

(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2003 - 14693

(P2003 - 14693A)

(43)公開日 平成15年1月15日(2003.1.15)

(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 27/447			G 0 1 N 33/53	N
	33/53		33/558	
	33/558		27/26	311 E
				311 G
				301 A

審査請求 未請求 請求項の数 2書面(全 5 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 235575(P2001 - 235575)

(22)出願日 平成13年6月29日(2001.6.29)

(71)出願人 501308270

芝 紀代子

東京都文京区湯島1 5 45 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科 先端情報応用検査学 内

(72)発明者 芝 紀代子

東京都千代田区一番町20 - 9 一番町ハウス503

(72)発明者 平塚 信夫

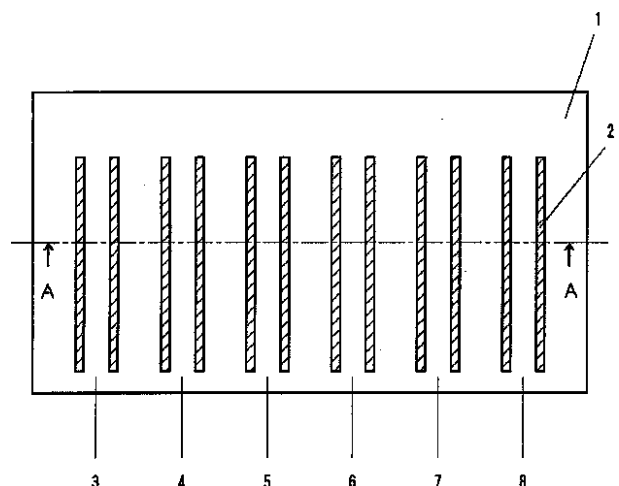
東京都文京区湯島1 - 5 - 45東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科先端情報応用検査学 内

(54)【発明の名称】 電気泳動の支持体に高分子多孔質膜を用いる免疫固定法

(57)【要約】

【課題】 検体量の保持力の少ない高分子多孔質膜を免疫固定法に使うためには高感度に蛋白質を染める方法でなければならない。また一般的に5種類の特異抗血清を各電気泳動の列に重層する必要があるが、それぞれが膜中や膜表面を流れ交じり合うことを防止する必要がある。抗血清は高価なので出来るだけ使用量を減らす必要がある。

【解決手段】 高分子多孔質膜(1)に最低6種類の電気泳動の列(3~8)をその網目構造を壊すことにより独立した仕切り(2)で区切られた列で検体を電気泳動した後、特異抗血清を反応させ洗浄後高感度の銀染色液を用いて検体のモノクローナル蛋白を検出できる方法を発明した。高感度の染色液を使うため検体を希釈し、それに対応する高価な高血清も少なくする事が出来るので結果的に低価格化につながる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】電気泳動の支持体である高分子多孔質膜上に電気泳動で展開した蛋白質を抗原抗体反応を用いてその種類を同定する免疫固定法において、高分子多孔質膜の網目構造を電気泳動の列に合わせ試薬や溶液の流れを遮断し電気泳動のそれぞれの列を独立化したことを特長とした高分子多孔質膜を用いる免疫固定法。

【請求項 2】請求項 1 を用いて、電気泳動後、抗原抗体反応および酸による蛋白固定をしたあと、脱蛋白を行い、銀イオンを還元剤とあらかじめ反応させコロイド状にした高感度銀染色液中で「銀 - 蛋白質結合体」を形成させることを特長とする、高分子多孔質膜を用いる免疫固定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】人や動物の血液や尿及び髄液などの体液中の蛋白質は、アルブミンと多数のグロブリンから成っており、全部で約 150 種類の蛋白質が含まれると言われている。これらの蛋白質の機能は、栄養物自体であったり栄養物の搬送の役割を果したり、体外から進入した細菌や異種物質を攻撃する免疫に関わる物質であったりする。これらの蛋白質を分析する分析法は、物理的や化学的な方法及び免疫学的な方法による測定法が一般的に使われている。これらの分析法の中で、最も感度と特異性が高いとされている測定法は、抗原抗体反応を使用する免疫学的測定法であることは周知のとおり*

表 1

1.	2 倍に希釈した人血清	-----	固定液
2.	10 倍に希釈した I g G	-----	抗 I g G 血清
3.	I g A	-----	抗 I g A 血清
4.	I g M	-----	抗 I g M 血清
5.	κ	-----	抗 κ 血清
6.	λ	-----	抗 λ 血清

電気泳動後長方形のテンプレートを重ねそれぞれのレーンに対応する抗血清をテンプレートの枠内に均一に塗布する(表 1)。湿潤箱に入れ静かに抗原抗体反応させる。固定液にはスルホサリチル酸などが使われている。次に未反応の蛋白質を 10%の NaCl 液で除去し完全に乾燥する。蛋白の染色液はボンソー 3 R ・ ニグロシン ・ アミドブラックなどの有機染料が用いられている。結果はそれぞれの対応する位置に染色帯が認められた場合、例えば I g G の位置及び κ の位置に染色帯が認められた時は I g G の 型と判定され、I g M の位置及び λ の位置に染色帯が認められた時は、I g M の 型と判定をおこなっている。多発性硬化症の診断に用いられる髄液中のオリゴクロナルの検出は、アガロースゲルプレート上で検体を電気泳動したあと、I g G ・ κ の特異抗血清を作用させる。判定は現れた 2 ~ 3 本のバンド

*である。免疫学的測定法の中で、容易に特定の免疫グロブリンを同定したりその免疫グロブリンのサブクラスを同定したりする方法として、免疫電気泳動法と免疫固定法がある。本発明はこれらの内、新しい免疫固定法に関するものである。免疫固定法が必要になる場合は

- M 蛋白のクラス別及び L 鎖の型判定
- 髄液中のオリゴクロナルバンドの検出
- 蛋白のマイクロヘテロジェニティの検出
- 尿中ベンズジョーンズ蛋白質の検出
- 尿中の糸球体及び尿細管性蛋白の検出などである。

【0002】

【従来の技術】従来の免疫固定法は、電気泳動の支持体としてアガロースゲルを用いるため、取り扱いが難しく検査に熟練を要した高価なアガロースゲルプレートを使用するばかりか高価な特異抗血清を多量に使用する必要があった。すなわち電気泳動の支持体としてアガロースゲルを用い、電気泳動後特異抗体をそれぞれの電気泳動レーンに直接作用させ染み込ませ、この支持体の中で抗原抗体反応を起こさせる。これによって不溶性の免疫複合物を生成させ未反応の他の蛋白質を洗浄して除去したのち蛋白染色していた。また検体をアガロースゲル上に塗布するには、アガロースゲル上に楔状に作られた溝または楔状の血清塗布用の穴の開いたフィルムを重ねる。アガロースゲル上の 6 個のサンプル孔には、検査しなければならない患者の検体を一定量塗布し染み込ませた後電気泳動する。

が 型と反応していれば 型と、 型と反応していれば 型のオリゴクロナルと判定する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】課題 1 電気泳動の支持体としてアガロースゲルの代わりに高分子多孔質膜例えばセルースアセテート膜が免疫固定法に使われなかったのは、アガロースゲルに比較して膜が薄いため検体として塗布する検体量が約 1 / 5 と少ないので普通の場合でも染色帯が読み取れず判定が難しかった。特に蛋白濃度が低い場合は高感度の有機染料を用いても全く染色帯が認められず今までは使用出来ないものとされていた。高分子多孔質膜例えばセルースアセテート膜への検体の塗布量は限られているので、実質目視で確認できる程の高感度な染色法がなければならぬことになる。アガロースゲル用の銀染色液はセルロースアセテート膜に使う

ことが出来ない。課題2 従来のアガロースゲルではゲル面に抗血清を重層する場合、予め長方形の穴の開いたテンプレートを重ねて、抗血清を直接塗布しても隣の列に抗血清が流れ出ないようにしている。セルロースアセテート膜ではこのようなテンプレートを使用できないのでそれに代わる方法を見つける必要があった。通常のセルロースアセテート膜では検体を注入する検体溝や検体の列を規定する長方形の枠があるテンプレートを使用することが出来ないでセルロースアセテート膜では実質使用できないとされていた。その理由は最低5種類の抗血清を平面上のセルロースアセテート膜上に単に載せるだけでは互いの抗血清が適当に拡散し交じり合ってしまう致命的な欠点があった。課題3 抗血清は1名の患者に5種類以上の高価な特異抗血清を使用しなければならない。低価格化を目指すには抗血清の使用量を減らすことが重要な課題である。

【0004】

【課題を解決するための手段】課題1 高分子多孔質膜等のセルロースアセテート膜には検体をアガロースゲルのように多量に塗布できない。アガロースゲルプレートには、約3 μ L程の検体を塗布することができるが、セルロースアセテート膜上にはせいぜい0.6 μ Lしか塗布する事が出来ない。結果的に検体量として約1/5倍と少ないので普通の蛋白染色では染色帯が検出されず、セルロースアセテート膜が免疫固定法に利用されることは無かった。解決する手段としては微量の蛋白質でも濃く染色できセルロースアセテート膜に適する染色法を發明する以外に方法はない。本發明ではこの蛋白質の染色法としてとして、銀コロイドを用いる高感度の銀染色液をセルロースアセテート膜の免疫固定用に使える發明をすることで、感度を大幅に増加させ、検体の塗布量を1/100以下でも蛋白質を検出することが出来た。課題2 抗血清が別の隣の列に流れ込まないようにするには本来一定の高さのある仕切り又は枠を貼っておく等の手段を講じる必要がある。アガロースゲルプレートを用いる免疫固定法は、泳動後テンプレートをゲル面に重ねて抗血清用の各レーンを確保し直接特異抗体をそれぞれ各レーンに塗布していた。本發明では、高分子多孔質膜等のセルロースアセテート膜には、これらの仕切りや枠ではなく、セルロースアセテート膜の各列を独立の列とするために、1枚の膜を複数の列になるよう加熱または溶剤により網目構造を壊す方法または網目構造の中に固まる溶液を吸着させることで網目構造を解消し、完全な仕切り構造にすし、お互いの列に重層した抗血清や固定用の試薬が混じらないような發明をした。課題3 検体の塗布量を最大1/100に希釈して用いることが出来るので、それに対応する高価な抗血清も通常使用されている濃度の最大約1/100と大幅に希釈しても本發明の免疫固定法に使用できた。使用する抗血清の種類は最低でも5種類必要なので全体の価格低減率は非常に大きい

と判断できる。

【0005】

【發明の実施の形態】本發明において電気泳動用の高分子多孔質膜としてセルロースアセテート膜、ろ紙、ニトロセルロース膜ポリスルホン膜などが使用できるがセルロースアセテート膜が最も好適である。このセルロースアセテート膜(1)に独立した列を設ける方法は、一定間隔に一定の幅をもって熱変性するかまたはセルロースを溶かす溶剤例えばアセトン・メタノール混合液などで多孔質膜の網目構造をつぶし固化する仕切り(2)によって得られる。例えばこの仕切り(2)は常温硬化性の水溶性樹脂またはアルコール溶解性樹脂液などを用いることが出来る。セルロースアセテート膜上に独立した列(3~8)を設けることにより例えばTP(総蛋白質)(3)の列とIgG(4), IgA(5), IgM(6), (7), (8)の列の計6種の電気泳動の列を確保することができた。実際の使用上において、検体の塗布量を約0.6 μ Lにし、特異抗体はそれぞれ従来の使用量の10倍~100倍程度希釈したものが問題無く使えることが分かった。また、高感度の銀染色液は、280mMクエン酸ソーダからなる銀染色液1、25mM硫酸第一鉄溶液からなる銀染色液2、350mM硝酸銀溶液からなる銀染色液3、15%酢酸溶液からなる銀染色液4およびスルホサリチル酸からなる固定液と0.1M炭酸水素ナトリウムからなる固着液などで構成した。

【0006】

【実施例】以下に実際、本發明による免疫固定法の操作を述べる。先ず血清を10~100倍に希釈(尿蛋白質の検出の場合は希釈不要)して、検体塗布器で一定量例えば0.8 μ Lをセルロースアセテート膜などの多孔質膜に塗布する。一定時間(例えば20分間)電気泳動したのち、総蛋白(TP)の列(3, 9, 15)には上記固定液をその他のIgG(4, 10, 16), IgA(5, 11, 17), IgM(6, 12, 18), (7, 13, 19), (8, 14, 20)の列にはそれぞれの特異抗体を重層する。その後洗浄液で余分な蛋白質を洗い流し銀染色液1から4の混合液に洗浄後のセルロースアセテート膜を浸し15分間染色する。染色後蒸留水で水洗し固着液でしっかりと銀をセルロースアセテート膜に固定する。本發明による免疫固定法は、尿蛋白質の免疫固定法において、検体の尿を濃縮することなくそのまま電気泳動し免疫固定法に使用することも確認した。図1は高分子多孔質膜に6種類の列(3~8)をその仕切り(2)を設けることで作りそれぞれの列を独立させたものを示した。図2は本發明の実施例であり、TP(9)の列は全蛋白質が染め出されており、IgGの列(10)と(13)の列にのみ濃い横線が見える。この判定はIgG型と判定する。また図3はTP(15)の列は全蛋白質が染め出されており、IgAの

列(17)と(20)の列にのみ濃い横線が見える。この判定はIgA型と判定する。

【0007】

【発明の効果】本発明の最大の効果は、高価で扱いの難しいアガロースゲルプレートを使用することなく既に一般的に使用されているセルロースアセテート膜を使用することで、特に操作面において検体塗布溝や特異抗体のテンプレートを使用したり、アガロースゲルの乾燥操作も不要になる事で操作性が非常に改善できるとともに、安価にセルロースアセテート膜が使え、かつ操作が簡便なため、既に実用化されている血清蛋白分画の全自動装置と同様全自動型の免疫固定法の装置が簡単に開発できるようになる。現在手作業に頼っている免疫固定法の検査は本発明の実施により、癌の診断のスクリーニング検査化が図れるようになり、その早期発見に道を開くことになる。その上、高価な特異抗血清5種類(一般的な免疫固定法の場合)を約10~100倍も希釈して使用できるのでコストを大幅に下げることができる。また、検体として血清のみならず尿・髄液・唾液など蛋白濃度の低い検体も従来のような濃縮操作なしで直接セルロース*20

*アセテート膜に塗布しても充分免疫固定が出来ることになった。結果的に、免疫固定法の技術革新につながる。

【図面の簡単な説明】

【図1】平面図

【図2】A-A断面図

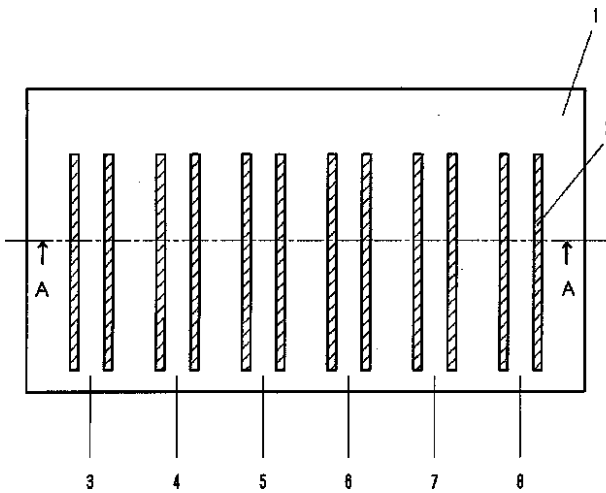
【図3】実施例1

【図4】実施例2

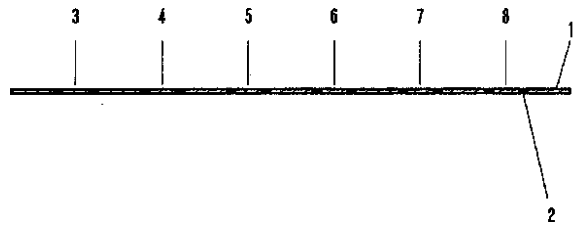
【符号の説明】

- | | | | |
|----|------------|----|------------|
| 1 | 高分子多孔質膜 | 11 | IgAの列 |
| 2 | 仕切り | 12 | IgMの列 |
| 3 | 総蛋白質(TP)の列 | 13 | の列 |
| 4 | IgGの列 | 14 | の列 |
| 5 | IgAの列 | 15 | 総蛋白質(TP)の列 |
| 6 | IgMの列 | 16 | IgGの列 |
| 7 | の列 | 17 | IgAの列 |
| 8 | の列 | 18 | IgMの列 |
| 9 | 総蛋白質(TP)の列 | 19 | の列 |
| 10 | IgGの列 | 20 | の列 |

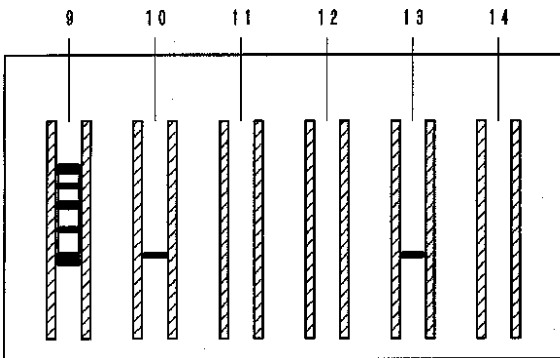
【図1】



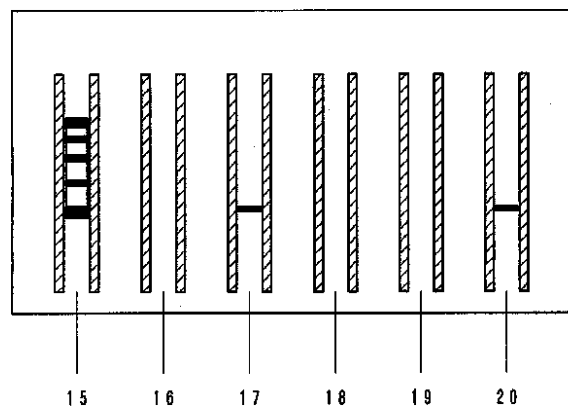
【図2】



【図3】



【図4】



(5)

特開2003-14693

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I
G 0 1 N 27/26

テ-マコード(参考)

3 1 1 A

专利名称(译)	使用聚合物多孔膜进行电泳支持的固定方法		
公开(公告)号	JP2003014693A	公开(公告)日	2003-01-15
申请号	JP2001235575	申请日	2001-06-29
申请(专利权)人(译)	芝 纪代子		
[标]发明人	芝 纪代子 平塚信夫		
发明人	芝 纪代子 平塚 信夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/447 G01N33/558		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/558 G01N27/26.311.E G01N27/26.311.G G01N27/26.301.A G01N27/26.311.A G01N27/447.301.A G01N27/447.311.A G01N27/447.311.E G01N27/447.311.G		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：为了在免疫固定法中使用样品保留量少的高分子量多孔膜，它必须是一种高灵敏度染色蛋白质的方法。通常，在每个电泳柱上需要层叠五种类型的特异性抗血清，但是有必要防止它们在膜中或在膜表面上相互流动和混合。由于抗血清价格昂贵，因此有必要尽可能减少使用量。解决方案：通过破坏聚合物多孔膜（1）的网络结构，将其分成至少6种电泳行（3至8），以独立的隔板（2）分隔成一行进行电泳。之后，开发了一种方法，在该方法中，使特定的抗血清反应，洗涤，然后使用高灵敏度的银染剂检测样品中的单克隆蛋白。由于使用了高度敏感的染色溶液，因此可以稀释样品，并减少与之对应的昂贵的高血清含量，从而降低成本。

