

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5500423号
(P5500423)

(45) 発行日 平成26年5月21日(2014.5.21)

(24) 登録日 平成26年3月20日(2014.3.20)

(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 O 1 J
 GO 1 N 33/53 N

請求項の数 2 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2009-291639 (P2009-291639)	(73) 特許権者	000003160 東洋紡株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
(22) 出願日	平成21年12月24日(2009.12.24)	(74) 代理人	100103816 弁理士 風早 信昭
(65) 公開番号	特開2011-133285 (P2011-133285A)	(74) 代理人	100120927 弁理士 浅野 典子
(43) 公開日	平成23年7月7日(2011.7.7)	(72) 発明者	三澤 修平 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡 績株式会社敦賀事業所内
審査請求日	平成24年11月5日(2012.11.5)	(72) 発明者	曾家 義博 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡 績株式会社敦賀事業所
		審査官	海野 佳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

牛乳アレルギーの被験者由来の血液サンプルを含む血液サンプル中の牛乳以外の特定アレルギーに対する I g E 抗体を固相サンドイッチ免疫学的測定法によって定量するアレルギー検査方法であって、固相担体上にリガンド捕捉抗体又はリガンド捕捉抗体に結合したスパーサーを吸着固定させ、固相担体のリガンド捕捉抗体吸着部位又はスパーサー吸着部位以外のタンパク質吸着部位をブロッキング剤で封止し、次に前記リガンド捕捉抗体と標識された抗 I g E 抗体との間に、リガンドに結合された特定アレルギーと前記特定アレルギーに対する I g E 抗体との複合体をサンドイッチし、次に標識された抗 I g E 抗体を検出することを含む方法において、前記ブロッキング剤が、メタクリル酸エステル系合成ポリマーであることを特徴とする方法。

【請求項2】

ブロッキング剤が、ポリオキシエチレンモノメタクリレート、ポリオキシエチレンポリオキシテトラメチレンモノメタクリレート、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレート、オクチルポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレート、及びこれらの混合物からなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液サンプル中の特定アレルゲンに対するIgE抗体の量を定量することによって被験者が特定アレルゲンに対するアレルギーを持つかどうかを検査する方法に関し、特に、被験者が、検査対象のアレルゲンに対するアレルギーを持たないにもかかわらずアレルギーを持つと誤って判定されることを防止することによって判定精度を向上させたアレルギー検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、食物や環境物質、大気物質に対するアレルギーを持つ人が増加している。アレルギー反応は、アレルギーを持つ人が、そのアレルギーを生じる物質（アレルゲン）を含む食物を摂取したり、アレルゲンが存在する環境や大気中で生活してアレルゲンを吸込むことによって発生する。従って、アレルギー反応の発生を防止するためには、自分自身の持つアレルギーの種類を予め知ることが望ましい。

10

【0003】

アレルギーの検査方法としては、被験者から採取した血液サンプル中の特定アレルゲンに対するIgE抗体を固相サンドイッチ免疫学的測定法によって定量する方法が一般的である。この方法では、例えば、ガラスフィルターなどの固相担体上にリガンド捕捉抗体を吸着させ、リガンド捕捉抗体吸着部位以外のタンパク質吸着部位をカゼインなどのブロッキング剤で封止したものを準備し、一方、リガンドにカモガヤ花粉などの特定アレルゲンを結合したものを準備し、これを血液サンプルと混合して、リガンドに結合された特定アレルゲンと血液サンプル中の前記特定アレルゲンに対するIgE抗体との複合体を形成させる。そして、この複合体を含む混合液を、上述の固相担体上にリガンド捕捉抗体を吸着させたものに添加し、複合体中のリガンドの部分のリガンド捕捉抗体に結合させ、次に、酵素などで標識された抗IgE抗体を添加し、複合体中のIgE抗体の部分に標識抗IgE抗体に結合させる。次に、複合体に結合しなかった過剰な標識抗IgE抗体を除去し、標識の種類に応じた呈色反応を行って、IgE抗体に結合された標識抗IgE抗体を検出する。得られた検出結果は、予め標準IgE抗体を使用して作成しておいた検量線と比較され、血液サンプル中の特定アレルゲンに対するIgE抗体を定量する。

20

【0004】

上記の方法では、ブロッキング剤は、標識抗体を添加した際に、標識抗体が固相担体上の余分なタンパク質吸着部位に非特異的に吸着して生ずる測定誤差や判定ミスを防ぐために使用される（特許文献1参照）。

30

【0005】

しかしながら、このようにブロッキング剤で標識抗体の非特異的吸着を防止しているにもかかわらず、アレルギー検査の現場では、原因不明の異常測定値が頻発していた。従って、この原因を追求して判定精度をさらに向上させることが求められていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2004-191073号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、かかる従来技術の現状に鑑み創案されたものであり、その目的は、固相サンドイッチ免疫学的測定法によるアレルギー検査において、ブロッキング剤を使用してもなお発生する原因不明の異常測定値の原因を究明し、その発生を防止する手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、特定の傾向を持つ被験者の血液サンプルをアレルギー検査した場合にのみ異常測定値が発生していることを見出し

50

、この原因をさらに追求したところ、このような異常測定値は、ブロッキング剤がウシタンパク質由来のカゼインであり、被験者がこのカゼインと同じウシ由来の物質（例えば牛乳）についてのアレルギーを持つ場合に生じていることを見出した。そして、本発者らは、被験者が持つ可能性の高いアレルギーの原因物質を含まないブロッキング剤を使用することにより異常測定値の発生を低減することができることを見出した。

【0009】

本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものであり、以下の(1)～(2)の構成を有する。

(1) 牛乳アレルギーの被験者由来の血液サンプルを含む血液サンプル中の牛乳以外の特定アレルゲンに対するIgE抗体を固相サンドイッチ免疫学的測定法によって定量するアレルギー検査方法であって、固相担体上にリガンド捕捉抗体又はリガンド捕捉抗体に結合したスパーサーを吸着固定させ、固相担体のリガンド捕捉抗体吸着部位又はスパーサー吸着部位以外のタンパク質吸着部位をブロッキング剤で封止し、次に前記リガンド捕捉抗体と標識された抗IgE抗体との間に、リガンドに結合された特定アレルゲンと前記特定アレルゲンに対するIgE抗体との複合体をサンドイッチし、次に標識された抗IgE抗体を検出することを含む方法において、前記ブロッキング剤が、メタクリル酸エステル系合成ポリマーであることを特徴とする方法。

10

(2) ブロッキング剤が、ポリオキシエチレンモノメタクリレート、ポリオキシエチレンポリオキシテトラメチレンモノメタクリレート、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレート、オクチルポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレート、及びこれらの混合物からなる群から選択されることを特徴とする(1)に記載の方法。

20

【発明の効果】

【0010】

本発明のアレルギー検査方法は、固相サンドイッチ免疫学的測定法において、ブロッキング剤として動植物由来でない合成ポリマーを使用しているため、被験者が動植物に対してアレルギーを持っていたとしても、ブロッキング剤に起因する異常測定値が発生しない。従って、本発明のアレルギー検査方法は、判定精度が高く、被験者が検査対象のアレルゲンに対してアレルギーを持たないにもかかわらずアレルギーを持つと誤って判定されることがない。

30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1 a - c】図1 a - cは、従来公知の固相サンドイッチ免疫学的測定法の手順を示す。

【図1 d - f】図1 d - fは、従来公知の固相サンドイッチ免疫学的測定法の手順を示す。

【図1 g - h】図1 g - hは、従来公知の固相サンドイッチ免疫学的測定法の手順を示す。

【図2 a - c】図2 a - cは、ブロッキング剤としてカゼインを使用した場合と動植物由来でない合成ポリマーを使用した場合との、固相担体上での反応の相違を示す。

40

【図2 d - e】図2 d - eは、ブロッキング剤としてカゼインを使用した場合と動植物由来でない合成ポリマーを使用した場合との、固相担体上での反応の相違を示す。

【図2 f - g】図2 f - gは、ブロッキング剤としてカゼインを使用した場合と動植物由来でない合成ポリマーを使用した場合との、固相担体上での反応の相違を示す。

【図2 h - i】図2 h - iは、ブロッキング剤としてカゼインを使用した場合と動植物由来でない合成ポリマーを使用した場合との、固相担体上での反応の相違を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明のアレルギー検査方法について詳述する。

50

本発明は、血液サンプル中の特定アレルゲンに対する I g E 抗体を固相サンドイッチ免疫学的測定法によって定量するアレルギー検査方法において、標識抗体の固相担体への非特異的吸着を防止するためのブロッキング剤として、動植物由来でない合成ポリマーを使用することにより、異常測定値の発生を防止して判定精度を向上させたことを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

本発明のアレルギー検査方法自体は、従来公知の方法を採用するものであり、食物、環境物質、大気物質などの様々なアレルゲンのうちのアレルゲンに対して被験者がアレルギーを持つのかを判定するものである。アレルギー反応は、被験者の体内に侵入したアレルゲンが、マスト細胞の表面にある I g E 抗体と結合することによって開始される。アレルギーを持つ人は、特定のアレルゲンに対する I g E 抗体を血液中に多量に含む。例えば、カモガヤ花粉アレルギーの人は、カモガヤ花粉に対する I g E 抗体を血液中に多量に含み、ハウスダストアレルギーの人は、ハウスダストに対する I g E 抗体を血液中に多量に含む。アレルギー検査は、この現象を利用したものであり、被験者の血液サンプル中の特定アレルゲンに対する I g E を定量することにより、被験者がこの特定アレルゲンに対してアレルギーを持つかどうかを判定するものである。

10

【 0 0 1 4 】

具体的には、特定アレルゲンに対する I g E 抗体の定量は、従来公知の固相サンドイッチ免疫学的測定法によって行われる。以下、この測定法の手順について、図 1 を参照して説明する。

20

【 0 0 1 5 】

固相サンドイッチ免疫学的測定法では、まず、図 1 (a) に示すように固相担体を準備し、そこに、図 1 (b) に示すようにリガンド捕捉抗体を添加して吸着固定させる。固相担体は、液相中の特定成分をその上に固定して液相から分離できるようにするためのものである。固相担体としては、タンパク質を吸着できるものであればいかなるものも使用することができ、例えば、ガラスフィルター、磁性粉子、ラテックス、金コロイド、ナイロンメンブレンなどであることができる。これらの中でも、取扱いの容易さや費用の点から、ガラスフィルターが好ましい。リガンド捕捉抗体は、次に添加されるリガンドと抗原抗体反応によって結合してリガンドを固相担体上に固定するためのものであり、例えば、リガンドがビオチンである場合、リガンド捕捉抗体は抗ビオチン抗体である。リガンド捕捉抗体は、固相担体に直接固定される必要はなく、リガンド捕捉抗体とリガンドが結合するときに、リガンド結合アレルゲン同士が立体障害により結合困難になることを防ぎ、感度を向上させるために抗ヤギ抗体などのスペーサーを介して間接的に固定されてもよい。

30

【 0 0 1 6 】

図 1 (b) に示す状態では、固相担体上の一部のタンパク質吸着部位にのみリガンド捕捉抗体が吸着されており、残りのタンパク質吸着部位は空いている。この状態で他の試薬を添加すると、試薬中の標識抗体がこれらの吸着部位に吸着され、標識として検出されてしまい、測定結果に誤差が生じたり判定ミスが生じたりするおそれがある。これを防止するため、図 1 (c) に示すようにブロッキング剤を添加して、固相担体上の余分なタンパク質吸着部位を封止する。

40

【 0 0 1 7 】

一方、図 1 (d) に示すように、検査対象のアレルギーの原因となる特定のアレルゲンをリガンドに結合したものを準備する。例えば、カモガヤ花粉アレルギーの検査の場合、特定アレルゲンはカモガヤ花粉であり、ハウスダストアレルギーの検査の場合、特定アレルゲンはハウスダストである。リガンドとしては、免疫学的測定法において従来公知のいかなるものも使用することができ、例えばビオチンやジゴキシゲニン (D I G) であることができる。特定アレルゲンへのリガンドの結合は、ビオチン化試薬などの公知の手段によって行うことができる。

【 0 0 1 8 】

次に、このリガンドが結合された特定アレルゲンを、被験者の血液サンプルと混合する

50

。血液サンプルは、被験者から採取したままの全血であってもよいし、採取後の血液を遠心分離して得た血清であってもよい。被験者がこの特定アレルゲンに対してアレルギーを持つ場合、被験者の血液サンプル中にはこの特定アレルゲンに対する I g E 抗体が含まれているので、この I g E 抗体が特定アレルゲンに抗原抗体反応により結合して、図 1 (e) に示されるような複合体が形成される。また、被験者のアレルギーの度合いが強いほど、特定のアレルゲンに対する I g E 抗体の量が多いため、形成される複合体の量が多くなる。被験者がこの特定アレルゲンに対してアレルギーを持たない場合、被験者の血液サンプル中にはこの特定アレルゲンに対する I g E 抗体はほとんど含まれておらず、微量の複合体しか形成されない。

【 0 0 1 9 】

次に、この複合体を含む混合液を、図 1 (c) の固相担体に添加すると、複合体中のリガンドの部分と固相担体上のリガンド捕捉抗体との間で抗原抗体反応が生じ、図 1 (f) に示すように、複合体中のリガンドの部分がリガンド捕捉抗体に結合される。

【 0 0 2 0 】

次に、標識された抗 I g E 抗体を添加すると、複合体中の I g E 抗体の部分と標識された抗 I g E 抗体との間で抗原抗体反応が生じ、図 1 (g) に示すように、複合体中の I g E 抗体の部分が、標識された抗 I g E 抗体に結合される。抗 I g E 抗体の標識としては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼ等の酵素、ヨウ素 1 2 5 等の放射性同位元素 (R I)、アクリジニウム化合物等の発光物質あるいはフルオレセインイソチオシアネート等の蛍光物質などを使用することができる。これらの中でも、取扱いの容易さや検出方法の簡便さの点から、酵素が好ましい。

【 0 0 2 1 】

なお、標識された抗 I g E 抗体の添加時期は、複合体を含む混合液を固相担体に添加した後に限定されず、図 1 (e) の複合体形成の後に、標識された抗 I g E 抗体を混合液に添加してもよい。この場合、図 1 (h) に示すような、リガンド、特定アレルゲン、特定アレルゲンに対する I g E 抗体の複合体に、標識化された抗 I g E 抗体がさらに結合したものがまず形成され、次に、これが固相担体に添加されて図 1 (g) に示す状態になる。

【 0 0 2 2 】

その後、固相担体を洗浄して、複合体に結合しなかった過剰な標識抗 I g E 抗体を除去し、標識の種類に応じた検出方法で、I g E 抗体に結合された標識抗 I g E 抗体を検出する。例えば、標識として西洋ワサビペルオキシダーゼを使用した場合は、この酵素の基質であるテトラメチルベンジジン(4-TMB)を固相担体に添加し、酵素反応によって生じる青色の色調を検出する。検出結果を、予め標準 I g E 抗体を使用して作成しておいた検量線と比較して、血液サンプル中の特定アレルゲンに対する I g E 抗体を定量する。定量された I g E 抗体の量から、C A P - R A S T などの公知の判定基準に従って、被験者が検査対象の特定のアレルゲンに対してアレルギーを持つかどうかを判定する。

【 0 0 2 3 】

本発明のアレルギー検査方法は、以上のような従来公知のアレルギー検査方法において、固相担体への標識抗体の非特異的吸着を防止するためのブロッキング剤として、動植物由来でない合成ポリマーを使用することを特徴とする。かかるブロッキング剤としては、ブロッキング剤用合成ポリマーとして販売されているいかなるものも使用できるが、例えば、生化学バイオビジネス株式会社から「B l o c k i n g R e a g e n t f o r E L I S A」の商品名で販売されているポリオキシエチレンモノメタクリレート、日油株式会社から「N 1 0 1」の商品名で販売されているポリオキシエチレンポリオキシテトラメチレンモノメタクリレート、日油株式会社から「N 1 0 2」の商品名で販売されているポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレート、ナノビオテック株式会社から「N a n o B i o B l o c k e r」の商品名で販売されているオクチルポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレートなどのメタクリル酸エステル系のブロッキング剤を挙げることができる。

【 0 0 2 4 】

アレルギー検査方法を含む免疫学的測定におけるブロッキング剤としては、カゼイン、ウシ血清アルブミン（BSA）、ゼラチンなどのウシ由来の物質を使用することが普通である。これらはそれぞれ、ウシの乳、血、骨を原料としており、安価で大量に入手することができる。また、これらのウシ由来の物質のブロッキング剤は、従来から多くの実験で使用されており、測定系の構築が容易である。しかしながら、本発明者らは、アレルギー検査方法においてブロッキング剤としてこれらのウシ由来の物質を使用すると、被験者の傾向によっては異常な測定値が発生することを見出した。その理由について、図2を参照して説明する。

【0025】

まず、牛乳アレルギーを持つがカモガヤ花粉アレルギーを持たない被験者がカモガヤ花粉アレルギーを持つかどうかについてカゼインブロッキング剤を使用して検査する場合について考える。この被験者の血液サンプルには、牛乳に対するIgE抗体が多量に含まれるが、カモガヤ花粉に対するIgEはほとんど含まれていない。

【0026】

この場合、固相担体へのリガンド捕捉抗体の吸着固定及び余分なタンパク質吸着部位のブロッキング剤での封止が、図2(a)～(c)に示すように行われ、リガンドとカモガヤ花粉との結合が、図2(d)に示すように行われる。次に、リガンドが結合されたカモガヤ花粉を、被験者の血液サンプルと混合すると、血液サンプル中のカモガヤ花粉に対する微量のIgE抗体が、カモガヤ花粉に抗原抗体反応により結合して、図2(e)に示されるような複合体がごく少量形成される。ここまでは、図1(a)～(e)と同様である。被験者は牛乳アレルギーを持つので、その血液サンプル中には、牛乳に対するIgE抗体が多量に含まれるが、このIgE抗体は、カモガヤ花粉を抗原として認識せず、カモガヤ花粉に結合しない。

【0027】

次に、この複合体を含む混合液を、図2(c)の固相担体に添加すると、複合体はごく少量しかないので、大部分のリガンド捕捉抗体には、図2(f)に示すように、複合体ではなく、リガンドとカモガヤ花粉の結合物が結合する。一方、多量の牛乳に対するIgE抗体が、図2(f)に示すように、固相担体上のブロッキング剤（カゼイン）を抗原として認識し、ブロッキング剤（カゼイン）に抗原抗体反応によって結合する。次に、標識された抗IgE抗体を添加すると、この抗体は、ブロッキング剤に結合した牛乳に対するIgE抗体を認識して抗原抗体反応を生じ、図2(g)に示すように、ブロッキング剤上の牛乳に対するIgE抗体に、標識された抗IgE抗体が結合される。この状態で標識の検出を行うと、牛乳に対するIgE抗体の量も、カモガヤ花粉に対するIgE抗体の量として測定されてしまうので、この血液サンプルは多量のカモガヤ花粉に対するIgE抗体を含むという測定結果が得られ、カモガヤ花粉に対するIgE抗体がほとんど含まれておらず本来陰性と判定されるべき血液サンプルが、陽性や擬陽性と誤判定されてしまう。

【0028】

これに対して、ブロッキング剤として動植物由来でない合成ポリマーを使用する本発明のアレルギー検査方法では、カモガヤ花粉とカモガヤ花粉に対するIgE抗体との複合体を形成させるところまではブロッキング剤としてカゼインを使用する場合と同様であるが、この複合体を含む混合液を固相担体に添加しても、図2(h)に示すように、牛乳に対するIgE抗体は、固相担体上のブロッキング剤を抗原として認識せず、ブロッキング剤に結合しない。従って、標識された抗IgE抗体を添加しても、図2(i)に示すように、標識された抗IgE抗体が、リガンド捕捉抗体に結合された複合体以外の部分に結合することがなく、カモガヤ花粉に対するIgE抗体が過剰に定量されてしまうことがないので正しい判定を行うことができる。

【実施例】

【0029】

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0030】

実施例 1

(1) 抗ビオチン抗体固定化固相担体の作成

ガラスフィルターを固相担体とし、その上に、リガンド捕捉抗体としての抗ビオチン抗体ヤギ Ig G を、スパーサーとしての抗ヤギ抗体ウサギ Ig G を介して固定した。具体的には、ガラスフィルターと吸収層とを組み込んだプロット装置（特開平 7 - 218438 号公報参照）のフィルター上部から 10 mM リン酸塩 - 生理食塩水緩衝液（湿潤液：pH 7.4）を添加し、次に、50 µg/mL の抗ヤギ抗体ウサギ Ig G 溶液（100 mM クエン酸緩衝液：pH 3.0）を 200 µL 添加して、30 分間放置した。次に、200 µg/mL の抗ビオチン抗体ヤギ Ig G 溶液（10 mM リン酸塩 - 生理食塩水緩衝液：pH 7.4）を 50 µL 添加し、さらに 30 分間放置し、次に、ブロッキング剤と防腐剤とを含有する安定化剤混合液を添加した。ブロッキング剤としては、(i) 生化学バイオビジネス株式会社から「Blocking Reagent for ELISA」の商品名で販売されているポリオキシエチレンモノメタクリレートを使用した。その後、プロット装置を一昼夜凍結乾燥し、抗ビオチン抗体ヤギ Ig G が抗ヤギ抗体ウサギ Ig G を介して固定されたガラスフィルター（抗ビオチン抗体固定化固相担体）を作成した。

10

【0031】

(2) 標準 Ig E 抗体を使用した検量線の作成

ヒト Ig E 抗体標品（次の 5 種類の濃度の Ig E 抗体標準液（iu/mL）：0、0.35、0.7、3.5、17.5、50.0、100）各 50 µL に、抗ヒト Ig E モノクローナル抗体をビオチン化試薬で標識した試薬 5 µL を加え、5 分間 37 °C で加温混合して混合液を調製した。(1) で作成した抗ビオチン抗体固定化固相担体を組み込んだプロット装置に上述の (i) のブロッキング剤と防腐剤とを含有するブロック液を各 50 µL 添加し、次に、上述の混合液 50 µL を滴下した。2 分間 37 °C で加温した後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ヒト Ig E マウスモノクローナル抗体溶液を 20 µL 滴下し、37 °C 2 分間加温した。次に、0.5 重量% の非イオン界面活性剤（Tween-20）を含有する緩衝化生理食塩水からなる洗浄液 80 µL を 2 回、直前に供給した溶液が完全に吸収された後に滴下し、固相担体に残った過剰の標識抗体を除去した。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン（TMBZ）の溶液を 40 µL 添加して 37 °C で反応させ、波長 670 nm のレーザー光を光源とする積分球検出器で固相担体表面の青色の色調の反射率（K/S）を測定した。具体的には、プロット装置に基質を添加した後、6 分以内で 2 回（a 秒後、及び b 秒後）、反射率を測定した。基質の添加時から a 秒後、b 秒後の反射率をそれぞれ（K/S）_a、（K/S）_b とし、基質の添加直後の反射率（K/S）を、下記の式に従って計算した。

20

30

$$K/S = ((K/S)_b - (K/S)_a) \times 60 / (b - a)$$

各 Ig G 抗体濃度における基質の添加直後の反射率をプロットし、検量線を作成した。

【0032】

(3) 被験者の血液サンプル中の特定アレルゲンに対する Ig E 抗体の定量及びアレルギー判定

牛乳アレルギーであるがカモガヤ花粉アレルギーでないことが予め判明している 10 人の被験者（被験者 A ~ J）から血液サンプルを採取し、サンプル中の牛乳に対する Ig E 抗体及びカモガヤ花粉に対する Ig E 抗体をそれぞれ定量し、アレルギーの有無を判定した。具体的な手順は、以下の通りであった。

40

【0033】

(1) で作成した抗ビオチン抗体固定化固相担体を組み込んだプロット装置に上述の (i) のブロッキング剤と防腐剤とを含有するブロック液を 50 µL 添加した。一方、ビオチン化カモガヤ花粉・アレルゲン液（G3）、又はビオチン化牛乳・アレルゲン液（F2）の各々 5 µL に、被験者の血液サンプルから調製した血清を 50 µL 添加し、37 °C で 5 分間加温した。これらをプロット装置に 50 µL 添加して 37 °C で 2 分間加温した。次に、プロット装置に西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ヒト Ig E マウスモノクロー

50

ーナル抗体溶液を20 μ L加えて、37 $^{\circ}$ Cで2分間加温した。プロット装置に、0.5重量%の非イオン界面活性剤(Tween-20)を含有する緩衝化生理食塩水からなる洗浄液80 μ Lを2回、直前に供給した溶液が完全に吸収された後に滴下し、固相担体に残った過剰の標識抗体を除去した。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン(TMBZ)溶液を40 μ L添加して37 $^{\circ}$ Cで反応させ、(2)と同様にして基質の添加直後の反射率(K/S)を計算した。計算結果を、(2)で作成した検量線と比較して、各アレルゲンに対するIgE抗体を定量し、以下の表1に示すCAP-RASTの判定基準に従って、被験者のアレルギーを判定した。その結果を表2に示す。

【0034】

10

表1. CAP-RASTの判定基準

クラス	特定アレルゲンに対するIgE抗体の濃度(iu/mL)	判定
6	100以上	陽性
5	50以上100未満	陽性
4	17.5以上50未満	陽性
3	3.5以上17.5未満	陽性
2	0.7以上3.5未満	陽性
1	0.35以上0.7未満	擬陽性
0	0.35未満	陰性

20

【0035】

実施例2

ブロッキング剤として(ii)日油株式会社から「N101」の商品名で販売されているポリオキシエチレンポリオキシテトラメチレンモノメタクリレートを使用した以外は、実施例1と同様にして、抗ビオチン抗体固定化担体を作成し、検量線を作成し、IgE抗体の定量及びアレルギー判定を行った。その結果を表2に示す。

30

【0036】

実施例3

ブロッキング剤として(iii)日油株式会社から「N102」の商品名で販売されているポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレートを使用した以外は、実施例1と同様にして、抗ビオチン抗体固定化担体を作成し、検量線を作成し、IgE抗体の定量及びアレルギー判定を行った。その結果を表2に示す。

【0037】

実施例4

ブロッキング剤として(iv)ナノバイオテック株式会社から「NanoBio Blocker」の商品名で販売されているオクチルポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレートを使用した以外は、実施例1と同様にして、抗ビオチン抗体固定化担体を作成し、検量線を作成し、IgE抗体の定量及びアレルギー判定を行った。その結果を表2に示す。

40

【0038】

比較例1

ブロッキング剤としてカゼインを使用した以外は、実施例1と同様にして、抗ビオチン抗体固定化担体を作成し、検量線を作成し、IgE抗体の定量及びアレルギー判定を行った。その結果を表2に示す。

【0039】

50

表2. 実施例及び比較例のアレルギー判定の結果

プロッキング剤	実施例 1		実施例 2		実施例 3		実施例 4		比較例 1	
	(i)		(ii)		(iii)		(iv)		カゼイン	
被験者	牛乳 (F 2)	カモガヤ花粉 (G 3)	牛乳 (F 2)	カモガヤ花粉 (G 3)	牛乳 (F 2)	カモガヤ花粉 (G 3)	牛乳 (F 2)	カモガヤ花粉 (G 3)	牛乳 (F 2)	カモガヤ花粉 (G 3)
A	クラス 3	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 5	クラス 0	クラス 5	クラス 0
B	クラス 3	クラス 0	クラス 4	クラス 1	クラス 3	クラス 0	クラス 5	クラス 1	クラス 5	クラス 2
C	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0
D	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 5	クラス 0	クラス 4	クラス 2
E	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 4	クラス 2
F	クラス 4	クラス 0	クラス 3	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 5	クラス 0	クラス 5	クラス 0
G	クラス 5	クラス 0	クラス 5	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 5	クラス 0	クラス 5	クラス 3
H	クラス 5	クラス 1	クラス 5	クラス 0	クラス 5	クラス 1	クラス 5	クラス 1	クラス 5	クラス 1
I	クラス 6	クラス 0	クラス 4	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 6	クラス 1
J	クラス 6	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 6	クラス 0	クラス 5	クラス 0	クラス 5	クラス 3

(注) 表2中、(i)は、ポリオキシエチレンモノメタクリレートを表し、(ii)は、ポリオキシエチレンポリオキシテトラメチレンモノメタクリレートを表し、(iii)は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレートを表し、(iv)は、オクチルポリオキシエチレンポリオキシプロピレンモノメタクリレートを表す。

【0040】

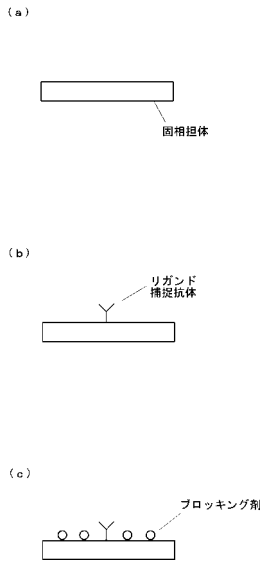
表2から明らかかなように、牛乳アレルギーを持つがカモガヤ花粉アレルギーを持たない被験者を検査した場合、プロッキング剤として(i)～(iv)の合成ポリマーのいずれかを使用した実施例1～4では、カモガヤ花粉に対するアレルギークラスはすべての被験者で0又は1(陰性又は擬陽性)と判定されるが、プロッキング剤としてカゼインを使用した比較例1ではカモガヤ花粉に対するクラスは、10人中5人の被験者で2又は3(陽性)と判定され、50%の判定ミスがあった。また、牛乳アレルギーの検査では、実施例1～5と比較例1のいずれも陽性と正しく判定した。これらの結果から、本発明のアレルギー検査方法は、検査対象のアレルゲンに対するアレルギーを持たないのにもかかわらずアレルギーを持つと誤って判定されるおそれがなく、判定精度が極めて高いことがわかる。

【産業上の利用可能性】

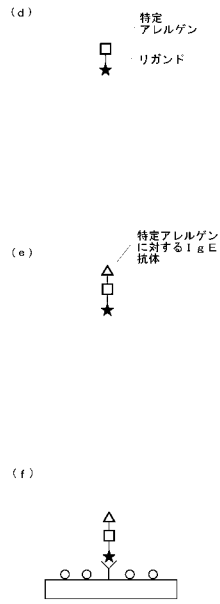
【0041】

本発明のアレルギー検査方法は、判定精度が極めて高いので、食物、環境物質、大気物質などの様々なアレルゲンに対するアレルギーを簡便に検出するために広く利用することができる。

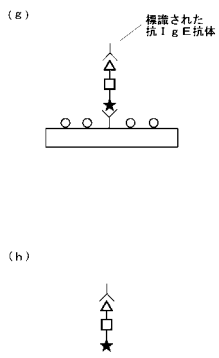
【図 1 a - c】



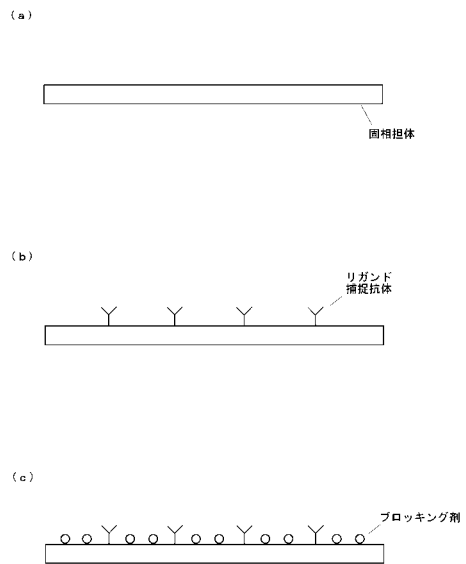
【図 1 d - f】



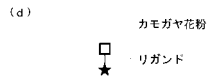
【図 1 g - h】



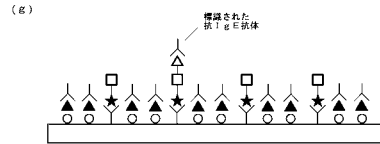
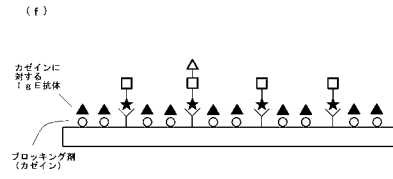
【図 2 a - c】



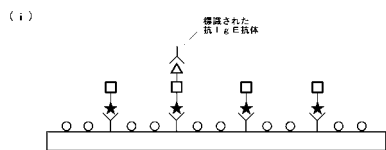
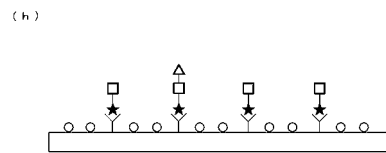
【図 2 d - e】



【図 2 f - g】



【図 2 h - i】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平08-259598(JP,A)
特開平02-228561(JP,A)
国際公開第2005/076002(WO,A1)
特開2004-175754(JP,A)
特開2001-281249(JP,A)
特開2001-242171(JP,A)
特開2007-135587(JP,A)

Denise Huber et al. , Effectiveness of natural and synthetic blocking reagents and their application for detecting food allergens in enzyme-linked immunosorbent assays , Analytical & Bioanalytical Chemistry , 2009年 5月 , Vol.394, No.2 , P.539-548

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	过敏测试方法		
公开(公告)号	JP5500423B2	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	JP2009291639	申请日	2009-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	东洋纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	东洋纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	东洋纺株式会社		
[标]发明人	三澤修平 曾家義博		
发明人	三澤 修平 曾家 義博		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/543.501.J G01N33/53.N		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
其他公开文献	JP2011133285A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：使用固相夹心免疫测定，即使在过敏试验中使用阻断剂，也要防止出现不明原因的异常测量值。溶解情况：这种过敏测试方法可以量化针对特定过敏原的IgE抗体通过固相夹心免疫测定法在血液样品中进行。将配体捕获抗体或与配体捕获抗体结合的间隔物吸附并固定在固相载体上，得到除了由封闭剂密封的固相载体的配体捕获抗体吸附区域或间隔物吸附区域以外的蛋白质吸附区域。接下来获得与配体结合的特异性过敏原和夹在配体捕获抗体和标记的抗IgE抗体之间的特异性过敏原的IgE抗体的复合物，然后随后检测标记的抗IgE抗体，其中封闭剂包含不源自动物和植物的合成聚合物。

表1. CAP-RASTの判定基準

クラス	特定アレルゲンに対するIgE抗体の濃度 (i u/mL)	判定
6	100 以上	陽性
5	50 以上 100 未満	陽性
4	17.5 以上 50 未満	陽性
3	3.5 以上 17.5 未満	陽性
2	0.7 以上 3.5 未満	陽性
1	0.35 以上 0.7 未満	擬陽性
0	0.35 未満	陰性