

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4271086号
(P4271086)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 4 5 S	
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	E	
GO 1 N 27/416	(2006.01)	GO 1 N	27/46	3 3 6 Z	
GO 1 N 33/544	(2006.01)	GO 1 N	33/544	B	

請求項の数 4 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2004-170056 (P2004-170056)	(73) 特許権者	000003078
(22) 出願日	平成16年6月8日(2004.6.8)		株式会社東芝
(65) 公開番号	特開2005-351662 (P2005-351662A)		東京都港区芝浦一丁目1番1号
(43) 公開日	平成17年12月22日(2005.12.22)	(74) 代理人	100058479
審査請求日	平成17年9月7日(2005.9.7)		弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100084618
			弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100092196
			弁理士 橋本 良郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫分析方法であって、

(1) 標的物質に対する抗体、標的物質と特異的に結合し得る結合物質およびこれら的一部から成る群から選択される物質が表面に固定化された磁気微粒子に対して、当該標的物質を結合させる工程と、

(2) 前記標的物質に対する抗体、前記標的物質と特異的に結合し得る結合物質およびこれら的一部から成る群から選択される物質が表面に固定化され、且つ電気化学的活性物質を発生し得る酸化還元酵素を内包したマイクロカプセルの形態の免疫分析担体を、(1)の前記標的物質に結合させる工程と、

(3) 当該磁気微粒子を、磁石への結合を利用して分離する工程と、

(4) (3) で得られた物質を含む溶液に前記酵素の基質を添加する工程と、

(5) 該免疫分析担体を、浸透圧ショック、超音波刺激、および pH 変化による刺激から成る群から選択される何れか 1 つの手段によって破壊し、前記酸化還元酵素と酵素の基質を反応させる工程と、

(6) 前記酸化還元酵素と基質の反応を電気化学的に測定する工程と、を含むことを特徴とする免疫分析方法。

【請求項 2】

前記免疫分析担体の破壊が、純水の添加による浸透圧ショックによって行われる、請求項 1 に記載の免疫分析方法。

【請求項3】

前記免疫分析担体の破壊が、超音波刺激によって行われる、請求項1に記載の免疫分析方法。

【請求項4】

前記免疫分析担体の破壊が、pH5のBBSの添加によるpH変化によって行われる、請求項1に記載の免疫分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫分析用担体およびそれを用いる免疫分析方法に関する。より詳細には、試料中に存在する特定の物質を特異的に検出・定量または定性するために使用する免疫分析試薬およびそれを用いる免疫分析方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

試料中に存在する微量の抗原または抗体などの標的物質の定量分析には、一般的にラジオイムノアッセイ法（以下、RIAと記す）が用いられる。しかし、RIAでは、放射性元素を用いるため、専用の機器を設置し、資格を有するオペレータが操作を行わなければならない、しかも廃棄物の処理等にも注意を要するという問題がある。また、その他の分析方法として、たとえば免疫電気泳動法が知られている。しかし、免疫電気泳動法では測定に長時間を要するうえ、感度が低く、標的物質がごく微量しか含まれていない場合には適用することができないという問題がある。

20

【0003】

そこで、本発明者らは、先に特許文献1において、リポソーム（脂質膜からなるマイクロカプセル）の内部に親水性の標識物質を封入し、その表面に共有結合を介して親水性の抗体または抗原を固定化した免疫分析試薬を開示した。この試薬を用いた免疫分析方法は以下のようなものである。すなわち、抗原または抗体が存在する試料中にこの免疫分析試薬を加える。次いでこれとは別に補体を加えると、抗原-抗体反応およびそれに伴う補体の作用によってリポソームが破壊され、封入されていた標識物質（たとえば蛍光性化合物）が流出する。この流出した標識物質の量と、試料中の標的物質の量との間には相関関係があるので、流出した標識物質を所定の分析方法（たとえば、蛍光分析）によって定量することにより、標的物質を定量することができる。この試薬を用いれば、RIAのような問題が生じることはなく、免疫分析の簡便化が期待できる。

30

【0004】

しかし、この免疫分析試薬を用いて血清やタンパク質を含有する試料の分析を行った場合、抗原-抗体反応以外に非特異反応が起こり、これに起因してリポソームが破壊されることが分かってきた。これは、試料中のタンパク質や微量化学物質と補体およびリポソームとの反応によると考えられる。このため、従来は血清やタンパク質を含有する試料を適当に希釈して分析を行っていた。

【0005】

たとえば、リポソームに抗-ヒト-フェトプロテイン抗体（以下、抗-ヒトAFP抗体と記す）を固定化した免疫分析試薬を用いてヒト血清中のAFPを分析する場合、非特異反応の影響を除去するためにヒト血清を100倍希釈していた。ところが、正常人の血清中のAFP濃度は10 ng/mL以下である。したがって、正常人の血清を100倍希釈すると、0.1 ng/mL以下の濃度のAFPをたとえば蛍光分析で測定しなければならない、超高感度な分析を要求されていた。また、精密な蛍光分析を行うためには、大型の蛍光検出装置が必要であり、分析装置全体が大型で高価なものになるという問題があった。

40

【特許文献1】特開昭60-117159号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

本発明は前記問題点を解決するためになされたものであり、精密かつ簡便な分析が行える免疫分析試薬およびそれを用いる免疫分析方法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】

【0007】

本発明は、免疫分析用担体であって、免疫分析用担体は、標的物質に対する抗体もしくは標的物質と特異的に結合し得る物質、またはこれらの一部がその表面に固定化されていることと、免疫分析用担体は、電気化学的活性物質を発生し得る酸化還元酵素が封入されていることを特徴とする免疫分析用担体を提供する。

【0008】

また、本発明は、免疫分析用担体であって、前記免疫分析用担体は、電気化学的活性物質を発生し得る酸化還元酵素を内包したマイクロカプセルの形態であることを特徴とする免疫分析用担体を提供する。

【0009】

さらに、本発明は、免疫分析のためのキットであって、上記免疫分析用担体と、標的物質に対する抗体もしくは標的物質と特異的に結合し得る結合物質、またはこれらの一部をその表面に固定化した分離用粒子とを含むことを特徴とするキットを提供する。

【0010】

さらに、本発明は、上記キットに加えて、酵素の基質をさらに含むことを特徴とするキットを提供する。

【0011】

また、本発明は、免疫分析方法であって、上記分離用粒子と標的物質溶液を混合して、該分離用粒子に固定された抗体または結合物質と該標的物質とを結合させる工程と、分離用粒子と標的物質溶液を分離する工程と、混合液に前記酵素の基質を添加する工程と、酸化還元酵素が前記免疫分析担体に内包されている場合には、該免疫分析担体を破壊することによって酸化還元酵素と酵素の基質を反応させる工程と、および酸化還元酵素と基質の反応を測定する工程とを含むことを特徴とする免疫分析方法を提供する。

【0012】

さらに、本発明は、上記方法において酵素と基質の反応の測定が、電気化学的に測定されることを特徴とする方法を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明の免疫分析用担体および免疫分析方法により、安価でコンパクトでありながら高感度な免疫分析が達成される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の一つの態様において、免疫分析用担体は、いずれの材料からなるものであってもよいが、たとえば脂質分子でできた担体（リポソーム試薬）を適用することができる。好ましくは、本発明の免疫分析用担体は、マイクロカプセルの形態である。この場合、脂質組成物の主要構成成分としては、リン脂質および糖脂質のうち少なくともいずれか一方を使用することができる。また、必要に応じて、コレステロールなどの他の脂質を膜の安定化のために共存させることもある。本発明に使用することができるリン脂質および糖脂質は、特に限定されるものではなく、たとえばジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（DPE）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミンなどが挙げられる。これらのリン脂質および糖脂質の脂肪酸炭素鎖は、炭素原子数が12~18であることが好ましく、偶数であることがより好ましい。これらの脂質は、たとえば市販のリポソーム試薬を使用してもよい。また、測定物質、測定感度、およびリポソーム試薬の安定性などによって、最適な種類および組成比の脂質を適宜選択して予め決定しておくことが好ましい。このようリポソーム試薬をマイクロカプセルの材料とすることにより、浸透圧ショックや超音波刺激

10

20

30

40

50

などで簡単に破壊することができ、内部に封入されている酵素分子を漏出させることが可能である。

【0015】

その他、本発明に用いられる免疫分析用担体は、マイクロカプセルの形態として、一般的なミセル構造を持つ高分子化合物を使用することもできる。この場合、pH変化などの化学的刺激によりマイクロカプセルを破壊することができる。

【0016】

さらに、本発明に用いられる免疫分析用担体は、多孔性担体を適用することもできる。このような多孔質担体としては、たとえばセファロースCL(アマシャム社製)が挙げられる。このような多孔質担体を使用する場合、多孔質担体の表面に直接酵素を担持させることができる。

10

【0017】

また、本発明の免疫分析用担体は、標的物質に対する抗体もしくは標的物質と特異的に結合し得る物質、またはこれらの一部(以下、標的物質に対する抗体等)がその表面に固定化されている。本発明の免疫分析用担体において、その膜上に固定化される標的物質に対する抗体または特異的に標的物質と結合し得る物質(受容体など)は、IgG、IgE、IgD、IgA、およびIgMなどを始めとする標的物質と結合可能な任意のタンパク質またはその他の有機化合物であってもよい。

【0018】

免疫分析用担体に抗体を固定化する場合には、感度の向上という点からポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体を使用することが好ましい。また、場合によっては、抗体のFc部分を、ペプシンなどのタンパク質分解酵素で除去して得たF(ab')₂抗体、または更にF(ab')₂を還元して得たFab'であってもよい。

20

【0019】

以下、マイクロカプセルの形態の免疫分析用担体の材料として、リポソーム試薬を用いる場合を例に、本発明の免疫分析用担体およびその製造方法をより詳細に説明する。

【0020】

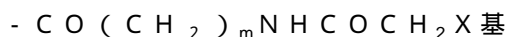
本発明の免疫分析用担体は、標的物質に対する抗体もしくは標的物質と特異的に結合し得る物質、またはこれらの一部がその表面に固定化されている。標的物質は、特に制限は無く、本発明の免疫分析用担体を使用して、一般的なタンパク質および核酸などの高分子化合物、麻薬などの薬物、並びに火薬などの低分子有機化合物を標的物質として検出することができる。ただし、本免疫分析方法は、いわゆるサンドイッチアッセイで標的物質を検出するため、標的物質は抗原決定基を二つ以上有する物質である必要がある。

30

【0021】

標的物質に対する抗体等(たとえば、抗体)を免疫分析用担体材料に固定化するためには、たとえばハロゲン化アセチル基などの官能基を利用することができる。この場合は、まず、リン脂質および糖脂質に以下の基を導入する。

【0022】



[ここで、mは脂質分子と官能基部分を結合させるスペーサを意味し、m=0~12の内で最適な長さを選択する必要がある。また、XはCl、BrまたはIの各元素を示し、場合により適宜選択される]。

40

【0023】

このようなスペーサを導入するのは、標的物質および標的物質と特異的に結合し得る物質との反応において、固定化担体から受ける立体障害を軽減させるためである。以下のような反応を利用して、官能基を導入することができる。

【0024】

すなわち、上記のようなスペーサを有する官能基付き脂質(m=0)の場合には、3-アミノプロピオン酸(NH₂(CH₂)₂COOH)または5-アミノ吉草酸(NH₂(CH₂)₄COOH)などのα-アミノ酸のアミノ基側を保護した後、これをN-ヒドロキシサクシニイ

50

ミド(HSI)およびN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCD)とともにトリエチルアミン(TEA)の存在下でアミノ基含有脂質(たとえば、DPPE)と反応させる。その後に塩酸などによって保護基を除去する。なお、3-アミノプロピオン酸または5-アミノ吉草酸などの α -アミノ酸のアミノ基側を保護した後、これとHSIおよびDCCDとをTEA存在下で反応させてサクシンイミドエステルを合成し、このサクシンイミドエステルをアミノ基含有脂質と反応させた後に、保護基を除去してもよい。

【0025】

次に、ハロゲン化酢酸をHSIおよびDCCDと共にTEAの存在下で前記スパーサ付脂質と反応させる。また、予め3-アミノプロピオン酸または5-アミノ吉草酸などの α -アミノ酸のカルボキシル基をエステル化して保護し、ハロゲン化酢酸を結合させた後、脱保護して、これをアミノ基含有脂質とHSI・DCCDおよびTEAの存在下で反応させてもよい。このようにして合成される脂質の精製には、分取用薄層クロマトグラフィを用いると簡便である。

【0026】

次いで、リポソーム試薬の作製方法を説明する。上述のようにして得られた、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCH}_2\text{X}$ 基を有するリン脂質や糖脂質および脂肪族アミン、必要に応じてコレステロールや他の脂質をフラスコに入れ、溶媒を加えて溶解・混合させた後、溶媒を吸引除去して乾燥させる。この結果、フラスコ壁面に均一な脂質薄膜が形成される。

【0027】

続いて、フラスコ内に適当な濃度の酸化還元酵素水溶液を添加して、適当な温度まで加温した後に密栓して激しく浸漬することにより、多重層リポソームの懸濁液を調製することができる。封入する酸化還元酵素は、当業者に既知のいずれの酸化還元酵素をすることもでき、たとえばグルコースオキシダーゼを使用することができる。なお、多重層リポソームの懸濁液を更に超音波処理することによって小さな1枚膜リポソームを調製して使用すると、更に反応増幅効果が増大する。このときに封入される酸化還元酵素の数は、それぞれの分子量やリポソームの粒径・調製法などに依存するが、1個のリポソーム当り、およそ100~100,000個になる。また、封入される酸化還元酵素は、分子量1万以上の高分子化合物であり、基質との反応により電気化学的活性物質を発生させ得る酸化還元酵素以外の酵素を用いてもよい。

【0028】

一方、標的物質に対する抗体等に対しては、ペプシンなどによる酵素処理もしくは還元処理を施して遊離のSH基を付与するか、またはSPDP(ファルマシア社製)などの二官能性試薬と反応させた後に還元してSH基を導入しておく。更に、前記リポソーム懸濁液と標的物質に対する抗体等を適当な緩衝液中で穏やかに反応させることにより、リポソームに $-\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCH}_2-$ 結合(ただしmは2または4など)を介して標的物質に対する抗体等を固定化させることができる。

【0029】

なお、以下に説明するように、本発明の免疫分析用担体は、分離用粒子と共に使用されるが、この分離用粒子として磁気微粒子などが適用可能であり、その表面には標的物質に対する抗体等が固定化されている。たとえば、固定化は、上記免疫分析用担体と同様に共有結合やアビジン-ビオチン反応などを使用して行うことができる。

【0030】

以上のような本発明の免疫分析試薬は、以下のように使用することができる。ここでは、表面に抗体を固定化した免疫分析用担体および分離用粒子を用いて、抗原(標的物質)を測定する場合を考える。上述のように、分離用粒子は、標的物質に対する抗体等を予め固定化された粒子である(図1:符号1を参照されたい)。固定化される、標的物質に対する抗体等は、本発明の免疫分析用担体に結合された標的物質に対する抗体等とは異なる抗原決定基を有することが好ましい。また、ここでは分離用粒子として磁気微粒子を使用する場合を例に説明するが、標的物質と結合し、かつB/F分離が可能な粒子であればいかなる粒子を使用することもできる。

10

20

30

40

50

【0031】

まず、一定温度で標的物質を含有する試料に分離用磁気粒子を加えて一定時間反応させる。次いで、標的物質に対する抗体を固定化した免疫分析用担体を適当量添加して、標的物質と結合させる。次いで、分離用粒子-標的物質-免疫分析用担体からなる複合体を、溶液から分離する。たとえば、分離用磁気粒子と磁石の結合を利用して、分離用磁気粒子-標的物質-免疫分析用担体の複合体を回収することができる。これを十分に洗浄液で洗浄して未反応の免疫分析用担体(リポソーム試薬)を洗い流す。次いで、免疫分析用担体が、マイクロカプセルの形態で酸化還元酵素が内包されている場合には、マイクロカプセルを破壊する。たとえば、適当量の純水を添加することによっては解することができる。更に、破壊によって漏出してくる酸化還元酵素に対する基質を添加する(図1中段)。一方、免疫分析用担体が、その表面に酸化還元酵素が担持された形態の場合には、破壊工程は不要であり、単に基質を添加するだけよい。基質には、免疫分析用担体に封入され、または担持された酸化還元酵素の基質を使用するが、たとえば酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼを使用した場合、グルコース(PBS溶液)を使用すればよい。また、基質の濃度は、封入した酸化還元酵素により適切な濃度となるように添加すればよく、たとえばグルコースオキシダーゼを使用した場合、1%のグルコースに添加すればよい。

10

【0032】

最後に、酸化還元酵素と基質の反応を検出する。たとえば、作用電極を反応液に挿入することにより、酸化還元反応に伴う電気化学反応を検出することができる(図1下段)。たとえば、以下の実施例に記載したように相対電流値を算出することによって、電気化学反応を検出することができる。

20

【0033】

実際の定量分析においては、予め既知濃度の標的物質を用いて検量線を作成しておき、同一条件で未知濃度の標的物質を含む試料との反応により得られた電気信号量を測定し、検量線に基づいて標的物質の濃度を定量することができる。また、本発明の免疫分析用担体を使用することにより、十分な時間(標的物質の種類や免疫分析試薬の特性によって異なるので、予め適当な時間を設定しておくことが必要である)、標的物質と免疫分析用担体を混合した後に、電気信号量を計るだけで標的物質の存在を超高感度で定性的に知ることが可能である。

【0034】

本発明の免疫分析用担体(マイクロカプセル化されたりリポソーム試薬など)と標的物質を含む試料との反応に要する時間および温度などの条件は、標的物質の種類、マイクロカプセルの特性、酵素分子の種類、更には免疫分析用担体に化学結合された標的物質と特異的に結合し得る物質もしくはそれらの一部の種類、量、純度などによって異なる。このため、個々の場合に応じて、前述した検量線の作成の際に、特定の濃度に調製された標的物質を含む試料を用いて予備測定を行い、最適反応時間および温度を設定することが望ましい。

30

【0035】

本発明の免疫分析用担体によって定量が可能な標的物質としては、血清を始めとする体液中の腫瘍マーカー(AFP、BFP、CEA、POAなど)や免疫グロブリン(IgG、IgE、IgD、IgMなどの抗体)を始めとするタンパク質、ホルモン(インシュリン、T₃など)、および麻薬を含む薬物や火薬のような低分子化合物などが挙げられ、その対象は広範囲にわたる。

40

【0036】

また、本発明の免疫分析用担体は、標的物質を検出するために必要な材料と共に、たとえば分離用粒子、酵素の基質、および/またはその他の適切な試薬等と共にキットの形態で提供することもできる。

【実施例】

【0037】

本発明の1つの態様に係る免疫分析用担体としてリポソーム試薬を使用してAFP(- フ

50

エトプロテイン；肝癌の腫瘍マーカー）を測定する系を例として実験を行った。図1は、本分析系を模式的に示した図である。本実施例に用いた試薬のうちジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（DPE）、およびコレステロールは、シグマ社製のものを用いた。その他の試薬は、市販品（特級）を精製せずに使用した。なお、水は全てイオン交換水を用いた。

【0038】

実施例1：ヒトIgG固定化リポソーム[スペーサー付き(m=4)官能基脂質およびステアリルアミン含有]の調製

1. NH₂-C₅-DPPEの合成

(a) Boc-5-アミノ吉草酸の合成

5-アミノ吉草酸(Aldrich社製)1.17 g[10ミリモル]にトリエチルアミン(TEA)3 mL[約20ミリモル]および水10 mLを加えて溶解した。これにアミノ基の保護基となるBoc-ON(ペプチド研究所製)2.7 g[11ミリモル]をジオキサン10 mLに溶解した溶液を添加し、室温で3時間攪拌した。反応後、反応液をロータリーエバポレータで濃縮し、酢酸エチル、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、5%クエン酸水溶液の順で抽出・精製した。最後に、無水硫酸ナトリウムで脱水し、低温で結晶化させてBoc-5-アミノ吉草酸を得た。収率は約70%であった。

【0039】

(b) Boc-5-アミノ吉草酸サクシンイミドエステルの合成

前記Boc-5-アミノ吉草酸0.23 g[1ミリモル]をクロロホルム20 mLに溶解し、N-ヒドロキシサクシンイミド(HSI;ペプチド研究所製)0.13 g[1.1ミリモル]およびジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCD;ペプチド研究所製)0.25 g[1.2ミリモル]を添加した後、室温で3時間攪拌した。反応後、ロータリーエバポレータで溶媒を除去し、生成物に酢酸エチル30 mLを加えて溶解し、濾過して沈殿物を除去した。再び溶媒を除去し、生成物をクロロホルム5 mLに溶解し、Boc-5-アミノ吉草酸サクシンイミドエステル溶液[約0.2ミリモル/mLと仮定]として以下の反応に使用した。

【0040】

(c)NH₂-C₅-DPPEの合成

DPPE 70 mg[100マイクロモル]をクロロホルム20 mLに懸濁し、TEA 50 μLおよび前記Boc-5-アミノ吉草酸サクシンイミドエステル溶液1 mL[約200マイクロモル]を加え、20で一晚攪拌・反応させた。反応後、メタノールおよび3%クエン酸水溶液を用いてTEAを抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレータを用いて溶媒を除去した。次に、生成物に1M塩酸/酢酸1.5 mLを加えて溶解し、37で1時間放置した。これをロータリーエバポレータで濃縮した後、繰り返しメタノールおよびクロロホルムで洗浄し、塩酸および酢酸を除去した。次いで、シリカゲルの分取用薄層クロマトグラフィ(#5717,Merck社製)を用い、クロロホルム/メタノール=7/3混合溶媒を展開溶媒として、生成物を精製した。収率は約60%であった。

【0041】

2. プロモアセチル(BrAc)-NH-C₅-DPPEの合成

プロモ酢酸140 mg[1ミリモル]をクロロホルム30 mLに溶解し、HSI 140 mg[1.2ミリモル]およびDCCD 250 mg[1.2ミリモル]を添加し、室温で3時間反応させた後、ロータリーエバポレータで溶媒を除去し、酢酸エチル30 mLを加えた。生じた白色沈殿を濾別し、再び溶媒を除去した後、クロロホルム10 mLに再溶解させた。

【0042】

次に、1.で調製したNH₂-C₅-DPPEのクロロホルム溶液約10 mL[50マイクロモル]に前記溶液1 mLおよびTEA 50 μLを加え、室温で1晩反応させた。反応後、溶媒を濃縮し、分取用薄層クロマトグラフィを用い、クロロホルム/メタノール=7/3混合溶媒を展開溶媒として、生成物を精製した。収率は50%であった。なお、最終生成物は1 mMの濃度になるようにクロロホルムで希釈した。

【0043】

10

20

30

40

50

3. リポソーム試薬の調製

使用した脂質および脂肪族アミンは、全てクロロホルムまたはクロロホルム/メタノール(2/1)混合溶媒に溶解した。5 mMのDPPC 200 μ L、10 mMのコレステロール100 μ L、2. で調製した1 mMのBrAc-NH-C₅-DPPE 50 μ Lおよび5 mMのステアリルアミン25 μ Lを、10 mL容量のナシ型フラスコに入れ、更にクロロホルム2 mLを加えてよく混合した。次に、約40 °Cの水浴中でロータリーエバポレータにより溶媒を除去した。再びクロロホルム2 mLを加えて十分に攪拌した後、再度ロータリーエバポレータにより溶媒を除去した。この操作を数回繰り返すと、フラスコ壁面に均一な脂質薄膜が形成された。続いて、フラスコをデシケータ中に移して真空ポンプで約1時間吸引することにより溶媒を完全に除去した。

【0044】

次いで、1mg/mLのグルコースオキシダーゼ(以下、GODと略す、pH7.4・100mMリン酸緩衝液(0.85%NaCl含有、PBSと略す)使用、シグマ社製)100 μ Lを添加し、フラスコ内部を窒素で置換した後、密栓して約60 °Cの水浴中に約1分間浸漬した。続いて、Vortexミキサを用い、フラスコ壁面の脂質薄膜が完全に消失するまで、フラスコを激しく振盪した。この操作により多重層リポソーム懸濁液が調製される。更に、リポソーム懸濁液に緩衝液を少量添加した後、すべて遠心チューブに移し、4 °Cにおいて15,000 rpmで20分間遠心する操作を数回繰り返した。最後に、10 mMのホウ酸緩衝液(pH 9.0、0.85% NaCl含有；以下、BBSと記す)でセラムチューブ(コーニング社製)にリポソームを移し、1度遠心分離して上澄を除去した後、後述する抗-ヒトAFP抗体固定化反応に使用するまで冷蔵庫に保存した。

【0045】

4. 抗-ヒトAFP抗体の修飾

抗-ヒトAFPモノクローナル抗体は、精製ヒトAFP(Dako社製)でマウスを免疫することにより独自に調製した(サブクラス；IgG₁)。本抗体(1mg/mL；0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.5)使用)1mLにペプシン(シグマ社製)100 μ gを添加し、37 °Cで1時間反応させた。次に、高速液体クロマトグラフィ-によりF(ab')₂分画のみを分取した。このF(ab')₂分画[0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)中]にメルカプトエチルアミン・塩酸塩10 mgを加え、37 °Cで90分間反応させ、ゲル濾過(セファデックスG-25使用、BBS)により遊離のSH基を含有したタンパク分画(Fab')のみを分取した。このタンパク分画の溶液については、OD 280nm = 1であった。

【0046】

5. 抗-ヒトAFP抗体(Fab')のリポソームへの固定化

前記リポソーム懸濁液とFab'の溶液とを混和し、20 °Cで44時間攪拌・反応させた。反応後、ゼラチン・ペロナール緩衝液(以下、GVB⁻と記す)で3回洗浄した。最後に、得られたリポソーム試薬をGVB⁻ 2 mLに懸濁させて4 °Cで保存した。

【0047】

6. ウサギ抗-ヒトAFP抗体(ポリクローナル；Dako社製)の磁気粒子への固定化

ウサギ抗-ヒトAFP抗体に架橋剤であるSPDP(ファルマシア社製)を作用させ、同様の処理で得たビオチン(シグマ社製)をジチオスレイトール(シグマ社製)で還元したものと反応させることによりビオチン標識したウサギ抗-ヒトAFP抗体を得た。この標識抗体をアビジン固定化磁気粒子(チッソ社製)と反応させることにより、ウサギ抗-ヒトAFP抗体固定化磁気粒子溶液を調製した。

【0048】

7. ヒトAFP測定用検量線の作成

予め、GVB²⁺(GVB⁻に0.5 mM MgCl₂および0.15 mM CaCl₂を添加したもの)でヒトAFP(Dako社製)の標準液(0.01~1000ng/mL)を調製した。マイクロタイター・プレートの各ウェルに、これらの溶液100 μ Lと磁気粒子溶液100 μ Lの10倍希釈溶液とを添加し、5分間37 °Cでインキュベートした後、温度を30 °Cまで冷却した。これにより磁気粒子が凝集し、磁石による回収が可能となる。磁石で回収したものを100 μ LのGVB²⁺で2回洗浄した。洗浄後、上記リポソーム試薬の10倍希釈溶液100 μ Lを添加し、37 °Cで

10

20

30

40

50

5分間反応させた。反応後、温度を再び30℃に冷却して磁気粒子を凝集・回収した。前述と同様に2回洗浄した後、100μLの純水を加え、37℃で1分後に1%グルコース（PBS溶液）100μLを添加して、東亜DKK製の特注微小作用電極により酵素反応をモニタした。電極を挿入してから5分後の電流値を記録した。相対電流値を以下のようにして算出した。

$$\text{相対電流値} = (A_e - A_o) / (A_m - A_o) \times 100 (\%)$$

ここで、 A_e ：各濃度のヒトAFPで実測された電流値、 A_o ：ヒトAFP溶液の代わりに等量のGV B^{2+} を添加したときに得られた電流値、 A_m ：最大の電流値が得られた濃度での電流値である。また、比較として酵素GODの代わりに、蛍光物質である0.1Mカルボキシフルオレセインを封入したリポソーム試薬を用いた系についても検討した。この際には、マイクロ
10
タイター・プレート用蛍光分光光度計（MTP-32、コロナ電気製）により励起波長460 nm、蛍光波長505 nmの条件（フィルタ特注）で測定した。そして、次式に基づいて相対蛍光強度を計算した。

【0049】

$$\text{相対蛍光強度} = (F_e - F_o) / (F_m - F_o) \times 100 (\%)$$

ここで、 F_e ：各濃度のヒトAFPで実測された蛍光強度、 F_o ：ヒトAFP溶液の代わりに等量のGV B^{2+} を添加したときの蛍光強度、 F_m ：この濃度範囲での最大の蛍光強度である。これらの測定結果を第2図に示す。この図から、蛍光測定よりも電気化学測定の方が2桁程度高感度になっていることが分かる。また、この検量線を使用して実際の血清試料中のAFP濃度も測定することも可能であることも示された。
20

【0050】

実施例2：抗-ヒトAFPモノクローナル抗体固定化ポリマーマイクロカプセル試薬を用いたヒトAFPの測定

上記リポソーム試薬に代わり、pH応答性ポリマーによるマイクロカプセルを調整した（試薬1）。封入物質はGODである。抗体固定化には化学吸着法を利用した。他の条件は上記リポソーム試薬系と同様にした（実施例1と同一）。ただし、マイクロカプセルを破壊するために、水の代わりにpH5のBBSを使用した。実験の結果、ほぼ実施例1のリポソーム試薬と同等の測定感度が得られることが明らかとなった。

【0051】

実施例3：抗-トリニトロトルエン（TNT）モノクローナル抗体固定化リポソーム試薬によるTNTの超微量定性検出
30

TNTモノクローナル抗体およびウサギ抗-DNP（ジニトロフェニル）抗体（免疫分析試薬4；第2抗体）は、ハプテンに対する抗体の作製法（「タンパク質 核酸 酵素」臨時増刊、1966年12月号、p.84~87参照）により独自に調製した。実施例1と同様の方法でリポソーム試薬および磁気粒子を得た。TNTの0.1~1,000 pg/mL標準液（GV B^{2+} 使用）を作製し、実施例1と同様に測定を行ったところ、反応時間5分間でも0.1 pg/mLのTNTで10%の相対電流値の上昇が認められ、定性的測定が可能であることが明らかになった。因みにこの濃度は、1Lのガスをサンプリングして1mLのGV B^{2+} に溶解する場合を考えると、pptオーダーのTNTの測定が可能であることを意味しているので、空港などでの爆発物発見への適応が可能と思われる。
40

【0052】

実施例4：免疫分析用担体として、酸化還元酵素が担持された多孔質担体を使用した場合の実施例

リポソームに代えて多孔質担体（多孔性微粒子）を利用して実施例1と同様の実験を行うこともできる。多孔性微粒子としては、セファロースCL（アマシャム社製）を使用する。実施例1で適用したAFPポリクローナル抗体とGODを重量比1:10になるように混合し、化学結合法により微粒子表面に固定化する。実施例1と同様の手順でAFP標準液を測定することができるが、磁石による回収後に微粒子を破壊する工程は含まれない。直接基質溶液（グルコース）を添加して酵素活性を測定した。

【0053】

10

20

30

40

50

測定結果は、実施例1と同様の結果が得られるが、本法の方が検出感度は1桁程度劣ることが予想される。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】本発明の免疫分析用担体（マイクロカプセル試薬）を使用した免疫分析方法の原理図。

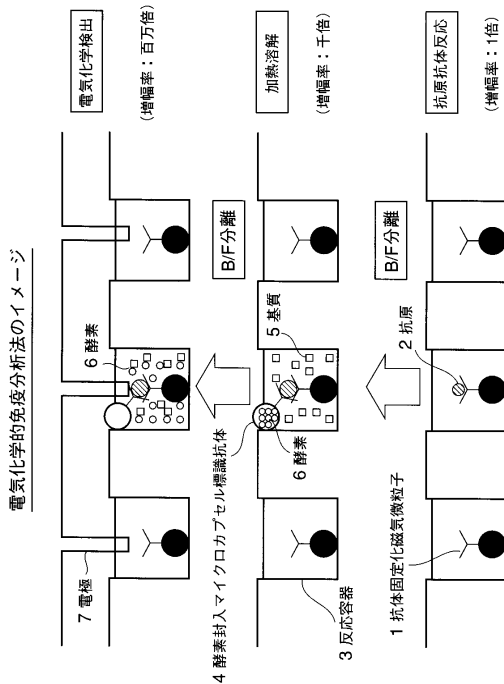
【図2】実施例1の免疫分析用担体（マイクロカプセル試薬）を使用して測定の結果を示す図（GODおよびカルボキシフルオレセインをそれぞれ封入した場合の相対電流値および相対蛍光強度を示す）。

【符号の説明】

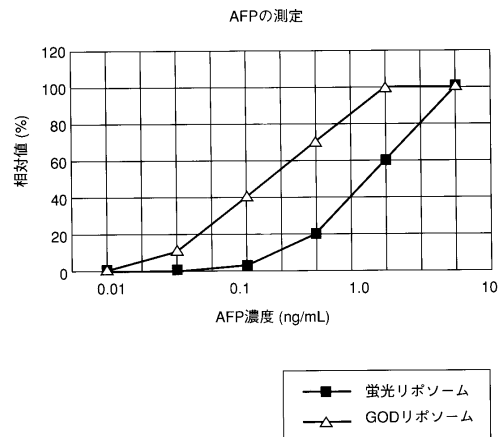
【0055】

- 1・・・抗体固定化分離用磁気粒子
- 2・・・抗原
- 3・・・反応容器
- 4・・・酵素封入マイクロカプセル標識抗体
- 5・・・基質
- 6・・・酵素
- 7・・・電極

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 石森 義雄

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝研究開発センター内

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特開平03-206962(JP,A)

特開昭60-138466(JP,A)

特開昭61-099867(JP,A)

特開平05-296973(JP,A)

特開平04-303770(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/543

C12M 1/34

G01N 27/416

G01N 33/544

专利名称(译)	免疫分析方法		
公开(公告)号	JP4271086B2	公开(公告)日	2009-06-03
申请号	JP2004170056	申请日	2004-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社东芝		
申请(专利权)人(译)	东芝公司		
当前申请(专利权)人(译)	东芝公司		
[标]发明人	石森義雄		
发明人	石森 義雄		
IPC分类号	G01N33/543 C12M1/34 G01N27/416 G01N33/544 G01N33/53 G01N33/537		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/5432 G01N2333/902 G01N2333/904		
FI分类号	G01N33/543.545.S C12M1/34.E G01N27/46.336.Z G01N33/544.B G01N27/416.336.Z		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/CC05 4B029/FA09 4B029/FA12		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
其他公开文献	JP2005351662A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了解决使用小型且廉价的设备而需要免疫分析方法的任务，同时它具有超高灵敏度，因为设备尺寸大且昂贵且在许多情况下检测灵敏度低相对于常规荧光检测型免疫分析方法。解决方案：在用于免疫分析的载体中，针对目标物质的抗体或特异性结合目标物质或其部分的物质部分固定于其表面。该用于免疫分析的载体在其表面上进行，或包括能够产生电化学活性物质的氧化还原酶。此外，在该免疫分析方法中，通过使用用于免疫分析的载体电化学检测目标物质。 Z

