

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4783872号
(P4783872)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 O 1 B
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/544 (2006.01) GO 1 N 33/544 Z

請求項の数 24 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2011-514948 (P2011-514948)	(73) 特許権者	000005821
(86) (22) 出願日	平成22年11月22日(2010.11.22)		パナソニック株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/006831		大阪府門真市大字門真1006番地
(87) 国際公開番号	W02011/064981	(74) 代理人	110001276
(87) 国際公開日	平成23年6月3日(2011.6.3)		特許業務法人 小笠原特許事務所
審査請求日	平成23年4月6日(2011.4.6)	(72) 発明者	若井 純子
(31) 優先権主張番号	PCT/JP2010/003573		大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内
(32) 優先日	平成22年5月27日(2010.5.27)	(72) 発明者	亀井 明仁
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2009-267109 (P2009-267109)	(72) 発明者	村岡 仁
(32) 優先日	平成21年11月25日(2009.11.25)		大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
早期審査対象出願			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

基板の表面にプロテインAを介して結合している免疫グロブリンG抗体を、前記表面から解離させる方法であって、

前記方法は、以下の工程(A)および(B)を具備する：

プロテインAを介して免疫グロブリンG抗体が結合している表面を有する基板を用意する工程(A)、および

ヒト血清アルブミンを含有する溶液を前記表面に提供し、前記免疫グロブリンG抗体を前記プロテインAから解離させる工程(B)

を含み、

ここで、前記免疫グロブリンG抗体は、受託番号FERM BP-10459号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(2F13F11G11)であり、

前記溶液は6以上8.9以下のpHを有する。

【請求項2】

前記工程(B)において、抗原抗体反応によって、前記免疫グロブリンG抗体と前記ヒト血清アルブミンとの複合体が形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記複合体が形成された際に、前記免疫グロブリンG抗体が前記表面から解離する、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (B) の後、前記溶液が前記表面から解離した前記免疫グロブリン G 抗体を含有している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記工程 (B) の後、前記溶液が前記複合体を含有している、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 pH は、7.4 以上 8.9 以下である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記溶液は、緩衝液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 pH は、7.4 以上 8.9 以下である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

溶液に含まれるヒト血清アルブミンを定量する方法であって、以下の工程 (A) ~ 工程 (C) を具備する：

プロテイン A を介して免疫グロブリン G 抗体が結合している表面を有する基板を用意する工程 (A)、

ここで、前記免疫グロブリン G 抗体は、標識体によって修飾されており、

前記免疫グロブリン G 抗体は、受託番号 F E R M B P - 1 0 4 5 9 号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体 (2 F 1 3 F 1 1 G 1 1) であり、

ヒト血清アルブミンを含有する溶液を前記表面に提供し、前記免疫グロブリン G 抗体を前記プロテイン A から解離させて前記溶液に混合する工程 (B)、ここで

前記溶液は 6 以上 8.9 以下の pH を有し、および

前記溶液に混合された前記免疫グロブリン G 抗体を修飾する前記標識体を定量し、前記溶液に含有される前記ヒト血清アルブミンを定量する工程 (C)。

【請求項 10】

前記工程 (B) において、抗原抗体反応によって、前記免疫グロブリン G 抗体と前記ヒト血清アルブミンとの複合体が形成される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複合体が形成された際に、前記免疫グロブリン G 抗体が前記表面から解離する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記工程 (B) の後、前記溶液が前記表面から解離した前記免疫グロブリン G 抗体を含有している、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記工程 (B) の後、前記溶液が前記複合体を含有している、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 pH は、7.4 以上 8.9 以下である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

前記溶液は、緩衝液である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 pH は、7.4 以上 8.9 以下である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

溶液がヒト血清アルブミンを含有するかどうかを決定する方法であって、以下の工程 (A) ~ 工程 (D) を具備する：

プロテイン A を介して免疫グロブリン G 抗体が結合している表面を有する基板を用意する工程 (A)、

ここで、前記免疫グロブリン G 抗体は、標識体によって修飾されており、

前記免疫グロブリン G 抗体は、受託番号 F E R M B P - 1 0 4 5 9 号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体 (2 F 1 3 F 1 1 G 1 1) であり、

ヒト血清アルブミンを含有する可能性がある溶液を前記表面に提供し、前記免疫グロブリン G 抗体を前記プロテイン A から解離させて前記溶液に混合する工程 (B)、ここで、前記溶液は 6 以上 8 . 9 以下の pH を有し、

前記溶液に混合された前記免疫グロブリン G 抗体を修飾する前記標識体を検出する工程 (C)、および

前記工程 (C) において前記標識体を検出されれば、前記溶液が前記ヒト血清アルブミンを含有していることを決定する工程 (D)。

【請求項 18】

前記工程 (B) において、抗原抗体反応によって、前記免疫グロブリン G 抗体と前記ヒト血清アルブミンとの複合体が形成される、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記複合体が形成された際に、前記免疫グロブリン G 抗体が前記表面から解離する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記工程 (B) の後、前記溶液が前記表面から解離した前記免疫グロブリン G 抗体を含有している、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記工程 (B) の後、前記溶液が前記複合体を含有している、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 pH は、7 . 4 以上 8 . 9 以下である、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記溶液は、緩衝液である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 pH は、7 . 4 以上 8 . 9 以下である、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロテイン A を用いて基板の表面に結合している免疫グロブリン G を、前記表面から解離させる方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

プロテイン A は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の細胞壁成分の 5 % を構成するタンパク質であり、「SpA」と略記される。プロテイン A は、免疫グロブリン G に対して高い親和性を有する。プロテイン A は基板の表面および当該免疫グロブリン G の間に挟まれ、当該基板の表面上に免疫グロブリン G を固定する。特許文献 1 の第 3 頁右下第 3 行目 ~ 第 4 行目は、免疫グロブリン G はプロテイン A に結合するが、pH を低下させることによって免疫グロブリン G はプロテイン A から解離することを開示している。この pH の低下による解離を利用して、生体試料に含有される標的物質が検出または定量され得る。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開平 02 - 073158 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

pH の低下は、生体試料の好ましくない変性をもたらし得る。pH を低下させるために、工程数が増加し得る。

【課題を解決するための手段】

50

【0005】

本発明者らは、受託番号FERM BP-10459号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(2F13F11G11)からなる免疫グロブリンIgG抗体がプロテインAを介して結合している表面に、ヒト血清アルブミンを含有する生体試料が供給されると、当該生体試料のpHが6以上、好ましくは7.4以上であっても、当該免疫グロブリンIgG抗体がプロテインAから解離するという知見を見出した。

【0006】

本発明は、基板の表面にプロテインAを介して結合している免疫グロブリンG(IgG)抗体を上記表面から解離させる方法を、提供する。この方法は、以下の工程、すなわち、(A)免疫グロブリンG抗体がプロテインAを介して結合している表面を有する基板を用意する工程、および(B)ヒト血清アルブミンを含有する溶液を上記表面に提供し、上記免疫グロブリンG抗体を上記プロテインAから解離させる工程を具備する。ここで、免疫グロブリンG抗体は、受託番号FERM BP-10459号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(2F13F11G11)であり、前記溶液は6以上8.9以下のpHを有する。

10

【0007】

本明細書で使用される場合、用語「プロテインA」は、「SpA」とも称されるタンパク質である。このタンパク質は、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の細胞壁成分で発見された。当業者は、市販供給元より、天然または合成のプロテインAを入手することができる。

20

【0008】

一実施形態において、上記工程(B)では、抗原抗体反応によって、上記免疫グロブリンG抗体と上記ヒト血清アルブミンとの複合体が形成され得る。

【0009】

本明細書で使用される場合、「複合体」とは、2つ以上の分子が相互作用を介して結合し、その全体で1つの分子のように挙動する状態となった一群の分子をいう。例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの複数個の分子が相互作用し結合し、1つの分子のように挙動する状態となった一群の分子を形成し得る。本明細書において上述した例では、上述の免疫グロブリンG抗体が、ヒト血清アルブミン分子と相互作用して結合し、1つの分子のように挙動する状態となった一群の分子を形成する。

30

【0010】

本明細書において使用される場合、用語「相互作用」とは、2つの物質(の分子)についていうとき、一方の物質と他方の物質との間で力(例えば、分子間力(ファンデルワールス力)、水素結合、疎水性相互作用など)を及ぼしあうこという。通常、相互作用をした2つの物質は、会合または結合している状態にある。

【0011】

本明細書中で使用される場合、用語「結合」は、2つのタンパク質もしくは化合物または関連するタンパク質もしくは化合物の間、あるいはそれらの組み合わせの間での、物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。この結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用(結合)は、直接的または間接的であり得、間接的なものは、別のタンパク質または化合物の効果を介するかまたは起因する。直接的な結合とは、別のタンパク質または化合物の効果を介してもまたはそれらに起因しても起こらず、他の実質的な化学中間体を伴わない、相互作用をいう。

40

【0012】

他の実施形態において、上記複合体が形成された際に、上記免疫グロブリンG抗体が上述した表面から解離し得る。

【0013】

なお、上述の免疫グロブリンG抗体が、上述の表面から解離した後、その解離の際に存在していた複合体が、必ずしも安定に存在している必要はなく、解離とともに、その複合

50

体間の結合が解けた場合であっても、後続の工程において適宜必要な測定系が構築され得る。

【 0 0 1 4 】

別の実施形態において、上記工程（ B ）の後、上記溶液は、上記表面から解離した上記免疫グロブリン G 抗体を含有し得る。

【 0 0 1 5 】

さらに別の実施形態において、上記工程（ B ）の後、上記溶液は、上記複合体を含有し得る。

【 0 0 1 6 】

さらに別の実施形態において、上記 pH は、 7 . 4 以上 8 . 9 以下である。

10

【 0 0 1 7 】

さらに別の実施形態において、上記溶液は、緩衝液であり得る。より好ましくは、上記 pH は、 7 . 4 以上 8 . 9 以下である。

【 0 0 1 8 】

別の態様において、本発明は、基板の表面にプロテイン A を介して結合している免疫グロブリン G（ I g G ）抗体を上記表面から解離させる上述の方法を利用して、溶液に含まれる被測定物質を定量する方法、または、その溶液が被測定物質を含有するかどうかを決定する方法を提供し得る。ここで、基板の表面にプロテイン A を介して結合された免疫グロブリン G 抗体は、適当な標識体によって修飾されている。そして、免疫グロブリン G 抗体は、その溶液中に存在する被測定物質（ヒト血清アルブミン）と相互作用し、プロテイン A から解離する。解離した免疫グロブリン G 抗体が、当該溶液に混合され、その免疫グロブリン G 抗体に結合している標識体の存在の有無、またはその標識体の量を当該溶液中で検出することで、被測定物質の存在の有無の検出、およびその定量を実現する。

20

【 0 0 1 9 】

別の態様において、本発明は、上述の基板の表面にプロテイン A を介して結合している免疫グロブリン G 抗体を上記表面から解離させる方法を利用して、免疫測定方法を実施する装置を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明の一実施形態に係る免疫測定方法を実行するための装置は、例えば、少なくとも標識体により修飾された被測定物質に対して特異的に結合する抗体（受託番号 F E R M B P - 1 0 4 5 9 号の産生細胞株により産生された免疫グロブリン G 抗体）と、上記抗体と特異的に結合する結合剤（プロテイン A ）と、担体（例えば、基板）とを備える。

30

【 0 0 2 1 】

当該装置に行われる免疫測定方法は、次のような工程、すなわち、
（ 1 ）上記担体上に上記結合剤を介して固定化された上記抗体に対し、被測定物質を提供する工程と、
（ 2 ）抗原抗体反応により、上記抗体と上記被測定物質との複合体を形成する工程と、
（ 3 ）上記抗体と上記被測定物質とが複合体を形成した際に、上記抗体が上記結合剤との結合を解消することで、上記担体上から解離する工程、
（ 4 ）解離した上記抗体の上記標識体の量を計測する工程を含む。

40

【 0 0 2 2 】

上述の解離した前記抗体の前記標識体の量を計測する工程は、標識体の化学的性質または物理的性質を利用することで、標識体を定量する手法であれば、いずれの手法で実現されてもよい。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 3 】

本発明は、抗原に対して特異結合する 1 種類の抗体だけを用い、かつ簡単な工程を特徴とする免疫測定系の構築を達成した。これにより、高分子の抗原だけでなく低分子の抗原からなる被測定物質を測定可能な免疫測定の方法及び装置の提供が可能となる。

50

多くの生体試料のpHは中性である。従って、pHを低下させる工程なしに、生体試料は溶液として用いられ得る。従って、本発明では、pHの低下による生体試料への悪影響が回避され得る。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本発明における免疫測定方法の基本構成図

【図2】本発明における免疫測定方法の測定フローを示す図

【図3】本発明における免疫測定方法のイムノクロマトへの応用例を示す図

【図4】実施例1において測定されたセンサーグラフ

【図5】実施例2において測定されたセンサーグラフ

10

【図6】実施例2における塩濃度を解離率の関係を示すグラフ

【図7】実施例2における緩衝液種類およびpHと解離率の関係を示すセンサーグラフ

【図8】実施例2における緩衝液種類およびpHと解離率の関係を示すグラフ

【図9】比較例2において測定されたセンサーグラフ

【図10】比較例2において測定されたセンサーグラフ

【図11】比較例2において測定されたセンサーグラフ

【発明を実施するための形態】

【0025】

図面を参照しながら、以下、本発明の例示的な実施の形態を説明する。

【0026】

20

(実施の形態1)

図1は、実施の形態1における免疫測定方法の基本構成図を示す。抗体102は、被測定物質に特異的に結合する抗体である。標識体103は、抗体102に結合する標識体である。図1(a)に示されるように、抗体102は、結合剤104を介して担体11上に固定化されている。図1(b)に示されるように、抗体102が結合剤104に結合し、抗体-結合剤複合体105を形成する。この抗体-結合剤複合体105は、抗体102と、その抗体102の結合剤結合部位111に結合した結合剤104とを有する。

【0027】

担体11は、結合剤104を固定化できれば特に限定されない。具体的な担体11としては、例えば、ガラスおよび表面に金属膜を有する樹脂基板が挙げられる。

30

【0028】

抗体102は、被測定物質が抗体102に結合することによって結合剤結合部位111を介して結合している結合剤104から解離する性質を有する。具体的な抗体102としては、IgG抗体が挙げられる。より具体的な抗体102は、受託番号FERM BP-10459号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(2F13F11G11)である。このとき、被測定物質(例えば、後述する図2においては、101で示される)は、ヒト血清アルブミン(hSA)である。抗体102、すなわち、上述の抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体は、hSAが供給されると、hSAと相互作用し、結合し得る。

【0029】

40

結合剤104は、その結合剤104に結合している抗体102に対して被測定物質が結合した際に当該抗体102を解離させる性質を有する。具体的な結合剤としては、例えば、プロテインAが挙げられる。

【0030】

標識体103は、抗体102の存在量を光学的にまたは電気化学的に計測するために用いられ得る物質である。具体的な標識体103としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼなどの酵素、蛍光色素、ルテニウム錯体、ルミノールなどの発光色素、フェロセンなどの電気化学活性物質などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

50

以下、本発明の免疫測定方法の一例を説明する。

【0032】

図2は、実施の形態1における免疫測定の方法の測定フローを示す。当該方法は、以下の工程(1)から(4)までを含む。

【0033】

工程(1)において、抗体-結合剤複合体105を有する担体11に、被測定物質101を含む溶液が供給される。溶液のpHは6以上8.9以下である。当該pHは7.4以上8.9以下であることが好ましい。

【0034】

工程(2)において、抗原抗体反応によって被測定物質101および抗体102が複合体を形成する。

【0035】

工程(3)において、被測定物質101および抗体102が複合体を形成した際に、抗体102が結合剤104から解離する。上述のように、被測定物質101は、ヒト血清アルブミン(hSA)である。後述の例示的な実施例においても明らかになるが、hSAの代わりに、ウシ血清アルブミン(BSA)を用いた場合には、抗体102(免疫グロブリン抗体IgG)は、結合剤104から解離しない。

【0036】

工程(4)において、解離した抗体102が有する標識体103の量を測定することによって、解離した抗体102の量を算出する。これにより、当該溶液に含まれる被測定物質101を定量する。これに代えて、工程(4)において、解離した抗体102が有する標識体103を検出することによって、当該溶液に被測定物質101が含まれているかどうかを検出され得る。

【0037】

抗原を含む試料を抗体-結合剤複合体に反応させ、抗原が抗体に結合すれば、抗体が結合剤から解離するという原理が、簡便な免疫測定を可能とする。さらに、標識体103の検出は、用いる標識体の性質に合わせて選択することができるため、実施の形態1の免疫測定の方法を従来の免疫測定方法へ応用することは容易である。

【0038】

(イムノクロマト測定キットの例)

イムノクロマト試験片および試験用反応液からなるイムノクロマト測定キットに上述の免疫測定法を利用した例を、以下に説明する。図3は、実施の形態1の免疫測定の方法を、当該イムノクロマト測定キットに応用した例を示す。このイムノクロマト測定キットは、特定の物質の表面あるいは内部(固定相または担体と呼ばれる)を、検体を含む物質(移動相)が通過する際に、当該検体中の抗原(被測定物質)と標識抗体とが相互作用する過程を利用して、その被測定物質の存在を確認することを実現する。

【0039】

イムノクロマト試験片は、固定相ならびに付属する構造体を提供する。イムノクロマト試験片は、毛細管現象を生じる性質(例えば、構造または物性)を有する材料により作製される。好ましくは、このイムノクロマト試験片は、多孔性担体であるニトロセルロースメンブレンである。タンパク質は、このニトロセルロースメンブレンに対して容易に固定化され得る。また、ニトロセルロースメンブレンの強度は低い。したがって、ニトロセルロースメンブレンは、ポリテトラフルオロエチレン基板(以下、PTFE基板)に貼り付けられた形態で使用される。また、PTFE基板によって裏打ちされた形態のニトロセルロースメンブレンが、市販されている。

【0040】

図3の例において、ニトロセルロースメンブレン113(例えば、幅1cm×長さ6cm、厚さ200μm)からなる多孔性担体が、スプレー糊を用いてPTFE基板112(例えば、幅1cm×長さ10cm、厚さ3mm)に貼り付けられる。ニトロセルロースメンブレン113は、その長さ方向の一端に、ガラス繊維濾紙からなる試料液導入部114

10

20

30

40

50

を有している。他方、ニトロセルロースメンブレン 113 は、その長さ方向の他端に、ガラス繊維性の吸水性パッドからなる吸水部 115 を有している。

【0041】

イムノクロマト試験片 111 は、吸水部を有さなくてもよい。当該イムノクロマト試験片は、移動相として導入される試料液によって完全に浸潤しない程度の長さを有する。

【0042】

本例において、イムノクロマト試験片 111 は、ニトロセルロースメンブレン 113 の長さ方向に沿って移動相が移動する経路において、順に、標識固定化部、および判定部を有している。

【0043】

本例において、標識 103 で標識された抗体 102 が、結合剤 104 を介してニトロセルロースメンブレン 113 に固定化され、上述の標識固定化部を形成する。

【0044】

抗体 102 は、被測定物質 101 に対して特異的に結合可能な IgG 抗体である。好ましくは、この抗体 102 は、被測定物質 101 がヒト血清アルブミンである場合、受託番号 FERM BP - 10459 号の産生細胞株より産生される IgG 抗体（すなわち、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（2F13F11G11））である。

【0045】

標識体 103 は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼのような酵素であり得る。このような酵素を抗体 102 に結合させる種々の方法が、確立されている。

【0046】

例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼの標識方法は、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法が知られている。

【0047】

抗体の NH₂ 基に標識できる Peroxidase Labeling Kit - NH₂、および抗体の SH 基に標識できる Peroxidase Labeling Kit - SH（共に同仁化学製）に代表される市販の標識用キットが、利用され得る。

【0048】

当該市販のキットは、抗体へ酵素を標識することを容易にし得る。

【0049】

好ましくは、結合剤 104 は、プロテイン A である。

【0050】

第 2 の抗体 116 が、ニトロセルロースメンブレン 113 に固定化されて、上述の判定部を形成する。

【0051】

第 2 の抗体 116 は、動物を、IgG 抗体（2F13F11G11）分子の全体または Fc 部分で免疫することによって得られた抗ヒト IgG 抗体を用いることができる。好ましくは、第 2 の抗体 116 は、当該ヒト IgG 抗体の Fc 部分で免疫して得られた抗体である。このようにして得られた抗体は、抗体 102 および被測定物質の結合を妨げない。

【0052】

結合剤 104 および第 2 の抗体 116 は、以下のようにしてニトロセルロースメンブレン 113 上に固定化される。

【0053】

ニトロセルロースメンブレン 113 の長さ方向の一端から 2 cm 離れた場所に、ディスペンサーを用いて、1 mg/ml のプロテイン A（結合剤 104）を溶解した 100 μl の PBS 緩衝液（8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.2 g/l KH₂PO₄, pH 7.4）を塗布する。

【0054】

ニトロセルロースメンブレン 113 の長さ方向の他端から 2 cm 離れた場所に、ディス

10

20

30

40

50

ペンサーを用いて、第2の抗体116を溶解した100 μ lのPBS緩衝液(濃度:1mg/ml)を塗布する。

【0055】

その後、40 $^{\circ}$ Cで約2時間、基板112は乾燥される。

【0056】

好ましくは、結合剤104および第2の抗体116をニトロセルロースメンブレン113上に固定化した後、ニトロセルロースメンブレン113は、抗原抗体反応に関与しない物質でブロッキング処理される。ブロッキング処理により、抗体102が結合剤104を介さずにニトロセルロースメンブレン113上に非特異的に結合することが防止される。さらに、検体中に含まれる成分が測定時にニトロセルロースメンブレン113上へ結合することが防止される。ブロッキング処理は、例えば、以下のように行われる。ニトロセルロースメンブレン113を1重量%のカゼインを含むPBS緩衝液中に15分間程度浸漬し、ニトロセルロースメンブレン113上へカゼインを結合させる。

10

【0057】

ブロッキング処理されたニトロセルロースメンブレン113は、PBS緩衝液を保持する容器中で約15分間、振とうによって洗浄され、余分なカゼインが除去される。洗浄されたニトロセルロースメンブレン113は、再度40 $^{\circ}$ Cで約2時間程度乾燥される。その後、ディスペンサーを用いて標識体103を有する1mg/mlの抗体102を溶解した100 μ lのPBS緩衝液を標識固定化部に塗布する。約1時間、室温で静置され、標識体103を有する抗体102が結合剤104に結合される。

20

【0058】

静置後、PBS緩衝液を保持する容器を約15分間振とうすることにより洗浄する。これにより、結合剤104との結合を生じず余分に沈着した抗体102が除去される。洗浄後、ニトロセルロースメンブレン113を40 $^{\circ}$ Cで約2時間乾燥する。これにより、ニトロセルロースメンブレン113上に標識固定化部および判定部が形成され得る。

【0059】

以上の手順を経て、イムノクロマト試験片111が完成される。

【0060】

試験用反応液は、標識体103の存在量を同定するために使用される反応液である。この試験用反応液は、次のようにして調製され得る。

30

【0061】

西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼのような酵素を標識体103として用いる場合、試験用反応液は、次のようなA液およびB液から構成される。A液は、酵素反応に必要な基質を提供し、他方、B液は、酵素反応に必要なH₂O₂を提供する。

【0062】

基質として、例えば、3,3'-ジアミノベンジジンを溶解した0.5mg/mlの濃度を有するHBS緩衝液(0.05M HEPES-Na, 0.15M NaCl, pH 7.5)を調製する(A液)。好ましくは、A液は、遮光保存される。

【0063】

酵素反応に必要なH₂O₂を供給するために、0.15% H₂O₂を含むHBS緩衝液を調製する(B液)。A液およびB液が、使用の際に混合され、試験用反応液が得られる。

40

【0064】

次に、得られたイムノクロマト試験片および試験用反応液からなるイムノクロマト測定キットの使用方法を説明する。

【0065】

ガラス繊維濾紙114からなる試料液導入部に試料液を滴下する。試料液はニトロセルロースメンブレン113を毛細管現象によって移動し、結合剤104と抗体102との複合体からなる標識固定化部に到達する。

【0066】

試料液中に被測定物質が存在する場合には、被測定物質が、標識体103で修飾された

50

抗体 102 に結合する。被測定物質と抗体 102 との複合体が形成され、この形成された複合体は、ニトロセルロースメンブレン 113 に固定化された結合剤 104 から解離する。毛細管現象によってニトロセルロースメンブレン 113 を移動する試料液の流れが、当該複合体を、判定部に移動させる。当該複合体は、判定部に到達すると、第 2 の抗体 116 に結合する。なお、仮に、被測定物質と抗体 102 から形成された上述の複合体が、ニトロセルロースメンブレン 113 を移動する間に、被測定物質と抗体 102 とに分離しても、この抗体 102 は、第 2 の抗体 116 に結合し得る。このとき、抗体 102 は、標識体 103 により修飾されているから、上述の形成された複合体と同様に、判定部における判定対象となり得る。

【0067】

判定部で結合されなかった分子、ならびに余分な試料液は毛細管現象により、ニトロセルロースメンブレン 113 上を更に移動し、吸水部 115 で吸収される。

【0068】

試料液が吸水部 115 に到達し、かつ試料液導入部に滴下した試料液が無くなったことが確認された後、基質を溶解した溶液と H_2O_2 を含む溶液（上記で構成した A 液と B 液との混合液）を滴下する。この滴下する位置は、判定部と標識固定化部との間であり、滴下は、判定部に近い上流側から行う。A 液と B 液との混合液を滴下して一定時間が経過した後、判定部の着色を目視、あるいは機器によって判定する。

【0069】

実施の形態 1 の免疫測定の方法を化学発光および電気化学発光に応用することは、イムノクロマト法への応用と同様に、容易である。

【0070】**（実施例 1）**

以下、本発明の免疫測定方法の具体例を示す。本実施例では、表面プラズモン共鳴装置（以下、SPR 装置）を用いた測定を行った。具体的には、Biacore 社製の Biacore 3000 システム（以下、Biacore と記す）を測定装置として使用した。この測定装置は、表面プラズモン共鳴現象を測定原理として、生体分子間の相互作用を標識なしで検出することが可能な分析装置である。Biacore を使用して測定対象である分子の間の相互作用を測定するためには、測定対象分子の一方を測定用チップに固定化し、固定した分子に作用する分子を含む試料液を当該測定用チップ表面に送液する。このとき、この測定装置は、測定用チップの表面で起こる分子間の結合・解離に帰因する微量の質量変化を表面プラズモン共鳴シグナルとして検出し、当該シグナルを経時的にモニタして、そのモニタした結果をセンサーグラムとして記録する。

【0071】

本実施例では、Biacore 社製の CM5（以下、センサーチップと記す）を測定チップとして用いた。このセンサーチップは、ガラス板上の金膜表面にカルボキシメチルデキストランを有している。試料がセンサーチップに固定化される際、カルボキシメチルデキストランのカルボキシル基は適切な試薬（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS））で活性化され、次いで、固定化される試料がそこに導入される。当該デキストランが有するカルボキシル基と、当該試料が有するアミノ基との間のカップリング（アミノカップリング）により、センサーチップに対する結合剤の固定化が可能となる。

【0072】

評価に用いた被測定物質、抗体および結合剤を以下に示す。ヒトアルブミン（以下、hSA と記す）を、被測定物質として、用いた。使用したヒトアルブミンは、SIGMA 社製のヒトアルブミンであった。本測定例で使用した抗体は、受託番号 FERMBP-10459 号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（以下、2F13F11G11 と記す）であった。結合剤として、CALBIOCHEM 社製のプロテイン A（Lot # D33524）を使用した。

【0073】

次に、抗原（すなわち、被測定物質）の存在 / 不在に伴う、抗体と結合剤との結合量変

10

20

30

40

50

化を測定した測定手順を示す。

【0074】

まず、結合剤（プロテインA）を、前述のアミノカップリングによりセンサーチップ上に固定化した。この固定化は、Biacore提供の固定化方法に従った。固定化に際し、所定のpHの酢酸緩衝液により希釈されたプロテインAを使用した。十分な量のプロテインAが固定化されるための当該酢酸溶液のpHを決定する必要がある。そこで、pH4、pH5およびpH6の10mM酢酸緩衝溶液に、20ng/mlのプロテインAを溶解した溶液を各々準備した。この異なるpHを有する調製した溶液を、Biacoreが備える4つのフローセルのいずれかに、順次、流速10μl/分で流した。それぞれの調製した溶液について得られたセンサーグラムに基づき、十分な量のプロテインAが固定化されるpHを決定した。

10

【0075】

本実験では、センサーチップ上への固定化量が最も多かったpH4の条件を採用した。上記pH4の条件下で、プロテインAをセンサーチップ上に約5ng/mm²固定化した。また、ブランク値を測定するために、フローセルにプロテインAを固定化しない条件でセンサーグラムを得た。

【0076】

次に、抗原の存在/不在に伴う、抗体とプロテインAとの結合量変化を、Biacoreを用いて測定した。

【0077】

まず、2F13F11G11を溶解させた緩衝溶液を、流速20μl/minにて流量10μlを全4つのフローセルへ流し、センサーチップ上に固定化されたプロテインAと結合させた。この際、緩衝液に溶解した2F13F11G11の濃度は、200nMであった。また、プロテインAへの結合量は、およそ5ng/mm²であった。ここでは、プロテインAと結合した2F13F11G11以外の物質の影響を排除するため、2F13F11G11をフローセルに流入させた後、緩衝溶液のみをフローセルに流入させた。本実験において、緩衝溶液として、0.05% Tween 20を含むPBS緩衝液（pH7.4）を用いた。

20

【0078】

次に、被測定物質であるhSAを溶解させた緩衝溶液をフローセルへ流入させ、2F13F11G11と結合反応させた。このときの流速は20μl/min、流量は60μlであった。使用したhSAの濃度は、4μM、2μM、500nMおよび0nMであった。図4は、測定の結果得られたセンサーグラムを示す。図4は、以下の比較例1の結果も示す。

30

【0079】

（比較例1）

hSAと2F13F11G11との特異性を測定するため、hSAの代わりに2F13F11G11と反応しないウシ血清アルブミン（以下、BSAと記す）を用いて同様の実験（pH：7.4）を実施した。

【0080】

図4から理解されるように、hSAを流入したときレスポンスの低下が観測された。他方、このようなレスポンスの低下は、BSAを流入した直後には観測されなかった。このことは、hSAと2F13F11G11の特異的な結合反応により、プロテインAからhSAと2F13F11G11との複合体がpH：7.4下でも解離していることが示された。

40

【0081】

上記の実験に用いた、被測定物質と特異的に反応しその反応によりプロテインAから解離する抗体を用いることにより、本発明の免疫測定方法が実現可能であることが示された。

【0082】

50

(比較例2)

2F13F11G11に代えて、11-4B抗体、42-DA3抗体、および13-3B抗体が用いられ、実施例1と同様に実験(pH:7.4)が実施された。

11-4B抗体は、受託番号FERM BP-7937号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体であった。

42-DA3抗体は、受託番号FERM ABP-10637号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体であった。

13-3B抗体は、受託番号FERM BP-7938号の産生細胞株より産生される抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体であった。

図9は、11-4B抗体が用いられた測定の結果得られたセンサーグラムを示す。

10

図10は、42-DA3抗体が用いられた測定の結果得られたセンサーグラムを示す。

図11は、13-3B抗体が用いられた測定の結果得られたセンサーグラムを示す。

図9~図11から理解されるように、hSAまたはBSAを流入しても、レスポンスの低下は観測されなかった。従って、2F13F11G11およびhSAの組合せのみが、pH6上8.9以下での、好ましくはpH7.4以上8.9以下での、免疫グロブリンG抗体の前記プロテインAからの解離を可能にする。

【0083】

(実施例2)

次に、本発明の免疫測定方法に適した条件について、SPR装置での測定例を示す。

【0084】

20

実施例2では、実施例1と類似の測定系を使用したため、使用した測定系における相違点を中心に説明する。

【0085】

測定装置としてBiacore社製のBiacore3000システム(以下、Biacoreと記す)を用いた。また、被測定物質、抗体、結合剤は、実施例1と同じものを用いた。Biacore社製のCM5(以下、センサーチップと記す)を、測定チップとして使用した。アミノカップリングによって、結合剤であるプロテインAを上述のセンサーチップに固定化した。プロテインAの固定化量は、約6ng/mm²であった。また、ブランク値を測定するために、フローセルにプロテインAを固定化しない条件でセンサーグラムを得た。

30

【0086】

次に、種々のNaCl濃度を有する0.005%Tween20を含むPBS緩衝液(pH7.4)を調製した。NaClの濃度は、0g/l、4g/l、8g/l、12g/lまたは24g/lとした。得られたPBS緩衝液の各々に、2F13F11G11を溶解した。この一連の2F13F11G11溶液を、流速20μl/minにて流量40μlの条件で、全4つのフローセルへ流し、センサーチップ上に固定化されたプロテインAと結合させた。この際、結合した2F13F11G11の濃度は1μMであった。

【0087】

さらに、プロテインAと結合した2F13F11G11以外の物質の影響を排除するため、2F13F11G11をフローセルに流入させた後、緩衝溶液のみをフローセルに流入させた。次に、被測定物質であるhSAを溶解させた緩衝溶液をフローセルへ流入させ、2F13F11G11と結合反応させた。このときの流速は20μl/minであった。また、流量は40μlであった。濃度は、1μMであった。これら操作を、先述の5種の緩衝液のそれぞれを用いて行った。

40

【0088】

図5は、測定により得られたセンサーグラムを示す。このセンサーグラムは、プロテインAを固定化していないブランク値を、それぞれの測定値から差し引いた結果を示す。5種の緩衝液において、NaCl濃度に依存して、プロテインAと2F13F11G11との結合量変化に大きな変化が観測された。NaCl濃度が0g/lであったとき、緩衝液を流した場合にもレスポンスの上昇が見られており、非特異的な反応が起こりやすい条件

50

であると考えられる。この条件は、被測定物質の測定には適さないと考えられた。4 g / l 以上の NaCl を含む緩衝液では、次のような観測結果が得られた。低い塩濃度を有する緩衝液ほど、大きな 2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 の結合量を有する傾向があった。さらに、低い塩濃度を有する緩衝液ほど、hSA を流入した際に、hSA と 2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 との複合体がプロテイン A から解離する量が大きかった。

【0089】

図6は、NaCl 濃度と解離量との関係を示す。図6に示されるグラフ内の解離率は、2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 をフローセルに流入させた後、hSA を添加する直前の Biacore レスポンスを 100% とし、hSA 添加により減少した Biacore レスポンスの割合を%で示したものである。但し、NaCl 濃度が 0 g / l であるとき、解離が観測できなかつたため、その場合のデータは、示していない。図6から理解されるように、4 g / l または 8 g / l の NaCl を含む緩衝液を用いた場合、解離率が高くなった。

10

【0090】

これらの結果は、プロテイン A から解離する抗体を用いた免疫測定法は、4 g / l から 8 g / l の NaCl を含む緩衝液を用いることでより感度よく実現できることを示す。

【0091】

次に、本発明の免疫測定方法に適した条件としての緩衝液 pH と緩衝液種について検討した結果を示す。利用した測定系は、先の SPR 装置による測定と同様のものだった。

【0092】

8 g / l の NaCl 濃度を有する 0.005% Tween 20 を含む PBS 緩衝液 (pH 7.4)、8 g / l の NaCl 濃度を有する 0.005% Tween 20 を含む PBS 緩衝液 (pH 8.9)、および 8 g / l の NaCl 濃度を有する 0.005% Tween 20 を含む Gly 緩衝液 (pH 8.9) を調製した。この調製された緩衝液の各々に、2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 を溶解させた。

20

【0093】

得られた 2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 溶液を、流速 20 μ l / min かつ流量 40 μ l の条件で4つ全てのフローセルに流し、センサーチップ上に固定化されたプロテイン A と結合させた。この際、緩衝液に溶解した 2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 の濃度は 1 μ M であった。さらに、プロテイン A と結合した 2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 以外の物質の影響を排除するため、2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 をフローセルに流入させた後、緩衝溶液のみをフローセルに流入させた。次に、被測定物質である hSA を溶解させた緩衝溶液をフローセルへ流入させ、2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 と結合反応させた。このときの流速は 20 μ l / min であった。流量は 40 μ l で実施した。また、濃度は、1 μ M であった。

30

【0094】

図7は、各緩衝液について得られたセンサーグラムを示す。図8は、図7に示される結果に基づき算出した hSA 添加に伴う解離率を示す。図7を参照すると、pH と緩衝液種によって 2 F 1 3 F 1 1 G 1 1 の結合量に違いが見られるものの、図8を参照すると、緩衝液の pH および緩衝液種類の違いによる解離率の違いは小さいことが理解される。すなわち、上述の測定系は、少なくとも PBS 緩衝液または Gly 緩衝液のいずれを用いた場合でも、利用することが可能である。また、上述の結果から、当該測定系は、pH 7.4 から pH 8.9 までの間で pH 範囲においても使用可能であることが示された。

40

【0095】

以上、本発明を詳細に説明してきたが、前述の説明はあらゆる点において本発明の例示にすぎず、その範囲を限定しようとするものではない。本発明の範囲を逸脱することなく種々の改良や変形を行うことができることは言うまでもない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。また、当業者は、本発明の具体的な実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて均等な範囲を実施することができることが理解される。また、本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」な

50

ど)は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書(定義を含めて)が優先する。

【産業上の利用可能性】

【0096】

本発明は、例えば、抗原に対して特異結合する1種類の抗体により免疫測定系を構成することができる。これにより、免疫測定系の構築の労力を低減でき、また、抗原とそれに対して特異結合する2種類の抗体により、サンドイッチ様の結合体を生じさせる必要がないため、ハプテンのような低分子化合物抗原においても適用することができると考えられる。

10

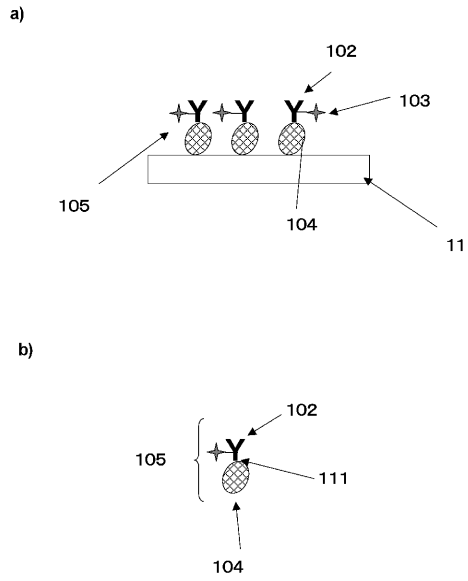
【符号の説明】

【0097】

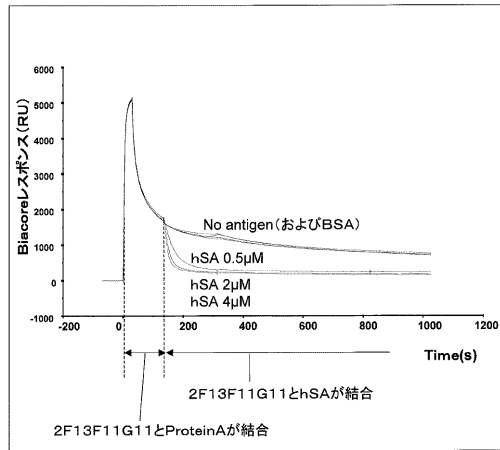
- 1 1 担体
- 1 0 1 被測定物質
- 1 0 2 抗体
- 1 0 3 標識体
- 1 0 4 結合剤
- 1 0 5 抗体 - 結合剤複合体
- 1 1 1 イムノクロマト試験片
- 1 1 2 P T F E 基板
- 1 1 3 ニトロセルロースメンブレン
- 1 1 4 ガラス繊維濾紙
- 1 1 5 吸水性パッド
- 1 1 6 第2の抗体

20

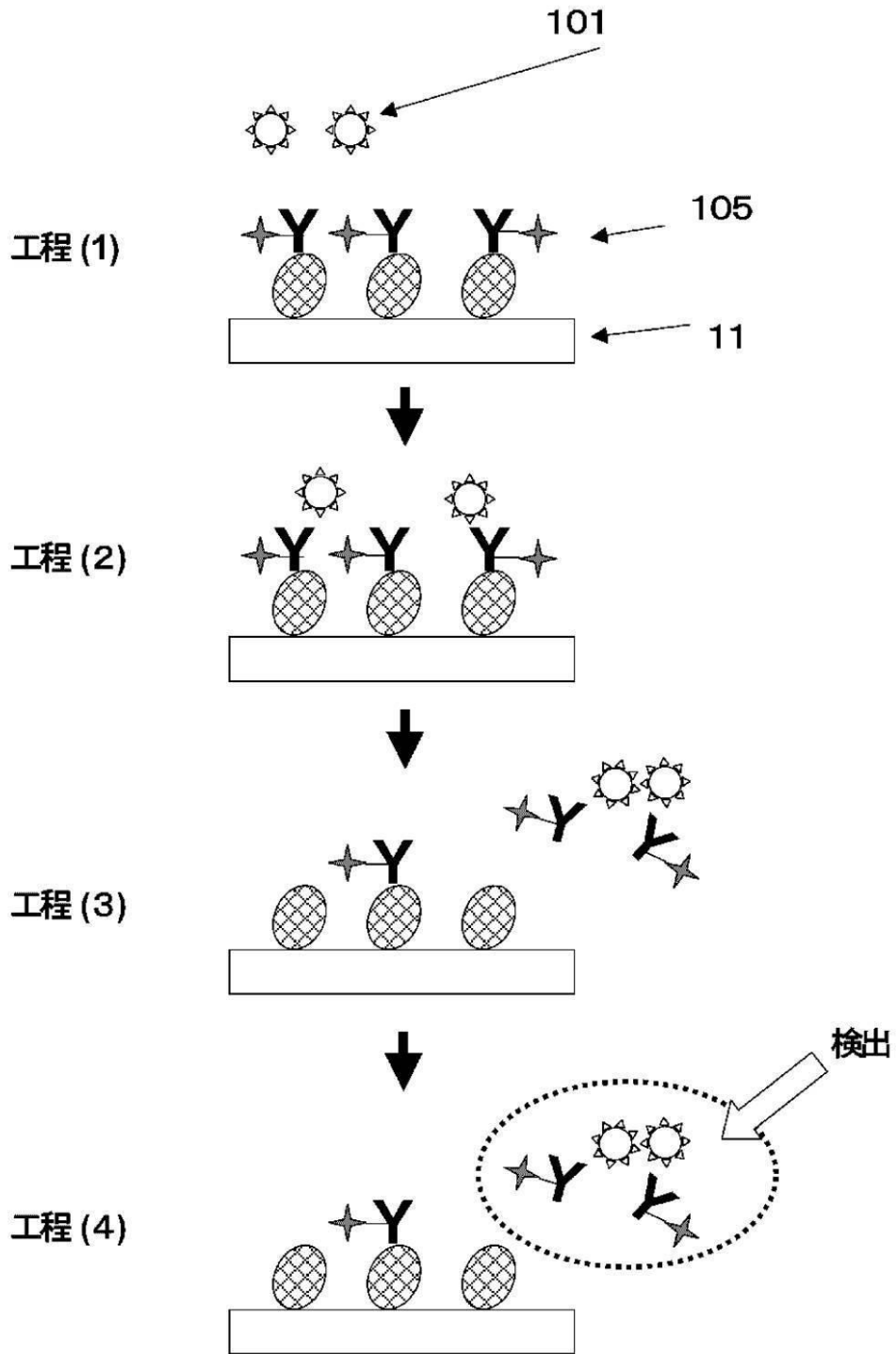
【 図 1 】



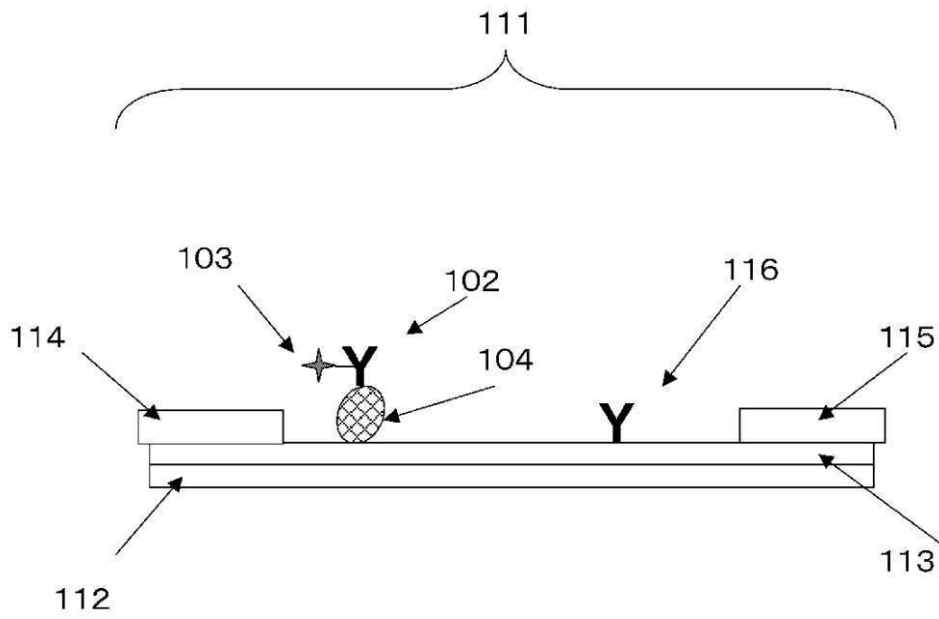
【 図 4 】



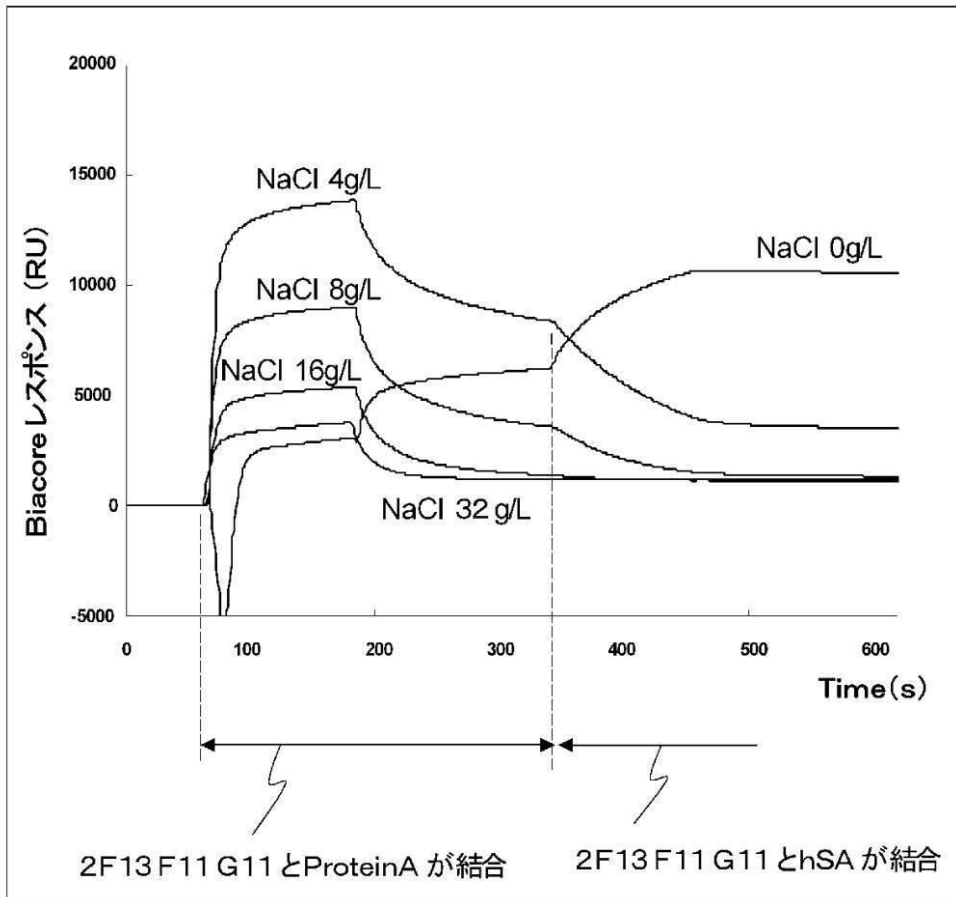
【 図 2 】



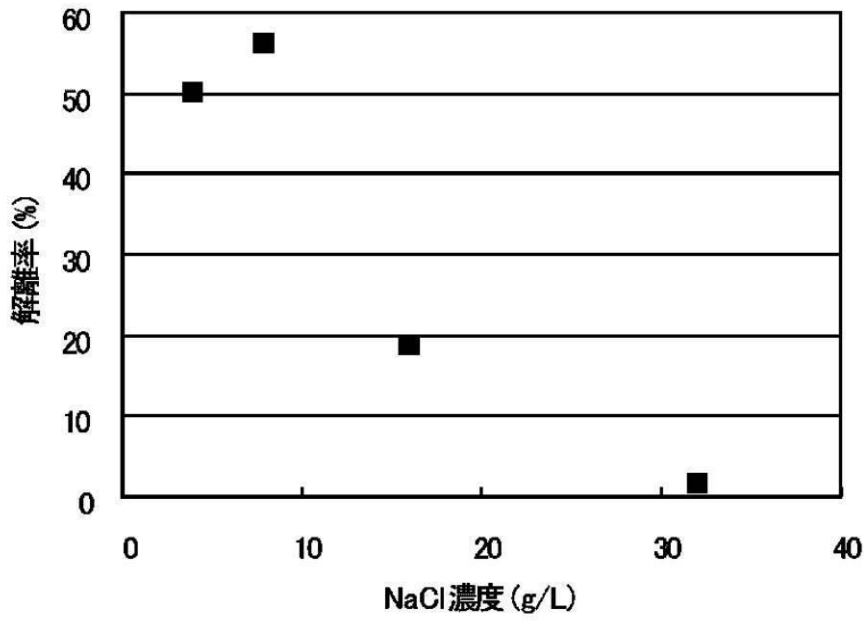
【 図 3 】



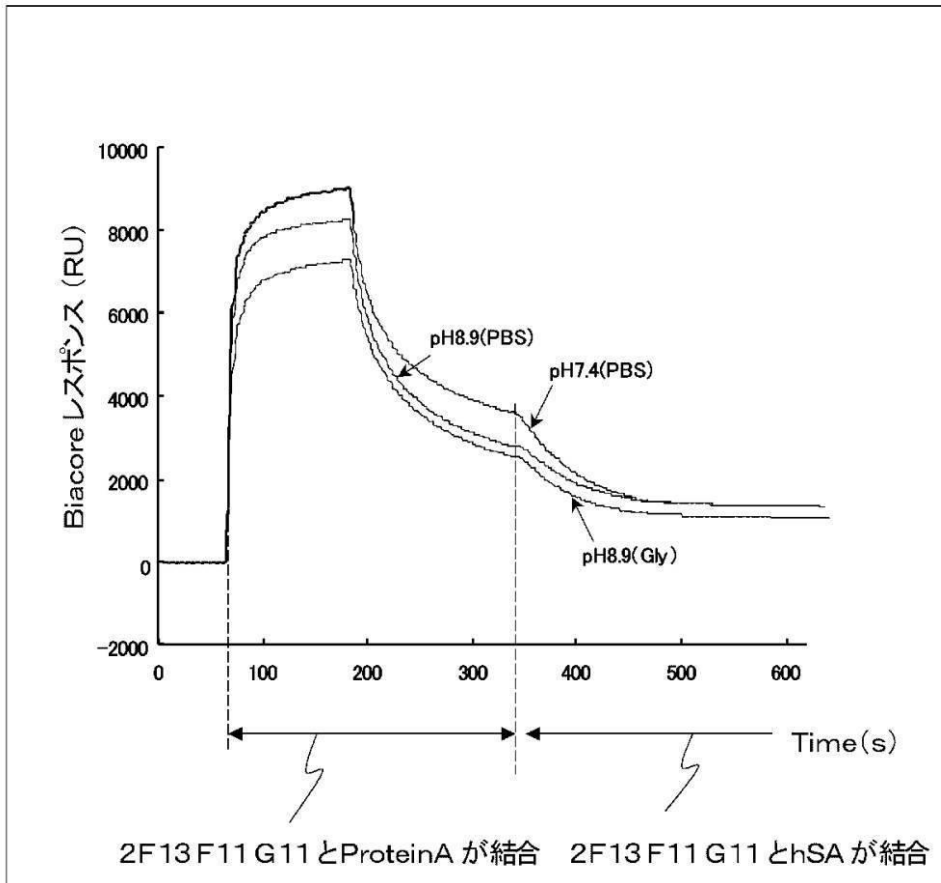
【 図 5 】



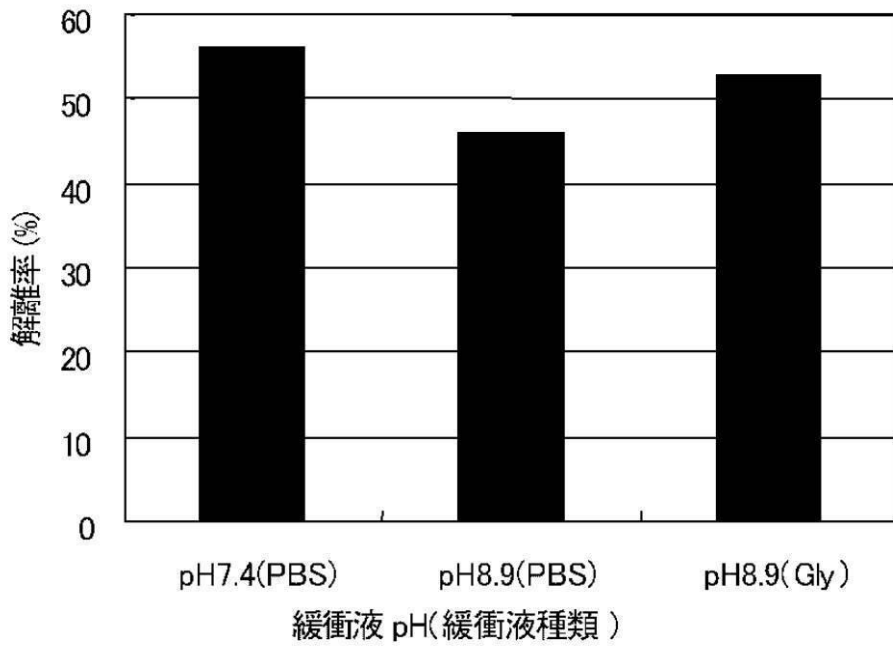
【 図 6 】



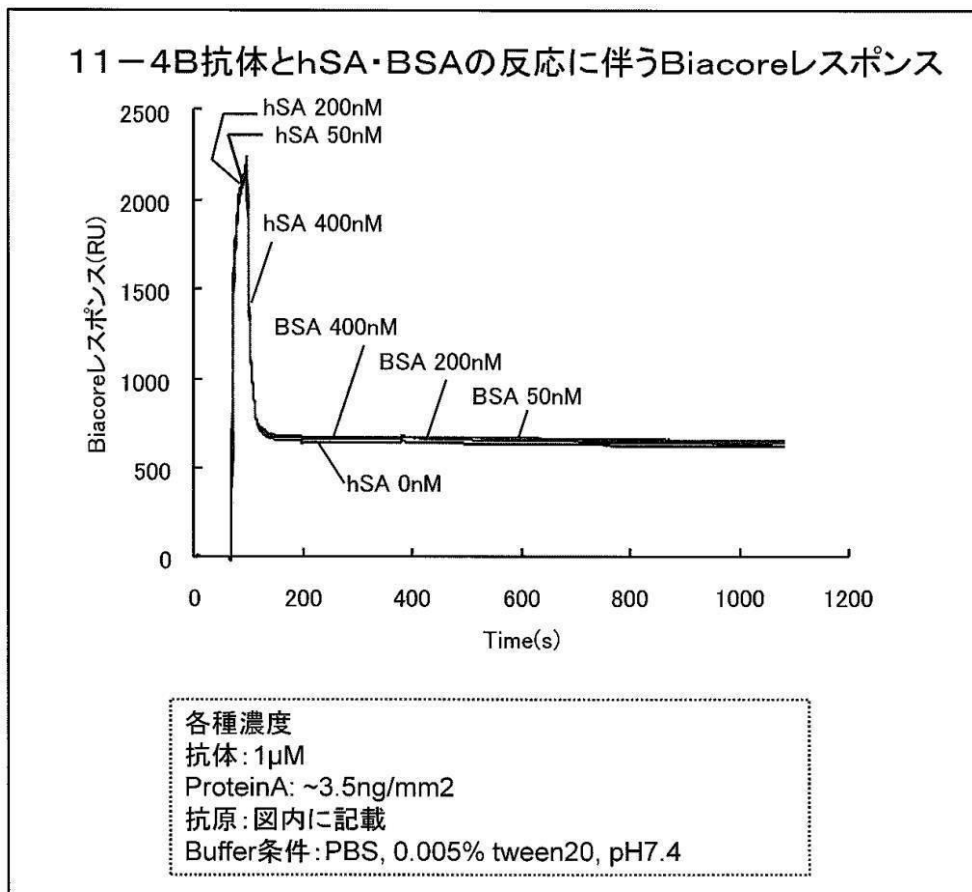
【 図 7 】



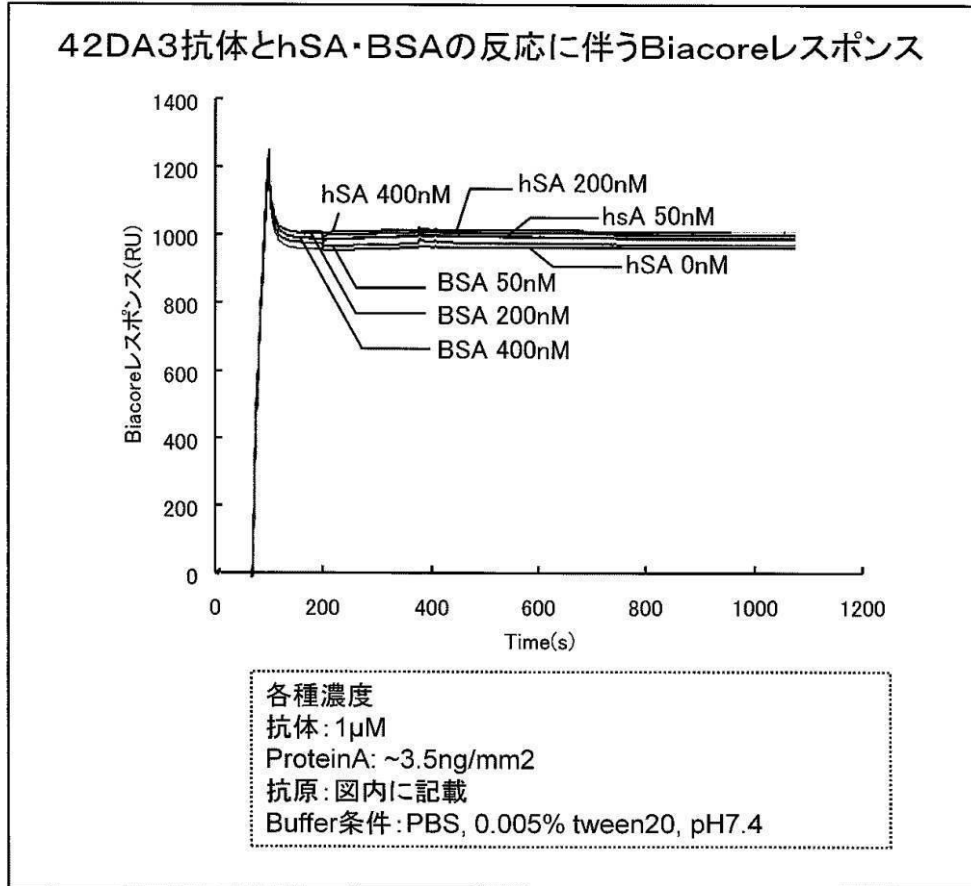
【 図 8 】



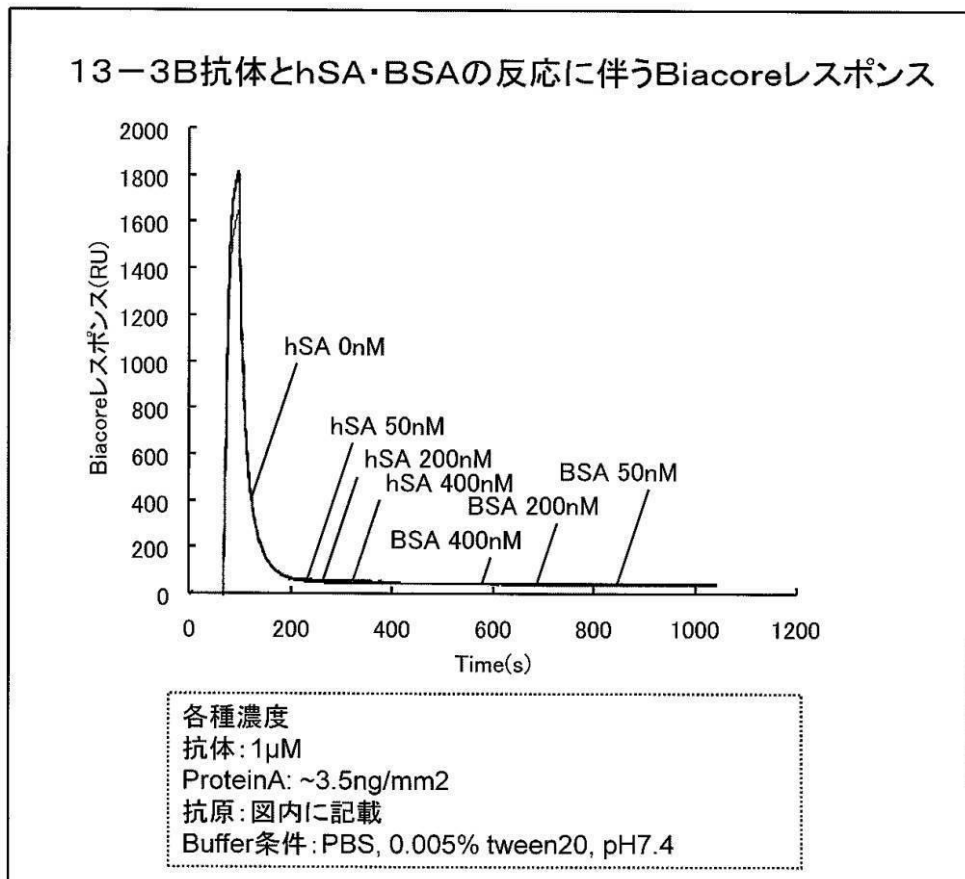
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



フロントページの続き

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開2009-20120(JP,A)
特開2007-225417(JP,A)
特開平05-273212(JP,A)
特開平02-73158(JP,A)
特開2009-240235(JP,A)
特開平07-63759(JP,A)
特表2009-539102(JP,A)
特表2004-537042(JP,A)
特開平05-149952(JP,A)
特開平03-185000(JP,A)
特開昭61-012631(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

专利名称(译)	免疫测定方法		
公开(公告)号	JP4783872B2	公开(公告)日	2011-09-28
申请号	JP2011514948	申请日	2010-11-22
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	若井純子 亀井明仁 村岡仁		
发明人	若井 純子 亀井 明仁 村岡 仁		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N2333/765		
FI分类号	G01N33/543.501.B G01N33/53.D G01N33/544.Z		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	PCT/JP2010/003573 2010-05-27 WO 2009267109 2009-11-25 JP		
其他公开文献	JPWO2011064981A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种免疫测定方法，其不需要两种或更多种抗体，减少了构建免疫测定系统所涉及的劳动，并且不仅能够应用于高分子量抗原，而且能够应用于低分子量抗原如半抗原。一种通过蛋白A从表面解离与底物表面结合的免疫球蛋白G抗体的方法，所述方法包括以下步骤 (A) 和 (B)：保藏号FERM BP提供具有表面的底物，所述表面由NO-10459的生产细胞系产生的免疫球蛋白G抗体通过蛋白A结合并含有人血清白蛋白，并且具有至少6且至多8.9的表面。提供在表面上具有pH，优选pH为7.4至8.9的溶液，并使免疫球蛋白G抗体与蛋白A (B) 解离。

