

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/060519

発行日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(43) 国際公開日 平成15年7月24日(2003.7.24)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/543

GO 1 N 21/78

GO 1 N 33/569

F I

GO 1 N 33/543 5 7 5

GO 1 N 33/543 5 8 1 A

GO 1 N 21/78 C

GO 1 N 33/569 G

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 8 頁)

出願番号	特願2003-560562 (P2003-560562)	(71) 出願人	803000012
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/011573		株式会社テクノネットワーク四国
(22) 国際出願日	平成13年12月27日(2001.12.27)		香川県高松市丸の内2番5号
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(72) 発明者	中村 教泰
			徳島県徳島市蔵本町3-18-15徳島大学内

(54) 【発明の名称】凝集反応の測定方法

(57) 【要約】

高価な自動分析装置や電子顕微鏡を必要とせず、蛍光顕微鏡による観察のみで、凝集反応を正確に測定することができ、特に、臨床検査等への応用の広い免疫凝集反応の測定方法を提供する。すなわち、測定対象物質である抗体（またはウイルス）に対応したウイルス（または抗体）に蛍光標識を施し、溶液中において、それらの凝集を観察することを特徴とする免疫凝集反応などの測定方法である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

測定対象物質である凝集反応しうる物質に蛍光標識を施し、溶液中において、それらの凝集を観察することを特徴とする凝集反応の測定方法。

## 【請求項 2】

測定対象物質である抗体（またはウイルス）に対応したウイルス（または抗体）に蛍光標識を施し、溶液中において、それらの凝集を観察する免疫凝集反応を測定する請求項 1 に記載した方法。

## 【請求項 3】

凝集反応が一次または二次以上の多次であり、免疫反応、多価結合分子反応またはその組み合わせである請求項 1 に記載した方法。

10

## 【請求項 4】

測定対象物質が多価結合能を有する分子である請求項 1 に記載した方法。

## 【請求項 5】

測定対象物質は凝集反応を惹起または誘発しうる物質または凝集反応を起こす物質である請求項 1 または 3 に記載した方法。

## 【請求項 6】

測定対象物質である凝集反応しうる物質に蛍光標識を施してなる凝集反応する物質の検出試薬。

## 【請求項 7】

測定対象物質である抗体（またはウイルス）に対応したウイルス（または抗体）に蛍光標識を施してなる、抗体またはウイルスを検出する請求項 4 に記載した試薬。

20

## 【発明の詳細な説明】

発明の属する技術分野：

本発明は、抗体とウイルスとの免疫凝集反応などの凝集反応を測定する方法に関する。

従来技術：

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的な方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

30

免疫測定法としては、免疫比濁法（T I A 法）、ラテックス比濁法（L I A 法）、酵素免疫測定法（E I A 法）、放射免疫測定法（R I A 法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。

近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できる方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、特に E I A 法が重用されている。また、その測定法自体の精度を上げるため、あるいは測定の簡素化を図るための各種応用法が研究されており、例えば、E I A 法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに発光物質を利用する方法（特開平 5 - 3 4 3 4 6 号公報）や強磁性粒子に抗体を固定化し蛍光標識を行い、凝集を生じさせたのち、蛍光濃度測定を行う方法（特開平 5 - 9 9 9 2 6 号公報）、測定対象物質をキャリアタンパク質に複合化させた後、該キャリアタンパク質を不溶性担体に担持させることにより、B / F 分離と呼ばれる操作（B は免疫反応等により結合した成分、F は未反応の成分）を不要とした方法（特開 2 0 0 0 - 3 3 8 1 0 8 号公報）が提案されている。

40

しかしながら、上記方法は、それ以前の従来手法に比べれば測定時間等の点で簡素化されているものの、汎用自動分析装置や専用自動分析装置、或いは電子顕微鏡による観察を必要とし、簡易検査もしくは予備的検査の手法としては十分満足できるものではなかった。

## 発明の開示

本発明は、上記従来技術の課題に鑑みなされたものであり、高価な自動分析装置や電子顕

50

微鏡を必要とせず、蛍光顕微鏡による観察のみで、免疫凝集反応などを正確に測定することができ、臨床検査等への応用の広い免疫凝集反応の測定方法の提供を目的のひとつとする。

即ち、本発明は、測定対象物質である凝集反応しうる物質に蛍光標識を施し、溶液中において、それらの凝集を観察することを特徴とする凝集反応の測定方法である。

例えば、測定対象物質である抗体（またはウイルス）に対応したウイルス（または抗体）に蛍光標識を施し、溶液中において、それらの凝集を観察する免疫凝集反応を測定する方法である。

凝集反応が一次または二次以上の多次であり、免疫反応、多価結合分子反応、またはその組み合わせであることが好ましい。

測定対象物質が多価結合能を有する分子である場合も含む。

測定対象物質は凝集反応を惹起または誘発しうる物質または凝集反応を起こす物質を含む。

また、本発明は、測定対象物質である凝集反応しうる物質に蛍光標識を施してなる凝集反応する物質の検出試薬を提供する。測定対象物質である抗体（またはウイルス）に対応したウイルス（または抗体）に蛍光標識を施してなる、抗体またはウイルスを検出する試薬も含む。

これらの凝集を蛍光顕微鏡により観察することで免疫凝集反応などの凝集反応を正確に測定できる。

#### 発明の詳細な説明：

以下に本発明を詳しく説明する。ウイルスに対応する抗ウイルス抗体を反応させるとウイルスの凝集体が形成されることは公知であるが、その観察には電子顕微鏡が必要になる。本発明では、測定対象物質である抗体（またはウイルス）と、蛍光標識を施したウイルス（または抗体）を含む溶液とを混ぜ合わせ、該蛍光標識が取り込まれたウイルスの凝集体を形成させ、それを蛍光顕微鏡により観察するという簡単な操作により免疫凝集反応を測定可能としたため、簡易検査もしくは予備的検査として非常に有用である。

即ち、本発明は、通常では光学顕微鏡レベルでは目視しえないウイルスという微生物を（目視しえない）蛍光標識した抗体で凝集させることにより非常に鮮明な凝集体として目視しうるものとした点に特徴を有する。即ち、2つ以上の固相化していない物質で、本来、溶液中で均一に分布するものが、ある特性（ここでは抗原抗体反応）を通じて極性を持つ分布（＝凝集）に変化すること、かつ、蛍光色素は均一分布である場合区別できませんが、分布に極性をもたらすことによって蛍光強度の勾配をもたらし、光学レベルで目視しうるものなりうるということ（名付けるなら「非固相系蛍光体再分布可視化特性」）を利用した方法である。

本発明の免疫凝集反応の測定方法は、測定対象物質である抗体（またはウイルス）に対応したウイルス（または抗体）に蛍光標識を施しておき、抗体またはウイルスの検出試薬、即ち従来法にはない迅速かつ簡便な検査キットとして応用することができる。ここで、蛍光標識は、ウイルスに対してでも抗体に対してでも、どちらでもよく、必要に応じ選択すればよい。また、蛍光標識を施したウイルス（または抗体）は、適当な緩衝液（リン酸緩衝液、トリス緩衝液）などにより希釈して用いられる。

ここで、本発明に係る免疫凝集反応より測定される測定対象物質としては、生体試料中のウイルスまたは抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型もしくはC型など）由来ウイルスまたは抗体、HIVウイルスまたは抗体、インフルエンザ由来ウイルスまたは抗体、大腸菌その他に感染するウイルスであるバクリオファージ等を例示することができるが、特にこれらに限定されるものではない。即ち、上記の如き、天然由来のウイルスや抗体に限らず、アダプター、遺伝子組み換えによるリコンビナント抗体等、人工的な物質であっても、凝集反応を惹起するものであれば、本発明の対象となり得る。

上記免疫反応の他に、一分子あるいは一複合体で多価結合能を持つ物質、例えばアビジンなどの凝集反応を同様に検出できる。

また、本発明では、反応が一つの抗体により起こる一段階の凝集反応に限らず、一つの抗

10

20

30

40

50

体（一次抗体）で凝集が不十分であれば、1次抗体に結合する抗体（二次抗体）を用いたものなど多段階の反応による凝集も対象となりうる。即ち、本発明は一次または二次以上の多次である免疫凝集反応に適用できる。

また、本発明で用いられる蛍光標識、並びに蛍光標識の付与手法には特に制限はなく、従来技術が適用でき、必要量の蛍光色素を対象物質に付与すればよい。蛍光顕微鏡観察の場合、その色素に応じたフィルターが必要となるため、この点から蛍光色素として最も一般的なフルオロセインイソチオシアネート（FITC）の使用が便利である。

ほかに、蛋白性の蛍光色素など、他の蛍光色素も使用できる。例えば、green fluorescent proteinなどの蛍光蛋白である。また、蛍光色素含有シリカ球のような大きな蛍光体の表面に抗原をつけ抗体を反応させ凝集体を観察できる。

10

#### 実施例

##### 実施例 1

大腸菌に感染するウィルスであるバクテリオファージに対して、蛍光標識を行った抗M13抗体を反応させて観察を行った。

##### <材料>

- ・線維状ファージM13KO7 helper phage (Gibco BRL社)
- ・抗M13抗体 (抗M13KO7 helper phageに結合するモノクローナル抗体) (アマシャムバイオテック社製)
- ・蛍光標識 (Fluorescence protein labeling kit (Roche社) (5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide ester, Sephadex G-25カラムなどを含む)。

20

##### <抗体の標識>

抗M13抗体 (1mg/ml) 200 $\mu$ lにリン酸緩衝食塩水を300 $\mu$ l加え、500 $\mu$ lとしDimethylsulfoxideに溶解した5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide ester (20mg/ml)を1 $\mu$ l加え、緩やかな攪拌を行いながら2時間、室温にて反応させた。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて標識した抗体と未反応の5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide esterを分離した。

30

##### <ファージの検出>

ファージ溶液 ( $10^1 \sim 10^7$  cfu; colony forming units/ $\mu$ l) 1 $\mu$ lに標識抗体 (1.5mg/ml)を1 $\mu$ l加え攪拌後、すぐに2 $\mu$ lの反応液をスライドガラス上のにのせ、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡にて観察した。図1はその観察写真である。

##### (結果)

反応直後から明瞭な蛍光を発する凝集体を  $10^4 \sim 10^7 / \mu$ l の濃度のファージ反応溶液で検出することができた。

一方、対照実験として、抗M13抗体の代わりに蛍光標識した抗マウス抗体、抗ウサギ抗体を使用したところ、凝集体は検出できなかった。

40

##### 【図面の簡単な説明】

図1は本発明の実施例における凝集反応の観察を示す顕微鏡写真である。

【 図 1 】

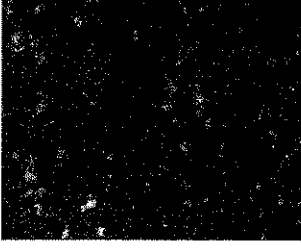


図 . 1

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/536, G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53-579		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 64-35373 A (Fujirebio Inc.), 06 February, 1989 (06.02.1989), (Full text) & EP 301584 A & DE 3878077 T	1-7
Y	JP 10-282098 A (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.), 23 October, 1998 (23.10.1998), (Full text) (Family: none)	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 25 January, 2002 (25.01.02)	Date of mailing of the international search report 12 February, 2002 (12.02.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/11573									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/536, G01N33/569											
B. 調査を行った分野											
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))											
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/53-579											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2001年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2001年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2001年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2001年	日本国登録実用新案公報	1994-2001年	日本国実用新案登録公報	1996-2001年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2001年										
日本国登録実用新案公報	1994-2001年										
日本国実用新案登録公報	1996-2001年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	JP 64-35373 A (富士レビオ株式会社) 1989. 02. 06 (全文) & EP 301584 A&DE 387807 T	1-7									
Y	JP 10-282098 A (松下電器産業株式会社) 1998. 10. 23 (全文) (ファミリーなし)	1-7									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献									
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 25. 01. 02		国際調査報告の発送日 12.02.02									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3250									

---

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	凝集反应的测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2003060519A1</a>	公开(公告)日	2005-05-19
申请号	JP2003560562	申请日	2001-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	TECHNO网络四国		
申请(专利权)人(译)	TECHNO网络四国		
[标]发明人	中村教泰		
发明人	中村 教泰		
IPC分类号	G01N33/543 G01N21/78 G01N33/536 G01N33/569 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/536 G01N33/56983 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/543.581.A G01N21/78.C G01N33/569.G		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种测定免疫凝集反应的方法，广泛适用于特别是临床检查等，从而可以通过简单地在荧光显微镜下观察而无需使用任何昂贵的自动分析仪或电子显微镜来精确地测定凝集反应。即，一种测定凝集反应的方法，其特征在于，包括荧光标记针对待测定的抗体或病毒的病毒或抗体，并在溶液中观察其凝集。