

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第4260872号
(P4260872)

(45) 発行日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(24) 登録日 平成21年2月20日(2009.2.20)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Q
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 B

請求項の数 5 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2008-155728 (P2008-155728)	(73) 特許権者	000250018
(22) 出願日	平成20年6月13日(2008.6.13)		住化エンビロサイエンス株式会社
審査請求日	平成20年6月27日(2008.6.27)		兵庫県西宮市上甲子園四丁目3番4号
早期審査対象出願		(74) 代理人	100074206
			弁理士 鎌田 文二
		(74) 代理人	100087538
			弁理士 鳥居 和久
		(74) 代理人	100112575
			弁理士 田川 孝由
		(74) 代理人	100084858
			弁理士 東尾 正博
		(72) 発明者	江口 英範
			兵庫県西宮市津門飯田町2番123号 住 化エンビロサイエンス株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高感度酵素免疫測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固相抗体に対してアレルゲンを反応させ、生成した抗原抗体複合体に酵素で標識した抗体を反応させ、前記酵素に反応する基質を加えて生じた酵素反応生成物を検出する酵素免疫測定法において、

前記固相抗体とアレルゲンとの反応および前記抗原抗体複合体と酵素標識抗体との反応における各反応温度を23以下とし、かつ各反応時間を6時間以上としたことを特徴とする高感度酵素免疫測定法。

【請求項2】

測定対象のアレルゲンが、10 ng/ml以下の低濃度のアレルゲンである請求項1に記載の高感度酵素免疫測定法。

【請求項3】

測定対象のアレルゲンが、0.1~5 ng/mlの低濃度のアレルゲンである請求項1に記載の高感度酵素免疫測定法。

【請求項4】

固相抗体とアレルゲンとの反応および前記抗原抗体複合体と酵素標識抗体との反応における各反応温度を2~10とし、かつ各反応時間を12時間以上とした請求項1~3のいずれかに記載の高感度酵素免疫測定法。

【請求項5】

検出される酵素反応生成物の測定値の変動係数が10以下であり、かつ理論値より算出

10

20

される酵素反応生成物の回収率が80～110%である請求項1～4のいずれかに記載の高感度酵素免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、高感度酵素免疫測定法に関し、詳しくは測定対象抗原がアレルゲンであるサンドイッチELISA法による高感度酵素免疫測定法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

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（EIA法）は、放射性同位体元素を用いている放射免疫測定法（RIA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も遜色のないことが知られている。

【0003】

また、EIA法のうち固相を用いる場合はELISA法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）と称されるが、その中には競合法やサンドイッチ法などの改良された測定方法がある。

【0004】

標識酵素を用いた酵素免疫測定法において、細菌などの微生物の定量について測定精度及び測定感度を向上させると共に反応時間を短縮させて迅速な測定を行ない、さらに安定した測定を行うことができるようにする固相抗体と測定対象との反応温度として11～30の条件を採用し、さらに標識酵素を加えて反応させる温度条件を11～22にすることが知られている（特許文献1、特許文献2）。

このような菌類などの微生物については、 1.0×10^4 個/ml程度以上の検出ができればよいと考えられ、それより低濃度の定量測定が要求されることはないものと考えられる。

【0005】

また、免疫測定法の高感度化を進めるためには、固相抗体と測定対象物質の反応条件を数時間とし、測定対象物質と酵素標識抗体との反応条件を長時間とした方がよいとの記載がある（非特許文献1）。

【0006】

実際にアレルゲンを測定する際に求められる測定精度は、厚生労働省のガイドラインや文部科学省の学校衛生基準によると、ダニ数100匹/m²以下またはこれと同等のアレルゲン量以下が衛生的基準値であり、ダニ100匹に相当するアレルゲン量は10μgであるから、比較的高感度で正確な定量が求められている。

【0007】

このようにアレルゲンを測定する免疫測定法においては、測定対象域1m²の塵埃中のダニ数100匹以下のアレルゲンを正確に定量できる精度が求められるが、通常、その程度のアレルゲンの測定について従来の測定方法においても支障は少ない。

【0008】

【特許文献1】特開平5-307030号公報

【特許文献2】特開平5-307036号公報

【0009】

【非特許文献1】石川栄治著、「超高感度免疫測定法」、1994年、学会出版センター発行（第129頁等）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

しかし、アレルゲン除去剤、アレルゲン除去方法またはアレルゲン低減化剤の研究開発を行う上では、その効力評価や効力比較などを行なう場合に、前記の衛生的基準値よりも相当に小さなスケールで精密に検討を要する必要がある、また1m²を確保できない対象

10

20

30

40

50

区域についても極微量のアレルゲンを測定する方法や手段についても確立されていないという問題点がある。

【0011】

また、抗原と抗体の濃度が低い条件では、免疫測定ができるまで反応が起こるには長時間を要するが、できるだけ早く反応を起こさせるには温度条件はできるだけ高温にすることが常識であるが、それでは定量の正確性は損なわれてしまう。

【0012】

そこで、この発明の課題は、上記した問題点を解決して、高感度酵素免疫測定法としてアレルゲンを測定対象抗原としてサンドイッチELISA法を利用する場合、可及的に低濃度の抗原に対しても測定できるようにし、しかも正確に定量できる高感度酵素免疫測定法とすることである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記の課題を解決するために、この発明においては、固相抗体に対してアレルゲンを反応させ、生成した抗原抗体複合体に酵素で標識した抗体を反応させ、前記酵素に反応する基質を加えて生じた酵素反応生成物を検出する酵素免疫測定法において、前記固相抗体に対するアレルゲンの反応条件と、前記抗原抗体複合体に対する酵素標識抗体の反応条件における各反応温度を23以下とし、かつ各反応時間を6時間以上としたことを特徴とする高感度酵素免疫測定法としたのである。

【0014】

上記したように構成されるこの発明の高感度酵素免疫測定法は、後述の試験結果からも明らかなように、固相抗体に対するアレルゲンの反応条件と、前記抗原抗体複合体に対する酵素標識抗体の反応条件における各反応温度を23以下の低温に調整し、かつ各反応時間を6時間以上の長時間に設定することにより、従来の23を超えるような比較的高温で1～3時間という短時間の反応では検出が困難であった10ng/ml以下のような低濃度のアレルゲンに対しても検出が可能であると共に、正確に定量することができる高感度酵素免疫測定法になる。

【0015】

測定対象のアレルゲンは、特にその種類を限定されることがなく、また測定対象の濃度は、例えば10ng/ml以下の低濃度、さらには0.1～5ng/mlの低濃度アレルゲンを測定可能であり、かつそのような範囲より高濃度でも問題なく測定可能である。

【0016】

また酵素反応生成物が、発色性または発光性の酵素反応生成物であれば、吸光度や発光強度を測定して抗原量を定量することができる。

【0017】

また、固相抗体に対するアレルゲンの反応条件、および抗原抗体複合体に対する酵素標識抗体の反応条件は2～10であり、かつ12時間以上であることが、吸光度の測定結果の変動係数を10以下とし、かつ理論値より算出される回収率を80～110%の範囲にし、正確な定量結果を得るために好ましい。

【発明の効果】

【0018】

この発明は、酵素免疫測定法における固相抗体に対するアレルゲンの反応条件と、前記抗原抗体複合体に対する酵素標識抗体の反応条件における各反応温度を23以下とし、かつ各反応時間を6時間以上としたことにより、10ng/ml以下という可及的低濃度の抗原に対しても、これを正確に定量することが可能になり、特に変動係数10以下、理論値より算出される回収率を80～110%の範囲という正確な定量ができる酵素免疫測定法であるという利点がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

この発明の高感度酵素免疫測定法は、一般的にサンドイッチELISA法と称される測

10

20

30

40

50

定法を改良した方法であり、抗原の一種である蛋白質のアレルゲンと特異的に反応する抗体、好ましくはモノクローナル抗体を担体に固定して固相とし、このような固相抗体と、これに特異的に反応する抗原とが反応することにより抗原抗体複合体を形成させる。このように固相抗体と抗原であるアレルゲンとの反応を以下に一次反応と称する。

【0020】

さらにこの抗原抗体複合体に対して、抗原と特異的に反応し、かつ酵素を結合させた抗体、好ましくは抗原と特異的に反応し、かつ酵素を結合させたモノクローナル抗体（以下、酵素標識抗体とする。）を反応させ、抗原に固相抗体と酵素標識抗体が結合させた抗原抗体複合体を形成させる。このように抗原抗体複合体と酵素標識抗体との反応を以下に二次反応と称する。

10

【0021】

そして、酵素に反応する基質を加えて生じた酵素反応生成物を検出し、例えば酵素の発色基質を反応させて発色させ、この発色の吸光度を測定して抗原量の定量を正確に行う測定方法である。

【0022】

この発明の高感度酵素免疫測定法は、通常酵素免疫測定と同様に実施することができる。例えば、担体としてマイクロウェルプレートなどを用い、これに被検体に特異的に結合する抗体を表面に固着させた基板を用いることができ、通常、反応のために振とうする必要はない。

20

【0023】

この発明におけるアレルゲンは、抗体と反応してアレルギー症状を引き起こす物質（抗原）そのものを指すが、その抗原を含んだ物質であってもよく、また測定対象のアレルゲンの種類は、特に限定されない。このようなアレルゲンの具体例としては、ダニ、植物の花粉、動物（皮塵、昆虫など）、食品、微生物（カビその他の真菌など）その他周知のアレルゲンが挙げられる。一般的に、室内環境でのアレルゲン量は、ダニアレルゲン量を基準に判断されている。

【0024】

固相抗体と測定対象物質中の抗原の反応、測定対象物質中の抗原と酵素標識抗体の反応における両反応条件は、23 以下好ましくは20 以下の温度条件に調整され、かつ6時間以上好ましくは12時間以上の反応時間に設定する。

30

【0025】

この反応条件によって、抗原濃度が数 ng/ml 以下、例えば10 ng/ml 以下の濃度の抗原液であっても実測値から算出した変動係数が10以下となり、かつ理論値と実測値から算出した回収率が80%以上110%以下の正確な測定結果を得ることができる。

【0026】

この発明の高感度酵素免疫測定法においてより正確な定量を行なうためには、固相抗体とアレルゲンとの反応、および前記抗原抗体複合体と酵素標識抗体との反応における各反応の温度を2~10 とし、かつ反応時間を12時間以上とすることが好ましい。

【実施例】

【0027】

40

[実施例1~24、比較例1~48]

精製ダニ抗原 Derf 2（アサヒビール社製）をリン酸緩衝液にて既知濃度の抗原液を調製した。この既知濃度の抗原液について、サンドイッチ ELISA 法により抗原量の測定を行なった。

【0028】

なお、上記のリン酸緩衝液は、pH 7.3 のものであり、0.1 重量%ウシ血清アルブミン及び0.05 重量%ポリオキシエチレン（20）ソルピタンモノラウレートを含むものである。以下に同じ組成のリン酸緩衝液をリン酸緩衝液（pH 7.3）と記す。

【0029】

まず、リン酸緩衝液（pH 7.3）で2 μg/ml に希釈した抗 Derf 2 モノクロー

50

ナル抗体（アサヒビール社製）をプレート（F16MAXISORP NUNC - IMMNO MODULEプレート：NUNC社製）に1ウェルあたり100 μ lずつ添加して4で1日以上静置してプレートに固相化させた。

【0030】

固相化させた後のウェル中の液を捨て、ブロッキング試薬である1重量%ウシ血清アルブミンとリン酸緩衝液（pH7.3）を1ウェルあたり200 μ lずつ添加し、37、60分間反応させた。この反応後、リン酸緩衝液（pH7.3）にてプレートを洗浄した。

【0031】

洗浄後、上記既知の抗原液を1ウェルあたり100 μ lずつ滴下し、表1に示す反応条件（一次反応）にて所定時間だけ反応させた。この反応後、リン酸緩衝液（pH7.3）にてプレートを洗浄した。

10

【0032】

洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗Derf2モノクローナル抗体（アサヒビール社製）をリン酸緩衝液（pH7.3）にて200 μ g/mlになるように溶解したものをさらにリン酸緩衝液（pH7.3）にて1200倍に希釈した液を1ウェルあたり100 μ lずつ添加し、表1中の反応条件（二次反応）で反応を行なった。この反応後、リン酸緩衝液（pH7.3）にてプレートを洗浄した。

【0033】

洗浄後、0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH6.2）13mlにオルトフェニルジアミンジヒドロクロライド（26mg Tablet、SIGMA CHEMICAL CO.製）と過酸化水素水13 μ lを加え、これを1ウェルあたり100 μ lずつ添加して37、約5分間反応させた。その後、直ちに2mol/L H₂SO₄を1ウェルあたり50 μ lずつ添加して反応を停止させた。

20

【0034】

[温度条件と反応時間の条件別の吸光度の測定試験]

実施例1~24、比較例1~48の各反応温度条件および反応時間条件における酵素免疫測定方法について、上記の反応停止後、マイクロプレートリーダー（Bio-Rad Laboratories Inc.製）を用いて490nmの吸光度を測定し、既知抗原濃度毎の吸光度と反応時間の関係を図1~12に示した。

30

【0035】

【表 1】

反応条件番号	比較例実施例の番号	反応温度	一次反応時間	二次反応時間
反応条件 1	比較例 1～3	37℃	8時間、6時間、3時間、	1時間
	比較例 4～6		2時間、1時間、30分間	
反応条件 2	比較例 7～9	37℃	1時間	8時間、6時間、3時間、
	比較例 10～12			2時間、1時間、30分間
反応条件 3	比較例 13～15	25℃	6時間、4時間、2時間	1日間
	比較例 16～18		1時間、30分間、15分間	
反応条件 4	比較例 19～21	25℃	1日間	6時間、4時間、2時間
	比較例 22～24			1時間、30分間、15分間
反応条件 5	実施例 1～3	20℃	1日間、8時間、6時間	1日間
	比較例 25～27		3時間、2時間、1時間	
反応条件 6	実施例 4～6	20℃	1日間	1日間、8時間、6時間
	比較例 28～30			3時間、2時間、1時間
反応条件 7	実施例 7～9	15℃	2日間、1日間、6時間、	2日間
	比較例 31～33		3時間、2時間、1時間	
反応条件 8	実施例 10～12	15℃	2日間	2日間、1日間、6時間、
	比較例 34～36			3時間、2時間、1時間
反応条件 9	実施例 13～15	10℃	2日間、1日間、6時間、	2日間
	比較例 37～39		3時間、2時間、1時間	
反応条件 10	実施例 16～18	10℃	2日間	2日間、1日間、6時間、
	比較例 40～42			3時間、2時間、1時間
反応条件 11	実施例 19～21	2℃	2日間、1日間、6時間、	2日間
	比較例 43～45		3時間、2時間、1時間	
反応条件 12	実施例 22～24	2℃	2日間	2日間、1日間、6時間、
	比較例 46～48			3時間、2時間、1時間

【0036】

反応条件 1～4 のように、温度条件が 25 以上が高い場合は反応時間が 2 時間以上という比較的短時間で、吸光度は一定になるのに対し、反応条件 5～12 のように温度条件 20 以下の場合、3 時間以下では不安定であるが 6 時間から吸光度が一定となっている。このことから反応条件 1～4 のような高温条件では 2 時間以上、反応条件 5～12 のような 20 以下では 6 時間以上の反応時間が必要である。

このように実施例の反応条件 5～12 のような 2～20 という低温反応条件では、反応時間は長く要するが、抗原濃度 0.1～6.25 ng/ml の吸光度は、6 時間を越えても安定しており、特に 2～10 では 24 時間までは一次反応および二次反応共に特に安定していて、低濃度の抗原量を測定可能であることがわかる。

一方、比較例 1～24 である反応条件 1～4 のように温度条件が 25 以上である場合は、反応時間が 3 時間を越えると、高濃度の測定対象に比べて低濃度の吸光度は不安定であり、6.25 ng/ml 以下の抗原濃度の試料について吸光度は特に不安定になった。

【0037】

[実施例 25～29、比較例 49～51]

精製ダニ抗原 Derf 2 (アサヒビール社製) をリン酸緩衝液 (pH 7.3) にて既知濃度の抗原液を調製した。この既知濃度の抗原液を Derf 2 としてサンドイッチ ELISA 法による抗原量の測定を行った。

【0038】

まず、リン酸緩衝液 (pH 7.3) で 2 μg/ml に希釈した抗 Derf 2 モノクローナル抗体 (アサヒビール社製) をプレート (F16 MAX ISORP NUNC - IMMNO MODULE プレート: NUNC 社製) に 1 ウェルあたり 100 μl ずつ添加して 4 にて 1 日以上静置させてプレートに固相化させた。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

固相とした後、プレートのウェル中の液を捨て、ブロッキング試薬として1重量%ウシ血清アルブミンとリン酸緩衝液(pH 7.3)の混合液を1ウェルあたり200 μ lずつ添加し、37、60分間反応させた。反応後、リン酸緩衝液(pH 7.3)にてプレートを洗浄した。

【 0 0 4 0 】

洗浄後、上記既知の抗原液を1ウェルあたり100 μ lずつ滴下し、表2の反応条件(一次反応)で反応を行った。反応後、リン酸緩衝液(pH 7.3)にてプレートを洗浄した。

【 0 0 4 1 】

洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗Derf2モノクローナル抗体(アサヒビール社製)をリン酸緩衝液(pH 7.3)にて200 μ g/mlになるように溶解したものをさらにリン酸緩衝液(pH 7.3)にて1200倍に希釈した液を1ウェルあたり100 μ lずつ添加し、表2の反応条件(二次反応)で反応を行った。反応後、リン酸緩衝液(pH 7.3)にてプレートを洗浄した。

【 0 0 4 2 】

洗浄後、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.2)13mlにオルトフェニルジアミンジヒドロクロライド(26mg Tablet, SIGMA CHEMICAL CO. 製)と過酸化水素水13 μ lを加えたものを1ウェルあたり100 μ lずつ添加して37、約5分間反応させた。その後直ちに、2mol/L H₂SO₄を1ウェルあたり50 μ lずつ添加して反応を停止させた。

【 0 0 4 3 】

[既知濃度抗原液測定の正確性確認試験]

実施例25~29、比較例49~51の各反応温度条件および反応時間条件における酵素免疫測定方法について、上記の反応停止後、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories Inc. 製)を用いて490nmの吸光度を測定した。測定結果(抗原量、標準偏差、変動係数、回収率)を表3~10に示した。

【 0 0 4 4 】

【表2】

反応条件の番号	実施例と比較例の番号	一次反応条件	二次反応条件
反応条件13	比較例49	37℃、1時間	37℃、1時間
反応条件14	比較例50	37℃、1日間	37℃、1日間
反応条件15	比較例51	25℃、1日間	25℃、1日間
反応条件16	実施例25	20℃、1日間	20℃、1日間
反応条件17	実施例26	15℃、2日間	15℃、2日間
反応条件18	実施例27	10℃、2日間	10℃、2日間
反応条件19	実施例28	2℃、2日間	2℃、2日間
反応条件20	実施例29	2℃、1日間	2℃、1日間

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

【表 3】

[反応条件 1 3 (37℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1ng/ml	1.00	0.10	9.59	99.61
0.5ng/ml	0.48	0.06	12.15	95.57
0.25ng/ml	0.24	0.03	13.81	95.42
0.125ng/ml	0.12	0.03	25.13	98.77
0.0625ng/ml	0.09	0.04	46.15	144.38
0.03125ng/ml	0.07	0.03	51.02	214.19
0.015625g/ml	0.04	0.04	103.12	276.09
0.0078125ng/ml	0.01	0.01	74.80	173.42

10

【0046】

【表 4】

[反応条件 1 4 (37℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1 ng/ml	1.18	0.28	23.39	118.14
0.5 ng/ml	0.60	0.12	19.20	120.29
0.25 ng/ml	0.35	0.04	12.41	140.54
0.125 ng/ml	0.14	0.02	16.30	113.10
0.0625 ng/ml	0.09	0.05	54.36	144.26
0.03125 ng/ml	0.06	0.05	84.82	186.27
0.015625 g/ml	0.19	0.29	152.88	1232.65
0 ng/ml	0.79	算出不可	算出不可	算出不可

20

【0047】

【表 5】

[反応条件 1 5 (25℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1 ng/ml	0.84	0.08	8.99	84.14
0.5 ng/ml	0.45	0.02	3.48	89.90
0.25 ng/ml	0.26	0.05	17.73	103.17
0.125 ng/ml	0.13	0.01	7.20	102.26
0.0625 ng/ml	0.08	0.01	10.07	127.93
0.03125 ng/ml	0.05	0.01	22.16	150.08
0.015625 ng/ml	0.03	0.01	38.94	163.41
0 ng/ml	0.01	0.01	79.55	125.06

30

【0048】

【表 6】

[反応条件 1 6 (20℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1 ng/ml	0.91	0.04	4.89	90.76
0.5 ng/ml	0.48	0.02	5.10	95.80
0.25 ng/ml	0.24	0.00	0.86	95.87
0.125 ng/ml	0.12	0.00	2.21	94.85
0.0625 ng/ml	0.06	0.00	3.61	89.54
0.03125 ng/ml	0.03	0.00	8.40	85.20
0.015625 ng/ml	0.01	0.00	23.81	64.32
0 ng/ml	0.00	0.00	82.35	44.03

40

【0049】

【表 7】

[反応条件 17 (15℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1 ng/ml	1.07	0.02	2.12	106.73
0.5 ng/ml	0.54	0.03	5.00	107.58
0.25 ng/ml	0.26	0.02	8.38	103.40
0.125 ng/ml	0.12	0.00	3.86	95.27
0.0625 ng/ml	0.06	0.00	7.80	91.90
0.03125 ng/ml	0.03	0.01	29.40	90.76
0.015625 ng/ml	0.01	0.00	33.37	67.76
0 ng/ml	0.01	0.00	53.37	算出不可

10

【0050】

【表 8】

[反応条件 18 (10℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1 ng/ml	0.97	0.05	5.17	96.91
0.5 ng/ml	0.48	0.01	2.04	96.30
0.25 ng/ml	0.24	0.01	2.76	94.09
0.125 ng/ml	0.11	0.01	4.76	88.52
0.0625 ng/ml	0.05	0.01	13.05	82.97
0.03125 ng/ml	0.04	0.04	89.80	129.17
0.015625 ng/ml	0.01	0.01	79.65	78.05
0 ng/ml	0.01	0.01	93.42	算出不可

20

【0051】

【表 9】

[反応条件 19 (2℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
4 ng/ml	4.16	0.19	4.63	104.00
2 ng/ml	2.12	0.08	3.66	105.97
1 ng/ml	0.98	0.07	6.94	97.88
0.5 ng/ml	0.52	0.02	3.87	103.58
0.25 ng/ml	0.24	0.01	3.94	96.28
0.125 ng/ml	0.12	0.00	3.72	93.04
0.0625 ng/ml	0.05	0.01	12.17	84.25
0.03125 ng/ml	0.03	0.01	22.27	83.39

30

【0052】

【表 10】

[反応条件 20 (2℃)]

理論量	測定値平均	標準偏差	変動係数	回収率
1 ng/ml	0.90	0.04	4.90	89.54
0.5 ng/ml	0.44	0.02	4.42	88.39
0.25 ng/ml	0.22	0.01	4.93	88.87
0.125 ng/ml	0.10	0.01	9.36	82.98
0.0625 ng/ml	0.05	0.01	21.29	85.84
0.03125 ng/ml	0.03	0.01	26.95	90.18
0.015625 ng/ml	0.01	0.00	28.10	63.44
0 ng/ml	0.01	0.01	129.27	算出不可

40

【0053】

50

反応条件 13、14、15 において 25 以上の温度条件では抗原濃度 0.5 ng/ml 未満では、変動係数が 10 以上になって、回収率も 80 ~ 110% の範囲にはなく、あまり正確に定量ができていないことがわかる。

また、反応条件 16 ~ 20 のように 25 未満の温度条件では 0.5 ng/ml 未満 (好ましくは 0.5 ng/ml 未満 0.1 ng/ml 以上) であっても変動係数は 10 以下であり、回収率も 80% 以上 110% 以下であることから正確に定量できていることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図 1】温度条件 37 での 1 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

10

【図 2】温度条件 37 での 2 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 3】温度条件 25 での 1 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 4】温度条件 25 での 2 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 5】温度条件 20 での 1 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 6】温度条件 20 での 2 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 7】温度条件 15 での 1 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 8】温度条件 15 での 2 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 9】温度条件 10 での 1 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 10】温度条件 10 での 2 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【図 11】温度条件 2 での 1 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

20

【図 12】温度条件 2 での 2 次反応の反応時間と吸光度との関係を示す図表

【要約】

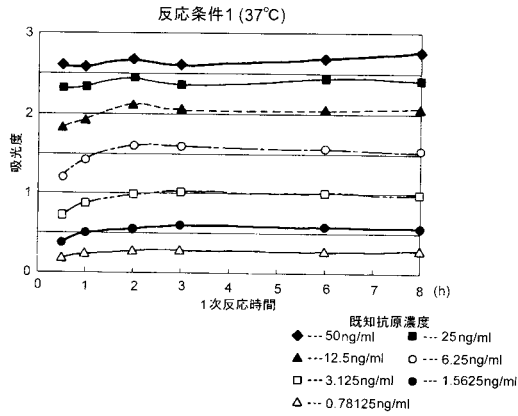
【課題】 可及的低濃度の抗原に対して、これを正確に定量することを可能にするサンドイッチ ELISA 法とすることである。

【解決手段】 一次抗体である固相抗体に対して測定対象の 10 ng/ml 以下の低濃度アレルギーを反応させ、このとき反応したアレルギーに対して酵素で標識した二次抗体を反応させた後、前記酵素に反応する発色性または発光性の基質を加えて得られる酵素反応生成物を検出する酵素免疫測定法において、前記一次抗体に対するアレルギーの反応条件、およびアレルギーに対する二次抗体の反応条件を 23 以下、かつ 6 時間以上に調整する。

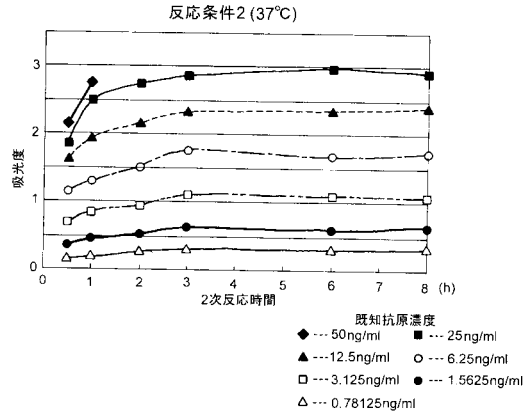
30

【選択図】なし

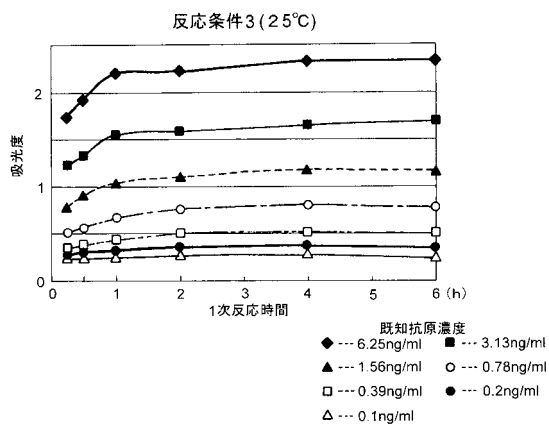
【 図 1 】



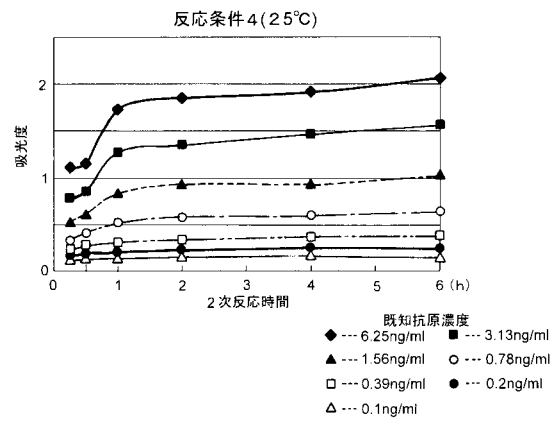
【 図 2 】



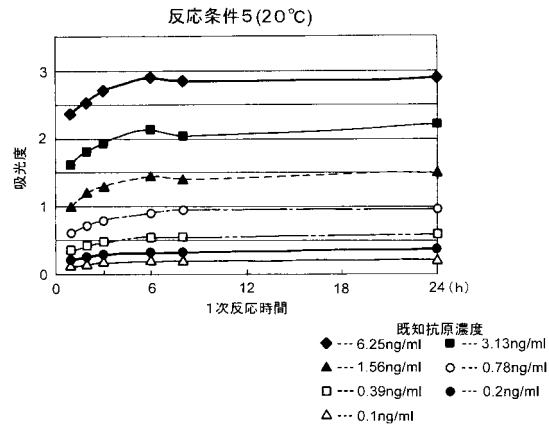
【 図 3 】



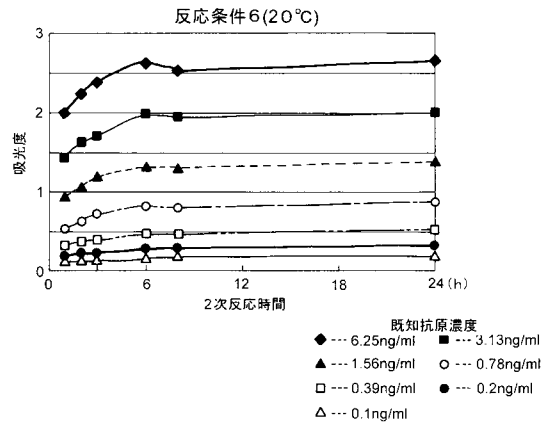
【 図 4 】



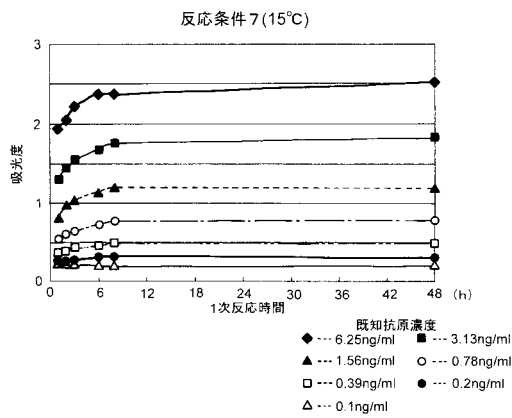
【 図 5 】



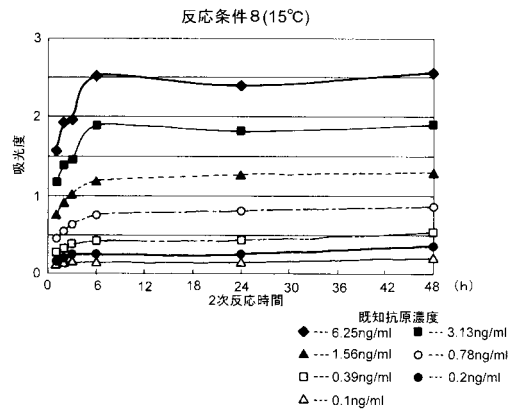
【 図 6 】



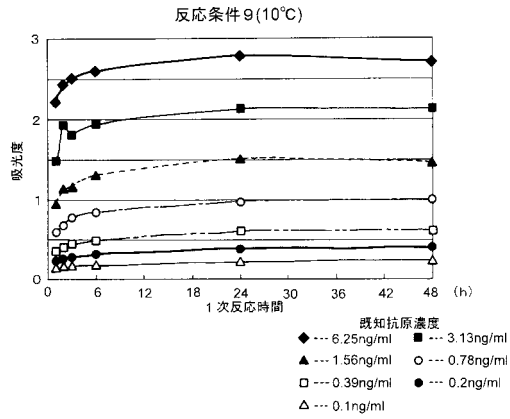
【 図 7 】



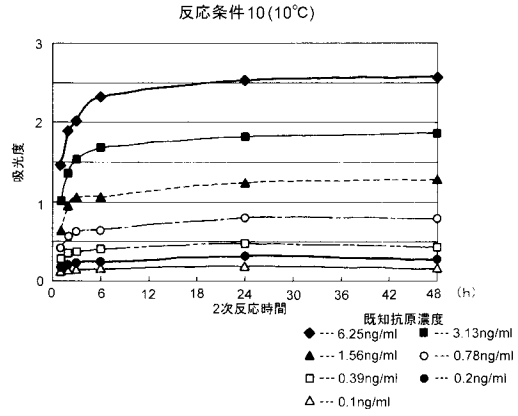
【 図 8 】



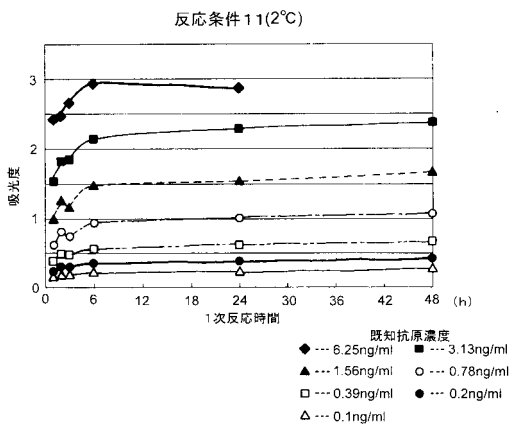
【 図 9 】



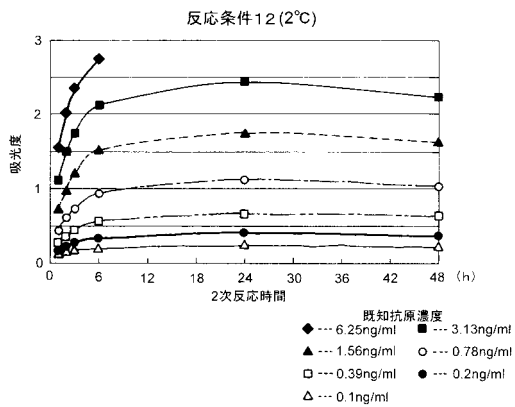
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



フロントページの続き

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第2005/085847(WO, A1)
特開2003-294738(JP, A)
特開2004-028954(JP, A)
Anal Chim Acta, 1984年, Vol.163, Page.119-125
臨床とウイルス, 1986年, Vol.14, No.1, Page.75-81
福岡県農業総合試験場研究報告, 1995年, Vol.14, Page.163-166
Can J Fish Aquat Sci, 1987年, Vol.44, No.1, Page.183-191
Radioisotopes, 1985年, Vol.34, No.2, Page.87-90
医学と薬学, 1988年, Vol.19, No.1, Page.105-112
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N33/48~33/98
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	高感度酵素免疫測定法		
公开(公告)号	JP4260872B1	公开(公告)日	2009-04-30
申请号	JP2008155728	申请日	2008-06-13
申请(专利权)人(译)	住化燕尾俄罗斯科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	住化燕尾俄罗斯科技有限公司		
[标]发明人	江口英範		
发明人	江口 英範		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/543.545.B		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2009300280A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种夹心ELISA方法，该方法能够以尽可能低的浓度准确定量抗原。解决方案：将要测量的10 ng / ml或更低的低浓度过敏原与作为一抗的固相抗体反应，并在此时用酶标记的二抗与反应后的过敏原反应，在用于检测通过添加与酶反应的生色或发光底物而获得的酶促反应产物的酶免疫测定中，针对一抗的过敏原的反应条件和针对二抗的第二抗体的反应条件为23 将温度调节到°C以下至少6小时。[选择图]无

反応条件番号	比較例実施例の番号	反応温度	一次反応時間	二次反応時間
反応条件 1	比較例 1~3	37℃	8時間、6時間、3時間、	1時間
	比較例 4~6		2時間、1時間、30分間	
反応条件 2	比較例 7~9	25℃	1時間	8時間、6時間、3時間、
	比較例 10~12			2時間、1時間、30分間
反応条件 3	比較例 13~15	20℃	6時間、4時間、2時間	1日間
	比較例 16~18		1時間、30分間、15分間	
反応条件 4	比較例 19~21	15℃	1日間	6時間、4時間、2時間
	比較例 22~24			1時間、30分間、15分間
反応条件 5	実施例 1~3	10℃	1日間、8時間、6時間	1日間
	実施例 25~27		3時間、2時間、1時間	
反応条件 6	実施例 4~6	5℃	1日間	1日間、8時間、6時間
	比較例 28~30			3時間、2時間、1時間
反応条件 7	実施例 7~9	0℃	2日間、1日間、6時間、	2日間
	比較例 31~33		3時間、2時間、1時間	
反応条件 8	実施例 10~12	-5℃	2日間	2日間、1日間、6時間、
	比較例 34~36			3時間、2時間、1時間
反応条件 9	実施例 13~15	-10℃	2日間、1日間、6時間、	2日間
	比較例 37~39		3時間、2時間、1時間	
反応条件 10	実施例 16~18	-15℃	2日間	2日間、1日間、6時間、
	比較例 40~42			3時間、2時間、1時間
反応条件 11	実施例 19~21	-20℃	2日間、1日間、6時間、	2日間
	比較例 43~45		3時間、2時間、1時間	
反応条件 12	実施例 22~24	-25℃	2日間	2日間、1日間、6時間、
	比較例 46~48			3時間、2時間、1時間