

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 189027

(P2002 - 189027A)

(43)公開日 平成14年7月5日 (2002.7.5)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543 33/53	511		G 0 1 N 33/543 33/53	511 D A

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 17数)

(21)出願番号 特願2000 - 389401 (P2000 - 389401)

(22)出願日 平成12年12月21日 (2000.12.21)

特許法第30条第1項適用申請有り 2000年8月3日～5日
社団法人日本生物工学会開催の「平成12年(2000年)
日本生物工学大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000173809

財団法人電力中央研究所
東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(71)出願人 599145122

サピダイン インストルメント インコー
ポレイテッド

S A P I D Y N E I N S T R U M E N
T I N C .

アメリカ合衆国 アイダホ州 83706 - 670
0 ボイシ, イー.パーク センター ブ
ルバード #445 967

(74)代理人 100087468

弁理士 村瀬 一美

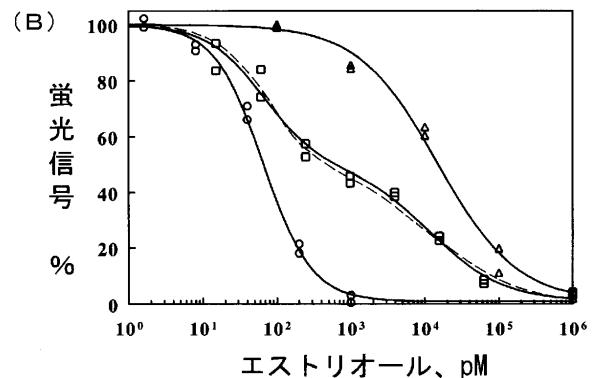
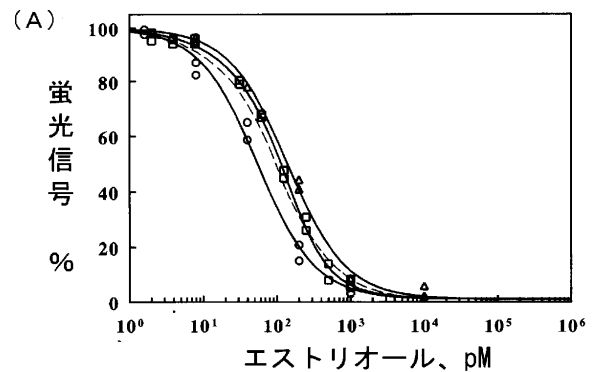
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫検出方法

(57)【要約】

【課題】 抗原抗体反応を利用した免疫検定系において、
検出される被測定物質の種類とその測定範囲(感度)を
拡大可能する。

【解決手段】 試料中における抗原の存在を検出する方
法であって、当該抗原に対し親和性の異なる2種ないしそ
れ以上の種類の抗体を用い、いずれの抗体濃度も抗原へ
の平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれ
ら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既
知量のこれら複数種の抗体を、同時に前記試料に導入し
て存在未知なる抗原と抗原抗体反応に供し、その後、こ
れら複数種の抗体と試料との反応混合液を、固定化され
た既知量の抗原と接触させ、固定化抗原に結合した抗体
量を、これら複数種の抗体に結合させた標識蛍光の蛍光
強度を測定することで検出し、その結果より試料中の抗
原の存在を検知することを特徴とする抗原の検出方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中における抗原の存在を検出する方法であって、当該抗原に対し親和性の異なる2種ないしそれ以上の種類の抗体を用い、いずれの抗体濃度も抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既知量のこれら複数種の抗体を、同時に前記試料に導入して存在未知なる抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これら複数種の抗体と試料との反応混合液を、固定化された既知量の抗原と接触させ、固定化抗原に結合した抗体量を、これら複数種の抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出し、その結果より試料中の抗原の存在を検知することを特徴とする抗原の検出方法。

【請求項2】 前記抗原が、女性ホルモンであり、前記複数種の抗体が当該女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】 前記抗原が、外因性内分泌攪乱物質であり、前記複数種の抗体が女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする請求項1に記載の検出方法。

【請求項4】 前記複数種の抗体が蛍光標識抗体であり、固定化抗原に結合した抗体量を、当該複数種の蛍光標識抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項5】 前記複数種の抗体を無標識一次抗体とし、固定化抗原に結合した抗体量は、二次抗体として当該複数種の一次抗体に特異的に結合する蛍光標識抗一次抗体を用い、固定化抗原に結合した一次抗体に特異的に結合した該二次抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項6】 前記抗原が、抗原自体とその抗原の誘導体とを含むものであり、前記複数種の抗体として、抗原自体およびその抗原の誘導体に対してほぼ同様の親和性を示す抗体と、異なる親和性を示す抗体とを組み合わせるにより、抗原自体と抗原の誘導体とを区別して同時に検出するものである請求項1～5のいずれかに記載の検出方法。

【請求項7】 試料中における複数の抗原の存在を検出する方法であって、各抗原に対する抗体を組み合わせるにより、いずれの抗体濃度もそれぞれの抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既知量のこれら複数の抗体を、同時に前記試料に導入して存在未知なる各抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これら複数種の抗体と試料との反応混合液を、固定化された既知量の各抗原と接触させ、固定化抗原に結合した抗体量を、これら複数種の抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度を測

定することにより検出し、その結果より試料中の当該複数の抗原の存在を検知することを特徴とする抗原の検出方法。

【請求項8】 前記複数種の抗原が、いずれも女性ホルモンであり、前記複数種の抗体が当該各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする請求項7に記載の検出方法。

【請求項9】 前記複数種の抗原が、いずれも外因性内分泌攪乱物質であり、前記複数種の抗体が各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする請求項7に記載の検出方法。

【請求項10】 前記複数種の抗体が蛍光標識抗体であり、固定化抗原に結合した抗体量を、当該複数種の蛍光標識抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする請求項7～9のいずれかに記載の検出方法。

【請求項11】 前記複数種の抗体を無標識一次抗体とし、固定化抗原に結合した抗体量は、二次抗体として当該複数種の一次抗体に特異的に結合する蛍光標識抗一次抗体を用い、固定化抗原に結合した一次抗体に特異的に結合した該二次抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする請求項7～9のいずれかに記載の検出方法。

【請求項12】 試料中における複数の抗原の存在を検出する方法であって、各抗原に対する抗体を組み合わせるにより、いずれの抗体濃度もそれぞれの抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既知量のこれら抗体を、前記試料の各アリコートにそれぞれ単独で導入して、存在未知なる各抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これらの各抗体を含む複数のアリコートを、固定化された既知量の双方の抗原を有するカラム内に順次流し、各アリコートの流下毎に固定化抗原に結合した抗体量を、これら抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度の測定によって検出し、各抗体に由来する蛍光強度によって、試料中の各抗原の存在を検知することを特徴とする抗原の検出方法を特徴とする抗原の検出方法。

【請求項13】 前記複数種の抗原が、いずれも女性ホルモンであり、前記複数種の抗体が当該各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする請求項12に記載の検出方法。

【請求項14】 前記複数種の抗原が、いずれも外因性内分泌攪乱物質であり、前記複数種の抗体が各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする請求項12に記載の検出方法。

【請求項15】 前記複数種の抗体が蛍光標識抗体であり、固定化抗原に結合した抗体量を、当該複数種の蛍光標識抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする請求項12～14のいずれかに記載の検出方法。

【請求項16】 前記複数種の抗体を無標識一次抗体とし、固定化抗原に結合した抗体量は、二次抗体として当該複数種の一次抗体に特異的に結合する蛍光標識抗一次抗体抗体を用い、固定化抗原に結合した一次抗体に特異的に結合した該二次抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする請求項12～14のいずれかに記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は改良された免疫検出法に関するものであり、特に、女性ホルモン、あるいはPCBやダイオキシンなどの外因性内分泌攪乱物質を高感度で、かつ簡便に検出する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、環境中に極低濃度に存在する化学物質や人畜由来の天然女性ホルモンが野生動物のメス化を引き起こす可能性が指摘されている(Weise, T.E. & Kelce, W.R. An introduction to environmental oestrogens. *Chemistry and Industry*24, 648-653 (1997)). このうち、近年社会的な問題となっている外因性内分泌攪乱物質、いわゆる環境ホルモンは、体内の天然ホルモンの作用を攪乱することで生体に悪影響を及ぼすと考えられている。その攪乱作用は現在未だ十分には解明されていないが、以下に示すような、ある種の女性ホルモン作用の攪乱メカニズムが提案されている。女性ホルモン作用は通常生体内で女性ホルモンが対応するホルモン受容体に結合することにより誘発される。ホルモンとその受容体の結合体は二量体化し、さらにDNAの特定の配列に結合する。これによりホルモン作用に必要な遺伝子の転写が始まり、結果として生理作用が起こる。ここで外因性内分泌攪乱物質は、天然の女性ホルモンの代わりに受容体に結合することによって、上記のホルモン作用を攪乱する。

【0003】このような外因性内分泌攪乱物質ないしは人畜由来の天然女性ホルモンの環境中への拡散を防止し、かつ環境中から除去する必要があるが、そのためにはまずこのような物質を簡易かつ高感度に検出しなければならない。しかしながら、ナノモルないしピコモル単位という極めて希薄な濃度で環境中に存在するだけで、生体への悪影響が危惧されている上記攪乱物質を検出する必要があるので、検出にはできるだけ感度の高い特殊な方法を採用する必要がある。

【0004】外因性内分泌攪乱物質を検出するための従来の方法には、放射受容体検定法(ラジオレセプターアッセイ)〔*Endocrine*, 138(3);863-870(1997)〕、免疫検定法(イムノアッセイ)〔*Reproductive Toxicology*, del Mazo eds., Plenum Press, New York(1998)〕、蛍光偏向解消法〔*Environmental Health Perspectives*, 106(9);551-557(1998)〕の他、組換え酵母を使用する方法や受容体との複合体と遺伝子との結合を指標として放射

活性を用いて使用する方法等が知られている。

【0005】しかしながら、これら従来の方法は、放射性物質や組換え酵母を利用するため操作が煩雑であったり、しかもいずれの方法も環境中の外因性内分泌攪乱物質の検出のためには感度が十分ではなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】このような従来技術の下に、本発明者は、先に、環境ホルモンの疑いのある化学物質の多くが女性ホルモンに類似的作用を有することに着眼し、試験すべき試料中に上記抗ホルモン抗体を導入して環境ホルモンと抗ホルモン抗体との抗原抗体反応を生じさせ、その後この反応混合物を固定化女性ホルモンの抗体を固定化女性ホルモンに結合させ、その結果を当該抗ホルモン抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度の差で検出することにより、被試試料中の環境ホルモンの存在の有無が高感度で、かつ簡便に検出し得ることを鋭意研究の結果見出した。

【0007】この方法は従来技術と比べるとその簡便性および感度の点において十分に優れるものであったが、被測定物質の種類とその測定範囲(感度)の面からは、更なる改良が望まれるものであった。

【0008】ところで、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイは、臨床検査などの医薬分野で広く応用されている。このアッセイの最大の利点は抗体の抗原結合性を利用して抗原となる物質の測定が簡易に行える点にある。一般に抗原である被測定物質の種類とその測定範囲(感度)は抗体の持つ抗原結合親和性に規定され、抗体制限イムノアッセイではこの結合親和性を十分に活用することが重要である。

【0009】多くのイムノアッセイでは単一の抗体を用いて単一の物質を測定する系で検討されているが、幾つかの多重検出系が報告されている。例として、異なる2種の抗原に対する抗体をマイクロキャピラリー内壁に固相固定し、これに結合しうる抗原を測定する方法(Narang, U., Gauger, P. R., Kusterbeck, A. W. & Ligler, F. S. Multianalyte detection using a capillary-based flow immunosensor. *Anal Biochem*, 255(1), 13-19 (1998))やビーズ固相に複数の抗体を固定した凝集法(Oh, S. et al. Use of a dual monoclonal solid phase and a polyclonal detector to create an immunoassay for the detection of human cardiotroponin I. *Clin Biochem*, 33(4), 255-262(2000)、Schray, K. J. & Niedbala, R. S. Separation-free dual solid phase enzyme immunoassay for macromolecules. *Anal Chem*, 60(4), 353-356(1988))などが挙げられる。また、最近ではチップにマルチスポットを行い、多数の検出を一挙に行う方法などが検討されている(Ekins, R. P. & Chu, F. Developing multianalyte assays. *Trends Biotechnol*, 12(3), 89-94(1994))。

【0010】なお、これらは、いずれも、多重検出に用いられる複数の抗体はお互い異なる抗原と結合するものである。

【0011】したがって、本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫検定系において、検出される被測定物質の種類とその測定範囲（感度）を拡大可能な方法を提供することを課題とする。本発明はさらに、環境中に存在する女性ホルモン、あるいはPCBやダイオキシンなどの外因性内分泌攪乱物質を高感度で、かつ簡便に検出する方法を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討の結果、複数の異なる結合親和性を持つ抗体を同時にアッセイに用いることができれば、被測定物質の種類とその測定範囲は抗体の組み合わせにより任意に設定できるのではないかとこの点に着目した。具体的には、同一の抗原に対して異なる結合親和性を持つ抗体を併用してイムノアッセイの欠点である測定範囲を拡大すること、異なる抗原に対する抗体を併用して多数の抗原を同時に検出すること、あるいは両者を同時に

実現できると考えられる。さらに、本発明者は、鋭意検討を進めた結果、このように複数の抗体の結合親和性を組み合わせるには、抗原抗体反応が起こる反応系において、いずれの抗体濃度も抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合が自身の抗原結合親和性により支配される条件でなければならないとの結論を得た。なぜなら、抗体が過剰に存在すると結合平衡状態は抗体濃度に支配され、抗体の結合親和性が十分にアッセイに反映されなくなるからである。また、このような結合親和性支配の条件下であれば、検出下限を理論的に到達可能な抗体の平衡解離定数に近づけられる利点もある。以上のような知見の下に完成された本発明は、以下のような特徴を有するものである。

(1) 試料中における抗原の存在を検出する方法であって、当該抗原に対し親和性の異なる2種ないしそれ以上の種類の抗体を用い、いずれの抗体濃度も抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既知量のこれら複数種の抗体を、同時に前記試料に導入して存在未知なる抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これら複数種の抗体と試料との反応混合液を、固定化された既知量の抗原と接触させ、固定化抗原に結合した抗体量を、これら複数種の抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出し、その結果より試料中の抗原の存在を検知することを特徴とする抗原の検出方法。

(2) 前記抗原が、女性ホルモンであり、前記複数種の抗体が当該女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする上記(1)に記載の検出方法。

(3) 前記抗原が、外因性内分泌攪乱物質であり、前記複数種の抗体が女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体

であることを特徴とする上記(1)に記載の検出方法。

(4) 前記複数種の抗体が蛍光標識抗体であり、固定化抗原に結合した抗体量を、当該複数種の蛍光標識抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする上記(1)~(3)のいずれかに記載の検出方法。

(5) 前記複数種の抗体を無標識一次抗体とし、固定化抗原に結合した抗体量は、二次抗体として当該複数種の一次抗体に特異的に結合する蛍光標識抗一次抗体抗体を用い、固定化抗原に結合した一次抗体に特異的に結合した該二次抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする上記(1)~(3)のいずれかに記載の検出方法。

(6) 前記抗原が、抗原自体とその抗原の誘導体とを含むものであり、前記複数種の抗体として、抗原自体およびその抗原の誘導体に対してほぼ同様の親和性を示す抗体と、異なる親和性を示す抗体とを組み合わせることで、抗原自体と抗原の誘導体とを区別して同時に検出するものである上記(1)~(5)のいずれかに記載の検出方法。

(7) 試料中における複数の抗原の存在を検出する方法であって、各抗原に対する抗体を組み合わせることで、いずれの抗体濃度もそれぞれの抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既知量のこれら複数種の抗体を、同時に前記試料に導入して存在未知なる各抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これら複数種の抗体と試料との反応混合液を、固定化された既知量の各抗原と接触させ、固定化抗原に結合した抗体量を、これら複数種の抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度を測定することにより検出し、その結果より試料中の当該複数種の抗原の存在を検知することを特徴とする抗原の検出方法。

(8) 前記複数種の抗原が、いずれも女性ホルモンであり、前記複数種の抗体が当該各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする上記(7)に記載の検出方法。

(9) 前記複数種の抗原が、いずれも外因性内分泌攪乱物質であり、前記複数種の抗体が各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする上記(7)に記載の検出方法。

(10) 前記複数種の抗体が蛍光標識抗体であり、固定化抗原に結合した抗体量を、当該複数種の蛍光標識抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする上記(7)~(9)のいずれかに記載の検出方法。

(11) 前記複数種の抗体を無標識一次抗体とし、固定化抗原に結合した抗体量は、二次抗体として当該複数種の一次抗体に特異的に結合する蛍光標識抗一次抗体抗体を用い、固定化抗原に結合した一次抗体に特異的に結合した該二次抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定すること

で検出することを特徴とする上記(7)~(9)のいずれかに記載の検出方法。

(12) 試料中における複数の抗原の存在を検出する方法であって、各抗原に対する抗体を組み合わせて用い、いずれの抗体濃度もそれぞれの抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、既知量のこれら抗体を、前記試料の各アリコートにそれぞれ単独で導入して、存在未知なる各抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これらの各抗体を含む複数のアリコートを、固定化された既知量の双方の抗原を有するカラム内に順次流し、各アリコートの流下毎に固定化抗原に結合した抗体量を、これら抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度の測定によって検出し、各抗体に由来する蛍光強度によって、試料中の各抗原の存在を検出することを特徴とする抗原の検出方法を特徴とする抗原の検出方法。

(13) 前記複数の抗原が、いずれも女性ホルモンであり、前記複数種の抗体が当該各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする上記(12)に記載の検出方法。

(14) 前記複数の抗原が、いずれも外因性内分泌攪乱物質であり、前記複数種の抗体が各女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体であることを特徴とする上記(12)に記載の検出方法。

(15) 前記複数種の抗体が蛍光標識抗体であり、固定化抗原に結合した抗体量を、当該複数種の蛍光標識抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする上記(12)~(14)のいずれかに記載の検出方法。

(16) 前記複数種の抗体を無標識一次抗体とし、固定化抗原に結合した抗体量は、二次抗体として当該複数種の一次抗体に特異的に結合する蛍光標識抗一次抗体抗体を用い、固定化抗原に結合した一次抗体に特異的に結合した該二次抗体の標識蛍光の蛍光強度を測定することで検出することを特徴とする上記(12)~(15)のいずれかに記載の検出方法。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施態様に基づきより詳細に説明する。

【0014】本発明に係る検定法において、検出可能な抗原および固定化抗原として使用される抗原の種類としては、特に限定されるものではないが、以下、抗原として女性ホルモンの場合を例にとり、本発明を説明する。

【0015】本発明に係る検定法は、抗体抗原反応を利用するものであって、その手順としては、概して、極微量の抗原を含有する試料に、所定量の抗体を接触させて、抗原抗体反応を起こさせた後、この反応に供しなかった余剰の未反応抗体を、固定化抗原において捕捉し、捕捉された抗体量を蛍光標識によって測定し、ブランクにおける値との蛍光強度差から、試料中の抗原の存在を

検出するものである。そして本発明においては、この検出に用いる抗体として、複数の異なる結合親和性を持つ抗体を用いる。

【0016】本発明において、担体に固定化される抗原として使用され得る女性ホルモンとしては、発情作用を有するものであれば、あらゆるものが使用でき、エストラジオール、エストロン、エストリオール、エキリン、エレキニン等のステロイドホルモンまたはその代謝物、これらの化学誘導体、例えばホモエストロン、エチニルエストラジオール、ドワシノール酸、または合成エストロゲン等を挙げることができる。

【0017】本発明において固定化抗原とは、不溶性担体に抗原を固定化したものを意味し、抗原が女性ホルモンである態様においては、固定化女性ホルモンとは不溶性担体に女性ホルモンを固定化したものを意味する。

【0018】このように固定化される抗原は、測定される試料中に含まれると推定される抗原と一般に同種のものである。しかしながら、本発明の検出方法において、測定対象となる抗原は、検出系において担体に固定化される抗原と必ずしも同一である必要はなく、使用される抗体に特異的な結合性を有する物質であれば良い。例えば、担体に固定化される抗原の誘導体、具体的には、固定化抗原が上記したようなエストラジオール、エストリオールといった女性ホルモンである場合、これらエストラジオールやエストリオールの包合体や、女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体に結合性を示す外因性内分泌攪乱物質の検出が可能である。その検出可能な外因性内分泌攪乱物質としては特に限定されるわけではなく多種多様な物質が含まれ得る。例えば、タモキシフェン、ノニルフェノール、ビスフェノールA、ジエチルスチルベストロール、エストラジオール-3-スルフェート、エストラジオール-17-グルクロニド、エストラジオール-3-グルクロニド、エストリオール-3-スルフェート、エストリオール-17-グルクロニド、エストリオール-3-グルクロニドなど化学物質が例示できるが、もちろん、これら数種の化学物質に限定されるものではない。

【0019】女性ホルモンなどのような抗原を固定化するための不溶性担体としては、例えばポリメチルメタクリル酸、ガラス等からなる固定化用ビーズ、アルギン酸カルシウム粒子等の微細粒子などを用いることができるが、特にこれらに限定されるものではなく、種々の形状、材質のものを使用することができる。このうち、ビーズないし微粒子形状、特に平均粒径50~100μm程度のビーズないし微粒子形状のものであることが好まれる。

【0020】このような不溶性担体に対する女性ホルモンの固定化方法としては、また担体への女性ホルモンの固定化方法としては、ホルモンを失活化させない方法であれば特に限定されるものではない。例えば、ホルモン

を直接自然吸着法、イオン結合法、共有結合法などを用いて担体に結合させることができ、また直接結合させる方法のみならず、適当な化学物質あるいはタンパク質などのスペーサーを介して間接的に結合させることも可能である。例えば、ホルモンの活性に影響のない部位に官能基を導入し共有結合を介して結合させること、長鎖のスペーサーを配するといった態様を取ることが望ましい。具体的には例えば、芳香族アミノ基を持つ担体をジアゾ化し、ホルモンなどの抗原となる化学物質をジアゾカップリングする方法、あるいは、セファロースなどの多糖類をBrCNで活性化してアミノ基を持つホルモンなどの化学物質のアミノ基と共有結合させる方法などを例示できる。また、ホルモンをタンパク質に化学結合により結合させ、この結合体をさらに担体に固定化することもできる。この固定化法についても、ホルモンとタンパク質の結合体を直接自然吸着法、イオン結合法、共有結合法などを用いて担体に結合させることができ、また直接固定させる方法のみならず、適当な化学物質、例えばグルタルアルデヒド架橋などのスペーサーを介して固定させることも可能である。その他の種類の抗原の場合であっても、同様な手法、あるいは公知のその他の手法を適宜採択することができる。

【0021】一方、固定化される抗原に対する抗体、この態様においては、女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体に蛍光標識したものを別途調製する。抗体としては、各種動物を起源とする免疫グロブリンのどのクラスに属するものであってもよく、一般に市販されるものを用いることも、あるいは適当な免疫系を該女性ホルモンで刺激し産生される該女性ホルモンに対する特異性の高い抗体を別途調製したものをを用いてもよい。またモノクローナル抗体を用いることも可能である。例えば、抗エストロジオール抗体は、バイオデザイン (Biodesign) 社、バイオスペシフィック (Biospecific) 社、フィツァーアールド (Fitzgerald) 社、コーテックスバイオケミストリー (Cortex Biochemistry) 社 (いずれも米国) などから、また抗エストロジオール抗体はバイオストライド (Biostride) 社などから入手可能である。このような抗体の蛍光標識化は、慣用の手段により行い得、また使用される蛍光色素としても上記したものと同様のものが例示できる。

【0022】あるいはまた、抗原に対する抗体、この態様の場合、女性ホルモンに対する抗ホルモン抗体には、蛍光標識付けせず、これを一次抗体として使用するとともに、別途この一次抗体に対して特異的に結合する抗体 (抗一次抗体抗体) を用意し、これを蛍光標識したものを二次抗体として用いることも可能である。この場合、固定化女性ホルモンに結合した抗ホルモン抗体 (一次抗体) に蛍光標識された二次抗体が特異的に結合するため、蛍光標識した抗ホルモン抗体を用いる上記態様と同様に、固定化女性ホルモンに結合した抗ホルモン抗体を

蛍光標識により識別化できるものである。

【0023】しかして、第1の発明においては、試料中に存在すると思われる抗原に対し、親和性の異なる2種ないしそれ以上の種類の抗体を用い、既知量のこれら複数種の抗体を、同時に前記試料に導入して存在未知なる抗原と抗原抗体反応を起こさせる。

【0024】例えば、ある女性ホルモンに対し、高い親和性を有する抗ホルモン抗体と親和性の低い抗ホルモン抗体という、親和性が大きく異なる2種の抗体を組み合わせる。このような組合せを用いた場合、試料中に存在する抗原 (女性ホルモン) の濃度が低い場合においては、親和性の高い抗体のみが抗原に結合し、抗原濃度が高くなるにつれて親和性が低い抗体の結合も同時に起こる。結果的に、本発明においては、検出可能な抗原濃度範囲 (感度) が拡大できる。

【0025】なお、複数の抗体を用いる本発明の検定方法において、いずれの抗体濃度も抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下で、行う必要がある。前記したように、抗体が過剰に存在すると結合平衡状態は抗体濃度に支配され、抗体の結合親和性が十分にアッセイに反映されなくなるからである。また、このような結合親和性支配の条件下であれば、検出下限を理論的に到達可能な抗体の平衡解離定数に近づけられる利点もある。

【0026】このためには、使用する個々の抗体の当該抗原に対する平衡解離定数を決定し、検定に使用する抗体濃度を、決定された平衡解離定数より十分小さな値、例えば、平衡解離定数の1/2以下 (下限値として0は含まない) とすることが望ましい。

【0027】後述する実施例に示すように、親和性支配の結合条件で10pM~1nMと1nM~1μMの測定範囲を示す2種類の抗エストロジオール抗体を組み合わせさせた場合、エストロジオールの測定可能な濃度範囲は10pM~1μMに拡大した。

【0028】さらに、第1の発明において、検出しようとする試料中にある抗原とその抗原の誘導体が存在すると想定される場合、例えば、エストロジオールと、その抱合体であるエストロジオール-3-硫酸およびエストロジオール-3-グルクロン酸などが存在する、あるいはエストロジオールと、その抱合体であるエストロジオール-3-硫酸、エストロジオール-3-グルクロン酸などが存在すると想定される場合、使用する抗体として、抗原自体およびその抗原の誘導体に対してほぼ同様の親和性を示す抗体と、異なる親和性を示す抗体とを組み合わせ用いれば、抗原自体と抗原の誘導体とを区別して同時に検出することが可能となる。上記した態様で言えば、例えば、エストロジオール系では、エストロジオール、エストロジオール-3-硫酸、およびエストロジオール-3-グルクロン酸のいずれにも高い親和性を示す抗エストロジオール抗体と、エ

ストリオールに対しては高い親和性を示すが、エストリオール-3-硫酸およびエストリオール-3-グルクロン酸に対する親和性は低い抗エストリオール抗体との組合せ、同様にエストラジオール系でも、エストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、およびエストラジオール-3-グルクロン酸のいずれにも高い親和性を示す抗エストリオール抗体と、エストラジオールに対しては高い親和性を示すが、エストラジオール-3-硫酸およびエストラジオール-3-グルクロン酸に対する親和性は低い抗エストラジオール抗体との組合せなどが例示できる。

【0029】この場合、両抗体ともに高い結合親和性を示すエストリオール（またはエストラジオール）に関しては両抗体の結合が低濃度のエストリオール（またはエストラジオール）に対して同時に起こり、濃度の増加に対して検出される蛍光強度が急激に減少するが、エストリオール-3-硫酸やエストリオール-3-グルクロン酸（エストラジオール-3-硫酸やエストラジオール-3-グルクロン酸）では前者の抗体が高い結合親和性を示すのに対して後者の抗体は低い親和性を示すため、低い抗原濃度では前者の抗体の結合のみが起こり、高い濃度では両抗体の結合が同時に起こることとなる。このように、異なる親和性を持つ2種の抗体を組み合わせることで、試料に含まれるホルモンの形態やそれらの測定能範囲を拡大できる。

【0030】次に、第2の発明においては、試料中に存在すると思われる複数の抗原に対し、それぞれの抗原に対する抗体を組み合わせると同時に使用する。例えば、エストリオールとエストラジオールの2つの女性ホルモンが存在すると思われる試料の測定において、エストリオールに対し高い結合親和性を有する抗エストリオール抗体とエストラジオールに対し高い結合親和性を有する抗エストラジオール抗体とを組み合わせると同時に、これら2つの抗体を当該試料に同時に導入して存在未知なる抗原と抗原抗体反応を起こさせる。

【0031】この第2の発明においても、使用されるいずれの抗体濃度もそれぞれの抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下として検出を行う。このような条件下とすれば、異なる抗原に対する親和性を組み合わせることができ、高感度に検出可能な抗原種を拡大できる。

【0032】後述する実施例において示すように、例えば、抗エストリオール抗体と抗エストラジオール抗体を組み合わせた測定では、それぞれの女性ホルモンを同時に1.6 pM ~ 1nMの範囲で定量することができた。

【0033】この第2の発明の方法では、複数の抗原、例えば上記態様では、エストラジオールとエストリオールを同時に検出できる一方、得られた蛍光強度に対して複数の抗原（エストリオールとエストラジオールの）濃度の組み合わせが対応するため、その存在の有無を確か

めるモニタリングなどには有効であるが、複数の抗体の定量にはあまり適していない。

【0034】一方、第3の発明においては、第2の発明と同様に、複数の抗原に対し、それぞれの抗原に対する抗体を組み合わせ、かついずれの抗体濃度もそれぞれの抗原への平衡解離定数に比べて十分に低く、抗体の結合がそれら自身の抗原結合親和性により支配される条件下として使用されるが、第2の発明とは異なり、試料中に同時にこれら複数の抗体を導入することはせず、前記試料の各アリコートに各抗体それぞれ単独で導入して、存在未知なる各抗原と抗原抗体反応に供し、その後、これらの各抗体を含む複数のアリコートを、双方の抗原を固定化してなる検出系へと順次導入する。そして、各アリコートの導入毎に固定化抗原に結合した抗体量を、これら抗体に結合させた標識蛍光の蛍光強度の測定によって検出する。

【0035】このような、順次多重測定により、試料中の各抗原は、他の抗原の濃度に関わりなく相応する抗体に起因する蛍光強度によって定量される。例えば、エストラジオールとエストリオールを含む試料の検出においては、当該試料中のエストリオールはエストラジオールの濃度に関わりなく蛍光強度の減少率から定量され、同様に共存するエストラジオール濃度に関わらずエストリ奥ールの定量も可能となる。後述する実施例においては、その定量濃度範囲はエストラジオールとエストリオールともに1.6 pM ~ 1nMとすることができた。

【0036】また、使用する複数の抗体として、いずれも特定の抗原とその誘導体の双方に高い結合親和性を示す抗体を選択し、これらを組み合わせれば、これらの誘導体を含めて各抗原系を識別して、定量することが可能となる。例えば、後述する実施例においては、エストラジオールとその抱合体のいずれにも高い結合親和性を有する抗エストラジオール抗体およびエストリオールとその抱合体のいずれにも高い結合親和性を有する抗エストリオール抗体の組み合わせによって、合計6種の物質をエストリオール系ホルモンとエストラジオール系に識別して1.6pM ~ 1nMの濃度範囲で定量が可能であったことが示されている。

【0037】このことは、環境中、特に、下水処理場向けの女性ホルモンのモニタリング法としての本発明方法の適用の可能性を示唆している。これは、近年、下水での女性ホルモンが問題となりつつあるが、下水処理場ではかならずしも女性ホルモンはフリーで存在するわけではなく、抱合体として様々な形態をとっており、上記したように本発明方法であれば、フリーのみの濃度と抱合体を含めた総濃度の両者が同時に定量できる可能性があるからである。また、アフィニティーコントロールであるため、高感度であり、測定時間も短いという利点もあるからである。

【0038】本発明の検出方法はいずれも、抗原抗体反

応を利用し、試料中に対象とする抗原が存在する場合に、試料に添加した抗体と当該抗原を反応させ、該試料中で抗原と反応に供しなかった未反応の抗体を、固定化抗原で捕捉しその抗体を測定することで、間接的に試料中の抗原を検出するものであるが、迅速な測定を行う上から、固定化抗原を内部に保持してなる検出容器を用いることが好ましい。

【0039】検出容器は固定化抗原を内部に保持し、かつ該固定化抗原に結合された蛍光標識抗体からの蛍光の検出を阻害しないことが必要であり、例えば透明ガラスまたは透明プラスチック等からなる。検出容器は底部が閉じられ、導入される試料が流出しないような形状であってもよい(この場合、蛍光強度の各々の測定はバッチ形式で行われる)、解放された底部に、固定化受容体は通さないが導入される試料は通すスクリーン等の保持材を設置するといった手法により、解放容器内の所定部位に固定化受容体を通液可能な状態で保持拘束した形態(いわゆるフロー式の検出容器)とすると、該試料を検出容器に連続的に導入することができ、それにより、受容体に結合する目的物質を極く微量含む試料であっても、目的物質が検出容器中に蓄積・濃縮され、結果的に目的物質の検出限界濃度が向上することとなるので好ましい。また液相と固相の接触時間が極端に短く、液中の数パーセントにあたる抗体をフローにより連続的に捕捉するため、液相中の結合平衡状態を乱すことなく解析が可能であると同時に、連続捕捉が可能のため、液相中の結合が抗体の親和性支配になるまで抗体の結合部位濃度を低下させることができる。

【0040】具体的には、ビーズを積層したセル内に、抗体と抗原の混合液を送液することで、固相担体に試料中の抗原と結合しなかったフリーの抗体を捕捉し、その捕捉量から間接的に液中の抗原と未結合の抗体および結合した抗体の濃度を決定し、抗原と抗体の平衡結合状態を解析する。前記第1および第2の発明方法では2種ないしはそれ以上の異なる抗体が同じ溶液中に存在し、同時に単独あるいは複数の抗原を検出する。一方、第3の方法では異なる抗体2種ないしそれ以上の種類をそれぞれ単独で、試料の別々のアリコートに適用し、これらを順次セル内に送液することで、1回の測定で両者が個別に定量できる。

【0041】なお、フロー式の検出容器内における固定化受容体の保持方法としては、上記したようなスクリーンのような保持材を用いる方法に限定されるものではなく、これ以外にも例えば、受容体を固定化する担体として通液性を有する塊状物を用い、この塊状物で検出容器の流路断面を塞ぐように配置するといった方法も採択し得る。

【0042】また、検出容器は少量の試料間でも極くわずかの蛍光強度の差を検知しうるように、微小セルの形状であることが好ましい。微小セルは例えば100mm

³以下、特に20~70mm³の容積を有することが望ましい。

【0043】蛍光強度は、上記固定化抗原に捕捉された抗体上の標識蛍光を適当な光源からのレーザー光、水銀灯等の照射により励起した際に発生する蛍光を検出器により検出される。

【0044】このような蛍光強度測定においては、まず実際の試料測定に先立ち、ある濃度の抗ホルモン抗体を上記固定化女性ホルモンに結合させた場合の蛍光強度(ブランク)を測定する(この値を検出値F0とする)。次に試験すべき試料を上記と同濃度の抗ホルモン抗体と接触させ、その後、この接触混合物を上記固定化女性ホルモンに接触させ、固定化女性ホルモンに結合した抗ホルモン抗体の蛍光強度を測定する(この値を検出値F1とする)。ここで、上記試料中に抗原が存在するならば、上記抗ホルモン抗体の一部は上記試料との最初の接触において、試料中の抗原と結合し、この試料中の抗原と結合した抗体は、続く固定化抗原との接触において、固定化抗原と結合できず、反応混合物中に遊離状態で残ることとなるため、その結果が検出値F1における蛍光強度の低下となって示される。従って、検出値F1が検出値F0に比べ小さい場合(F1<F0)、上記試験すべき試料中に対象とする抗原が存在すると判断できる。

【0045】しかし、F1のF0に比した低下の割合が、試料中に含まれる抗原の量にある程度比例することから、既知の濃度の抗原を用いて予め検量線等を作成することにより、F1の低下の割合に応じて被試試料中に含まれる抗原の定量を行うこともできる。

【0046】なお、本発明に係る免疫検定法において、蛍光標識の測定による検出段階としては、上記に例示したような手法に特に限定されるわけではなく、種々の態様を取ることが可能であり、例えば、蛍光標識の追加と検出セルの連結よりさらに高度化可能となる。

【0047】また、上記においては、複数の抗体を組み合わせることで試料中の抗原を検出するにおいて、抗原を固相に固定し、試料と接触させた抗体のうち試料中の抗原と未反応の抗体を、この固定化抗原で捕捉し、間接的に試料中の抗原を測定する態様を示したが、複数の抗体を固相に固定し、これを試料と接触させて試料中の抗原を直接捕捉固定化する態様も、同様に考慮し得るものである。

【0048】

【実施例】次に、図面を参照して本発明の実施例について説明するが、これらは本発明をより詳細に説明するためのものであり、限定するためのものではない。なお、以下の実施例において、用いられた材料と方法は以下の通りである。

【0049】(1)抗体およびホルモン
固相担体のポリメタクリル酸メチルのビーズはガンツ化成から購入した。17 エストラジオールおよびエスト

リオールは和光純薬から購入した。また両者の抱合体は全てシグマ(St. Louis, MO)から購入した。また、担体に固定したエストリオールと牛血清アルブミンの複合体 (estriol-6-(o-carboxymethyl)oxime:BSA) およびエストラジオールと牛血清アルブミンの複合体 (estradiol-6-(o-carboxymethyl)oxime:BSA) はシグマ(St. Louis, MO)から購入した。また、実験に1次抗体として使用したモノクローナル マウス抗エストリオール抗体およびマウス抗エストラジオール抗体を表1にまとめた。なお、2次抗体として使用したCY-5標識モノクローナル ヤギ抗マウス抗体はJackson ImmunoResearch (West Grove, PA)から購入した。

【0050】(2) 固定化抗原の調製

抗原の固相固定は自然吸着により行った。担体には平均直径100 μ mのポリメタクリル酸メチルのビーズを用いた。具体的には200mgのビーズをエストリオールと牛血清アルブミンの複合体あるいはエストラジオールの複合体100 μ gを含む1mlの生理食塩水に投入し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうして行った。この後、100mgの牛血清アルブミンを1mlのPBSに溶解した液を調製し、この液0.1mlを先のビーズ懸濁液に加え、2時間同じ温度で振とうした。振とう後、ビーズを生理食塩水で洗浄して同溶液30mlに懸濁した。

(3) 試料液および1次抗体溶液の調製

1次抗体溶液は表1に示した抗体を単独あるいは2種の抗体を組み合わせ、1.0mg/mlの牛血清アルブミンを含む生理食塩水にて希釈して使用した。また、全てのホルモン溶液はジメチルスルオキシドに1mMの濃度で溶解し、さらに希釈する場合には牛血清アルブミンを1.0mg/mlの濃度で含む生理食塩水を用いて調製した。抱合体を含む混合女性ホルモンはエストリオール系ではエストリオール、エストリオール-3-硫酸、エストリオール-3-グルクロン酸をそれぞれ等モルで溶解し、同様にエストラジオール系ではエストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、エストラジオール-3-グルクロン酸を溶解した。これらの混合液を単独あるいは混合して測定に用いた。混合ホルモンのモル数は溶液中に存在するホルモンの総モル濃度として示した。以上の手順で調製したホルモン溶液と1次抗体溶液の等量を種々の組み合わせで混合して測定に供した。この際、ホルモンと1次抗体濃度は終濃度として表示した。一方、2次抗体として使用したCY-5標識モノクローナル ヤギ抗マウス抗体は血清アルブミンを1.0mg/mlの濃度で含む生理食塩水で表記した濃度に希釈して用いた。

【0051】(4) 蛍光検出装置および検出方法

測定にはフロー式蛍光光度計(KinExATM 3000, Sapidyn Instruments, Inc., Boise, ID)を用いた。この光度計は直径1.5mm、長さ30mmの円筒形ガラスセル、励起光源および蛍光検出器を備えており、測定に先だってセル内に導入される抗原固定ビーズを測定の固相担体として利

用する。詳しくは、ビーズを積層したセル内に、抗体と抗原の混合液を送液することで、固相担体に抗原と未結合の抗体を捕捉し、その捕捉量から間接的に液中の抗原と未結合の抗体および結合した抗体の濃度を決定し、抗原と抗体の平衡結合状態を解析する。液相と固相の接触時間が極端に短く、液中の数パーセントにあたる抗体をフローにより連続的に捕捉するため、液相中の結合平衡状態を乱すことなく解析が可能である。同時に、連続捕捉が可能のため、液相中の結合が抗体の親和性支配になるまで抗体の結合部位濃度を低下させることができる。免疫検定は、この抗体親和性支配の条件で同時多重法と順次多重法の両法で行った。同時多重法では2種の異なる1次抗体が同じ溶液中に存在し、同時に単独あるいは複数のホルモンを検出する。一方、順次多重法では異なる1次抗体2種をそれぞれ単独の抗体液2種を調製し、これらを順次用いることで、1回の測定で両者が個別に定量できる。

【0052】4-1) 同時多重免疫検定

先的要領で調製したエストリオールあるいはエストラジオール固定化ビーズの懸濁液(6.7mg of dry beads/ml)のうち700mlを流速1.5ml/minでセルに流し込み、1.5mlの生理食塩水で洗浄することによってセル内に均一に積層した。この後、2種類の1次抗体と単独あるいは複数種のホルモンを含む混合液をセルに導入した。この際、混合液中の2種の1次抗体とホルモンの濃度は実験により変えた。また、混合液の送液量も実験により変えたが、流速は0.25ml/minに固定した。さらに200mlの生理食塩水を流速0.25ml/minで送液してセル内を洗浄した。この後、2.0nMのCY-5標識モノクローナル ヤギ抗マウス抗体溶液を送液した。続いて、未結合の2次抗体を1.5mlの生理食塩水を流速1.5ml/minで送液することによって洗浄・除去した。実験中の蛍光信号(励起波長;620nm、測定波長;670nm)は1秒ごとに測定され、測定値はコンピューターに記録した。最終的に得られた残存蛍光信号値とベースライン値との差を測定値としてボルト単位で示した。

【0053】4-2) 順次多重免疫検定法

まず、1次抗体と単独あるいは複数種のホルモンを含む混合液を1次抗体別に2種類調製した。なお、混合液中の1次抗体とホルモンの濃度は実験により変えた。この後、それぞれの混合液に4.0nMのCY-5標識モノクローナル ヤギ抗マウス抗体溶液を等量加えた。エストリオールあるいはエストラジオール固定化ビーズをそれぞれ単独あるいは等量混合した懸濁液(6.7mg of dry beads/ml)のうち700mlを前述と同様な条件でセル内に積層した。ビーズ積層後、まず2種類の混合液のうち一方をセルに導入した。混合液の送液量は実験により変えたが、流速は0.25ml/minに固定した。次に生理食塩水を蛍光信号が一定になるまで送液し、得られた残存蛍光信号値とベースライン値との差を測定値とした。さらに

引き続き、もう一方の混合液と生理食塩水を同じ要領で送液した。測定値は最終的に残った蛍光信号値から最初の混合液に由来する蛍光信号値を差し引いて求めた。

【0054】(5) 結合解析
検定系に1種類の抗体のみが存在する場合は以下の式に従い解析した。また、2種類の抗体による反応を解析す*

$$\text{蛍光強度} = \text{NSB} + \frac{(\text{Sig0} - \text{NSB})}{[\text{Ab0}]}$$

$$\frac{(k[\text{Ab0}] - 1 - k[\text{Ag0}] + \sqrt{k^2[\text{Ab0}]^2 + 2k[\text{Ab0}] - 2k^2[\text{Ab0}][\text{Ag0}] + 1 + 2k[\text{Ag0}] + k^2[\text{Ag0}]^2})}{2k}$$

但し、式中、[Ag0]は抗原総濃度、[Ab0]は抗体総濃度、kは結合親和性 (k_{on}/k_{off})、Sig0は[Ab0]における蛍光強度、NSBは抗体の非特異的吸着による蛍光強度である。

参考例1 1次抗体のキャラクタリゼーション

【0056】いくつかのマウス 抗女性ホルモン モノクローナル抗体についてエストリオール、エストラジオールおよび、これらの抱合体に対する平衡解離定数を決定し、表1にまとめた。抗エストリオール抗体であるBS31M抗体はエストリオール、エストリオール-3-硫酸、エストリオール-3-グルクロン酸に対してそれぞれ $22 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ 、 $11 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ 、 $16 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ の平衡解離定数を示し、検討した女性ホルモンの形態にかかわらず*

*る場合は、それぞれの反応が同時に起こるので、抗体ごとに以下の数式1により蛍光強度を求め、その積算を蛍光強度とした。

【0055】
【数1】

*良く結合した。また、抗エストリオール抗体であるBS33M抗体とBD45021M抗体はBS31M抗体に比し、エストリオールに対して、それぞれ同等の平衡解離定数 ($89 \times 10^{-12} \text{mol/L}$)と2桁以上高い平衡解離定数を示した。

【0057】抗エストラジオール抗体であるBD2F9抗体はエストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、エストラジオール-3-グルクロン酸に対して約 $10 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ の平衡解離定数を示し、検討した女性ホルモンの形態にかかわらず良く結合した。BSP抗体はエストラジオールに $34 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ の平衡解離定数を示したが、その抱合体には3桁以上高い値を示した。

【0058】
【表1】

抗女性ホルモンモノクローナル抗体の平衡解離定数

抗体番号	抗エストリオール			抗エストラジオール	
	BS31M	BS33M	BDE45021M	BD2F9	BSP
エストラジオール	16.63	-	-	0.009	0.034
エストラジオール-3-硫酸	717.9	-	-	0.009	10.31
エストラジオール-3-グルクロン酸	318.7	-	-	0.009	497.2
エストリオール	0.022	0.089	3.071	3.891	10.41
エストリオール-3-硫酸	0.011	-	-	7.729	335.5
エストリオール-3-グルクロン酸	0.016	-	-	1.422	10.99

表中の平衡解離定数はnMで示した
BS; Biostride, Redwood City, CA USA
BD; Bidesign, Saco, ME USA
BSP; BiosPacific, Emeryville, CA USA

【0059】実施例1 単一抗原に対する複数の抗体の親和性を組み合わせた免疫検定

表1に示した抗体を2種類組み合わせたいムノアッセイ(以下、デュアルアッセイと称する。)を実施した。それぞれの抗体濃度は決定された平衡解離定数の1/2以下とし、結合が親和性支配になる条件で実験を行った。まず、単一の抗体を用いるイムノアッセイ(以下、シングルアッセイと称する。)にて2種の抗エストリオール抗体の蛍光強度とエストリオール濃度との関係をそれぞれ調べたところ、図1(A)に示すように、BS31M抗体ではエストリオール濃度55.1pM、BS33M抗体では140pMで最大蛍光強度の50%が得られた。そこで、得られた値をもとに2種の抗体とエストリオールの結合が親和性にもとづいて同時に起こると仮定し、デュアルアッセイの蛍光強度とエストリオール濃度との関係を計算するとともに実測も行った。その結果、破線で示した計算値と実測値

は良く一致し、エストリオール濃度115pMで最大蛍光強度の50%を示す曲線が得られた。この結果から、デュアルアッセイによって2種の抗体の親和性を組み合わせて用いることができると予想された。そこで、さらに親和性が大きく異なる2種の抗体を組み合わせることによって、低い抗原濃度では親和性の高い抗体のみが抗原に結合し、抗原濃度が高くなるにつれて親和性が低い抗体の結合も同時に起こると予想された。よって、測定可能な抗原の濃度範囲が拡大できると考えた。そこで、測定濃度範囲が10pM~1nMであったBS31M抗体に加え、新たにBD45021M抗体のモノアッセイを行ったところ、測定濃度範囲は1nM~1μMであった。これらの値をもとに両抗体を組み合わせたいムノアッセイの蛍光強度とエストリオール濃度との関係を実測した。その結果、図1(B)に示すように、破線で示した計算値と実測値は良く一致し、かつ測定濃度範囲は両抗体を合わせた10pM~1μMに

拡大した。よって、デュアルアッセイにより、異なる親和性を持つ2種の抗体を組み合わせて測定濃度範囲を拡大できることが確かめられた。

【0060】実施例2 単一抗原に対する複数の抗体の親和性を組み合わせた免疫検定

次に、エストラジオールとその抱合体に対して異なる結合親和性を示す2種の抗体の組み合わせによるデュアルアッセイについて検討した。この場合も前述した実施例1におけると同様に抗体の結合が親和性支配になる条件で実験を行った。具体的には、表1に示すように、エストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、エストラジオール-3-グルクロン酸に対して約 10×10^{-12} mol/Lの平衡解離定数を示すBD2F9抗体とエストラジオールに 34×10^{-12} mol/Lの平衡解離定数を示すが、その抱合体には3桁以上高い値を示すBSP抗体を組み合わせた。まずモノアッセイにて2種の抗エストラジオール抗体についてエストラジオールの形態別にホルモン濃度と蛍光強度との関係を調べた。図2(A)~(C)に示すように、BD2F9抗体ではエストラジオールの形態に関わらず29.3pM~44.1pMの範囲で最大蛍光強度の50%を示す曲線が得られ、測定濃度範囲は10pM~250pMであった。一方、図2

(A)~(C)に示すようにBSP抗体はエストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、エストラジオール-3-グルクロン酸に対して、それぞれ83.4pM、19.3nM、649nMで最大蛍光強度の50%を示す曲線が得られ、同順で測定濃度範囲は15.6pM~500pM、1.96nM~500nM、3.21nM~4.0 μ Mであった。2種の抗体の結合がそれぞれの親和性にもとづいて同時に起こるならば、デュアルアッセイにおける蛍光強度の減少は測定系内に共存するエストラジオールの形態によって大きく異なるはずである。そこで、モノアッセイから得られた値をもとにデュアルアッセイの蛍光強度をエストラジオールの形態別に計算し、同時に実測も行った。その結果、図2(A)~(C)検討した3種類のエストラジオールの形態について破線で示す計算値と実測値は良く一致していた。デュアルアッセイではエストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、エストラジオール-3-グルクロン酸に対して、それぞれ69.4pM、1.23nM、8.96nMで最大蛍光強度の50%を示す曲線が得られ、同順で測定濃度範囲は10.0pM~250pM、10pM~500nM、10.0pM~4.0 μ Mであった。これらの濃度範囲の下限は各抗原に対するBD2F9抗体の高い同等な親和性を、上限はBSP抗体の各抗原に対する親和性の違いを反映していた。これらの結果から、デュアルアッセイでは両抗体ともに高い結合親和性を示すエストラジオールに関しては両抗体の結合が低濃度のエストラジオールに対して同時に起こり、濃度の増加に対して蛍光強度が急激に減少することがわかった。一方、エストラジオール-3-硫酸やエストラジオール-3-グルクロン酸ではBD2F9抗体が高い結合親和性を示すのに対してBSP抗体は約4~5桁低い親和性を示すため、低い抗原濃度ではBD2F

9抗体の結合のみが起こり、高い濃度では両抗体の結合が同時に起こることが確かめられた。以上、デュアルアッセイにより、異なる親和性を持つ2種の抗体を組み合わせて試料に含まれるホルモンの形態やそれらの測定濃度範囲を拡大できることが確かめられた。

【0061】実施例3 同時多重免疫検定

2種類の異なる抗原に対してそれぞれ高い結合親和性を示す抗体を組み合わせ、親和性支配の結合条件下でデュアルアッセイにより高感度に2種類の抗原を検出することを試みた。実験には、エストリオールに対してBS31M抗体とエストラジオールに対してBSP抗体を用いた。エストラジオールをそれぞれ0pM、6pM、37pM、111pM、333pM、1000pM含む試料に、種々の濃度でエストリオールをさらに添加し、BS31M抗体とBSP抗体の存在下で蛍光強度を測定した。その結果、図3(A)に示すように、一定濃度のエストリオールを含む試料において、エストラジオールの濃度の増加に従い、蛍光強度の減少がみられた。同様に一定濃度のエストラジオールを含む試料において、エストリ奥ールの濃度の増加に従い、蛍光強度が減少した。

【0062】これらの結果をもとに蛍光強度とエストラジオールおよびエストリオール濃度の関係を図3(B)に示した。その結果、デュアルアッセイではエストリオールとエストラジオールをともに6pM~1nMの範囲で同時に検出が可能であった。このように、デュアルアッセイにより異なる抗原に対する親和性を組み合わせることができ、高感度に検出可能な抗原種を拡大できると考えられた。

実施例4 順次多重免疫検定

【0063】試料中に含まれる複数の抗原の定量が可能な順次多重免疫検定について実験を行った。

【0064】エストラジオールとエストリオールをそれぞれ0pM、1.6pM、8pM、40pM、200pM、1000pMの濃度で含む組み合わせの合計30種類の試料に対し、BS31M抗体とBSP抗体をCy-5標識した2次抗体とともにそれぞれ添加して調製した混合液を以下の要領で送液した。すなわち、緩衝液、BS31M抗体+CY-5標識2次抗体+エストラジオール+エストリオール、緩衝液、BD2F9抗体+CY-5標識2次抗体+エストラジオール+エストリオール、緩衝液の順に送液した。

【0065】送液時の蛍光強度の時間変化を図4(A)に示した。ホルモン混合液中のエストリオール濃度はBS31M抗体に由来する残存蛍光強度、同様にエストラジオール濃度はBD2F9抗体に由来する強度から定量された。この順次多重測定により、ホルモン混合液中のエストリオールはエストラジオールの濃度に関わりなく蛍光強度の減少率から定量され、同様に共存するエストラジオール濃度に関わらずエストリ奥ールの定量も可能であった(図4(B)、(C))。その定量濃度範囲はエストラジオールとエストリオールともに1.6pM~1nMである。

以上、2種の抗体を組み合わせる測定を連続的に行うことで、2種の抗原を定量できた。

【0066】この順次多重免疫検定において、連続した定量は用いた抗体の親和性が結合を支配する抗体濃度で行った。従って、エストラジオールとエストリオールの抱合体に親和性を持つ抗体の組み合わせによっては抱合体を含めた混合女性ホルモン中からエストラジオール系ホルモンとエストリオール系ホルモンにわけて定量することも可能であると予想された。そこで、前述と同様な順次多重測定でエストリオール系ホルモン(エストリオール、エストリオール-3-硫酸、エストリオール-3-グルクロン酸を等モルで混合)とエストラジオール系ホルモン(エストラジオール、エストラジオール-3-硫酸、エストラジオール-3-グルクロン酸を等モルで混合)を含む試料から両者をそれぞれ定量した。この時、エストリオール系ホルモンの検出には混合したエストリオールとその抱合体に対してほぼ同じ平衡解離定数を示すBS31M抗体、同様な理由でエストラジオール系ホルモンにはBD2F9抗体を用いた。その結果、図5(A)および(B)に示すように、混合液中の3種のエストリオール系ホルモンは共存するエストラジオール系ホルモンの濃度に関わりなく蛍光強度の減少率から定量され、同様に3種のエストラジオール系ホルモンについても定量可能であった。その定量濃度範囲はエストラジオール系とエストリオール系ホルモンともに総濃度として1.6pM~1nMであった。以上、2種類の抗女性ホルモン抗体を組み合わせる連続的に検出するデュアルアッセイにより、1回約10分間の測定で2種の女性ホルモンとその抱合体合計6物質を1.6pM~1nMの範囲で定量できた。

【0067】

【発明の効果】以上述べたように本発明によれば、複数の異なる結合親和性を持つ抗体を1つの免疫検定に併用して用いることができ、被測定物質の種類とその測定範囲(感度)を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】2種類の抗エストリオール抗体を組み合わせる免疫検定による測定範囲を示す図であり、図1(A)において、()はBS31抗体単独、()はBS33抗体単独、()はBS31抗体+BS33抗体の場合のデータであり、また、図1(B)において、()はBS31抗体単独、()はBD2F9抗体単独、()はBS31抗体+BD2F9抗体の場合のデータであり、また図中の破線は、いずれも2種の抗体を組み合わせる場合を単独の場合のデータに基づき計算により算出した値である。

【図2】2種類の抗エストラジオール抗体を組み合わせる免疫検定によるホルモンおよびホルモン抱合体測定範囲を示す図であり、図2(A)はエストラジオール、図2(B)はエストラジオール-3-硫酸、図2(C)は

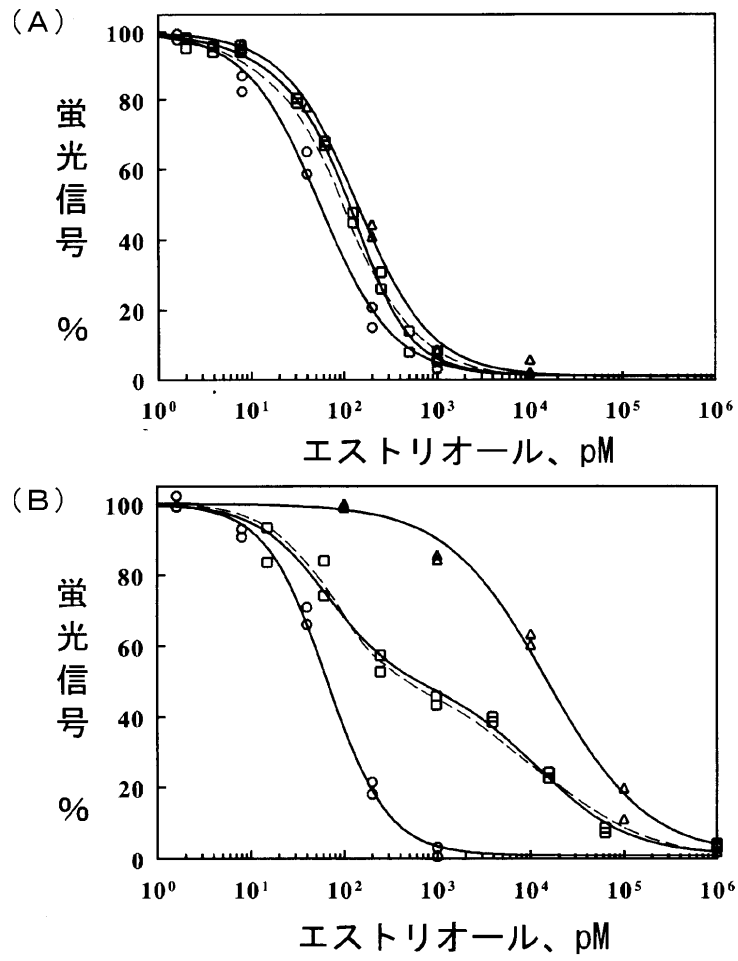
エストラジオール-3-グルクロン酸に関する検出値であり、各図において、()はBD2F9抗体単独、()はBSP抗体単独、()はBD2F9抗体+BSP抗体の場合のデータであり、また図中の破線は、いずれも2種の抗体を組み合わせる場合を単独の場合のデータに基づき計算により算出した値である。

【図3】デュアルアッセイによるエストラジオールとエストリオールの同時多重免疫検定の結果を示す図であり、図3(A)は、種々の濃度でエストリオールを含む試料に一定濃度でエストラジオールを添加した場合の蛍光信号を、また、図3(B)は図3(A)における蛍光信号に関してのエストリオールとエストラジオール濃度との関係を示す図である。

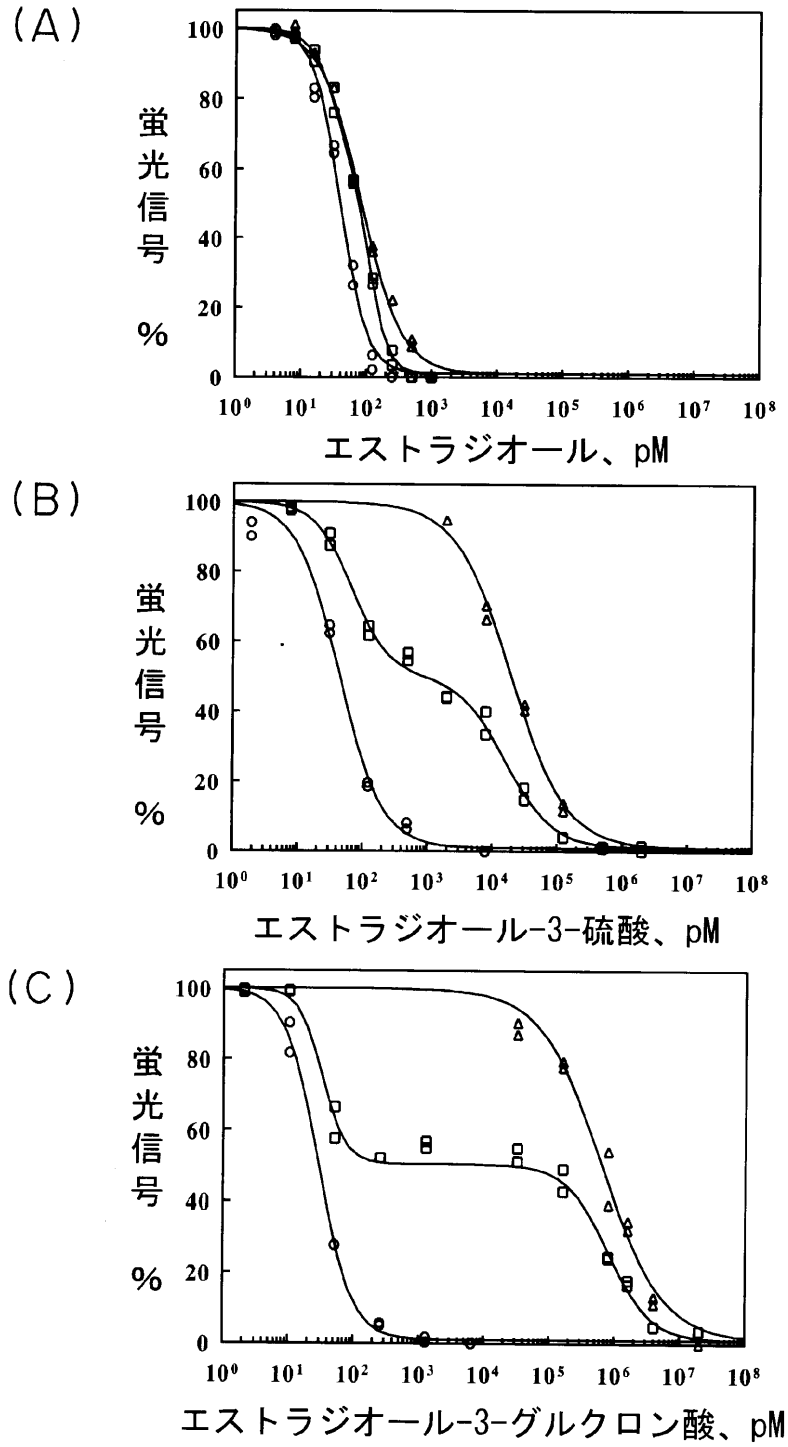
【図4】デュアルアッセイによるエストラジオールとエストリオールの順次多重免疫検定の結果を示す図である。図4(A)は、~の液体を順次送液した場合の蛍光強度の時間変化を示す図であり、ここにおいて、は緩衝液、はBS31M抗体+CY-5標識2次抗体+エストラジオール+エストリオール、は緩衝液、はBD2F9抗体+CY-5標識2次抗体+エストラジオール+エストリオール、は緩衝液である。なお、とについては曲線の上から、エストラジオールとエストリオールをともに0pM、1.6pM、40pM、200pM、1000pMで含む場合を示している。図4(B)および図4(C)は、図4(A)に示す結果から得られた、エストラジオールとエストリオールを種々の濃度で含む試料を測定した場合の蛍光強度変化とホルモン濃度との関係を示す図であり。図4(B)においては、エストラジオールを、また図4(C)についてはエストリオール濃度を();1000pM,();200pM,();40pM,();8pM,();1.6pM,();0pMでそれぞれ示した。

【図5】デュアルアッセイによる6種混合女性ホルモン中のエストラジオール系とエストリオール系ホルモンの順次多重免疫検定の結果を示す図であり、図5(A)は種々の濃度でエストリオール系ホルモン(エストリオール:エストリオール-3-硫酸:エストリオール-3-グルクロン酸=1:1:1)とエストラジオール系ホルモン(エストラジオール:エストラジオール-3-硫酸:エストラジオール-3-グルクロン酸=1:1:1)を含む試料を測定した場合のエストリオール系ホルモンに関する濃度と蛍光信号の関係、図5(B)は同測定でのエストラジオール系ホルモンに関する濃度と蛍光信号の関係を示す図であり、図5(A)および図5(B)中で、共存する他方のホルモン、すなわち、図5(A)でのエストラジオール系ホルモン濃度と、図5(B)でのエストリオール系ホルモン濃度は、それぞれ();1000pM,();200pM,();40pM,();8pM,();1.6pM,();0pMとし、濃度は各ホルモン系の総濃度として表示した。

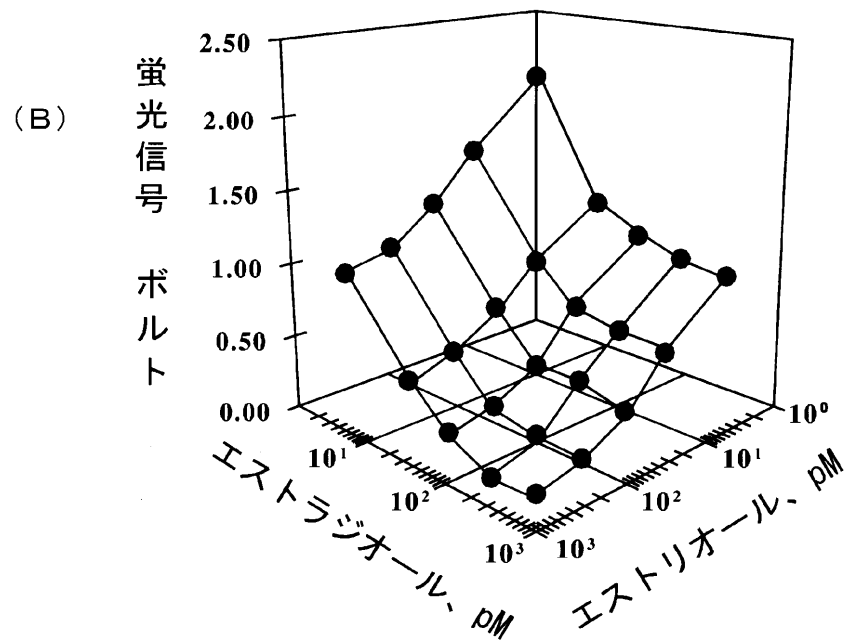
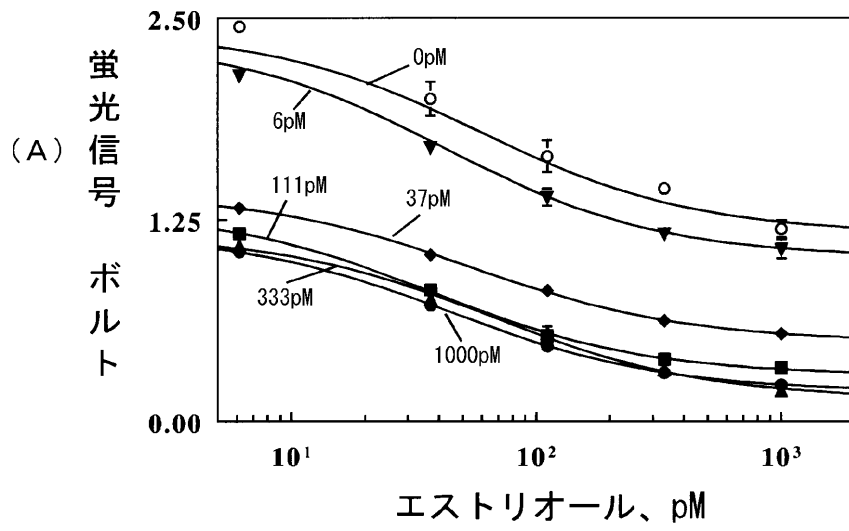
【図1】



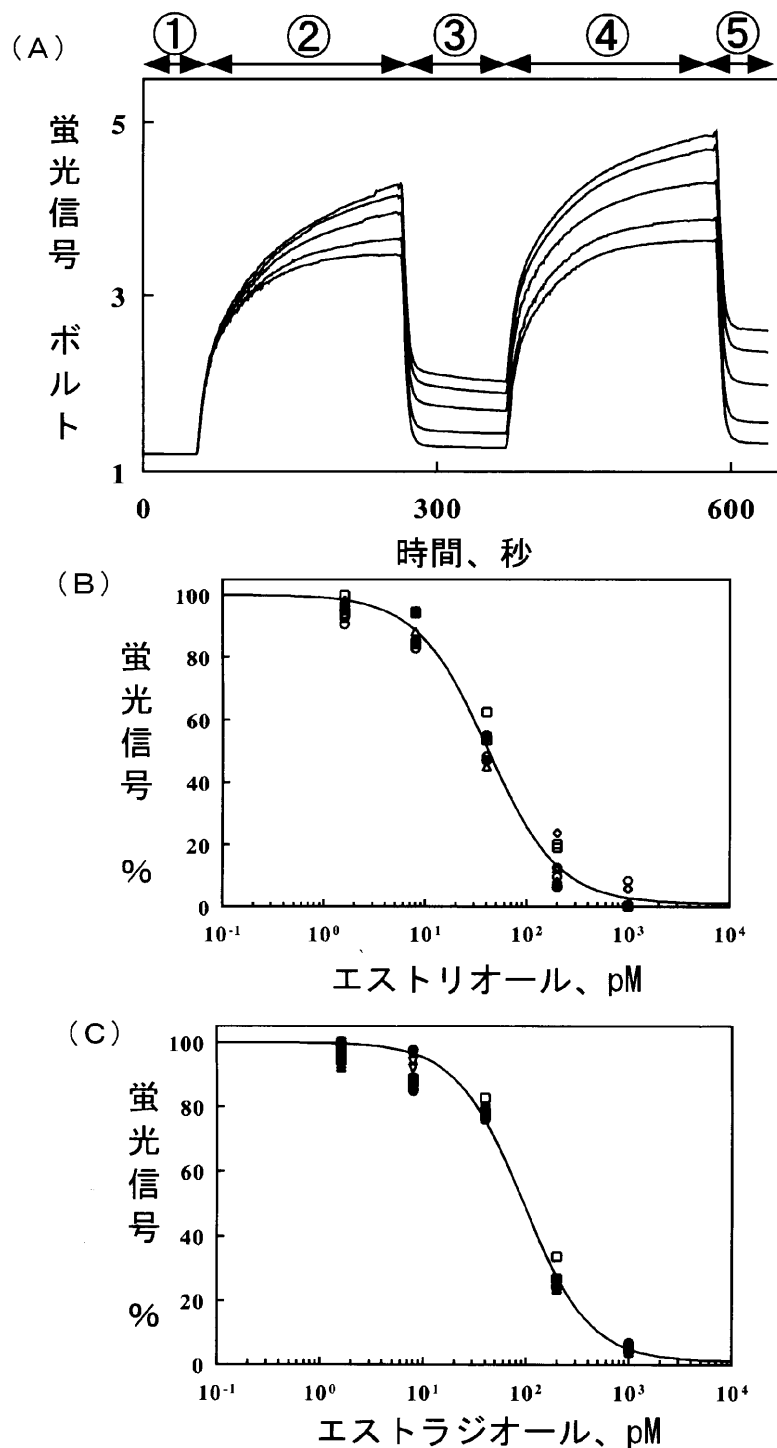
【図2】



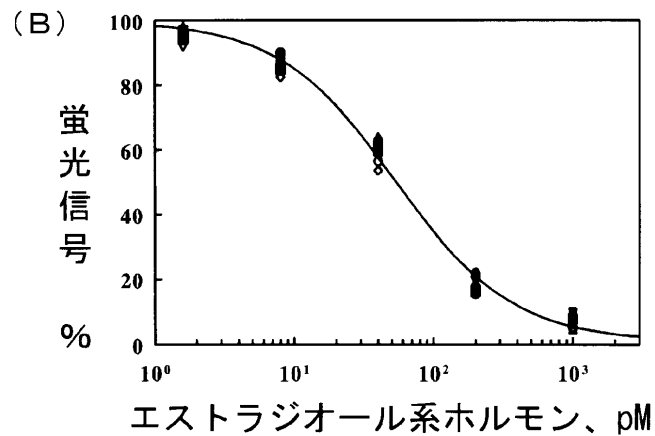
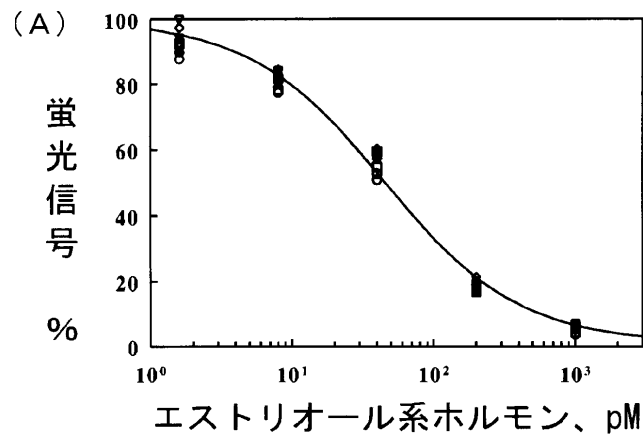
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(71)出願人 599145122
967 E. Park Center Bl
vd. #445, Boise ID 83706
- 6700, USA

(72)発明者 大村 直也
千葉県我孫子市我孫子1646番地 財団法人
電力中央研究所 我孫子研究所内

(72)発明者 スティーヴ ラッキー
アメリカ合衆国 アイダホ州 83706 -
6700 ボイシ, イー. パーク センター
ブールバード #445 967 サピダイン
インストルメント インコーポレイテッ
ド内

专利名称(译)	免疫検出方法		
公开(公告)号	JP2002189027A	公开(公告)日	2002-07-05
申请号	JP2000389401	申请日	2000-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	SAPIDYNE INSTR		
申请(专利权)人(译)	財団法人電力中央研究所 Sapidain仪器有限公司		
[标]发明人	大村直也 スティーヴラッキー		
发明人	大村 直也 スティーヴ ラッキー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.511.D G01N33/53.A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：扩大免疫检测系统中检测物质的种类，使用抗原 - 抗体反应并扩大其测量范围（灵敏度）。解决方案：在该方法中，检测样品中抗原的存在；与抗原的平衡解离常数和抗体的种类相比，在抗体浓度足够低的条件下，使用与抗原的亲合力不同的2种以上的抗体。由其自身的抗原结合亲和力控制；将已知量的多种抗体同时引入样品中，以便与已知存在的抗原一起用于抗原 - 抗体反应；使多种抗体和样品的反应混合溶液与已知量的固定化抗原接触；通过测量与多种抗体结合的标记荧光的荧光强度，检测与固定化抗原结合的抗原的量。并且基于结果检测样品中抗原的存在。

