

(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2001 - 318098

(P2001 - 318098A)

(43)公開日 平成13年11月16日(2001.11.16)

(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 33/531			G 0 1 N 33/531	B
	33/53		33/53	N
	33/543	501	33/543	501 M
			501	B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 数)

(21)出願番号 特願2000 - 135400(P2000 - 135400)

(22)出願日 平成12年5月9日(2000.5.9)

(71)出願人 000237204

富士テレビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 小山石 好宏

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士テレビオ株式会社内

(72)発明者 山本 克彦

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士テレビオ株式会社内

(74)代理人 100067448

弁理士 下坂 スミ子 (外 1 名)

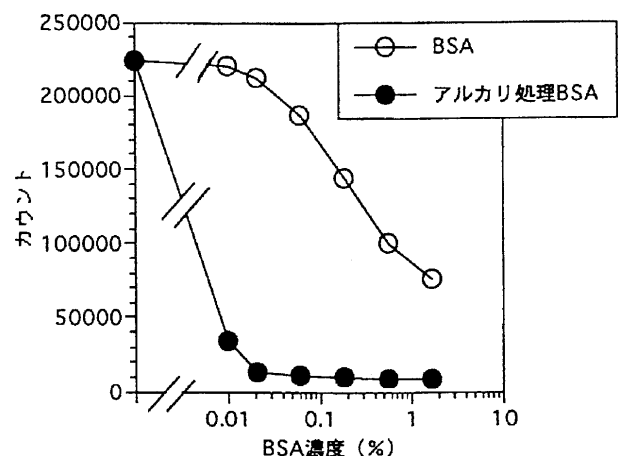
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルカリ処理したウシ血清アルブミンを用いた免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 従来、十分抑制することができなかった非特異反応を抑制することができる免疫測定方法の提供。

【解決手段】 検体中に存在する抗体の有無を検出するために標識した抗イムノグロブリン抗体を用いる測定系において、検体中の抗体と測定試薬との反応をアルカリ処理したウシ血清アルブミンの存在下行わせることにより、ウシ血清アルブミンで被覆された抗原結合固相を用いても十分抑制できなかった非特異反応を抑制することができる、改善された免疫測定方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体中に存在する抗体の有無を検出するために標識した抗イムノグロブリン抗体を用いる測定系において、検体中の抗体と測定試薬とをアルカリ処理したウシ血清アルブミンの存在下、反応させることを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 2】 測定試薬が抗原を固定化した固相である請求項 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 3】 検体中の抗体と測定試薬とを反応させた後、標識物質の検出を行うことを特徴とする請求項 1 乃至 2 に記載の免疫測定方法。

【請求項 4】 アルカリ処理が pH 7.5 ~ 9.5 の範囲で行われたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、検体中に存在する抗体の有無を検出するために標識した抗イムノグロブリン抗体を用いる測定系において、検体中の抗体と測定試薬とをアルカリ処理したウシ血清アルブミンの存在下、反応させることを特徴とする免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】検体中の抗体又は抗原の有無を測定する免疫測定方法は、疾患に感染したか否かを迅速に高感度に測定することができるため、疾患感染の診断において広く用いられている手法である。この分野においては、微量の検体から測定対象物質である抗体又は抗原を検出するためにさらに高感度な測定を行うことができるように現在でも種々の研究がなされている。その中でも、検体中に非特異反応を生じさせる物質が多種多様に存在することによる非特異反応を抑制するために、固相を用いる免疫測定においては、固相にウシ血清アルブミン（以下、BSA と称する。）を被覆させ、非特異反応の原因となる非特異物質が固相へ吸着することを阻害する技術は、効率のよい測定を行う上で極めて効果が高く、現在では、通常に用いられている。また、固相を BSA で被覆しても非特異反応が十分抑制できない場合もあり、非特異物質の影響をさらに少なくするため、反応溶液中にも BSA 等の蛋白質を熱処理後アシル化した物質（特表平 8-506907 号公報参照）等の吸収剤を添加する等、様々な改良が行われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記のような非特異反応を抑制した系であっても全ての非特異物質を吸収できるわけではなく、未だ非特異反応が生じ、測定結果を誤らせる原因となっている。特に、従来技術で記載したように固相を用いる測定系において、非特異反応を抑制するために固相を BSA で被覆する技術は、現在市販されている製品においても通常に用いられているものである。しかしながら、このような固相を B

SA で被覆することに起因する非特異反応も存在するため、これを原因として測定結果を誤らせてしまう場合がある。本発明は、このような原因に基づく非特異反応を効率よく抑制することにより、さらなる高感度な免疫測定方法を見いだすことを課題とした。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、検体中に存在する抗体の有無を検出するために標識した抗イムノグロブリン抗体を用いる測定系において、検体中の抗体と測定試薬とをアルカリ処理したウシ血清アルブミン（以下、アルカリ処理 BSA と称する。）の存在下、反応させることによって、従来十分抑制できなかった非特異反応を、効率よく抑制することができることを見出し本発明を完成した。

【0005】前記した課題は、BSA で固相を被覆することによって生じるものであるが、これは検体中に BSA に対する抗体が存在する場合があるため生じるものである。BSA で固相を被覆することによって、様々な蛋白質等の非特異物質が固相へ吸着することは抑制することができるが、BSA に対する抗体が存在する場合には、この抗体が固相へ結合してしまうのである。

【0006】これに起因し、標識した抗イムノグロブリン抗体を用いる測定において、該抗イムノグロブリン抗体は、固相に複合体を形成して結合している測定対象の抗体と固相を被覆した BSA に結合した非特異の原因となる抗体との両者と結合してしまうため、標識物の存在により測定結果を算出してもその中には測定対象以外の抗体に結合している標識物も含まれることとなり測定結果を誤ったものとしてしまうのである。

【0007】本発明は、このような欠点を改善した新たな免疫測定方法であり、前述した通り、検体中に存在する抗体の有無を検出するために標識した抗イムノグロブリン抗体を用いる測定系において、検体中の抗体と測定試薬とをアルカリ処理したウシ血清アルブミンの存在下、反応させることを特徴とする免疫測定方法である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、前記のように固相を BSA で被覆する場合であって、さらに標識抗体として抗イムノグロブリン抗体を用いる測定系で生じる問題を解決するものであるため該測定系に特に有用であるが、これに限定されるものではなく、その他の測定においても同様の問題が生じるのであれば用いることができる測定方法である。

【0009】本発明の免疫測定方法としては、サンドイッチ測定法、競争法等の公知の測定方法を用いることができる。また、固相としては、通常、この分野において用いられているもの、例えば、ポリスチレンビーズ、ラテックス粒子、磁性粒子等の微粒子であれば特に限定されずに用いることができ、この固相は非特異反応を抑制するため BSA で被覆処理されたものである。

【0010】抗イムノグロブリン抗体としては、例えば、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgG(Fab')抗体、抗ヒトIgG(Fab')₂抗体等を用いることができ、その標識物としては、酵素、発光物質、蛍光物質、放射性物質等の公知の標識物を用いることができる。

【0011】本発明の免疫測定においては、アルカリ処理BSAを存在させることを特徴とするが、アルカリ処理BSAはBSAにアルカリ性溶液を添加するか又はBSAを含有する溶液に塩基を添加することによるアルカリ性条件で処理することで得ることができる。原料となるBSAは、市販されている各種BSAを用いることができ、BSAは容易に入手可能なものである。

【0012】BSAのアルカリ処理に用いることができる塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基を挙げることができる。

【0013】アルカリ処理は、溶液をアルカリ条件にすることによって行われるが、特にpH7.5~9.5の範囲で行うことが好ましい。また、処理温度としては、40~75の範囲で行うことができるが、50~65であることが特に好ましい。さらに、塩基による処理時間は、30分間~6時間反応させることにより達成できる。

【0014】アルカリ処理後、不溶物を生じる場合には、ろ紙、ガラスフィルター等を用いてろ過し、不溶物を除去することが望ましい。また、アルカリ処理BSAはさらに、ゲルろ過法、透析法等を用いることによって精製することによって純度の高いものとすることができる。

【0015】このように製造されたアルカリ処理BSAは、免疫測定を行う反応溶液中に存在させるものであり、この時、反応溶液中のアルカリ処理BSA濃度が0.001~2%(W/V)の範囲となるように調製され、特に、非特異反応抑制効果の効率の観点から、0.02~0.2%(W/V)に調製されることが好ましい。アルカリ処理BSAは、反応溶液中に添加することにより存在させることもでき、また、抗原結合固相溶液、検体希釈液、添加剤溶液等の少なくとも一つに加えておき、反応の際に上記濃度となるように予め調製しておいてもよい。

【0016】本発明の測定検体としては、抗BSA抗体が存在する血液、血清、血漿等の目的物質を含有していると疑われるものを用いることができる。

【0017】測定操作の概要を、2ステップサンドイッチ法を例として下記に示す。本発明の測定方法は、まず、測定対象物質の抗体を含有すると思われる検体とBSAで被覆した抗原結合固相とをアルカリ処理BSAの存在下反応させ、固相を洗浄して未反応物質を除去し、固相に結合した抗体と標識抗イムノグロブリン抗体とを

反応させ、さらに固相を洗浄して未反応の標識抗イムノグロブリン抗体を除去した後、固相に結合した標識物質を測定することによって測定対象物質である抗体の存在を検出することができる測定方法である。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、参考例及び実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】参考例1：アルカリ処理BSAの作製
50mMトリス緩衝液(pH7.2)にBSAを100mg/mlとなるように溶解した。この溶液9容量に0.25M水酸化ナトリウム溶液1容量を加え、pH8.3に調整し65で30分間加熱した。この溶液を冷却後、0.45μmメンブレンフィルター(ミリポア社製)を用いてろ過した。得られたアルカリ処理BSAは分子量100Kd以上に分布していた。

【0020】参考例2：HIV抗原結合フェライト粒子の作製

特開平3-115762号に記載されたフェライト粒子を2%(w/v)BSA、4%(v/v)NRS、0.1MNaCl、0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)に分散し、更にHIV-1gp41抗原、HIV-2gp36抗原及びHIV-1p24抗原を添加して、37で一晩攪拌した。反応後、フェライト粒子を磁力で集め、粒子を洗浄液で洗浄してHIV抗原結合フェライト粒子を得た。

【0021】実施例1：非特異検体の測定

参考例2で作製したHIV抗原結合フェライト粒子と検体の血清とを反応させ、洗浄後にアルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体で検出するルミバルスHIV-1/2抗体測定試薬(富士レビオ社製)を用いて測定したところ、カットオフインデックス(C.O.I.)が3.0となる非特異反応検体が存在した。尚、C.O.I.はある検体の測定値をカットオフ値で割った値であり、1.0以上を陽性、1.0未満を陰性と判断する抗体測定における指標である。

【0022】更に、参考例2で作製したHIV抗原結合フェライト粒子懸濁液(トリス-塩酸緩衝液、pH7.2)250μlに50μlの0%、0.064%、0.128%、1.22%、3.58%、10.7%(W/V)のBSA溶液又はアルカリ処理BSA溶液を添加し、上記非特異反応検体を以下のように測定した。調製した粒子懸濁液に検体希釈液(トリス-塩酸緩衝液、pH7.2)で1:10に希釈した検体20μlを加えて反応溶液のBSA又はアルカリ処理BSAの最終濃度が、0%、0.01%、0.02%、0.19%、0.56%、1.67%となるよう混合し、攪拌後37で10分間反応させた。粒子懸濁液から粒子を磁石により集磁し上清を除去した後、粒子を洗浄液(トリス-塩酸緩衝液)にて3回洗浄した。洗浄後の粒子に0.2μg/mlのアルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体

溶液を250 μ l混合し、攪拌後37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。再び粒子懸濁液から粒子を磁石により集磁し上清を除去した後、粒子を洗浄液にて3回洗浄した。この粒子にアルカリホスファターゼの化学発光基質である3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩(AMPPD)溶液を200 μ l混合し、攪拌後37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させた。反応後の化学発光量をルミノメーターで測定した。なお、これら一連の免疫反応、酵素反応、化学発光量測定は全自動化学発光酵素免疫測定装置ルミパルス1200(富士レリオ社製)にて行った。その結果を図1に示す。

【0023】図1の結果から非特異反応検体の測定シグナルはBSAの添加により容量依存的に減少した。1.67%BSAにおいて0%濃度に比べて約1/3まで低下が見られている。一方、アルカリ処理BSAにおいては0.02%アルカリ処理BSAですでに0%濃度の約5%まで低下しており、それ以上の濃度でもさらに低下が見られ、1.67%では0濃度の3.7%まで低下していた。すなわち、アルカリ処理BSAではBSAの最*

*低でも1/16以下の濃度で同等以上の効果を示していることとなる。

【0024】参考例3: TP、HIV-1/2、HCV抗原結合粒子の調製

TP抗原結合粒子についてはウサギ鞣丸にて培養された菌体抽出成分抗原を、HIV-1/2抗原結合粒子についてはリコンビナント抗原であるHIV-1gp41、HIV-2gp36、HIV-1p24抗原を、HCVについてはリコンビナント抗原であるc25、c33c、NS5抗原をそれぞれフェライト粒子に結合し、ポストコート後、0.01~0.015%濃度になるように懸濁液を加えて粒子を調製した。この懸濁液中に0.2%BSAを添加したものと、同様に0.2%アルカリ処理BSAを添加したものとを調製した。

【0025】実施例2: 非特異反応検体の測定
実施例1の非特異反応検体を同じく実施例1に示した方法で、参考例3の粒子を用いて測定した。その結果を表1に示す。

【0026】

【表1】

測定項目	検 体	シグナル(カウント)	
		BSA	アルカリ処理BSA
TP抗体	標準陽性検体	154,828	155,857
	非特異検体	105,556	13,658
	C. O. I.	3.0	0.4
HIV-1/2抗体	標準陽性検体	249,981	248,665
	非特異検体	199,664	12,600
	C. O. I.	2.9	0.2
HCV抗体	標準陽性検体	110,889	113,993
	非特異検体	72,050	17,442
	C. O. I.	2.3	0.5

【0027】表1に示すようにTP、HIV-1/2、HCV抗体測定系においてBSAの代わりにアルカリ処理BSAを使用することで測定シグナル、ならびにC. 50

O. I. が低下して、その結果陽性判定であった非特異反応検体(偽陽性検体)が陰性判定となった。また、このとき同時に測定した陽性標準検体の測定シグナルに二

者間の差は見られなく、陽性検体には影響を与えず、非特異反応を起こす偽陽性検体のシグナルのみを低下させることがわかった。

【0028】

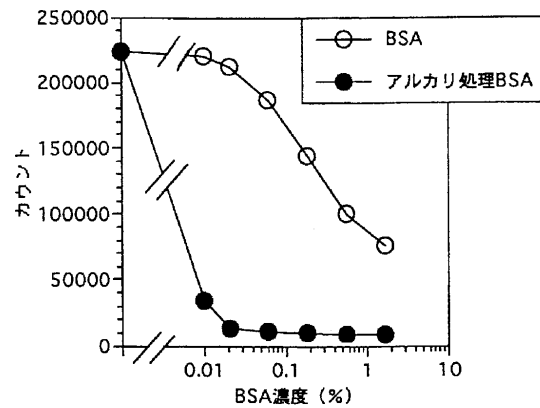
【発明の効果】本発明は、反応の溶液中に添加されるアルカリ処理BSAによって、固相への非特異反応による抗体結合を低減することができるため、検体に含まれる

測定対象物質の抗体だけを正確に測定することができる。殊に、測定対象物質が低濃度の検体にあってはその効果が大きい。

【図面の簡単な説明】

【図1】 濃度を変えてアルカリ処理BSA又はBSAを添加し、HIV-1/2抗体測定が発光量のシグナルを測定した結果を比較した図である。

【図1】



专利名称(译)	使用碱处理的牛血清白蛋白进行免疫测定		
公开(公告)号	JP2001318098A	公开(公告)日	2001-11-16
申请号	JP2000135400	申请日	2000-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	小山石好宏 山本克彦 西菌功		
发明人	小山石 好宏 山本 克彦 西菌 功		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.N G01N33/543.501.M G01N33/543.501.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够抑制常规无法充分抑制的非特异性反应的免疫测定方法。在使用标记的抗免疫球蛋白抗体检测样品中是否存在抗体的测量系统中，样品中的抗体与测量试剂之间的反应是在碱性处理的牛血清白蛋白的存在下进行的。通过这样做，改进的免疫测定方法能够抑制即使通过使用涂有牛血清白蛋白的抗原结合固相也不能充分抑制的非特异性反应。

