

(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2009-98138

(P2009-98138A)

(43) 公開日 平成21年5月7日(2009.5.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 X	
	GO 1 N 33/53 E	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2008-248023 (P2008-248023)	(71) 出願人	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号
(22) 出願日	平成20年9月26日 (2008.9.26)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(31) 優先権主張番号	特願2007-254179 (P2007-254179)	(72) 発明者	村谷 浩二 宮城県黒川郡大和町松坂平1-6 富士フイルム株式会社内
(32) 優先日	平成19年9月28日 (2007.9.28)	(72) 発明者	斎藤 義雄 宮城県黒川郡大和町松坂平1-6 富士フイルム株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	大原 智也 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内

(54) 【発明の名称】 高感度免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】生体物質の定量を実施するにあたり、抗原抗体反応による免疫凝集反応を応用した高感度な免疫診断試薬を提供すること。

【解決手段】抗体を担持させた担体に抗原を接触させることによって生成する凝集を測定することを含む抗原の測定方法において、上記の抗体を担持させた担体が、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を同時に担体へ感作して担持させた担体であることを特徴とする抗原の測定方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗体を担持させた担体に抗原を接触させることによって生成する凝集を測定することを含む抗原の測定方法において、上記の抗体を担持させた担体が、抗原の異なるエピトープを認識する複数種モノクローナル抗体を同時に担体へ感作して担持させた担体であることを特徴とする抗原の測定方法。

【請求項 2】

抗体を担持させた担体が、抗原の異なるエピトープを認識する複数種モノクローナル抗体を予め任意の混合比で混合した混合物を担体へ感作して担持させた担体である、請求項 1 に記載の抗原の測定方法。

10

【請求項 3】

抗原が C R P (C 反応性蛋白) または T S H (甲状腺刺激ホルモン) である、請求項 1 又は 2 に記載の抗原の測定方法。

【請求項 4】

抗原の異なるエピトープを認識する複数種モノクローナル抗体を同時に担体へ感作して担持させることによって製造される担体からなる、請求項 1 から 3 の何れかに記載の抗原の測定方法で使用するための免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

20

本発明は、抗原及び抗体等の免疫素材とラテックス等の担体とを使用した凝集反応を行うことによって抗原を測定する免疫測定方法に関する。より詳細には、本発明は、エピトープの異なる複数種モノクローナル抗体を同時に担体に感作することにより得られる抗体担持担体を用いた高感度な免疫測定方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

これまで、臨床診断における疾病の特定には、血液(全血、血漿、血清)や尿などの体液成分を採取して検体とし、その検体中の特定成分の濃度を定量して、その特定成分濃度を指標とする方法が採用されてきた。このような臨床検査の様態において、検体中の測定対象成分が抗原または抗体である場合、抗体が抗原を厳密に識別して結合する性質を利用して該成分の定量を行う方法として、免疫診断試薬が用いられてきた。

30

【0003】

抗原抗体反応を用いた免疫診断試薬において、標識反応を使用しない方法、即ち非標識法として、沈降反応を利用した免疫拡散法や免疫比濁法及び免疫比濁法(ネフェロメトリー)、凝集反応を利用した血球凝集法やラテックス法などがあり、標識反応を使用した方法としては、その標識する物質の種類や性質に応じて酵素免疫測定法(EIA法)や放射免疫測定法(RIA法)の他、蛍光免疫測定法(FIA法)、化学発光免疫測定法(CLIA法)、生物発光免疫測定法(BLIA法)などが、現在使用されている。

【0004】

例えば、EIA法においては、酵素反応を長時間に渡り行わせて反応産物を蓄積、即ち増幅して酵素からのシグナルを検出するので、非常に高感度な免疫反応試薬を調製することが可能で、これは他の標識法においても当てはまる。しかしその反面、測定対象成分である目的の抗原または抗体に対して結合する抗体または抗原に対して酵素(ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなど)を標識する必要があるため、試薬の調製が複雑である。また、一般にEIA法を始めとする標識法においては、B/F分離を行わないホモジニアス法とB/F分離を行うヘテロジニアス法があり、特にヘテロジニアス法ではB/F分離を行うために感度、安定性の面で優れるが、逆に迅速性、簡便性の面でホモジニアス法に劣る。

40

【0005】

さらにEIA法、RIA法などの標識法は、測定操作が煩雑で、特殊な測定機器や設備

50

、施設などが必要となる。標識法を用いた免疫診断試薬のメーカーは、各社試薬専用に開発した比較的大型の自動分析装置を供給することにより対応しているが、そのことが却って、免疫診断試薬及びシステムのPOCT分野への普及を容易ならざるものになっている。

【0006】

このように、標識法は感度、安定性の面で有利である反面、迅速性、簡便性の面で問題があり、さらに測定操作が煩雑で特殊な測定機器や設備、施設などが必要であるため、臨床検査技師の常駐する中央検査室の整備された中～大規模病院においては比較的導入が容易であるが、小規模病院や開業医、クリニック及び動物病院などの小規模医療施設、あるいはPOCT分野においては、未だ障壁が存在するのが実情である。

【0007】

一方で、ラテックス法に代表される非標識法においては、標識操作が不要であり、さらに紫外～可視～近赤外領域のある特定波長における測光により測定対象成分の定量が可能であるため、汎用・小型の分光学的装置のみ準備すればよく、小規模医療施設やPOCTの分野における導入が簡単であることは、容易に推察できる。

【0008】

但し非標識法は、迅速性、簡便性の面で有利な半面、先述のような標識法における増幅効果が原理的に不可能であるため、感度、安定性の面で問題がある。このことは、観点を変えると、ラテックス法のような非標識法の感度を改善することにより、小規模医療施設やPOCTの分野へ免疫診断試薬及びシステムが容易に導入され得ることを意味する。

【0009】

特にラテックス法による凝集反応は、試薬製造時の調製方法が比較的簡単であり、またユーザーが使用する際に、ラテックス試薬に検体を添加するだけで測定開始、一定時間における紫外～可視～近赤外領域のある特定波長での測定を行えばよく、通常の場合は数分～数十分後に測定完了と、迅速性、簡便性、汎用性に優れた方法である。

【0010】

ところが、従来公知のラテックス凝集法における高感度化技術として、例えば特開平5-80051号公報、特開平5-297002号公報、特開平6-58935号公報に開示されているポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、デキストランまたはデキストラン硫酸を始めとする特定の増感剤(凝集促進剤)の添加があるが、これらの増感剤は、測定の感度及び信号を増大するのに効果があるものの、非特異反応も同様に増大させるという問題がある。また、特開昭60-53846号公報、特開平1-118770号公報、特開平2-257063号公報に開示されている、使用するラテックスの粒径を特定範囲に規定する方法、粒径の異なるラテックスを混在させる方法、界面活性剤を添加する方法においては、ラテックス粒径が大きくなると感度は増大するが定量範囲が狭くなり、粒径の異なるラテックスが混在すると個々の粒径の効果が制限され、界面活性剤を添加する場合においては、その感度改善効果が不十分である。

【0011】

他に、特開2000-206115号公報に開示されている、抗体を還元剤で処理して断片化してラテックスなどの担体に担持させる方法においては、抗体の前処理が必要となり、ラテックス凝集法の利点である試薬調製の簡便性を犠牲にしている。

【0012】

特開平10-90268号公報には、測定対象成分に対する抗体として、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を用いる免疫学的粒子凝集反応が記載されているが、これは高感度化、即ち測定対象成分の低濃度域での応答改善を目的としたものではなく、高濃度域におけるプロゾーン現象を抑制し、検体の希釈機構を持たない装置であっても、広いダイナミックレンジにおいて測定を可能にすることを目的としたものである。また、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせることで、及び、これらの抗体をそれぞれ不溶性担体粒子に固定して混合するか、あるいは抗体を混合したものを不溶性担体粒子も固定するかは、どちらでもよいとしている。

【0013】

10

20

30

40

50

【特許文献 1】特開平 5 - 8 0 0 5 1 号公報
【特許文献 2】特開平 5 - 2 9 7 0 0 2 号公報
【特許文献 3】特開平 6 - 5 8 9 3 5 号公報
【特許文献 4】特開昭 6 0 - 5 3 8 4 6 号公報
【特許文献 5】特開平 1 - 1 1 8 7 7 0 号公報
【特許文献 6】特開平 2 - 2 5 7 0 6 3 号公報
【特許文献 7】特開 2 0 0 0 - 2 0 6 1 1 5 号公報
【特許文献 8】特開平 1 0 - 9 0 2 6 8 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0 0 1 4】

本発明は、従来公知の免疫診断試薬の高感度化方法では達成し得なかった、ラテックス凝集法の利点である試薬調整の簡便性を損なうことなく、測定対象とする成分の凝集反応のみを特異的に増強するための方法を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 5】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を用いてラテックス試薬を調製する際に、個々の抗体を別々にラテックスへ担持させて凝集反応時にそれらを混合するのではなく、複数種の抗体を予め混合した抗体溶液を調製した後に、この抗体溶液を用いて抗体をラテックスへ担持させることにより、試薬調製の簡便性を維持したまま、測定対象成分の凝集反応のみを特異的に増強せしめることに成功し、本発明を完成するに至った。

20

【0 0 1 6】

即ち、本発明によれば、抗体を担持させた担体に抗原を接触させることによって生成する凝集を測定することを含む抗原の測定方法において、上記の抗体を担持させた担体が、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を同時に担体へ感作して担持させた担体であることを特徴とする抗原の測定方法が提供される。

【0 0 1 7】

好ましくは、抗体を担持させた担体は、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を予め任意の混合比で混合した混合物を担体へ感作して担持させた担体である。

30

好ましくは、抗原は C R P (C 反応性蛋白) または T S H (甲状腺刺激ホルモン) である。

【0 0 1 8】

さらに本発明によれば、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を同時に担体へ感作して担持させることによって製造される担体からなる、上記した本発明による抗原の測定方法で使用するための免疫測定試薬が提供される。

【発明の効果】

【0 0 1 9】

本発明によれば、試薬調製の簡便性を維持したまま、測定対象成分の凝集反応のみを特異的に増強せしめた抗原の測定方法、及び上記方法に用いるための免疫測定試薬が提供される。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0 0 2 0】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の抗原の測定方法は、抗体を担持させた担体に抗原を接触させることによって生成する凝集を測定することを含む抗原の測定方法であって、上記の抗体を担持させた担体が、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を同時に担体へ感作して担持させた担体であることを特徴とする方法である。なお、本発明で言う抗原の測定とは、抗原の存在の有無の検出、並びに抗原の量の測定（即ち、定量）などを含む、最も広い概念として解釈されるものとする。また、本発明で言う凝集を測定とは、凝集の度合

50

いの測定のみならず、凝集を観察することなども含む広い概念として解釈されるものとする。

【0021】

本発明において使用され得る抗体は、モノクローナル抗体であればよく、測定対象成分の異なるエピトープを認識する抗体が複数種含有されていれば特に制限されない。

【0022】

また、抗体の動物種を制限するものでもなく、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ヒトなどに由来するモノクローナル抗体が使用可能である。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清や培養上清から公知の方法により調製した抗体でも使用可能である。

10

【0023】

本発明において好ましくは、抗原の異なるエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を予め任意の混合比で混合した混合物を担体へ感作させることによって、抗体を担体に担持させることができる。複数種の抗体を混合する際の混合比は特に制限されるものではなく、任意の混合比において複数種の抗体を混合することができる。この際、個々の抗体を別々にラテックスに担持させて凝集反応時に混合するよりも、予め混合した抗体溶液をラテックスへ担持させることによって、測定対象成分の凝集反応のみを特異的に増強させることができる。

【0024】

本発明で使用される担体は、抗体を担持可能なことと、抗体を担持させた後の担体が、抗原の存在下、抗原抗体反応に伴う凝集反応を生成するものであれば使用可能であり、公知の担体は特に制限されることなく使用することができる。抗体を担持させた担体を調製する際の抗体量及び担体量も特に制限されるものではなく、任意の量にて調製することが可能である。

20

【0025】

担体としては、従来公知のポリスチレン粒子を使用することが可能だが、特に材質についても免疫凝集反応の分野において用いられる公知の担体用材質であれば、特に制限されることなく使用できる。そのような材質の例として、ポリスチレン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル(メタ)アクリレート共重合体、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、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の合成高分子粉末があり、これらを均一に懸濁させたラテックスが好ましい。また、その他の有機高分子粉末や無機物質粉末、微生物、血球や細胞膜片、プラスチック製マイクロタイタープレートなどが挙げられる。無機物質粉末の例としては、金、チタン、ニッケルなどの金属片やシリカ、アルミナなどが挙げられる。

30

【0026】

上記担体の粒径は、担体の材質や測定対象成分を定量する濃度範囲、測定機器及び方法によって異なるが、通常は0.01~1.0 μ m、より好ましくは0.05~0.7 μ mのものが使用可能である。

【0027】

抗体を担体に担持させて試薬を調製する方法については、例えば、特開2000-206115号公報に記載のような、免疫凝集反应用試薬を調製する公知の方法がいずれも使用可能である。即ち、抗体を担体に担持させる方法として、物理吸着法及び共有結合による化学結合法のいずれでも使用可能で、抗体を担体に担持させた後に抗体が被覆されていない担体表面を覆うブロッキング剤としても、公知の物質、例えば、BSA(ウシ血清アルブミン)やブロックエース、スキムミルク、カゼインなどが使用可能である。これらのブロッキング剤は、必要に応じて熱や酸・アルカリ等により部分変性などの前処理を施すことも可能である。

40

【0028】

抗体を担体に担持させて試薬を調製する具体的な方法を、以下に例示する。ラテックス

50

粒子の固形分濃度が 0.1 ~ 10 % になるよう分散させた液に、0.01 ~ 20 mg / mL の濃度に調整した抗体溶液を添加して、混合する。温度 4 ~ 50 の条件下で 10 分から ~ 48 時間攪拌を継続する。その後、遠心分離その他の方法により担体と溶液を分離して、溶液に含まれている、担体に結合しなかった抗体を十分に除去する。その後、担体を緩衝液にて洗浄する操作を 0 ~ 10 回繰り返す。担体と抗体を混合して、担体に抗体を結合させる操作を実施した後に、抗原抗体反応に関与しない成分、好ましくは蛋白質、より好ましくは BSA (ウシ血清アルブミン)、ブロックエース、スキムミルク及びカゼインなどのブロッキング剤を使用して担体表面の抗体が結合していない部分を保護し、測定時の非特異反応を防ぐことが望ましい。

【0029】

測定対象の検体としては、生体成分を含む液体であればよく、例えば、血液(全血、血漿、血清)、胸水、腹水、リンパ液、尿、便、汗、髄液などが使用可能である。また、測定対象となる生体成分(抗原)としては、抗原抗体反応を行い得る物質であればよく、例えば、免疫グロブリンあるいはそれ以外の蛋白質やペプチド、多糖類及び糖類、脂質、ホルモン及びホルモン様物質、薬物などが挙げられる。

【0030】

本発明の測定法については、抗体を担持させた担体の分散液と測定対象成分を含む検体とを接触させて反応を開始させ、抗原抗体反応に伴う凝集物の生成を、一定時間における紫外 ~ 可視 ~ 近赤外領域のある特定波長での測定により定量する。通常の場合、数分 ~ 数時間後には測定が完了する。担体の分散液と検体の 2 液で反応を開始させてもよいし、さらに安定化剤あるいは凝集促進剤を含む溶液を別に調製して、3 液で反応させてもよい。これらの安定化剤あるいは凝集促進剤は、担体の分散液や検体中に含有されていてもよく、これらの物質は必要に応じて添加可能である。

【0031】

安定化剤とは、例えばグッドバッファーなどの緩衝液、ポリエチレングリコールや多糖類などの合成あるいは天然高分子、界面活性剤など、反応時の各試薬及び成分、あるいは反応の進行自体を安定化するものであれば特に制限されない。これらの物質が安定化剤としてのみではなく、凝集反応の促進物質として作用する場合も同様である。反応時の各試薬及び成分とは、例えば、担体に結合させた抗体や測定対象成分のことであり、例えば、特開平 8 - 187095 号公報に記載されているように、抗体や酵素などの蛋白質を安定化するために糖類を添加することは公知の事実である。従って、試薬中の抗体の安定性を維持するために糖類、アミノ酸などの安定化剤を共存させることは容易に推察可能である。また、測定対象物質が蛋白質等のような不安定な物質の場合にも、その測定対象物質を測定の間、安定に保つことを目的として、同様に安定化剤を共存させることができる。

【0032】

凝集促進剤の例として、例えば、ポリエチレングリコール、ポリグリコシルメタクリレート、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、プルラン等の合成あるいは天然高分子が挙げられる。同様の作用を有す界面活性剤の例としては、例えば、特開平 5 - 297002 に記載のポリエチレングリコール脂肪酸モノエステル誘導体が挙げられる。疎水基部分を構成する脂肪酸の飽和、不飽和の別は無関係であり、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などが挙げられる。

【0033】

使用することのできる緩衝液は、通常の抗原抗体反応が行われる pH 条件下で緩衝能を有していればよく、そのような pH 条件として 5 ~ 11、より好ましくは、6 ~ 10 が用いられる。この pH 条件下で緩衝能を有す緩衝液の例として、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、MES 緩衝液、HEPES 緩衝液、グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液など、グッドバッファーを含む、通常の生化学実験において使用され得る緩衝液であれば、いずれも使用可能である。また、抗体を担持させた担体の分散液や測定対象成分を含む検体など、凝集反応に関与する液体については、必要に応じて界面活性剤、合成あるいは天然高

10

20

30

40

50

分子、有機及び無機試薬などを添加することができる。例えば、界面活性剤については、ノニオン系、アニオン系、カチオン系等、免疫凝集反応に公知のものが使用可能で、それは他の試薬についても同様である。

【0034】

抗原抗体反応に伴う凝集反応を行わせる際、凝集の度合いを測定する方法としては、目視やビデオ等による撮影の他に分光学的に行う方法などがある。分光学的な測定については、抗体を担持させた担体の分散液と測定対象成分を含む検体とを接触させた反応液を公知の方法によって行えばよく、例えば担体の粒径、濃度、反応時間の経過に伴う散乱光強度や吸光度または透過光の変化(増加や減少)を測定する。

【0035】

以下に、本発明の例として、ラテックス凝集反応試薬の一形態を示すが、これによって本発明の範囲が限定されるものではない。

【実施例】

【0036】

<実施例1> CRP(C反応性蛋白)の検出

(1)抗体結合ラテックスの調製

エピトープの異なる2種類のマウス由来抗CRPモノクローナル抗体A及びマウス由来抗CRPモノクローナル抗体Bを、公知の方法に従い作製した。モノクローナル抗体の作製法は、例えば「免疫実験法ハンドブック」(中島泉編、名古屋大学出版会)に記載されている。具体的には、抗原としてCRPを用いマウスに免疫し、数週間後に脾細胞を取り出し、ポリエチレングリコールを用いて骨髓腫細胞と融合させた。HAT選択培地中で約2週間培養後、抗CRP抗体産生ハイブリドマクローンからクローニングしてモノクローナル抗体産生クローンを選択した。その中から異なるエピトープを認識する抗CRP抗体A、Bを精製して使用した。抗CRP抗体A、及び抗CRP抗体BがCRPの異なるエピトープを認識することは、ELISAその他の方法より確認した。ポリスチレン製のラテックス粒子(JSR社製、粒径0.5 μ m)を固形分濃度3%になるようグリシンバッファー(pH9.6)にて希釈し、同様にして濃度約2mg/mLになるよう調製した抗CRP抗体A及び抗CRP抗体Bを、そのラテックス分散液に等量になるよう添加して攪拌し、室温で1時間反応させた。11,000rpmで15min、遠心分離した後に上清を除去、沈殿にブロッキング剤として0.2%のBSAのグリシンバッファー溶液(pH9.6、0.001%のTriton X-100を含む)を、ラテックス固形分濃度1.5%になるよう添加した。室温で1時間攪拌後、11,000rpmで15分間遠心分離して上清を除去した。沈殿にグリシンバッファー(pH9.6)を添加して再分散した後、再度11,000rpmで15分間遠心分離して上清を除去した。その沈殿に、最終的にラテックス固形分濃度が3.0%になるよう、グリシンバッファー(pH9.6)を添加して再分散し、抗CRP抗体結合ラテックス試薬とした。その際、表1に示したように、2種の抗CRPモノクローナル抗体A及び抗CRP抗体Bを、それぞれ単独でラテックスに結合させて所定の割合(100:0、75:25、50:50、25:75、0:100)に混合したものと、予め所定の割合(75:25、50:50、25:75)で混合してラテックスに結合させたものとを調製した。また、比較のために、市販の抗CRPポリクローナル抗体を使用して、同様の操作によりラテックス粒子に結合させ、抗CRP抗体結合ラテックス試薬を調製した。購入した抗CRPポリクローナル抗体は日本バイオテスト研究所製で、抗ヒトCRPヒツジIgG分画から成る。

【0037】

10

20

30

40

【表 1】

表 1. 抗体A及び抗体Bの混合比(A : B)

試薬調製法	①	②	③	④	⑤
抗体A及び抗体Bを単独に結合	100 : 0	75 : 25	50 : 50	25 : 75	0 : 100
抗体A及び抗体Bを混合して結合	—	75 : 25	50 : 50	25 : 75	—

【 0 0 3 8 】

(2) C R P の 検 出

10

C R P 濃度が 0 ~ 2 4 $\mu\text{g} / \text{dL}$ になるよう、C R P 標準液をバッファーにて希釈して、C R P 溶液(検体)とした。日立製分光光度計を使用して、表 1 に示した抗 C R P 抗体結合ラテックスと検体を 3 7 で反応させ、一定時間における吸光度変化を測定した。まず反応セルに、所定の濃度になるよう希釈した C R P 溶液を 4 0 0 μL 添加し、3 7 で予備加温を 5 分間行った。その後、反応液中のラテックス固形分量が最終的に 0 . 0 1 5 % となるように予め希釈した抗 C R P 抗体結合ラテックス試薬を 6 0 0 μL 添加して、反応を開始し、4 0 m i n . 経過後に反応を停止した。その間、一定間隔毎に波長 8 0 0 n m における吸光度を測定し、その変化から一定濃度の C R P (2 . 4 $\mu\text{g} / \text{dL}$) に対する応答をみた。その際の測定結果を図 1 に示す。横軸に抗体 A、B の割合をとり、縦軸に反応開始後 0 . 2 5 分と 1 . 9 3 分の O D 値の差を 1 分間あたりの変化量 O D / 分に換算した値をとった。この O D / 分が高値であるほど、強い凝集反応が起きていることを示す。抗体 A と抗体 B の混合比に関わらず、抗体を単独でラテックスに結合させて反応時に混合した場合よりも、予め抗体を混合してラテックスに結合させて反応させた場合のほうが強い凝集反応が起きていた、即ち感度が高いことが明らかとなった。また、比較のために調製した、抗 C R P ポリクローナル抗体を結合させたラテックス試薬を使用して同様の操作を行った結果、モノクローナル抗体を所定の割合で混合して調製したラテックス試薬よりも弱い凝集反応しか認められず、従って、単純な混合物としてのポリクローナル抗体よりも、特定のエピトープを認識する複数種のモノクローナル抗体を混合することの優位性が示された。

20

【 0 0 3 9 】

30

< 実施例 2 > T S H (甲状腺刺激ホルモン) の検出

(1) 抗体結合ラテックスの調製

エピトープの異なる市販の抗 T S H モノクローナル抗体を 4 種類準備した。購入した抗 T S H モノクローナル抗体は、メディックス社(フィンランド)製の抗ヒト T S H モノクローナル抗体で、クローン番号 5 4 0 1、5 4 0 5、5 4 0 7、5 4 0 9 の 4 種類を使用した。この 4 種類の異なるクローン番号の抗 T S H 抗体のうち、5 4 0 5 と 5 4 0 7 は T S H の同じエピトープを認識するが、5 4 0 1 と 5 4 0 5 / 5 4 0 7 と 5 4 0 9 は、各々異なる T S H のエピトープを認識する。そこで、3 種類の組み合わせ A (5 4 0 1、5 4 0 5、5 4 0 9) 及び B (5 4 0 1、5 4 0 7、5 4 0 9) について、実施例 1 と同様の方法を用いてラテックス粒子に抗 T S H 抗体を結合させた。即ち、ポリスチレン製のラテックス粒子(J S R 社製、粒径 0 . 5 μm) を固形分濃度 3 % になるようグリシンバッファー(p H 9 . 6) にて希釈し、同様にして濃度約 2 m g / m L になるよう調製した抗 T S H 抗体 5 4 0 1、5 4 0 5、5 4 0 7、5 4 0 9 を、そのラテックス分散液に等量になるよう添加して攪拌し、室温で 1 時間反応させた。1 1 , 0 0 0 r p m で 1 5 m i n . 遠心分離した後に上清を除去、沈殿にブロッキング剤として 0 . 2 % の B S A のグリシンバッファー溶液(p H 9 . 6、0 . 0 0 1 % の T r i t o n X - 1 0 0 を含む) を、ラテックス固形分濃度 1 . 5 % になるよう添加した。室温で 1 時間攪拌後、1 1 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離して上清を除去した。沈殿にグリシンバッファー(p H 9 . 6) を添加して再分散した後、再度 1 1 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離して上清を除去した。その沈殿に、最終的にラテックス固形分濃度が 3 . 0 % になるよう、グリシンバッファー(p H 9 .

40

50

6)を添加して再分散し、抗TSH抗体結合ラテックス試薬とした。その際、3種の抗TSHモノクローナル抗体を、それぞれ単独でラテックスに結合させて等しい割合(1:1:1)に混合したものと、予め等しい割合(1:1:1)で混合してラテックスに結合させたものとを調製した。

【0040】

(2) TSHの検出

TSH濃度が $5\mu\text{g}/\text{dL}$ になるよう、TSH標準液をバッファーにて希釈して、TSH溶液(検体)とした。日立製分光光度計を使用して、抗TSH抗体結合ラテックスと検体を37で反応させ、一定時間における吸光度変化を測定した。まず反応セルに、所定の濃度になるよう希釈したTSH溶液を $400\mu\text{L}$ 添加し、37で予備加温を5分間行った。その後、反応液中のラテックス固形分量が最終的に0.015%となるように予め希釈した抗TSH抗体結合ラテックス試薬を $600\mu\text{L}$ 添加して、反応を開始し、40min.経過後に反応を停止した。波長 800nm における40min.後の反応セルの吸光度を測定し、一定濃度のTSH($5\mu\text{g}/\text{dL}$)に対する応答をみた。同時に、ブランクとしてTSH濃度 $0\mu\text{g}/\text{dL}$ の場合の40min.後の吸光度も測定し、 $5\mu\text{g}/\text{dL}$ の吸光度からの差をとった。測定結果を表2に示す。この結果から、抗CRP抗体のみならず、抗TSH抗体においても、異なるエピトープを認識する複数種の抗体を単独にラテックスに結合させて測定時に混合するよりも、予めラテックス試薬調製時に抗体を混合してラテックスに結合させたほうが有利であることが示された。

10

【0041】

20

【表2】

表2. 抗TSH抗体の組み合わせとTSHに対する応答：反応時間40min.

(TSH濃度 $5\mu\text{g}/\text{dL}$ の吸光度とTSH濃度 $0\mu\text{g}/\text{dL}$ の吸光度との差)

抗体組み合わせ	A (5401, 5405, 5409)	② (5401, 5407, 5409)
3種類の抗体を単独に結合	0.263	0.157
3種類の抗体を混合して結合	0.304	0.289

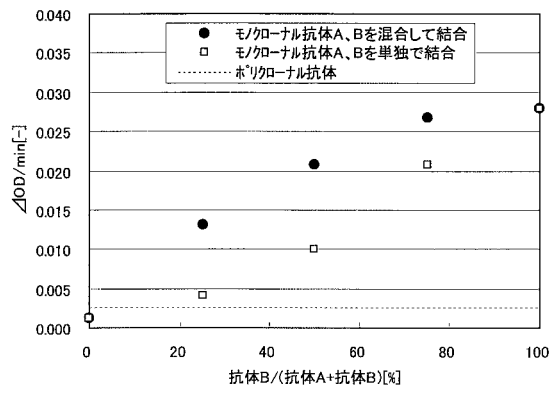
30

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1は、2種の抗体を結合させたラテックス試薬とCRP標準液との応答を示す。比較のために、ポリクローナル抗体を結合させたラテックス試薬とCRP標準液との応答を破線で示す。

【 図 1 】



专利名称(译)	高感度免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2009098138A	公开(公告)日	2009-05-07
申请号	JP2008248023	申请日	2008-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	村谷浩二 斎藤義雄 大原智也		
发明人	村谷 浩二 斎藤 義雄 大原 智也		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N2333/4737 G01N2333/59		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/53.X G01N33/53.E		
优先权	2007254179 2007-09-28 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供高灵敏度的免疫诊断试剂，通过定量生物材料上的抗原 - 抗体反应应用免疫凝集反应。解决方案：在用于测定抗原的方法中，包括测定通过使抗原与支持抗体的载体接触而产生的凝集，支持抗体的载体包含识别抗原的不同表位的多种类型的单克隆抗体。通过同时对载体敏化来支持其上。 Z

試薬調製法	①	②	③	④	⑤
抗体A及び抗体Bを単独に結合	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
抗体A及び抗体Bを混合して結合	-	75:25	50:50	25:75	-