 (ppm)	KC400 (ppm)	KC500 (ppm)	PCB總量 (ppm)
試験液1	1	0	0	1
試験液2	0	1	0	1
試験液3	0	0	1	1
試験液4	0.5	0	0.5	1
試験液5	4	0	1	5
試験液6	2	0	3	5
試験液7	2	1	2	5