

(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2018-173334

(P2018-173334A)

(43) 公開日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)		GO 1 N 33/531		B
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543		5 8 1 D

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2017-71377 (P2017-71377)	(71) 出願人	391025811 株式会社シマ研究所 東京都板橋区前野町一丁目16番4号
(22) 出願日	平成29年3月31日 (2017.3.31)	(74) 代理人	110001999 特許業務法人はなぶさ特許商標事務所
		(72) 発明者	橋本 健太郎 東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内
		(72) 発明者	浅川 裕美 東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内
		(72) 発明者	野中 和彦 東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法及びそれに用いる試薬キット

(57) 【要約】

【課題】 免疫学的測定方法及びそれに用いる試薬キットを提供する。

【解決手段】 検体を第1試薬と混合する第1工程と、該第1工程で得られた混合液を第2試薬と混合する第2工程とを含む、前記検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法であって、

前記第1試薬は、前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する第1粒子を含み、前記第2試薬は、第2粒子を含み、該第2粒子は、前記抗原が有するエピトープの2つ以上を捕捉する粒子であるか又は前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する粒子の2種以上の混合物であって、各種の粒子は、前記抗原の異なるエピトープを捕捉する粒子であることを特徴とする測定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体を第 1 試薬と混合する第 1 工程と、該第 1 工程で得られた混合液を第 2 試薬と混合する第 2 工程とを含む、前記検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法であって、

前記第 1 試薬は、前記抗原が有するエピトープの 1 つを捕捉する第 1 粒子を含み、前記第 2 試薬は、第 2 粒子を含み、該第 2 粒子は、前記抗原が有するエピトープの 2 つ以上を捕捉する粒子であるか又は前記抗原が有するエピトープの 1 つを捕捉する粒子の 2 種以上の混合物であって、各種の粒子が、前記抗原の異なるエピトープを捕捉する粒子であることを特徴とする測定方法。

10

【請求項 2】

前記第 1 粒子は、前記抗原が有するエピトープの 1 つに親和性を有するポリクローナル抗体を担持した粒子である請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】

前記第 1 粒子は、前記抗原が有するエピトープの 1 つに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子である請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 4】

前記第 2 粒子は、前記抗原が有するエピトープの 2 つ以上に親和性を有するポリクローナル抗体を担持した粒子である請求項 1 乃至請求項 3 の何れか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 5】

前記第 2 粒子は、前記抗原が有するエピトープの 1 つに親和性を有するモノクローナル抗体の 2 種以上を担持した粒子であって、各種のモノクローナル抗体は、前記抗原の異なるエピトープに親和性を有する抗体である請求項 1 乃至請求項 3 の何れか 1 項に記載の測定方法。

20

【請求項 6】

前記第 2 粒子は、前記抗原が有するエピトープの 1 つに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子の 2 種以上の混合物であって、各種の粒子は、前記抗原の異なるエピトープに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子である請求項 1 乃至請求項 3 の何れか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 7】

検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法に用いるための、第 1 試薬と第 2 試薬とを含む免疫測定用試薬キットであって、

前記第 1 試薬は、請求項 2 又は請求項 3 に記載の第 1 粒子を含み、前記第 2 試薬は、請求項 4 乃至請求項 6 の何れか 1 項に記載の第 2 粒子を含むことを特徴とする免疫測定用試薬キット。

30

【請求項 8】

更に、抗体を担持した粒子を含まない第 3 試薬を含む、請求項 7 記載の免疫測定用試薬キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

40

【0001】

本発明は、免疫学的測定方法及びそれに用いる試薬キットに関するものであり、詳細には、担体凝集免疫測定法において、抗原に対する高い反応性を有し、それにより、高感度の測定を可能とする免疫学的測定方法及びそれに用いる試薬キットに関する。

【背景技術】**【0002】**

担体凝集免疫測定法の中でも、ラテックス凝集免疫測定法は生化学自動分析装置を適用することで汎用化され、広く多くの臨床検査項目の測定に利用されている。

ここで、標準的なラテックス凝集免疫測定法は、緩衝液を主成分とする第 1 試薬 (R 1) を反応用セルに加え、これに被験検体 (S) を加えて混合し一定時間静置し、次いでこ

50

の混液に、標的とする抗原分子を認識する抗体を担持したラテックス粒子を主成分とする、第2試薬(R2)を加えて混合し、一定時間静置する過程での吸光度(濁度)変化量を光学的に測定するものである。

【0003】

上記のような生化学自動分析装置を適用するラテックス凝集免疫測定法は、短時間に多量の検体を測定できることから、大学病院などの大規模病院の中央検査室や受託臨床検査機関における利用頻度が高い。

しかしながら、ラテックス凝集免疫測定法の検出感度は、一般的な蛋白質抗原にあっては、1.0 ng/mL程度であるため、より希薄な抗原の濃度の検体の測定には限界があり、該測定法によりカバーしきれない項目の測定には化学発光酵素免疫測定法(CLIA)などの専用の機器・試薬を利用する必要がある。

10

【0004】

ここで、生化学自動分析装置用のラテックス凝集免疫測定法用の免疫測定法試薬キットの構成は、通常、第1試薬(R1)と第2試薬(R2)とからなっており、第1試薬の主成分は緩衝液であり、第2試薬の主成分は、測定対象物(抗原分子)を認識する抗体を担持したラテックス粒子である。第1試薬の主な役割は検体間の違いを補正して(非特異反応の中和も含む)反応を均質化することと、増感剤による検出感度の増強である。一方、第2試薬の役割は、ラテックス粒子に固定された抗体を、測定対象(抗原分子)と反応させることで、被検検体中に存在する抗原分子数(濃度)に応じたラテックス粒子の凝集塊を形成させ、濃度依存的な吸光度(濁度)変化を惹起させることである。

20

【0005】

これまで、生化学自動分析装置を適用するラテックス凝集免疫測定法を高感度化するための提案が幾つかなされている。例えば、特開2001-091516号公報(特許文献1)は、ヒトα-フェトプロテイン(AFP)の高感度で迅速な定量法として、ヒトα-フェトプロテイン抗体のFc部分を取り除き、F(ab')₂のみとした抗体を担持したラテックス粒子を用いるAFPの定量法を提案しており、また、特開2003-294753号公報(特許文献2)は、特にラテックス凝集法において高い測定感度及び定量性を実現することができる免疫測定法として、少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を用いる免疫測定法を提案している。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2001-091516号公報

【特許文献2】特開2003-294753号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、特許文献1、2に記載の方法は、残念ながら、生化学自動分析装置を適用するラテックス凝集免疫測定法を高感度化するという目的を十分に達成しているとは言えない。

40

従って、本発明の課題は、担体凝集免疫測定法において、抗原に対する高い反応性を有し、それにより高感度の測定を可能とする免疫学的測定方法及びそれに用いる試薬キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、検体に第1試薬及び抗体担持粒子を含む第2試薬を順次添加混合する担体凝集免疫測定方法において、第1試薬に抗原が有するエピトープの1つを捕捉する粒子を添加すると、第2試薬を加えて混合した際に、該第2試薬に含まれる抗体担持粒子は、抗原との高い反応性を示し、検体中の抗原の濃度が希薄であっても凝集し、結果として、高感度で抗原が測定できることを見出し

50

、本発明を完成させた。

【0009】

即ち、本発明は、

[1] 検体を第1試薬と混合する第1工程と、該第1工程で得られた混合液を第2試薬と混合する第2工程とを含む、前記検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法であって、

前記第1試薬は、前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する第1粒子を含み、前記第2試薬は、第2粒子を含み、該第2粒子は、前記抗原が有するエピトープの2つ以上を捕捉する粒子であるか又は前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する粒子の2種以上の混合物であって、各種の粒子は、前記抗原の異なるエピトープを捕捉する粒子であることを特徴とする測定方法、

[2] 前記第1粒子は、前記抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するポリクローナル抗体を担持した粒子である前記[1]記載の測定方法、

[3] 前記第1粒子は、前記抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子である前記[1]記載の測定方法、

[4] 前記第2粒子は、前記抗原が有するエピトープの2つ以上に親和性を有するポリクローナル抗体を担持した粒子である前記[1]乃至前記[3]の何れか1つに記載の測定方法、

[5] 前記第2粒子は、前記抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するモノクローナル抗体の2種以上を担持した粒子であって、各種のモノクローナル抗体は、前記抗原の異なるエピトープに親和性を有する抗体である前記[1]乃至前記[3]の何れか1つに記載の測定方法、

[6] 前記第2粒子は、前記抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子の2種以上の混合物であって、各種の粒子は、前記抗原の異なるエピトープに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子である前記[1]乃至前記[3]の何れか1つに記載の測定方法、

[7] 検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法に用いるための、第1試薬と第2試薬とを含む免疫測定用試薬キットであって、

前記第1試薬は、前記[2]又は前記[3]に記載の第1粒子を含み、前記第2試薬は、前記[4]乃至前記[6]の何れか1つに記載の第2粒子を含むことを特徴とする免疫測定用試薬キット、

[8] 更に、抗体を担持した粒子を含まない第3試薬を含む、前記[7]記載の免疫測定用試薬キット

に関するものである。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、担体凝集免疫測定法において、抗原に対する高い反応性を有し、それにより高感度の測定を可能とする免疫学的測定方法が提供される。

また、本発明は、上記の高感度の免疫学的測定方法に用いる試薬キットも提供する。

尚、第1試薬に抗原が有するエピトープの1つを捕捉する粒子を添加することにより、第2試薬に含まれる抗体担持粒子が抗原と高い反応性を示して、検体中の抗原の濃度が希薄であっても凝集する理由に関しては必ずしも明らかではないが、第1試薬に含まれる粒子が抗原のエピトープの1つを捕捉することにより、抗原の他のエピトープが第1試薬に含まれる粒子の表面方向に提示され、それにより、第2試薬に含まれる抗体担持粒子が、提示されたエピトープを効率よく捕捉できるようになり、結果として、検体中の抗原の濃度が希薄であっても抗原と高い反応性を示したことが考えられる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

更に詳細に本発明を説明する。

本発明は、検体を第1試薬と混合する第1工程と、該第1工程で得られた混合液を第2

10

20

30

40

50

試薬と混合する第2工程とを含む、前記検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法であって、

前記第1試薬は、前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する第1粒子を含み、前記第2試薬は、第2粒子を含み、該第2粒子は、前記抗原が有するエピトープの2つ以上を捕捉する粒子であるか又は前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する粒子の2種以上の混合物であって、各種の粒子は、前記抗原の異なるエピトープを捕捉する粒子であることを特徴とする測定方法に関する。

尚、本発明におけるエピトープは、抗原（抗原分子）の抗原決定基を意図するが、抗原決定基が明確でない小さな分子に関しては、該分子が有するアミノ酸配列の1部分のアミノ酸配列を意図する。

【0012】

検体に含まれ得る抗原（抗原分子）としては、特に限定されず、一般に抗原抗体反応を利用して測定し得る生理活性物質及び病原体（ウイルス、細菌等）の抗原の全てが挙げられる。具体的には、生理活性物質としては生体内に存在する各種生体内レセプター、酵素、血中タンパクなどが挙げられる。具体的な生理活性物質としては、例えば、ミオグロビン、D-ダイマー、 α -フェトプロテイン等が挙げられる。具体的な病原体の抗原としては、例えば、フィラリア抗原、B型肝炎ウイルス抗原、C型肝炎ウイルス抗原、梅毒菌由来抗原、HBS抗原、HCV抗原、HIV抗原、ATLA抗原、クラミジア抗原、ヘルペス抗原、ヘリコバクター・ピロリ抗原等が挙げられる。

【0013】

本発明に使用し得る第1試薬は、上記の抗原が有するエピトープの1つを捕捉する第1粒子を含む。

第1粒子は、抗原が有するエピトープの1つしか捕捉しないため、抗原との混合によりエピトープを捕捉した際にも、粒子の凝集は惹起されない。

【0014】

第1粒子は、抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するポリクローナル抗体を担持した粒子であり得る。

上記の様なポリクローナル抗体は、例えば、エピトープマッピング分析の結果から特定のエピトープに対応するペプチド抗原を設計・合成し、該ペプチド抗原を免疫源としてポリクローナル抗体を作成することにより得ることができる。

また、第1粒子は、抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子であり得る。

【0015】

第1粒子に使用し得る、抗体を担持するための粒子としては、抗体を担持し得る粒子であれば特に限定されないが、有機高分子粉末、無機物質粉末、微生物、血球および細胞膜片などが挙げられる。有機高分子粉末としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどが例示でき、好ましくはラテックス懸濁液が用いられる。ラテックス懸濁液に使用するラテックス粒子としては、例えばポリスチレン、スレチン-スチレンスルホン酸塩重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどがある。用いるラテックス粒子の平均粒径は、0.05~1.0 μ mの範囲で適宜選択される。無機物質担体としては、シリカ、アルミナ、炭素末、あるいは金、チタン、鉄、ニッケルなどの金属片などが例示される。

第1粒子に使用し得る、抗体を担持するための粒子としては、好ましくは、ラテックス粒子が挙げられ、特に、ポリスチレン系のラテックス粒子が好ましい。

【0016】

第1粒子に使用し得るモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、当該分野で公知の方法により行うことができ、また、市販されている抗体を用いることもできる。

また、抗体を粒子に担持する方法も、当該分野で公知の方法により行うことができ、例えば、物理吸着法、化学結合法等が挙げられる。

10

20

30

40

50

第1試薬に含まれる第1粒子の量は、該第1試薬の総体積に対する質量として、通常、0.001乃至0.1% (w/v) であり、好ましくは、0.003乃至0.07% (w/v) である。

尚、第1試薬は、原則として、第1粒子以外の抗体を担持した粒子を含まない。

【0017】

第1試薬は、第1粒子に加えて、水性媒体を含み得る。

該水性媒体としては特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。上記媒体のpHは、5.5~8.5が好ましい。

【0018】

第1試薬は、更に、牛血清アルブミン、ショ糖、塩濃度調整のために塩化ナトリウム等を適宜溶解させてもよい。

また、第1試薬は、測定感度の向上及び抗原抗体反応の促進のために、増感剤を添加し得る。具体的な増感剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、プルラン、ポリビニルピロリドン、アルギン酸等が挙げられる。

【0019】

第2試薬は、第2粒子を含む。

本発明に使用し得る第2粒子は、抗原との混合により粒子の凝集を惹起する粒子であれば特に限定されるものではなく、同一の抗体を担持した粒子であってもよく、また、異なる抗体を担持した2種以上の粒子の混合物であってもよい。

つまり、第2粒子は、粒子全体として抗原が有するエピトープの2つ以上を捕捉すればよく、そして、抗原が有するエピトープの2つ以上を捕捉することにより、抗原との混合によりエピトープを捕捉した際に、粒子の凝集を惹起するものである。

そして、第2試薬は、第2粒子として、抗原が有するエピトープの2つ以上を捕捉する粒子であるか又は前記抗原が有するエピトープの1つを捕捉する粒子の2種以上の混合物であって、各種の粒子は、抗原の異なるエピトープを捕捉する粒子を含む。

ここで、第2粒子が捕捉する抗原の2つ以上のエピトープのうち少なくとも1つは、第1粒子が捕捉する抗原のエピトープとは異なるエピトープである。

つまり、第2粒子が捕捉する抗原の2つ以上のエピトープのうち1つは、第1粒子が捕捉する抗原のエピトープと同一であってもよい。また、第2粒子が捕捉する抗原の2つ以上のエピトープの全てが、第1粒子が捕捉する抗原のエピトープと異なってもよい。

【0020】

第2粒子は、抗原が有するエピトープの2つ以上に親和性を有するポリクローナル抗体を担持した粒子であり得る。

該ポリクローナル抗体を担持した粒子は、同一のポリクローナル抗体を担持した粒子であり得るが、異なるポリクローナル抗体を担持した粒子の混合物でもあり得る。

また、第2粒子は、抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するモノクローナル抗体の2種以上を担持した粒子であり得、この場合、各種のモノクローナル抗体は、抗原の異なるエピトープに親和性を有する抗体となる。

該モノクローナル抗体の2種以上を担持した粒子は、同一の2種以上のモノクローナル抗体を担持した粒子であり得るが、異なる2種以上のモノクローナル抗体を担持した粒子の混合物でもあり得る。

また、第2粒子は、抗原が有するエピトープの1つに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子の2種以上の混合物であり得、この場合、各種の粒子は、抗原の異なるエピトープに親和性を有するモノクローナル抗体を担持した粒子となる。

また、第2試薬に含まれる粒子は、抗原との混合により粒子の凝集を惹起すればよいものであり、そのため、第2試薬は、第2粒子に加えて他の抗体を担持した粒子も含み得る。

例えば、第2試薬は、

10

20

30

40

50

- ・上述のポリクローナル抗体を担持した粒子に、上述の2種以上のモノクローナル抗体を担持した粒子を混合したものの、
 - ・上述のポリクローナル抗体を担持した粒子に、上述の1種のモノクローナル抗体を担持した粒子を混合したものの、
 - ・上述の2種以上のモノクローナル抗体を担持した粒子に、上述の1種のモノクローナル抗体を担持した粒子を混合したものの、
 - ・上述のポリクローナル抗体を担持した粒子に、上述の2種以上のモノクローナル抗体を担持した粒子及び上述の1種のモノクローナル抗体を担持した粒子を混合したものの、
- を含み得る。

【0021】

第2粒子に使用し得る、抗体を担持するための粒子としては、第1粒子で使用したものと同様の粒子が使用できる。

尚、第1粒子に使用する抗体を担持するための粒子と、第2粒子に使用する抗体を担持するための粒子とは、同一であり得るが、異なるものもあり得る。

第2粒子に使用し得る、抗体を担持するための粒子としては、好ましくは、ラテックス粒子が挙げられ、特に、ポリスチレン系のラテックス粒子が好ましい。

【0022】

第2粒子に使用し得るモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、当該分野で公知の方法により行うことができ、また、市販されている抗体を用いることもできる。

また、抗体を粒子に担持する方法も、当該分野で公知の方法により行うことができ、例えば、物理吸着法、化学結合法等が挙げられる。

第2試薬に含まれる第2粒子の量は、該第2試薬の総体積に対する質量として、通常、0.01乃至0.15% (w/v) であり、好ましくは、0.05乃至0.1% (w/v) である。

【0023】

第2試薬は、第2粒子に加えて、水性媒体を含み得る。

該水性媒体としては特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。上記媒体のpHは、5.5~8.5が好ましい。

【0024】

第2試薬は、更に、牛血清アルブミン、ショ糖、塩濃度調整のために塩化ナトリウム等を適宜溶解させてもよい。

【0025】

本発明の担体凝集免疫測定方法は、検体を第1試薬と混合する第1工程と、該第1工程で得られた混合液を第2試薬と混合する第2工程とを含む。

検体を第1試薬と混合する第1工程は、検体に第1試薬を添加して混合することにより行われるが、恒温で行うのが好ましく、25~40℃で行うのが好ましく、30~38℃で行うのがより好ましい。また、上記混合は、5秒~30分間、より好ましくは、5秒~15分間行う。これに続く第1工程で得られた混合液を第2試薬と混合する第2工程は、得られた混合液に第2試薬を添加して混合することにより行われるが、恒温で行うのが好ましく、25~40℃で行うのが好ましく、30~38℃で行うのがより好ましい。また、上記混合は、5秒~30分間、より好ましくは、5秒~15分間行う。

【0026】

上記第1工程及び第2工程をおこなうことにより得られた混合液の吸光度変化量を測定することにより、検体中の抗原を測定する。上記吸光度変化量は、粒子の凝集の進行に伴う吸光度の増加量である。

上記吸光度変化量の測定の際の測定波長は、通常、340~1000nm、好ましくは、500~800nmの範囲から適切な波長が選択される。上記吸光度変化量の測定に用いられる測定装置としては、経時的に上記溶液の吸光度を測定することができるものであれば特に限定されず、例えば、汎用の生化学自動分析装置等が挙げられる。上記測定波長

10

20

30

40

50

、試料量、試薬量等は、上記測定装置に合わせて適宜選択することができる。

【0027】

本発明はまた、検体中の抗原を測定するための担体凝集免疫測定方法に用いるための、第1試薬と第2試薬とを含む免疫測定用試薬キットにも関する。

免疫測定用試薬キットに使用し得る第1試薬としては、上記した第1試薬を用いることができ、また、上記した第1粒子を含み、第2試薬としては、上記した第2試薬を用いることができ、また、上記した第2粒子を含む。

【0028】

本発明はまた、更に、抗体を担持した粒子を含まない第3試薬を含む、免疫測定用試薬キットにも関する。

上記の3種の試薬を含む免疫測定用試薬キットを使用する場合、例えば、検体を第3試薬と混合する第1工程、該第1工程で得られた混合液を第1試薬と混合する第2工程及び該第2工程で得られた混合液を第2試薬と混合する第3工程とを含み得る。

第3試薬は、緩衝液を主成分とする試薬であり、例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液、牛血清アルブミン、ショ糖、塩化ナトリウム、増感剤等を含み得る。

上記増感剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、プルラン、ポリビニルピロリドン、アルギン酸等が挙げられる。

上記の3種の試薬を含む免疫測定用試薬キットを採用する場合、第1試薬は、その保存安定性の観点から増感剤を含まないものとするのが好ましい。

【実施例】

【0029】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

調製例1：抗ヒトミオグロビン・モノクローナル抗体担持粒子の浮遊液（A1）の調製

平均粒径220nmのポリスチレン粒子を、0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH8.2で希釈して、5%（w/v）の懸濁液1mLを調製し、該1mLの懸濁液に、市販の抗ヒトミオグロビン・モノクローナル抗体（ミクリ免疫研究所：Lot8）（0.7mg/mL）1mLを加え、混合した。

37で2時間混和した後、遠心分離して上清を捨て、沈殿した粒子を、0.05%の牛血清アルブミン（BSA）を加えた0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH8.2の2mLに浮遊せしめて、粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A1）を調製した。

【0030】

調製例2：抗ヒトミオグロビン・モノクローナル抗体担持粒子の浮遊液（A2）の調製

モノクローナル抗体を、市販の抗ヒトミオグロビン・モノクローナル抗体（ミクリ免疫研究所：Lot44）（0.7mg/mL）に代えた以外は、調製例1と同様の操作を行って、粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A2）を調製した。

【0031】

調製例3：抗ヒトミオグロビン・家兔ポリクローナル抗体担持粒子の浮遊液（A3）の調製

ヒトミオグロビンを、フロインドの完全アジュバントと共に家兔の皮内に投与して免疫し、該家兔から得た抗血清をプロテイン-Gカラム法に付して、IgG抗体（抗ヒトミオグロビン・家兔ポリクローナル抗体）を分取した。

平均粒径220nmのポリスチレン粒子を、0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH8.2で希釈して、5%（w/v）の懸濁液1mLを調製し、該1mLの懸濁液に、上記で得たIgG抗体の溶液（0.7mg/mL）1mLを加え、混合した。

37で2時間混和した後、遠心分離して上清を捨て、沈殿した粒子を、0.05%の牛血清アルブミン（BSA）を加えた0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH8.2の2mLに浮遊せしめて、粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A3）を調製し

10

20

30

40

50

た。

【0032】

実施例 1

標準ミオグロビン希釈列溶液（0、25、50、100、200、400 ng/mL）を作成した。

反应用緩衝液試薬に、調製例 1 で調製した粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A1）を添加して、粒子（ラテックス粒子）を 0.07%（w/v）含む浮遊液（第 1 試薬）を調製し、該浮遊液の 150 μL を、上記で作製した標準ミオグロビン希釈列溶液の 5 μL に加え、攪拌混和し、約 5 分後に、該混合液に、調製例 3 で調製した粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A3）を、粒子（ラテックス粒子）の含有量が 0.075%（w/v）になるよう希釈調整された浮遊液（第 2 試薬）100 μL を添加し、攪拌混和後、約 5 分間の吸光度変化量を、日立 7180 型自動分析装置（（株）日立ハイテクノロジーズ製）を用い、660 nm の波長にて測定した。

【0033】

比較例 1

第 1 試薬として、反应用緩衝液試薬（粒子（ラテックス粒子）を含まない）を使用した以外は実施例 1 と同様の操作を行った。

【0034】

比較例 2

第 1 試薬として、反应用緩衝液試薬（粒子（ラテックス粒子）を含まない）を使用し、第 2 試薬として、調製例 1 で調製した粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A1）と調製例 2 で調製した粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（A2）を等量で混合した浮遊液を、粒子（ラテックス粒子）の含有量が 0.075%（w/v）になるよう希釈調整された浮遊液を使用した以外は実施例 1 と同様の操作を行った。

【0035】

実施例 1、比較例 1 及び比較例 2 における、標準ミオグロビン希釈列溶液（0、25、50、100、200、400 ng/mL）における吸光度変化量を表 1 に纏めた。

【表 1】

表 1

例番号		実施例 1	比較例 1	比較例 2	
第 1 試薬における粒子（ラテックス粒子）の濃度（%（w/v））	A 1	0.07	—	—	
	A 2	—	—	—	
	A 3	—	—	—	
第 2 試薬における粒子（ラテックス粒子）の濃度（%（w/v））	A 1	—	—	0.0375	
	A 2	—	—	0.0375	
	A 3	0.075	0.075	—	
吸光度変化量（ΔOD）	ミオグロビン濃度（ng/mL）	0	-12	-42	-34
		25	407	60	64
		50	843	127	136
		100	1963	268	405
		200	4349	563	804
		400	8820	1203	1701

結果：第 1 試薬に A 1 の粒子（ラテックス粒子）を添加した実施例 1 は、第 1 試薬に粒子（ラテックス粒子）を添加しなかった比較例 1 及び比較例 2 に比して、大きな吸光度変化量（高感度）を示した。

【0036】

調製例 4：抗フィラリアモノクローナル抗体担持粒子の浮遊液（B1）の調製

フィラリア成虫より生理食塩水にて抽出した抗原成分をマウスに免疫し、常法により抗フィラリアモノクローナル抗体を得た。

平均粒径200nmのポリスチレン粒子を、0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液(GSB) pH 8.2で希釈して、5%(w/v)の懸濁液1mLを調製し、該1mLの懸濁液に、上記で得た抗フィラリアモノクローナル抗体(0.7mg/mL)1mLを加え、混合した。

37で2時間混和した後、遠心分離して上清を捨て、沈殿した粒子を、0.05%の牛血清アルブミン(BSA)を加えた0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液(GSB) pH 8.2の2mLに浮遊せしめて、粒子の浮遊液(ラテックス浮遊液)(B1)を調製した。

【0037】

調製例5：家兔抗フィラリア抗原IgG抗体(ポリクローナル抗体)担持粒子の浮遊液(B2)の調製

フィラリア成虫より生理食塩水にて抽出した抗原成分を常法により家兔に免疫し、家兔抗フィラリア抗原IgG抗体(ポリクローナル抗体)を得た。

平均粒径317nmのポリスチレン粒子を、0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液(GSB) pH 8.2で希釈して、5%(w/v)の懸濁液1mLを調製し、該1mLの懸濁液に、上記で得た家兔抗フィラリア抗原IgG抗体(ポリクローナル抗体)(0.7mg/mL)1mLを加え、混合した。

37で2時間混和した後、遠心分離して上清を捨て、沈殿した粒子を、0.05%の牛血清アルブミン(BSA)を加えた0.1モル濃度のグリシン食塩緩衝液(GSB) pH 8.2の2mLに浮遊せしめて、粒子の浮遊液(ラテックス浮遊液)(B2)を調製した。

【0038】

実施例2

フィラリア標準抗原希釈列溶液(0、8、32、130ng/mL)を作成した。

反应用緩衝液試薬に、調製例4で調製した粒子の浮遊液(ラテックス浮遊液)(B1)を添加して、粒子(ラテックス粒子)を0.0125%(w/v)含む浮遊液(第1試薬)を調製し、該浮遊液の60μLを、上記で作製したフィラリア標準抗原希釈列溶液の30μLを生理食塩水120μLで希釈した希釈液の10μLに加え、攪拌混和し、約5分後に、該混合液に、調製例5で調製した粒子の浮遊液(ラテックス浮遊液)(B2)を、粒子(ラテックス粒子)の含有量が0.075%(w/v)になるよう希釈調整された浮遊液(第2試薬)55μLを添加し、攪拌混和後、約5分間の吸光度変化量を、BM2250(日本電子(株)社製)を用い、571nmの波長にて測定した。

【0039】

実施例3

第1試薬として、調製例4で調製した粒子の浮遊液(ラテックス浮遊液)(B1)を添加した、粒子(ラテックス粒子)を0.00625%(w/v)含む浮遊液を用いた以外は、実施例2と同様の操作を行った。

【0040】

比較例3

第1試薬として、反应用緩衝液試薬(粒子(ラテックス粒子)を含まない)を使用した以外は実施例2と同様の操作を行った。

【0041】

実施例2、実施例3及び比較例3における、フィラリア標準抗原希釈列溶液(0、8、32、130ng/mL)における吸光度変化量を表2に纏めた。

10

20

30

40

【表 2】

表 2

例番号		実施例 2	実施例 3	比較例 3	
第 1 試薬における粒子(ラテックス粒子)の濃度 (%(w/v))	B 1	0.0125	0.00625	—	
	B 2	—	—	—	
第 2 試薬における粒子(ラテックス粒子)の濃度 (%(w/v))	B 1	—	—	—	
	B 2	0.075	0.075	0.075	
吸光度 変化量 (ΔOD)	フィリア抗原 濃度 (ng/mL)	0	-27	-31	-42
		8	145	120	33
		32	541	514	90
		130	2685	2499	470

10

結果：第 1 試薬に B 1 の粒子（ラテックス粒子）を添加した実施例 2 及び実施例 3 は、第 1 試薬に粒子（ラテックス粒子）を添加しなかった比較例 3 に比して、大きな吸光度変化量（高感度）を示した。

【0042】

調製例 6：抗ヒト - フェトプロテイン（AFP）・モノクローナル抗体担持粒子の浮遊液（C 1）の調製

20

平均粒径 220 nm のポリスチレン粒子を、0.1 モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH 8.2 で希釈して、0.45 %（w/v）の懸濁液 1 mL を調製し、該 1 mL の懸濁液に、市販の抗ヒト - フェトプロテイン・モノクローナル抗体（ミクリ免疫研究所：clone 6 G 2）（0.235 mg/mL）1 mL を加え、混合した。

37 で 2 時間混和した後、遠心分離して上清を捨て、沈殿した粒子を、0.05 % の牛血清アルブミン（BSA）を加えた 0.1 モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH 8.2 の 2 mL に浮遊せしめて、粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（C 1）を調製した。

【0043】

調製例 7：抗ヒト - フェトプロテイン・モノクローナル抗体担持粒子の浮遊液（C 2）の調製

30

モノクローナル抗体を、市販の抗ヒト - フェトプロテイン・モノクローナル抗体（ミクリ免疫研究所：clone 3 C 5）（0.235 mg/mL）に代えた以外は、調製例 6 と同様の操作を行って、粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（C 2）を調製した。

【0044】

調製例 8：抗ヒト - フェトプロテイン・家兎ポリクローナル抗体担持粒子の浮遊液（C 3）の調製

ヒト - フェトプロテイン（AFP）を、フロインドの完全アジュバントと共に家兎の皮内に投与して免疫し、該家兎から得た抗血清をプロテイン - G カラム法に付して、IgG 抗体（抗ヒト - フェトプロテイン・家兎ポリクローナル抗体）を分取した。

40

平均粒径 220 nm のポリスチレン粒子を、0.1 モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH 8.2 で希釈して、0.45 %（w/v）の懸濁液 1 mL を調製し、該 1 mL の懸濁液に、上記で得た IgG 抗体の溶液（0.235 mg/mL）1 mL を加え、混合した。

37 で 2 時間混和した後、遠心分離して上清を捨て、沈殿した粒子を、0.05 % の牛血清アルブミン（BSA）を加えた 0.1 モル濃度のグリシン食塩緩衝液（GSB）pH 8.2 の 2 mL に浮遊せしめて、粒子の浮遊液（ラテックス浮遊液）（C 3）を調製した。

【0045】

実施例 4

50

標準ヒト - フェトプロテイン (AFP) 希釈列溶液 (0、35、144、619、2557 ng/mL) を作成した。

反应用緩衝液試薬に、調製例6で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C1) を添加して、粒子 (ラテックス粒子) を 0.025% (w/v) 含む浮遊液 (第1試薬) を調製し、該浮遊液の 180 µL を、上記で作製した標準ミオグロビン希釈列溶液の 15 µL に加え、攪拌混和し、約5分後に、該混合液に、調製例8で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C3) を、粒子 (ラテックス粒子) の含有量が 0.075% (w/v) になるよう希釈調整された浮遊液 (第2試薬) 90 µL を添加し、攪拌混和後、約5分間の吸光度変化量を、日立7170型自動分析装置 ((株) 日立ハイテクノロジーズ製) を用い、700 nm の波長にて測定した。

10

【0046】

実施例5

第1試薬として、調製例6で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C1) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.0125% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例4と同様の操作を行った。

【0047】

実施例6

第1試薬として、調製例6で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C1) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.00625% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例4と同様の操作を行った。

20

【0048】

実施例7

第1試薬として、調製例6で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C1) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.003125% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例4と同様の操作を行った。

【0049】

実施例8

第1試薬として、調製例6で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C1) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.025% (w/v) 含む浮遊液に代えて、調製例7で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C2) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.025% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例4と同様の操作を行った。

30

実施例9

第1試薬として、調製例7で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C2) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.0125% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例8と同様の操作を行った。

【0050】

実施例10

第1試薬として、調製例7で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C2) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.00625% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例8と同様の操作を行った。

40

【0051】

実施例11

第1試薬として、調製例7で調製した粒子の浮遊液 (ラテックス浮遊液) (C2) を添加した、粒子 (ラテックス粒子) を 0.003125% (w/v) 含む浮遊液を用いた以外は、実施例8と同様の操作を行った。

【0052】

比較例4

第1試薬として、反应用緩衝液試薬 (粒子 (ラテックス粒子) を含まない) を使用した以外は実施例4と同様の操作を行った。

50

【 0 0 5 3 】

実施例 4 乃至実施例 7 及び比較例 4 における、標準ヒト - フェトプロテイン (AFP) 希釈列溶液 (0、35、144、619、2557 ng/mL) における吸光度変化量を表 3 に纏め、実施例 8 乃至実施例 11 及び比較例 4 における、標準ヒト - フェトプロテイン (AFP) 希釈列溶液 (0、35、144、619、2557 ng/mL) における吸光度変化量を表 4 に纏めた。

【表 3】

表 3

例番号		実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	比較例 4	
第 1 試薬における粒子 (ラテックス粒子) の濃度 (% (w/v))	C 1	0.025	0.0125	0.00625	0.003125	—	
	C 2	—	—	—	—	—	
	C 3	—	—	—	—	—	
第 2 試薬における粒子 (ラテックス粒子) の濃度 (% (w/v))	C 1	—	—	—	—	—	
	C 2	—	—	—	—	—	
	C 3	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	
吸光度変化量 (ΔOD)	AFP 濃度 (ng/mL)	0	-5	1	-6	-28	-24
		35	89	77	96	105	43
		144	409	406	424	386	177
		619	1808	1778	1479	1118	773
		2557	6140	4513	3051	2292	2626

10

【表 4】

表 4

例番号		実施例 8	実施例 9	実施例 10	実施例 11	比較例 4	
第 1 試薬における粒子 (ラテックス粒子) の濃度 (% (w/v))	C 1	—	—	—	—	—	
	C 2	0.025	0.0125	0.00625	0.003125	—	
	C 3	—	—	—	—	—	
第 2 試薬における粒子 (ラテックス粒子) の濃度 (% (w/v))	C 1	—	—	—	—	—	
	C 2	—	—	—	—	—	
	C 3	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	
吸光度変化量 (ΔOD)	AFP 濃度 (ng/mL)	0	-21	-31	2	-12	-24
		35	50	45	47	48	43
		144	332	275	225	226	177
		619	1904	1501	1143	993	773
		2557	7039	5159	3840	3289	2626

20

30

結果：第 1 試薬に C 1 の粒子 (ラテックス粒子) を添加した実施例 4 乃至実施例 7 並びに第 1 試薬に C 2 の粒子 (ラテックス粒子) を添加した実施例 8 乃至実施例 11 は、第 1 試薬に粒子 (ラテックス粒子) を添加しなかった比較例 4 に比して、大きな吸光度変化量 (高感度) を示した。

また、第 1 試薬に C 1 の粒子 (ラテックス粒子) を添加した実施例 4 乃至実施例 7 では、AFP の低濃度領域での感度向上の程度が大きかったのに対して、第 1 試薬に C 2 の粒子 (ラテックス粒子) を添加した実施例 8 乃至実施例 11 では、AFP の高濃度領域での感度向上の程度が大きく、使用する抗体の種類により反応性が異なっていた。

また、何れの抗体を用いた場合においても、粒子 (ラテックス粒子) の非常に低い濃度において、感度の向上が観られており、抗原に対する高い反応性を示したことが分る。

40

フロントページの続き

(72)発明者 橋本 正勝

東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内

专利名称(译)	免疫学测定方法和用于其的试剂盒		
公开(公告)号	JP2018173334A	公开(公告)日	2018-11-08
申请号	JP2017071377	申请日	2017-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	志摩研究所		
申请(专利权)人(译)	有限公司司马研究所		
[标]发明人	橋本健太郎 野中和彦 橋本正勝		
发明人	橋本 健太郎 浅川 裕美 野中 和彦 橋本 正勝		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.581.D		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫学测量方法及其所用的试剂盒。为了测量样品中的抗原，包括将样品与第一试剂混合的第一步，以及将第一步中获得的混合溶液与第二试剂混合的第二步 载体聚集免疫分析方法 第一试剂包括捕获抗原具有的抗原决定簇之一的第一颗粒，第二试剂包括第二颗粒，第二颗粒，抗原具有抗原决定簇的两个或更多个表位 或捕获抗原具有的一个表位的两个或多个颗粒的混合物，其中每种类型的颗粒都是捕获抗原的不同表位的颗粒，如何测量。[选择图]无

(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2018-173334 (P2018-173334A)
	(43) 公開日	平成30年11月6日(2018.11.6)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 D
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14 頁)		
(21) 出願番号	特願2017-71377(P2017-71377)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成29年3月31日(2017.3.31)	391025811 株式会社シマ研究所 東京都板橋区前野町一丁目16番4号
		(74) 代理人
		110001999 特許業務法人はなぶさ特許商標事務所
		(72) 発明者
		橋本 健太郎 東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内
		(72) 発明者
		浅川 裕美 東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内
		(72) 発明者
		野中 和彦 東京都板橋区前野町1丁目16番4号 株式会社シマ研究所内
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法及びそれに用いる試薬キット		