

(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2004-163332

(P2004-163332A)

(43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

F I

GO 1 N 33/53

J

GO 1 N 33/53

G

GO 1 N 33/53

Q

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願2002-331428 (P2002-331428)

(22) 出願日

平成14年11月14日 (2002.11.14)

(71) 出願人 391030963

清水製薬株式会社

静岡県静岡市清水宮加三235番地

(72) 発明者 井坂 光良

静岡県清水市川原町16番8号

(54) 【発明の名称】 低分子物質に対する被分析物中特異的抗体の酵素免疫的な測定方法

(57) 【要約】

【目的】本発明は、抗体量を測定する非競合法の酵素免疫測定法において、低分子物質に対する特異的抗体を簡便かつ迅速、高感度に、環境衛生上の問題なく、検出する酵素免疫的測定方法を提供する。

【構成】低分子物質に対する特異的抗体を低分子物質が直接結合した固相を利用して固定化した後に、一旦洗浄して固定化低分子物質 - 低分子物質に対する特異的抗体結合物を低分子物質に対する特異的抗体を含む試料と分離後、残存した固定化抗原量を測定する事により抗体量を算出できる。これを、アナフィラキシーショックを誘発する可能性のある医薬品に適用した場合に、適時に危険性を予測する有用な手段となり得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

低分子物質に対する特異的抗体を含む試料と、低分子物質に対する特異的抗体と低分子物質を固体担体に固定させた固定化抗原とを反応させる第 1 工程、第 1 工程で生じた固定化低分子物質 - 低分子物質に対する特異的抗体結合物を、低分子物質に対する特異的抗体を含む試料と分離し、結合物を洗浄する第 2 工程、第 2 工程で生じた残存固定化抗原を、固定化抗原と特異的に反応する標識化抗体と反応させる第 3 工程、および、固定化担体に固定された結合物を、結合物中に含まれる標識を利用して検出する第 4 工程、を含むことを特徴とする免疫測定法。

【請求項 2】

固定化抗原として低分子物質（分子量 1000 未満）を用いることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定法。

【請求項 3】

D ガラクトシダーゼ等を用い、検出に際しエンハンサーとして 4 - メチルウンベリフェニル - D - ガラクトピラノキシド等を用いた化学発色法であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫測定法に関する。さらに詳しくは、低分子物質に対する特異的抗体を固相化抗原に結合させ、次にその結合物を認識する酵素標識物を反応させて、形成された結合物中の酵素標識量を測ることにより抗体量を算出する方法において、測定対象抗体量を正確に算出する方法に関する。

【0002】

【従来技術】生体成分の微量測定法として、免疫測定法は複雑な組成の混合物の中から免疫反応で特異的に選別できることから、通常定量法に必要な対象物を試料から分離する前処理が不要であり、しかも高感度・高精度に定量できる特徴を持つ。また免疫測定法のうち、酵素標識を特徴とする酵素免疫測定法は、放射性同位元素を用いる放射免疫測定法に比べて廉価で危険な廃棄物を伴わず、測定の感度と精度の面で遜色ないことから汎用されている。

【0003】この酵素免疫測定法で抗体量を測定する場合（ここでいう抗体とは抗原特異的抗体である）、競合法または非競合法による各種の方法が開発され利用されている。即ち競合法とは、固相化抗原と特異的に反応する標識抗体の結合に対する試料中の抗体の競合様式より抗体量を算出する方法である。一方、非競合法とは、まず試料中の抗体を固相化抗原に結合させ、次にその結合物を認識する酵素標識物を認識させて、形成された結合物中の酵素標識量を測ることにより抗体量を算出することができる。酵素標識物としては、ヒト抗体を認識する抗体や固相化に使用したのと同じ抗原が利用されている。

【0004】医薬品の多くは分子量 1000 未満の低分子物質である。また、医薬品の重篤な副作用の一つに、アナフィラキシーショックがある。アナフィラキシーショックの成因を正確に説明するまでに至っていないが、C o o m s & G e l l のアレルギーの分類では、I 型アレルギーに属すると考えられている。I 型アレルギーは、抗原暴露後に抗原特異的 I g E 抗体が B 細胞で産生されることから始まる。この I g E が種々の免疫細胞を刺激してヒスタミン等のケミカルメディエーターを遊離させ、生体内で好ましくない反応を引き起こすのである。従って、医薬品によるアナフィラキシーショックの誘発性は特異的 I g E との関連性が否定できない。このため、医療現場において、特に繰り返し患者に投薬される医薬品については、使用前に特異的 I g E 抗体価を測定することによりアナフィラキシーショックを誘発する可能性を事前に予測することは、安全な医薬品の使用という観点から非常に重要である。

【0005】低分子物質に対する特異的抗体の検出法としては、E I A 法の変法が使用される場合がある。この方法は、低分子物質とアルブミン等の生体高分子物質等を結合させハプテン化させたものを固相化したのち、測定対象試料と反応させたのち、非特異的な反

10

20

30

40

50

応を除去するために洗浄を行い、I g Eと結合する標識抗体と反応させたのち、結合物中に含まれる標識を利用して抗体価を測定する方法である。この方法は、測定時間および検出感度の問題があり、アナフィラキシーショックの予測には不便であった。

【0006】

【特許文献1】

特開昭59-94067号公報

【特許文献2】

特開平7-12817号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、抗体量を測定する非競合法の酵素免疫測定法において、低分子物質に対する特異的抗体を簡便かつ迅速、高感度に、環境衛生上の問題なく、検出する方法を提供するものである。

10

【0008】

【課題を解決するための手段】前記の目的は、以下の本発明により達成できる。すなわち本発明は、抗体量を測定する非競合法の酵素免疫測定法において、低分子物質に対する特異的抗体を低分子物質が直接結合した固相を利用して固定化した後に、一旦洗浄して固定化低分子物質-低分子物質に対する特異的抗体結合物を低分子物質に対する特異的抗体を含む試料と分離後、残存した固定化抗原量を測定する事により抗体量を算出する。

【0009】

具体的には、

20

(1) 低分子物質に対する特異的抗体を含む試料と、低分子物質に対する特異的抗体と低分子物質を固体担体に固定させた固定化抗原とを反応させる第1工程、第1工程で生じた固定化低分子物質-低分子物質に対する特異的抗体結合物を、低分子物質に対する特異的抗体を含む試料と分離し、結合物を洗浄する第2工程、第2工程で生じた残存固定化抗原を、固定化抗原と特異的に反応する標識化抗体と反応させる第3工程、および、固定化担体に固定された結合物を、結合物中に含まれる標識を利用して検出する第4工程、を含むことを特徴とする免疫測定法。

(2) 固定化抗原として低分子物質(分子量1000未満)を用いることを特徴とする(1)項の免疫測定法。

(3) Dガラクトシダーゼ等を用い、検出に際しエンハンサーとして4-メチルウンベリフェニル-D-ガラクトピラノキシド等を用いた化学発色法であることを特徴とする(1)項の免疫測定法。

30

である。

【0010】本発明によって測定される低分子量に対する特異的抗体は、アナフィラキシーショックを誘発することが知られているアスピリンなどの消炎鎮痛薬、ペニシリンなどの抗生物質、トランキライザー、インドシアニグリーン(ICG)、静脈用麻酔薬、筋弛緩薬、消毒薬、抗凝固薬(例;ナファモスタット、アルガトロバンなど)、医薬品添加物などの、ヒトへの低分子物質に対する特異的抗体を例示できるが、ヒト以外の各種動物あるいはヒトにおける感染症以外のアナフィラキシーショックの誘発性を予測するための各種抗体検査にも利用できる。

40

【0011】本発明において使用する固定化用の抗原となる低分子物質は、分子量1000未満のもので、臨床使用においてアナフィラキシーショックを誘発する危険性が僅かでもあれば、特に限定されるものではない。

【0012】本発明において使用する固定化担体としては、抗原を固定化できるものであればいかなる形態の担体でも利用可能であり、例えば抗原を物理的に吸着可能なポリスチレン製のプレート・チューブ・ビーズ・チップあるいは抗原固定化用の適当な官能基を有するガラス・磁性担体や膜などを利用することができる。

【0013】低分子物質に対する特異的抗体と特異的に反応する標識化抗体として使用される抗体は、ヒトI g Eと特異的に結合するものであればよく、Dガラクトシダーゼ標識マウス抗ヒトI g Eモノクローナル抗体等が好適に使用できる。

50

【0014】標識化抗体の標識として使用される酵素は、Dガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、各種のルシフェラーゼなどが挙げられる。標識の酵素活性を検出する手段としては、測定機器の特性によって適宜選択され、比色法・蛍光法・発光法などが利用できる。標識化抗体の標識としては、酵素以外にも発光物質・発光蛋白質や蛍光物質を利用する事が可能である。

【0015】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

[試験例]カルボキシル基を有するポリスチレン系親水性ポリマーとナファモスタットを、スミロンELISAカルボタイプ(住友ベークライト株式会社)の試薬、すなわち水溶性カルボジイミドとビオチンヒドラジドを用いて結合させるために37℃で2時間反応させ、固相化抗原を作製し、これを患者血清との反応に使用する200μL容量の円筒状容器(以下、反応容器)に充填する。以後、体外診断用医薬品 ユニキャップ特異IgE(ファルマシア株式会社)の試薬を用いて、ナファモスタット特異的IgE抗体価の測定を行う。すなわち、反応容器をモノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン-リン酸二カリウム混合溶液(以下、洗浄液)で洗浄したのち、患者血清40μLを反応容器に加え、37℃で30分間インキュベートし、その後、反応容器を洗浄液で洗浄し、Dガラクトシダーゼ標識マウス抗ヒトIgEモノクローナル抗体(1μg/mL)50μLを反応容器に加えて、37℃で24分間インキュベートする。再度、反応容器を洗浄液で洗浄したのち、基質液(4-メチルウンベリフェニル-D-ガラクトピラノキシド)を反応容器に加えて、37℃で9分間インキュベートし、この反応を炭酸ナトリウム溶液で停止、溶出させて、この溶出液の蛍光強度をUnicap1000(ファルマシア株式会社)を用いて測定波長445nmで検出する。ナファモスタット特異的IgE抗体価は、同様の操作でWHOのIgE標準品(75/502)を測定して得られた検量線に基づいて算出し、従前のEIA法の変法に対して10倍以上の高感度の良好な結果を得ることが出来る。さらに、以上の操作は、血清入手後3時間以内にナファモスタット特異的IgE抗体価の測定が可能となり、EIA法の変法での測定時間(2日)と比較して迅速で、医療現場においてアナフィラキシーショック誘発性を適時に予測するのに有用な手段となり得ることが明らかである。

【0016】

【発明の効果】以上、詳述したように、本発明の免疫測定法によって、低分子物質に対する抗体価を、簡便かつ迅速、高感度に、環境衛生上の問題なく、測定対象抗体を検出する方法が提供され、これにより低分子物質を薬剤として使用する際に適時にアナフィラキシーショックの誘発性を予測する手段として有効である。

专利名称(译)	低分子量物质分析物中特异性抗体的酶免疫分析		
公开(公告)号	JP2004163332A	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2002331428	申请日	2002-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	清水制药株式会社		
申请(专利权)人(译)	清水药业有限公司		
[标]发明人	井坂光良		
发明人	井坂 光良		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.J G01N33/53.G G01N33/53.Q		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[目的] 本发明提供一种用于测定抗体量的非竞争性酶免疫测定法，该酶免疫测定法用于简单，快速，高灵敏度且无环境健康问题地检测针对低分子量物质的特异性抗体的酶免疫测定。提供一种测量方法。[结构]使用直接结合有低分子物质的固相固定针对低分子物质的特异性抗体，然后洗涤并固定。抗体的量可以通过测量从含有针对分子物质的特异性抗体的样品中分离后剩余的固定化抗原的量来计算。当将其应用于可能引起过敏性休克的药物时，这可能是用于及时预测风险的有用工具。