

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4377602号  
(P4377602)

(45) 発行日 平成21年12月2日(2009.12.2)

(24) 登録日 平成21年9月18日(2009.9.18)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/553	(2006.01)	GO 1 N 33/553	
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 G
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N 33/569	L
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	B

請求項の数 6 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-84341 (P2003-84341)	(73) 特許権者	591125371 デンカ生研株式会社
(22) 出願日	平成15年3月26日(2003.3.26)		東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号
(65) 公開番号	特開2004-294157 (P2004-294157A)	(74) 代理人	100059959 弁理士 中村 稔
(43) 公開日	平成16年10月21日(2004.10.21)	(74) 代理人	100067013 弁理士 大塚 文昭
審査請求日	平成18年3月27日(2006.3.27)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189 弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100074228 弁理士 今城 俊夫
		(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 金コロイドと抗体の結合体を製造する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

金コロイド溶液の pH を酸性に調整し、その後抗体溶液と混合することを特徴とする、金コロイドと抗体の結合体を製造する方法。

【請求項 2】

該 pH が 4 . 2 ~ 6 . 7 の範囲内である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該抗体が、抗ウイルス抗体、抗細菌抗体、あるいは、ペプチドホルモン、ステロイド、生理活性アミン類、ビタミン類、プロスタグランジン類、抗生物質、細菌が産生する毒素、腫瘍マーカー、農薬に対する抗体、または、病原微生物に由来する核酸成分に相補的なヌクレオチドのいずれかである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該抗ウイルス抗体が抗インフルエンザウイルス抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

該抗インフルエンザウイルス抗体が抗 B 型インフルエンザウイルス抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法により金コロイドと抗体の結合体を製造し、これを使用することを特徴とする、免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

## 【 発明の属する技術分野 】

本発明は、金コロイドと抗体の結合体を製造する方法、該方法により作製される結合体を使用する免疫測定法に関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【 従来技術 】

免疫測定法等において、試料中のウイルス等の抗原を視覚的に検出するため、抗体が結合した金コロイド結合体が利用されている。従来、金コロイドと抗体との結合体の調製は pH 7 ~ 10 程度の中性から弱アルカリ状態で行われていた（例えば、非特許文献 1 参照）。しかし、従来の方法で作成した金コロイド - 抗体結合体を使用して、免疫測定法により前記抗体の抗原の検出を行うと、十分な感度が得られないという問題があった。この原因として金コロイドと抗体の結合効率が悪いという点が推測された。

10

## 【 0 0 0 3 】

## 【 非特許文献 1 】

イムノゴールド法、横田貞記、藤森修 編、ソフトサイエンス社発行、平成 4 年 4 月 20 日、p . 36 - 43

## 【 0 0 0 4 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、効率よく結合された金コロイドと抗体との結合体を製造する方法及び抗体により抗原の検出を感度良く行える免疫測定方法、を提供することを目的とする。

20

## 【 0 0 0 5 】

## 【 課題を解決するための手段 】

上記課題は、金コロイド溶液の pH を酸性に調整し、その後抗体溶液と混合することを特徴とする、金コロイドと抗体の結合体を製造する方法により解決されることが見出された。

上記方法は、pH が 4 . 2 ~ 6 . 7 の範囲内であることが特に好ましい。

また、本発明は、上記抗体が抗インフルエンザウイルス抗体である、上記方法に関する。

また本発明は、上記抗インフルエンザウイルス抗体が抗 B 型インフルエンザウイルス抗体である、上記方法に関する。

また、上記課題は、上記方法により金コロイドと抗体の結合体を製造し、これを使用した免疫測定方法により解決される。

30

従来の方で作成した金コロイド - 抗体結合体を使用して、免疫測定法により前記抗体の抗原の検出を行うと、十分な感度が得られないのに対し、本発明の方法により、金コロイド - 抗体結合体を高い効率で製造することができる。また、本発明の方法により製造される金コロイドと抗体との結合体を免疫測定法において使用することにより、感度の高い測定を行うことができる。

## 【 0 0 0 6 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下本発明の方法を説明する。

（金コロイド溶液）

40

本発明の方法は、金コロイド溶液と抗体溶液とを混合して金コロイドと抗体の結合体を作製する方法において、金コロイド溶液を、弱酸性、好ましくは 4 . 2 ~ 6 . 7 に調製することを特徴とする。

例えば、金コロイド溶液は通常、pH 3 . 5 ~ 4 . 5 程度の酸性溶液で販売されているので、これに緩衝液、例えばクエン酸緩衝液、燐酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等を加えて、室温において、弱酸性、好ましくは 4 . 2 ~ 6 . 7、より好ましくは 5 . 7 ~ 6 . 7、さらに好ましくは 6 . 2 ~ 6 . 7 に調製する。上記 pH の範囲内では、金コロイドと抗インフルエンザウイルス抗体の結合効率がより高くなるため好ましい。使用する金コロイド溶液の濃度は特に限定されないが、例えば塩化金酸として 0 . 0 1 (w/v) % 程度である。金コロイド溶液を作製する溶媒は、水であることが好ましい。

50

## 【0007】

(抗体溶液)

本発明の方法において、金コロイドと結合させて結合体を作成する抗体としては、抗インフルエンザウイルス抗体、抗アデノウイルス抗体、抗RSウイルス抗体、抗HAV抗体、抗HBc抗体、抗HCV抗体、抗HIV抗体、抗EBV抗体、抗NLVノーウォーク様ウイルス抗体、抗HBe抗体、抗HBs抗体、抗アデノウイルス抗体、抗口タウイルス抗体、抗パルボウイルス抗体、抗RSウイルス抗体等の抗ウイルス抗体、抗クラミジア・トラコマティス抗体、抗溶連菌抗体、抗百日咳菌抗体、抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、抗レプトスピラ抗体、抗トレポネマ・パリダム抗体、抗トキソプラズマ・ゴンディ抗体、抗ボレリア抗体、抗炭疽菌抗体、抗MRS A抗原、抗大腸菌抗体、抗サルモネラ抗体、抗ブドウ球菌抗体、抗カンピロバクター抗体、抗ウェルシュ菌抗体、抗腸炎ビブリオ菌抗体等の抗細菌抗体、抗マイコプラズマ脂質抗体、抗ヒトトランスフェリン抗体、抗ヒトアルブミン抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体、抗マイクログロブリン抗体、抗CRP抗体、抗トロポニン抗体、抗HCG抗体、抗クラミジア・トラコマティス抗体、抗ストレプトリジンO抗体、抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、抗-グルカン抗体、抗RF抗体、あるいは、ヒト織毛製ゴナドトロピン等のペプチドホルモン、ステロイドホルモン等のステロイド、エピネフリンやモルヒネ等の生理活性アミン類、ビタミンB類等のビタミン類、プロスタグランジン類、テトラサイクリン等の抗生物質、ベロトキシン等の細菌等が産生する毒素、各種腫瘍マーカー、農薬などに対する抗体、または、病原微生物に由来する核酸成分に相補的なヌクレオチド等を挙げることができるが、これらに限定されない。抗インフル

10

20

## 【0008】

抗体の濃度は、抗体の種類等により適宜決定することができる。例えば、公知の方法により作製した抗インフルエンザウイルス抗体は、適当な濃度、好ましくは50～200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調製する。使用する抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体など、どのような抗体であってもよい。このとき使用する溶媒は特に限定しないが、例えばホウ酸ナトリウム溶液で透析してもよい。

30

## 【0009】

(金コロイド溶液と抗体溶液の結合)

弱酸性に調製した金コロイド溶液に、上述した抗体溶液を加える。例えば、抗インフルエンザウイルス抗体を使用した場合、抗体の最終濃度が1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるような量の抗インフルエンザウイルス抗体を加えることが好ましい。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であると感度不足となり、また10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であると、抗体が架橋し合い金コロイドが凝集する場合がある。また金コロイドに結合しなかった抗体が残った場合、抗体が結合した金コロイドと抗原の取り合い(競合)してしまい感度低下の原因となる。

上記方法により、金コロイド溶液と抗体溶液の結合体の溶液が得られる。この溶液から金コロイド溶液と抗体溶液の結合体を例えば以下のようにして単離することができる。

40

## 【0010】

溶液を一定時間置いた後、ブロッキング剤としてBSA等を添加し、穏やかに攪拌した後、全量を遠心管に移し、遠心する。遠心後、上清を吸引廃棄し、沈殿している抗体結合金コロイドを得ることができる。この抗体結合金コロイドに緩衝液を加え、浮遊させて、フロースルーアッセイ法等の免疫測定法に使用することができる。

## 【0011】

(免疫測定法)

免疫測定法とは、免疫反応の特異性を利用して試料中の分析対象物を免疫学的手法により検出または定量する分析方法の総称として用いられる。具体的には、免疫拡散法、酵素免疫測定法等種々の方法が実用化されている。このような免疫測定法の中で、フロースルー

50

アッセイ方法は、ラテラルフロー式、タンジェンシャルフロー式等と並ぶメンブランを使用したイムノクロマトグラフィー法の1種であり、操作が簡便で一般的な検査の場に普及している。本発明の方法により製造される金コロイドと抗体との結合体は、フロースルーアッセイ方法のような簡易式の免疫測定法において非常に有用である。

フロースルーアッセイ方法による免疫測定方法についての詳細は、例えば“Guide to Diagnostic Rapid Test Device Components”, 2<sup>nd</sup> edition, published by Schleicher & Schuell company, January 2000, Edited by Lisa Vickers, p6-8、及び特公平7-34016号(ハイブリテックの特許)に記載されている。

本発明の結合方法により作製された金コロイドと抗体との結合体は、上記免疫測定法において標識化抗体として使用すると、高い結合効率で結合体が生成しているため、低濃度の抗原を感度良く検出することができる。

10

【0012】

【実施例】

[実施例1]

1. 抗B型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体(マウス)の作製及び精製  
精製B型インフルエンザウイルス抗原を免疫し、一定期間維持したBALB/cマウスから脾臓を摘出し、ケラーらの方法(Kohler et al., Nature, vol. 256, p495-497(1975))によりマウスミエロマ細胞(P3x63)と融合した。得られた融合細胞(ハイブリドーマ)は、37℃でインキュベーター中で維持し、B型インフルエンザウイルスNP抗原固相プレートを用いた。ELISAにより上清の抗体活性を確認しながら細胞の純化(単クローン化)を行った。取得した該細胞株をプリスタン処理したBALB/cマウスに腹腔投与し、約2週間後、抗体含有腹水を採取した。得られた腹水からアフィニティークロマトグラフィー法によってIgGを精製した(クローン名9D12)。

20

【0013】

2. 金コロイドのpHによる抗体の結合効率

以下のようにして、pHによる金コロイドと抗体の結合効率を調べた。

B型インフルエンザウイルスNP抗原(NP: Nucleoprotein、インフルエンザウイルスの核タンパク)を3µg/mLになるように調整し、96穴プレートに100µL/穴づつ入れ、4℃で17時間静置した。17時間後、プレートに吸着しなかった余分なB型インフルエンザウイルスNP抗原を除去、0.05%Tween20含むPBS(-)pH7.0で洗浄しBSA, PBSを含む緩衝液0.5%BSA, 0.05%Tween20含むPBS(-)pH7.0でブロッキングを行った。ブロッキングは4℃で17時間静置することにより行った。

30

【0014】

9mLの金コロイド液に100mMのクエン酸緩衝液、燐酸緩衝液、又はホウ酸緩衝液のいずれかの液1mL加え、表1に示される各pHに調整した金コロイド溶液を調製した。次に、100µg/mLに調整した抗B型インフルエンザウイルスNP抗体200µL(最終濃度2µg/mL)を混ぜ合わせ、5分間室温で放置した。5分後、ブロッキング剤としてBSAを最終濃度が1%となるような量において添加し、10分間穏やかに攪拌した。10分後、遠心管に移し、7300rpmにて30分間の遠心を行い、遠心上清を一定間隔で希釈したものを、上記光源を吸着させたプレートに入れた。

40

また、測定吸光度から抗B型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体の量を波長280nmにおける吸光度からもとめ、一定間隔で希釈したものを、上述したように抗原を吸着させたプレートに入れた。

【0015】

上記遠心上清サンプルまたは検量線作成のための抗B型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体の希釈液100µLをプレートに入れた後、37℃で、30分間反応を行った。30分後、未反応物を除去、洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体(ZYMED LABORATORIES社製)を2000倍に希釈し100

50

μLづつ各穴に入れ、37℃で、30分間反応させた。30分後、未反応物を除去、洗浄した。次に基質液TMB（テトラメチルベンチジン）を100μLづつ各穴に入れ、37℃で、15分間反応させた。15分後、0.6M硫酸を100μLづつ各穴に入れ、反応を停止した。反応停止後、吸光度計にて450nm、630nmの吸光を測定した。

【0016】

検量線作成のためにアッセイを行った抗B型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体の各希釈での吸光度を横軸に、また各希釈での抗体量を縦軸に取り検量線を作成した。

作成した検量線から金コロイド溶液に抗B型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体を感作した後の、遠心上清に存在する抗体量を求めた。感作する時の抗体の最終濃度（初期抗体量）が2.0μg/mLであることから、2.0μg/mLから未感作抗体量（遠心上清サンプル中の抗体量）を引くことで金コロイドに結合した抗体量を算定した。その結果、表1に示すように従来の方法（pH9.2）に比べ、本発明の方法（pH4.2~6.7）により、約1.3~約2.3倍の抗体量が金コロイドに結合した。

【0017】

表1

pH調整 緩衝液種類	pH	初期抗体量 (μg/mL)	遠心上清中の抗体 量 (μg/mL)	金コロイドに結合し た抗体量 (μg/mL)
クエン酸 緩衝液	4.2	2.00	0.64	1.36
	4.6	2.00	0.59	1.41
	5.3	2.00	0.61	1.39
	5.7	2.00	0.69	1.31
	6.2	2.00	0.91	1.09
リン酸緩衝液	6.7	2.00	1.18	0.82
ホウ酸緩衝液	9.2	2.00	1.39	0.61

【0018】

[実施例2]

フロールー型デバイスを用いた、B型インフルエンザウイルスの検出

1 固相デバイスの作成

図1のようなデバイス装置のアダプターホールAを通して、抗B型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体（クローン名A3）を12μL塗布し、45℃、40分間乾燥器で乾燥させた。クローンの製作と精製は実施例1で示した抗B型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体（マウス）の作製及び精製と同一の方法で行なった。

2 抗体結合金コロイドの作成

9mLの金コロイド溶液に100mMクエン酸Na緩衝液（pH5.7、6.2）、100mMリン酸Na緩衝液（pH6.7）、100mMホウ酸緩衝液（pH9.2）をそれぞれ1mL加えた。次に、100μg/mLに調整した抗B型インフルエンザウイルスNP抗体200μL（最終濃度2μg/mL）を混ぜ合わせ、5分間室温で放置した。5分後、ブロッッキング剤として10%BSAを1mL添加し、10分間穏やかに攪拌した。10分後、遠心管に移し、7300rpmにて30分間の遠心を行い、遠心後上清を吸引除

去し沈渣を1%BSA+150mMNaCl+含むトリス塩酸緩衝液(pH8.6)0.9mLで浮遊させた。

【0019】

3 サンプル

B型インフルエンザウイルスの希釈系列を5%BSA+4.5%TritonX-100+0.1mg/mL HBR1+150mMNaCl含むリン酸緩衝液(pH7.2)で調製した。

4 評価

サンプル500μLにPBS(-)で10倍希釈した抗体結合金コロイド液を125μL加え混合し10分間静置した。10分後0.22μmろ過し、デバイスへ500μL滴下した。液が全てメンブランへ吸収された後アダプターを外しシグナルの有無を判定した。

10

5 判定結果

希釈倍率 \ pH	5.7	6.2	6.7	9.2 (コントロール)
1000	+	+	+	—
10000	—	+	+	—
希釈液のみ (コントロール)	—	—	—	—

20

【0020】

【発明の効果】

本発明の方法により、金コロイドと抗体との結合を効率よく行うことができ、インフルエンザウイルスの検出を感度良く行うことができる。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例で用いたフロースルー型デバイスの平面図である。

【図2】図1のI-I'切断端面図である。

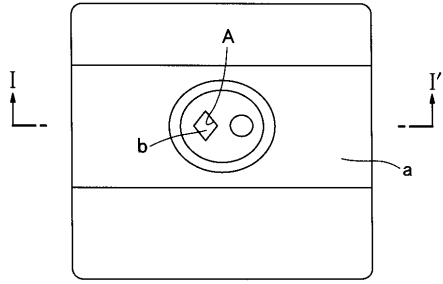
【符号の説明】

A：穴

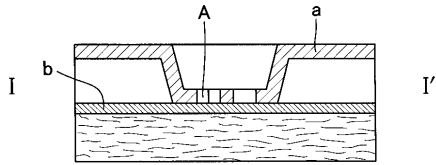
a：アダプター

b：シート状担体

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 南澤 智成

新潟県五泉市南本町1-2-2 デンカ生研株式会社内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平08-114591(JP,A)

特開平04-084766(JP,A)

特表平08-501018(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-579

专利名称(译)	产生金胶体和抗体缀合物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4377602B2</a>	公开(公告)日	2009-12-02
申请号	JP2003084341	申请日	2003-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
[标]发明人	南澤智成		
发明人	南澤 智成		
IPC分类号	G01N33/553 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/553 G01N33/543.525.G G01N33/569.L G01N33/531.B G01N33/543.521		
代理人(译)	中村稔 小川伸男 西岛隆义		
其他公开文献	JP2004294157A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供有效产生金胶体和抗体的缀合物的方法和用于以高灵敏度进行抗原检测的免疫测定方法。一种制备金胶体和抗体的缀合物的方法，其包括将胶体金溶液的pH调节至弱酸性然后与抗体溶液混合，以及使用通过上述方法制备的缀合物的方法免疫测定方法，其特征在于。【选择图】无

pH調整緩衝液種類	pH	初期抗体量 (μg/ml)	遠心上清中の抗体量 (μg/ml)	金コロイドに結合した抗体量 (μg/ml)
クエン酸緩衝液	4.2	2.00	0.64	1.36
	4.6	2.00	0.59	1.41
	5.3	2.00	0.61	1.39
	5.7	2.00	0.69	1.31
	6.2	2.00	0.91	1.09
リン酸緩衝液	6.7	2.00	1.18	0.82
ホウ酸緩衝液	9.2	2.00	1.39	0.61