

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03136494.2

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 21/17 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年5月9日

[11] 授权公告号 CN 1314965C

[22] 申请日 2003.5.22 [21] 申请号 03136494.2

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 22 [33] JP [31] 2002 - 148297

[32] 2003. 5. 9 [33] JP [31] 2003 - 131790

[73] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 汤川系子 重藤修行 龟井明仁

河村达朗

[56] 参考文献

CN1176391A 1998.3.18

US6136545A 2000.10.24

CN1156826A 1997.8.13

CN1318748A 2001.10.24

US4860767A 1989.8.29

应用单克隆抗体 ELISA 法检测尿中微量白蛋白 王红等,上海医学检验杂志,第 11 卷第 1 期 1996

审查员 汪妍瑜

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 汪惠民

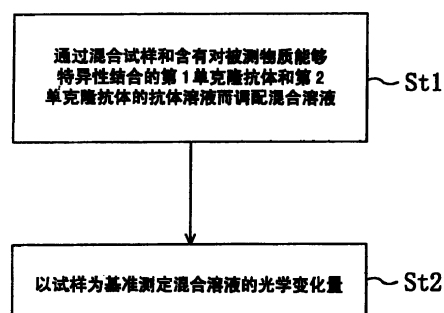
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 9 页

[54] 发明名称

免疫学的测定方法

[57] 摘要

本发明提供一种免疫学测定方法,是测定试样中被测物质含量的免疫反应测定方法,包括:通过混合上述试样和含有对上述被测物质能够特异性结合的第 1 单克隆抗体和第 2 单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的工序(a);测定所述混合溶液的光学特性的工序(b),所述第 1 单克隆抗体,能够与所述被测物质的所述第 1 抗原决定簇结合,所述第 2 单克隆抗体能够与所述测物质的所述第 1 抗原决定簇不同的第 2 抗原决定簇结合,所述第 1 抗原决定簇和所述第 2 抗原决定簇在所述被测物质中各存在一个。



1.一种免疫学的测定方法，是测定试样中白蛋白含量的免疫反应测定方法，其特征在于，包括：

5 通过混合上述试样和含有对上述白蛋白能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的工序a；

测定所述混合溶液的光学特性的工序b，

其中，所述第1单克隆抗体，能够与所述白蛋白的第1抗原决定簇结合，

所述第2单克隆抗体能够与所述白蛋白的所述第1抗原决定簇不同的  
10 第2抗原决定簇结合，所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在所述白蛋白中各存在一个，

在所述工序a中，所述抗体溶液进一步含有第3单克隆抗体，

所述第1单克隆抗体、所述第2单克隆抗体以及所述第3单克隆抗体分别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号  
15 FERM BP-7937号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株产生的单克隆抗体，或者分别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号细胞株产生的单克隆抗体。  
20

2.根据权利要求1所述的免疫学测定方法，其特征在于，所述光学特性是散射光强度或透过光的量。  
25

3.根据权利要求1所述的免疫学测定方法，其特征在于，改变所述抗体溶液中的所述第1单克隆抗体和所述第2单克隆抗体的分子数的比。

4.一种免疫学测定装置，是用于测定试样中的白蛋白的含量的免疫反应测定装置，其特征在于，包括：

30 通过混合上述试样和含有对上述白蛋白能够特异性结合的第1单克隆

抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的调配装置；

测定所述混合溶液的光学特性的光学测定装置，

其中，所述第1单克隆抗体，能够与所述白蛋白的第1抗原决定簇结合，

所述第2单克隆抗体能够与所述白蛋白的所述第1抗原决定簇不同的  
5 第2抗原决定簇结合，

所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在所述白蛋白中各存在一个，

所述抗体溶液进一步含有第3单克隆抗体，

所述第1单克隆抗体、所述第2单克隆抗体以及所述第3单克隆抗体分  
10 别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号  
FERM BP-7937号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综  
合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单  
克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编  
号FERM BP-8307号细胞株产生的单克隆抗体，或者分别是由独立行政法  
15 人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细  
胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄  
存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政  
法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号  
细胞株产生的单克隆抗体。

20 5. 一种生物成分测定用卫生间，是用于测定排泄物中白蛋白含量的  
生物成分测定卫生间，其特征在于，包括：

将排泄物或冲洗物和排泄物的混合物作为试样并采集的排泄物采集  
装置；

通过混合所述试样和含有对所述白蛋白能够特异性结合的第1单克隆  
25 抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的调配装置；

测定所述混合溶液的光学特性的光学测定装置，

其中，所述第1单克隆抗体，能够与所述白蛋白的第1抗原决定簇结合，

所述第2单克隆抗体能够与所述白蛋白的所述第1抗原决定簇不同的  
第2抗原决定簇结合，

30 所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在所述被测物质中各存在

一个，

所述抗体溶液进一步含有第3单克隆抗体，

所述第1单克隆抗体、所述第2单克隆抗体以及所述第3单克隆抗体分别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号  
5 FERM BP-7937号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株产生的单克隆抗体，或者分别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号细胞株产生的单克隆抗体。

6. 一种白蛋白检出试剂盒，是用于检测试样中的白蛋白的白蛋白检出试剂盒，其特征在于，

含有第1单克隆抗体、第2单克隆抗体以及第3单克隆抗体，

所述第1单克隆抗体是抗白蛋白的单克隆抗体，

所述第2单克隆抗体是抗白蛋白的单克隆抗体，并且由标记物质标记，

所述第3单克隆抗体是抗白蛋白的单克隆抗体，

20 所述第1单克隆抗体、所述第2单克隆抗体以及所述第3单克隆抗体分别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株产生的单克隆抗体，或者分别是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株产生的单克隆抗体、由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号  
25 细胞株产生的单克隆抗体。  
30

## 免疫学的测定方法

### 5 技术领域

本发明涉及一种对试样中特定成分进行测定的免疫学测定方法。

### 背景技术

10 以往作为不进行试样液的稀释或搅拌等而简便地对试样中的特定成分（被测物质）进行测定的方法，提出了各种利用抗体的免疫学的测定方法。

在免疫学的测定方法中，已知免疫比浊法是其中一种。免疫比浊法中所用的测定用试剂盒（微量白蛋白-HA化验试剂，和光纯药制）已有市售。该测定用试剂盒的组成，由缓冲液（50mM古德缓冲液PH7.4）和抗体溶液组成。在抗体溶液中，含有来自兔子的抗人白蛋白多克隆抗体（1.5mgAb/ml）和来自小鼠抗人白蛋白单克隆抗体（4.0mgAb/ml）。在测定时，在缓冲液中使试样和抗体作用。此时，若试样中含有白蛋白时，白蛋白和抗人白蛋白抗体发生特异性抗原抗体反应并产生浑浊。浑浊的程度（浊度）由于与试样中的白蛋白浓度成比例，所以通过测定浊度可以计算试样中的白蛋白的量。

20 在所述测定用试剂盒中，之所以同时使用多克隆抗体和单克隆抗体，认为是结合前者的“浊度变高”的特征和后者的难于引起“前带现象”的特征的缘故。即，通过将多克隆抗体和单克隆抗体同时结合使用，可以在避免作为免疫比浊法缺点的抗原过剩区域的前带现象的同时，而实现很宽的测定范围[参照初田和由等，第28次日本临床化学会要旨集、63、19页（1988）]。

上述类的免疫比浊法，通过选择与各个测定对象物质结合的抗体来测定各种物质，在原理上是可能的。例如，作为抗体，若选择抗人白蛋白抗体，可以制作测定试样液中的白蛋白浓度的传感器。

30 白蛋白，是约占从血液中除去血球等有形成分的剩余血浆中的蛋白

质50%的蛋白质。白蛋白，已知具有维持血液的渗透压；输送离子、脂肪酸、部分维生素、色素和药物；以及向末梢组织提供氨基酸等的作用。但是，若产生由于作为糖尿病并发症之一的糖尿病性肾病等引起的肾功能障碍，已知白蛋白可以渗透到尿中。

5 所以，若测定尿中的白蛋白量，就可以筛选病态、确认治疗效果以及愈后的判断等。由此，对尿中白蛋白量的测定作为用于早期发现糖尿病性肾病以及诊断糖尿病愈后的重要日常检查，近年来被广泛普及。对尿中的白蛋白的测定可以通过利用与白蛋白特异性结合的抗体的免疫学方法来实施。

10 以往，作为白蛋白的抗体，一直使用作为多克隆抗体的抗人白蛋白血清。以往的白蛋白的测定方法，几乎都是通过有无抗血清和白蛋白的凝集反应引起的沉降线或浊度的增加来测定白蛋白的。但是，未精制的抗血清，由于多含有血清中各种抗原对应的各种抗体，所以，有可能与白蛋白以往的抗原结合。所以，在测定中，为了防止误与白蛋白以往的  
15 抗原结合，对抗血清进行静置，使在人标准血清中不引起与来自白蛋白以外的抗原的抗体反应。抗血清的精制，为了从未精制的抗血清中去除与人标准血清中的蛋白质结合的抗体，通常采用亲和色谱法等方法。

但是，在如上述构成的免疫比浊法中，使用多克隆抗体（即人血清）。通常，多克隆抗体是精制从免疫动物的血液采集的血清的抗体。所以，  
20 制作方法简便，但是，免疫动物的系别、环境、身体状况等对抗体特性的影响很大。例如，在使用抗人白蛋白血清时，可能在制作的每个抗人白蛋白血清中含有的抗人白蛋白抗体的种类不同（例如抗原决定簇不同），有可能在每个抗人白蛋白血清中与白蛋白的反应性发生变化。

若在每次制作的多克隆抗体时所新得到的抗体的反应性发生变化，  
25 接着就难于获得同质的抗体。所以，即使通过免疫比浊法试着测定被测物质，也有可能得不到再现性的结果。

## 发明内容

本发明是鉴于上述问题而完成的，所以，目的在于提供一种测定试  
30 样中特定成分的结果可靠性高的免疫学测定方法。

本发明的免疫反应测定方法，是测定试样中被测物质含量的免疫反应测定方法，包括：通过混合上述试样和含有对上述被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的工序（a）；测定所述混合溶液的光学特性的工序（b），所述第1单克隆抗体，能够与上述被测物质的所述第1抗原决定簇结合，所述第2单克隆抗体能够与上述被测物质的所述第1抗原决定簇不同的第2抗原决定簇结合，所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在上述被测物质中各存在一个。

生产单克隆抗体的细胞株，大致永久地生产同一抗体。所以，可以稳定得到特性均质的抗体，可以抑制抗体溶液的批间差引起的特性不同。所以，根据本发明，被测物质的测定结果的再现性高，并且还可以提高测定值的可靠性。

所述光学特性，可以是散射光强度或透过光量的构成。

在上述工序（a）中，所述第1单克隆抗体和所述第2单克隆抗体的半数抑制率可以设为选自 $1 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1 \times 10^{-7} \text{M}$ 范围内值的构成。

也可设为改变在上述抗体溶液中所述第1单克隆抗体和所述第2单克隆抗体的分子数比的构成。

由此，可以根据须要改变能够测定的被测物质的浓度范围、检测灵敏度。所以，可以自由地设计能够测定的被测物质的浓度范围、检测灵敏度。

所述被测物质也可以为白蛋白的构成。

在上述工序（a）中，可以构成为上述抗体溶液进一步含有第3单克隆抗体，所述第1单克隆抗体是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株产生的单克隆抗体，所述第2单克隆抗体是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体，所述第3单克隆抗体是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株产生的单克隆抗体。

在上述工序（a）中，可以构成为上述抗体溶液进一步含有第3单克隆抗体，所述第1单克隆抗体是由独立行政法人产业技术综合研究所特许

生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的单克隆抗体，所述第2单克隆抗体是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株产生的单克隆抗体，所述第3单克隆抗体是由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号5 FERM BP-8309号细胞株产生的单克隆抗体。

本发明的免疫反应测定装置，是用于测定试样中的被测物质的含量的免疫反应测定装置，包括：通过混合上述试样和含有对上述被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的调配装置；测定所述混合溶液的光学特性的光学测定装置，所述第1单克隆抗体，能够与上述被测物质的所述第1抗原决定簇结合，所述第2单克隆抗体能够与上述被测物质的所述第1抗原决定簇不同的第2抗原决定簇结合，所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在上述被测物质中各存在一个。10

本发明的生物成分测定卫生间，是用于测定排泄物中被测物质含量的生物成分测定卫生间，包括：将排泄物或冲洗物和排泄物的混合物作为试样并采集的排泄物采集装置；通过混合上述试样和含有对上述被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的调配装置；测定所述混合溶液的光学特性的光学测定装置，所述第1单克隆抗体，能够与上述被测物质的所述第1抗原决定簇结合，所述第2单克隆抗体能够与上述被测物质的所述第1抗原决定簇不同的第2抗原决定簇结合，所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在上述被测物质中各存在一个。20

本发明的抗白蛋白单克隆抗体由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生。

25 本发明的另外抗白蛋白单克隆抗体由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株产生。

本发明的另外抗白蛋白单克隆抗体由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株产生。

30 本发明的另外抗白蛋白单克隆抗体由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株产生。

本发明的另外抗白蛋白单克隆抗体由独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号细胞株产生。

本发明的细胞株是独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株。

5 本发明的另外细胞株是独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株。

本发明的另外细胞株是独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株。

10 本发明的另外细胞株是独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株。

本发明的另外细胞株是独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号细胞株。

15 本发明的用于检测试样中的白蛋白的白蛋白检出试剂盒，含有第1单克隆抗体和第2单克隆抗体，所述第1单克隆抗体是抗白蛋白的单克隆抗体，所述第2单克隆抗体是抗白蛋白的单克隆抗体，并且由标记物质标记，所述第1单克隆抗体和所述第2单克隆抗体中至少一方是由选自独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号细胞株构成的一组中的细胞株产生的抗白蛋白的单克隆抗体。

25 生产单克隆抗体的细胞株，大致永久地生产同一抗体。所以，可以稳定得到特性均质的抗体，可以抑制抗体溶液的批间差引起的特性不同。所以，根据本发明的白蛋白检测用试剂盒，被测物质的测定结果的再现性高，并且还可以提高测定值的可靠性。

#### 附图说明

30 图1是表示本发明的免疫学测定方法的流程图。

图2是表示用于本发明免疫学测定方法的测定装置的上部示意图。

图3是表示本发明的生物成分测定卫生间的模式图。

图4是对于改变混合三种单克隆抗体所得到的抗体溶液的分子数比而比较相对于被测物质（人白蛋白）的浓度的浊度的曲线图。

5 图5是对于改变混合三种单克隆抗体所得到的抗体溶液的分子数比而比较相对于被测物质（人白蛋白）的浓度的浊度的曲线图。

图6表示利用7938抗体的抑制ELISA法的结果的曲线图。

图7表示利用7937抗体的抑制ELISA法的结果的曲线图。

图8表示利用8307抗体的抑制ELISA法的结果的曲线图。

10 图9表示利用8308抗体的抑制ELISA法的结果的曲线图。

图10表示利用8309抗体的抑制ELISA法的结果的曲线图。

### 具体实施方式

以下参照附图说明本发明的实施方式。图1是表示本发明实施方式的免疫学测定方法的流程图。另外，本说明书中“免疫学测定方法的”说法是包括免疫比浊法和比漏法的测定方法的总称。

本实施方式的免疫学测定方法，是测定试样中被测物质的含量的免疫学测定方法，如图1所示，包括：通过混合试样和含有对被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的工序St1；测定所述混合溶液的光学特性的工序St2。

以下详细说明各工序。

首先，在工序St1中准备试样和抗体溶液。

作为试样没有特殊限制，为了诊断各种疾病，可以举出尿、血液、排泄物、唾液等。

25 抗体溶液含有对于被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体。第1单克隆抗体，能够与被测物质的第1抗原决定簇结合，第2单克隆抗体能够与被测物质的第1抗原决定簇不同的第2抗原决定簇结合。另外，第1抗原决定簇和第2抗原决定簇在被测物质中各存在一个，不在多处存在。

30 由此，在试样中含有被测物质时，产生由被测物质和第1单克隆抗体

及第2单克隆抗体之间的抗原抗体反应而产生的凝聚复合物。在试样中不含有被测物质时，不产生由被测物质和第1单克隆抗体及第2单克隆抗体之间的抗原抗体反应而产生的凝聚复合物。

然后，在工序St2中，测定混合溶液的光学特性。此时，在所述工序  
5 St1中产生凝集复合物时，在所述反应系统内产生浑浊，散射光强度或透过光量等发生变化。所以，通过测定散射光强度或透过光量，能够估计混合液的浑浊程度。在这里，优选在将特异结合物质从所述反应系统中除去后的物质作为基准的同时，测定所述反应系统的光学变化量，即，  
10 散射光强度或透过光量的变化量。另外，也可以将试样从反应系统中除去后的物质作为基准。另外，混合溶液的光学特性为散射光强度或透过光量。若测定混合溶液的散射光强度则为免疫比浊法，若测定透过光量则为免疫比漏法。

一般，多克隆抗体，是通过免疫山羊或兔子等大型动物，在确认抗体效价、亲合力饱和后，在数月之内分成数次采集其血清并对其进行精  
15 制所得。所以，饱和亲合力以上的多克隆抗体，不言而喻，另外，即使是饱和亲合力以下的多克隆抗体也难于维持质量。所以，在利用多克隆抗体的以往的方法中，抗体溶液的质量中产生不均，测定结果的再现性和测定值的可靠性也降低。

另一方面，生产单克隆抗体的细胞株，大致永久地生产同一抗体。  
20 所以，可以稳定得到特性均质的抗体，可以抑制抗体溶液的批间差引起的特性不同。所以，根据本发明，被测物质的测定结果的再现性高，并且还可以提高测定值的可靠性。

另外，第1抗原决定簇和第2抗原决定簇，由于在被测物质中各存在1  
25 个，不在多处存在，所以，在一种单克隆抗体中，几乎不形成由免疫学测定方法中必须的抗原抗体反应产生的凝集复合体。在本实施方式中，使用被测物质中抗原决定簇相互不同的2类单克隆抗体混合形成的抗体溶液。当然，也可以使用被测物质中抗原决定簇相互不同的3类单克隆抗体混合形成的抗体溶液。但是，从抗体溶液的制备的观点来看，将抗体溶液中含有的单克隆抗体的种类控制在20种以下，在成本上是优选的。

30 另外，本实施方式的免疫学测定方法中所用的单克隆抗体的半数抑

制值，优选选自 $1 \times 10^{-11} \text{M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{M}$ 范围内的值。

另外，所谓“半数抑制值”，是指在ELISA法中，与固定在固相上的被测物质结合的单克隆抗体的量，通过添加竞争物质（抑制剂：这里和被测物质相同），与不存在抑制剂的情况下比较减少时，测定吸光度为抑制剂不存在下的吸光度（反映抗体的结合量）一半时的抑制剂的浓度。

另外，一旦使用含有被测物质中抗原决定簇和亲和性分别相互不同的3种以上的单克隆抗体的抗体溶液时，各单克隆抗体的抗原决定簇和亲和性复杂结合形成抗原-抗体复合物。所以，根据各单克隆抗体的分子数比不同，凝集复合物的大小及浓度产生差异。所以，可以根据须要改变能够测定的被测物质的浓度范围、检出灵敏度。由此，可以自由设计能够测定的被测物质的浓度范围和检出灵敏度。

具体地说，若使用将作为抗人白蛋白抗体的独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号（以下称为7938株）细胞株产生的单克隆抗体、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号（以下称为8308株）细胞株产生的单克隆抗体、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号（以下称为8309株）细胞株产生的单克隆抗体混合所得的抗体溶液测定人白蛋白时，通过分子数比可以改变人血清白蛋白浓度低时的灵敏度。

另外，阻碍在ELISA板上涂布 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 人血清白蛋白与所述各抗体结合的白蛋白浓度的半数值（半数抑制值），7938株产生的单克隆抗体（以下称为7938抗体）为 $3.0 \times 10^{-9} \text{M}$ ，8308株产生的单克隆抗体（以下称为8308抗体）为 $3.2 \times 10^{-10} \text{M}$ ，8309株产生的单克隆抗体（以下称为8309抗体）为 $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 。

另外，混合亲和性相互不同的3种以上的单克隆抗体时，使用亲和性相互差异大的3种以上的单克隆抗体时容易控制前带现象。

具体地说，若使用将作为抗人白蛋白抗体的独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号（以下称为7938株）细胞株产生的单克隆抗体、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号（以下称为7937株）细胞株产

生的单克隆抗体、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号（以下称为8307株）细胞株产生的单克隆抗体混合所得的抗体溶液测定人白蛋白时，通过其分子数比可以使产生前带现象的人血清白蛋白浓度在10mg/dl~50mg/dl范围内变化。

5 另外，阻碍在ELISA板上涂布 $1 \times 10^{-7}$ M人血清白蛋白与所述各抗体结合的白蛋白浓度的半数（半数抑制值），7938株产生的单克隆抗体（以下称为7938抗体）为 $3.0 \times 10^{-9}$ M，7937株产生的单克隆抗体（以下称为7937抗体）为 $5.5 \times 10^{-7}$ M，8307株产生的单克隆抗体（以下称为8307抗体）为 $1.0 \times 10^{-8}$ M。

10 另外，在本发明中“抗人白蛋白单克隆抗体”中，也含有保持其结合特性的片断。这些片断，对于白蛋白的特异性结合能够与产生这些片断的完整抗体竞争，至少能够以 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 的亲合性结合。抗体的片断可能含有免疫球蛋白的重链、轻链、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc以及Fv。抗体的片断，可以由完整免疫球蛋白的酶或化学分离产生。例如F(ab')<sub>2</sub>片断可以利用Harlow和Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY  
15 MANUAL COLD SPRING HARBOR LABORATORY, New York (1988) 中记载的标准方法，在pH3.0~3.5中通过用胃蛋白酶消化蛋白质由IgG分子得到。Fab片断，可以通过限制的还原由F(ab')<sub>2</sub>片断或在还原剂存在下通过番木瓜蛋白酶消化而由整个抗体得到（参照Paul, W.编，  
20 FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY第2版 Ravan Press, N.Y., 1989, 第7章）。

图2是表示本实施方式的免疫学测定方法中所用的测定装置的上图示意图。

25 本实施方式的测定装置20，包括：通过混合试样和含有对被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的调配装置20a；测定所述混合溶液的光学特性的光学测定装置20b，所述第1单克隆抗体，能够与被测物质的第1抗原决定簇结合，第2单克隆抗体能够与被测物质的第1抗原决定簇不同的第2抗原决定簇结合，第1抗原决定簇和第2抗原决定簇在被测物质中各存在一个。

30 在本实施方式中，调配装置20a，如图2所示，由固定基座2和样品基

座3组成的样品池1、通过配管连接器6和样品基座3连接的抗体溶液注入用配管4、以及配置在样品池1内的搅拌子5构成。

在固定基座2上设有微型搅拌器7，以便使在样品池1内配置的搅拌子5能够转动。在固定基座2上面通过固定样品池1形成能够保持液体的样品池1(光路长10mm)。在样品池1内形成能够由抗体溶液注入用配管4通过配管连接器6注入抗体溶液。

光学测定装置20b设置有：半导体激光组件8、能够检测由半导体激光组件8向样品1照射的激光束(波长：680nm，输出15mW，光束径约1.2mm)的45度前方散射光(Sc45)和90度侧散射光(Sc90)的光电二极管9和10。

在本实施方式中，为了提高各个散射光的检出灵敏度，可以构成为使激光束在频率270Hz内脉冲调配，通过各锁定放大器11和12对检出散射光的各光电二极管9和10的输出信号进行相位敏感检波。可以将它们的锁定放大的输出信号作为相当于各散射光强度的信号测定。

## 15 实施方式2

由于近年来对健康的期望，可以看出在家庭中能够快速检查健康状态的需求逐渐升高。为了适应于该需求，人们期望通过一步并且在对应需求的测定范围和灵敏度内测定尿、血液等的液体中的健康指标物质。

20 所以，在本实施方式中，参照图3对能够在家庭中快速地检查健康状态的生物成分测定卫生间进行说明。

本实施方式的生物成分测定卫生间30，如图3所示，为用于测定排泄物(尿和便等)中的被测物质的含量的生物成分测定卫生间，包括：作为试样采集排泄物或清洗物和排泄物的混合物的排泄物采集装置30a、以及上述实施方式2所述的测定装置20。

30 在本实施方式中，排泄物采集装置30a，由排出清洗水的清洗喷嘴31、收纳用从清洗喷嘴31排出的清洗水清洗的清洗水中含有的由使用者33排出的排泄物(便或尿)35的排泄物收纳装置34、由收纳排泄物35的排泄物收纳装置34向测定装置20的样品池输送排泄物35用的输送装置36构成。

另外，在本实施方式中，设置将测定装置20的输出演算为排泄物中被测物质的浓度的演算装置37。

本发明的卫生间包括：设置显示通过演算装置37所得的生物成分的浓度等的遥控和通信装置的显示装置装置40、便座42、便器43、容器44。

5 另外，图3是表示使用者33坐在便座42上进行排尿的情况。

作为操作例，使用本实施方式的生物成分测定卫生间来说明用于测定尿中含有的白蛋白的操作。

使用者33的排泄物35，被设置于落下途中的排泄物收纳装置34收纳，通过输送装置36输送至测定装置20的样品池1中，通过预先设定的抗人白蛋白单克隆抗体混合液（抗体的混合分子数比，7937抗体：7938抗体：8307抗体=4：3：3）的测定装置20测定白蛋白。所得的测定值，根据预先储存在演算装置37中的检量线换算为浓度，并显示在显示装置40中。

另外，达到显示装置40的白蛋白浓度，根据须要，通过通信装置输送至健康管理中心等管理使用者33的健康信息的医疗设施等中，并制作建议等，并也能够将健康建议输送给使用者33。另外，通过使用者33和医疗设施等之间的合同，根据制作的建议等，在医疗设施等的管理下记那个适于健康状态的饮食、消耗品、服务等送给使用者33。

### 实施方式3

在本实施方式中，对使用所述实施方式1中使用的单克隆抗体的白蛋白检出试剂盒进行说明。

本实施方式的白蛋白检出试剂盒，是用于检出试样中的白蛋白的白蛋白检出试剂盒。含有第1单克隆抗体和第2单克隆抗体，第1单克隆抗体，为抗白蛋白单克隆抗体，第2单克隆抗体，为抗白蛋白单克隆抗体并且在该领域内用公知的方法通过标记物进行标记。作为标记物的例子，可以举出酶、色素、磁性体、放射性物质和着色粒子（金胶质、乳胶等）等。

另外，第1单克隆抗体和第2单克隆抗体中至少一方是由选自独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7938号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8307号细胞株、独立行政法人产业技术

综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8308号细胞株、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-8309号细胞株构成的一组中的细胞株产生的抗白蛋白的单克隆抗体。

上述细胞株中的若干，产生对于白蛋白具有高结合能的单克隆抗体。

5 作为代表性的抗白蛋白单克隆抗体可以举出寄存编号FERM BP-7938号细胞株产生的抗体（7938抗体）。这种单克隆抗体对白蛋白的结合能，在与后述实施例中记载的抑制ELISA法实质上相同的条件下的测定中，受到抑制，所得半数抑制值在约 $1 \times 10^{-8}$ M以下。在本实施方式的白蛋白  
10 检出试剂盒中，若使用具有所述那样的半数抑制值的单克隆抗体时，可以以高的灵敏度检出溶液中的白蛋白。进而，由于能够检出以往不能检出的浓度的白蛋白，所以在临床领域，可以成为获得新见解的有效手段。另外，这里所述的“溶液”可以含有尿、血液类的液体，但不限于这些。

一般，已知能够测定溶液中的浓度最高约0.05~5.0mg/L范围的白蛋白。但是，例如，若在本实施方式的白蛋白检出试剂盒中使用7938抗体  
15 时，可以得到能够检出溶液中的浓度约0.0066~0.66mg/L的白蛋白的灵敏度。

另外，在所述实施方式中说明的细胞株中的若干，若用于本实施方式的白蛋白检出试剂盒时，产生能够对溶液中浓度超过约30~300mg/L范围的浓度范围的白蛋白进行定量的单克隆抗体。作为代表性的抗白蛋白  
20 单克隆抗体，可以举出独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心寄存编号FERM BP-7937号细胞株产生的单克隆抗体（7937抗体）。该单克隆抗体对白蛋白的结合能，在与后述实施例中记载的抑制ELISA法实质上相同的条件下的测定中，受到抑制，所得半数抑制值在约 $1 \times 10^{-7}$ M~约 $1 \times 10^{-5}$ M以下。特别优选单克隆抗体的半数抑制值在约 $1 \times 10^{-6}$ M  
25 前后。更优选半数抑制值为约 $1 \times 10^{-6.3}$ M。若在本实施方式的白蛋白检出试剂盒中使用单克隆抗体时，能够对溶液中的浓度约30~300mg/L范围的浓度范围的白蛋白进行测定。

一般，已知能够测定溶液中白蛋白浓度范围为30~300mg/L。但是，例如，若在本实施方式的白蛋白检出试剂盒中使用7937抗体时，能够对  
30 溶液中浓度约为6.6~660mg/L的白蛋白进行定量。所以，为了检查糖尿

病性肾病，在测定尿中的白蛋白浓度时，也可以对早期肾病和显著性肾病的交界区域的浓度进行测定。所以，可以成为临床领域中获得新见解的方法。另外，在使用具有如上述那样的半数抑制值得单克隆抗体时，由于可以用一种单克隆抗体广泛地覆盖白蛋白浓度的测定范围，所以可以降低白蛋白测定中费用。

本实施方式的白蛋白检出试剂盒，可以采用该领域内公知的免疫学方法。作为免疫学的方法，具体地说可以举出ELISA法、RIA法、荧光抗体法等。

为了以高灵敏度检出白蛋白，可以采用使用高灵敏度的抗体的ELISA法。特别在ELISA法，必须高亲合力抗白蛋白抗体。但是，由于免疫动物的身体状况或动物的周围环境不同，很难稳定控制抗白蛋白血清的质量。

另一方面，产生单克隆抗体的细胞株，大致永久地生产同一抗体。所以，可以稳定得到特性均质的抗体，可以抑制抗体溶液的批间差引起的特性不同。所以，根据本发明，被测物质的测定结果的再现性高，并且还可以提高测定值的可靠性。

#### 实施例

以下举出具体的实施例，对本发明进行进一步的详细说明。另外，本发明并不限于本实施例，另外，本实施例记载的“ALB”是指白蛋白。

#### 实施例1

用上述实施方式1说明的图2的测定装置20，在样品池1内，作为抗原边搅拌9 $\mu$ l的hSA（人血清白蛋白）溶液边注入后，注入50mM苹果酸缓冲液（pH5.0，含5%PEG6000）145 $\mu$ l。经过30秒后，开始测定，10秒钟后注入40 $\mu$ l的抗体溶液，20秒钟后停止搅拌，从开始至300秒测定样品池内溶液的浊度。抗体溶液的抗体浓度，在保持0.1mg/ml的同时，使7937株：8307株：7938株分别为90：5：5、80：10：10、70：15：15、60：20：20、40：30：30、20：40：40和10：45：45的比例进行混合。抗原调制成为最终浓度为0、5、10、30、50、100、300和500(mg/dl)，对于各分子数的比的抗体，以7种抗原浓度进行测定。结果如图4所示。

7937株的浓度为90%时，前带，从10mg/dl开始，对于40%一直到

50mg/dl, 随着白蛋白浓度上升, 比浊也上升。另外, 在20%时, 一直到30mg/dl比浊上升, 由此可知低浓度的灵敏度非常高。由该结果可知, 通过改变混合亲和力中有差异的多个单克隆抗体的分子数比, 可以控制测定范围和灵敏度。

## 5 实施例2

调配混合抗体的浓度, 在保持0.3mg/ml的同时, 对于8308抗体: 8309抗体: 7938抗体的分子数比分别为1: 1: 1、1: 1: 2或1: 1: 8三种情况下, 使抗原的最终浓度为0~30mg/dl。其余的与实施例1的条件相同, 利用各分子数比的混合抗体溶液进行免疫比浊测定。结果如图5所示。如图5所示可知, 通过增加7937抗体的分子数比, 可以一直提高至白蛋白30mg/dl的灵敏度。

## 实施例3

### 酶联免疫测定法 (ELISA法)

在以下实施例中, 所得抗血清、培养上清液和单克隆抗体的评价, 是通过ELISA法进行的。其操作法如以下记载。

#### (A) 抗原 (ALB) 的涂布

利用PBS-Az (0.04重量%叠氮化钠PBS溶液) 将ALB溶液调配至 $1 \times 10^{-7}$ M的浓度。在微量反应板 (聚苯乙烯制高结合型平底# 2580, costa社制) 上100 $\mu$ l/孔注入ALB溶液, 室温下在饱和水蒸气中保存一晚。在试验前用吸引器除去ALB溶液。

#### (B) 封闭

200 $\mu$ l/孔注入1重量%CASEIN-PBS-Az溶液, 室温下放置30分钟。之后, 用吸引器除去1重量%CASEIN-PBS-Az溶液。只要不是当天进行以后的试验, 就以该状态室温下保存在饱和水蒸气中。

#### 25 (C) 抗体的反应

50 $\mu$ l/孔注入用1重量%CASEIN-PBS-Az溶液稀释为各种浓度的抗体溶液 (抗血清、培养上清液、精制抗体等) 以及50 $\mu$ l/孔注入1重量%CASEIN-PBS-Az溶液。为了测定相对亲和性而进行抑制试验时, 在50 $\mu$ l/孔注入抑制溶液 (含有ALB溶液) 后, 进而50 $\mu$ l/孔加入抗体溶液, 振荡。常温下放置1个半小时后, 用PBS清洗三次, 用吸引器除去残留的PBS。

#### (D) 标记抗体的反应

100 $\mu$ l/孔注入将0.2 $\mu$ g/ml的过氧化物酶标记的来自山羊的抗小鼠IgG抗体（KPL社制）溶解在1重量%CASEIN的PBS溶液中的混合溶液、或者将0.2 $\mu$ g/ml的过氧化物酶标记的来自山羊的抗小鼠IgM抗体（KPL社制）溶解在1重量%CASEIN的PBS溶液中的混合溶液，常温下放置30分钟。用PBS冲洗三次，进而用吸引器除去残留的PBS。

#### (E) 基质的反应和停止

将邻苯二胺（生物化学用）40mg溶解在10ml的柠檬酸-磷酸缓冲液（pH5）中，在使用前100 $\mu$ l/孔注入加入30重量%过氧化氢水4 $\mu$ l的溶液（基质溶液），室温放置。约2分钟后，25 $\mu$ l/孔注入4N硫酸停止反应。

#### (F) 测定

利用微量反应板导块（东洋souda社制）测定波长492nm的吸光度。所得结果显示抑制剂浓度和向固相抗原的结合率（%）之间相关。另外，向固相抗原的结合率（%）是作为吸光度的相对值求出的。

另外，在本实施例中，作为免疫测定法，使用酶联免疫法，也可以使用其它的RIA法、荧光抗体法等。

#### 实施例4

在本实施例中，考虑本发明人等的研究所的结果，免疫小鼠使用了A/J系统小鼠。

#### (免疫)

利用生理食盐浓度磷酸缓冲液（PBS）将免疫原白蛋白（ALB）（Sigma INC.制）调配至2mg/ml。在该ALB的PBS溶液中，添加同体积的佐剂（人结核死菌含有完全弗罗因德佐剂，和光纯药制，H37RV），通过匀浆机以转动次数为1000rpm充分乳化，得到含有免疫原的佐剂乳剂。

腹腔给予或皮下注射给予生后7周龄的雌性小鼠（A/J）5只各100 $\mu$ l的含免疫原的佐剂乳剂。三周后用PBS通过匀浆机将调配至2mg/ml的ALB溶液和与之体积相同的不完全弗罗因德佐剂乳化，并在A/J小鼠的与前次相同的部位注射给予该乳剂各100 $\mu$ l。

之后，在开始免疫4周后、6周后、12周后，在小鼠的与前次相同的部位注射给予含有与两周后的免疫组成相同浓度的ALB的不完全弗罗因

德佐剂乳剂各100 $\mu$ l。在第2、3、4次注射1周后分别采血，确认以下所示抗体的产生。

#### (抗体产生的确认)

从采集的血清中分离血清，利用所得血清通过酶联免疫测定法  
5 (ELISA法) 确认抗体的产生。分别100 $\mu$ l/孔注入 $1 \times 10^{-7}$ M的ALB，使用放置一晚的涂布后的微量反应板。作为第2抗体使用过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体或者过氧化物酶标记的小鼠IgM抗体。通过每孔中的显色，确认在抗体样品中存与ALB结合的抗体。

其结果，确认在5只小鼠中全部产生抗ALB抗体。进而，在各个小鼠  
10 中，在第2次注射后已经确认抗体产生从IgG向IgM转换，在第3次照射后，IgG/ IgM比在100以上，确认已经充分地发生了类转换。

#### (细胞融合)

在免疫小鼠中，为了使效价高的3只的脾脏增大，进行了最终免疫。  
在免疫开始10周后，用PBS将免疫原的ALB调配至1mg/ml的浓度，不加  
15 入佐剂注射给予小鼠各100 $\mu$ l。

摘出经过最终免疫3日后的小鼠中1只的脾脏细胞。利用平均分子量  
1500的聚乙二醇，通过常法，使脾脏细胞和小鼠骨髓瘤细胞株(P3 $\times$ 63  
-Ag8.653) 融合，得到融合细胞。

使融合细胞悬浮在通过含有15重量%的牛血清(以下，FCS) 的  
20 ISHIKOFU培养基调配的次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸腺嘧啶脱氧核苷(HAT)  
培养基上后，分散在1个96孔板上(200 $\mu$ l/孔)。此时，饲养细胞(在培养开始时供给生长因子的细胞)，使用相同小鼠个体的脾脏细胞。在CO<sub>2</sub>  
孵化器(CO<sub>2</sub>浓度：5体积%，温度：37 $^{\circ}$ C，湿度：95%) 内进行培养。  
在以下的培养中，只要不是另有表示，都是以与此相同的条件进行培养。

#### 25 (细胞选择和克隆)

10日后，在采集融合细胞的培养上清液100 $\mu$ l后，将剩余的含有融合  
细胞的培养液接种在4个24孔板中，在各孔中加入含有1ml的15重量%的  
FCS次黄嘌呤/胸腺嘧啶脱氧核苷(HT) 培养基。

将融合细胞接种在24孔板4日后，以150 $\mu$ l/孔分别采集上清液。用该  
30 培养上清液和培养开始后第1周采集的培养上清液通过以下所示的ELISA

法测定对ALB的结合能。

作为固相使用以100 $\mu$ l/孔通过PBS-Az调配至 $1 \times 10^{-7}$ M浓度的ALB。作为抗体液，使用细胞培养上清液。作为第2抗体使用过氧化物酶标记得抗小鼠IgG抗体。

- 5 结合第2次采集的培养上清液的ELISA法结果，确认了对于ALB具有高的结合能的增殖状态良好的30孔。作为第1阶段的选择，将这些孔内的细胞全部接种至5个6孔板中，并在各孔中添加含有4ml的15重量%的FCS的HT培养基。

- 10 在第1阶段的细胞选择的2周后，采集培养上清液，通过以下所示的ELISA法（抑制ELISA法）测定对于ALB的结合能。

作为固相使用以100 $\mu$ l/孔通过PBS-Az调配至 $1 \times 10^{-7}$ M浓度的ALB，作为抑制剂使用ALB。作为抗体液使用细胞培养上清液。作为标记抗体使用过氧化物酶标记抗小鼠IgG抗体。在细胞培养上清液中，一旦存在与ALB结合的抗体，由于与作为抑制剂添加的可溶性ALB结合并抑制（阻碍与固相ALB的结合），所以不能孔中的显色。

15 其结果，作为第2阶段的选择，选择5个对于ALB具有高的结合能并在抑制ELISA法中显示抑制的孔。将这些孔中的细胞分别接种在中等容量瓶（容量50ml）。培养基，分别加入含有15重量%的FCS的HT培养基45ml。

- 20 在接收第2阶段选择的细胞接种培养3日后，采集培养上清液，通过以下所示的ELISA法测定对ALB的结合能。

作为固相使用以100 $\mu$ l/孔通过PBS-Az调配至 $1 \times 10^{-7}$ M浓度的ALB，作为抑制剂使用ALB，作为抑制剂使用ALB。作为抗体使用细胞培养上清液。作为第2抗体，使用过氧化物酶标记的小鼠IgG抗体。在细胞培养上清液中，一旦存在与抑制剂结合的抗体，由于受到抑制，所以不能确认孔中的显色。选择仅以ALB抑制的13孔。

25 对于上述13孔的细胞，分4次进行克隆。用含有15重量%的FCS的HT培养基，稀释至每孔含有1个细胞浓度（有限稀释），分别注入13个96孔的微量反应板中。作为饲养细胞，用生后四周龄的雌性小鼠（A/J）的胸腺细胞促进初期增殖。在边增大板的大小边进行培养，对于细胞培养上

30

清液，适时地反复进行所述ELISA法的筛选。最终选择对于ALB显示高的效价并且显示良好增殖的细胞株，并在200ml的培养基中培养至 $5 \times 10^5$ 细胞/ml的浓度。

5 最终选定对于ALB显示高的结合能的1株细胞。将该细胞株命名为13-3B，于平成14年3月7日寄存在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心（寄存编号FERM BP-7938号）。在本说明书中，将13-3B株（7938株）产生的抗体称为7938抗体。

10 另外，最终选择对于ALB在 $1 \times 10^{-7}M \sim 1 \times 10^{-5}M$ 之间的ALB浓度内，具有使与固相白蛋白的结合度发生变化的结合能细胞1株。将该细胞株命名为11-4B，于平成14年3月7日寄存在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心（寄存编号FERM BP-7937号）。在本说明书中，将11-4B株（7937株）产生的抗体称为7937抗体。

15 另外，进而最终选择对于ALB在 $1 \times 10^{-10}M \sim 1 \times 10^{-7}M$ 之间的ALB浓度内，具有使与固相白蛋白的结合度发生变化的结合能(即半数抑制值在 $1 \times 10^{-10}M \sim 1 \times 10^{-7}M$ 的范围内)细胞3株。分别将细胞株命名为42DB1、56E'61和56FT4。

42DB1株于平成15年2月27日寄存在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心（寄存编号FERM BP-8307号）。在本说明书中，将42DB1株（8307株）产生的抗体称为8307抗体。

20 56E'61株于平成15年2月27日寄存在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心（寄存编号FERM BP-8308号）。在本说明书中，将56E'61株（8308株）产生的抗体称为8308抗体。

25 56FT4株于平成15年2月27日寄存在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心（寄存编号FERM BP-8309号）。在本说明书中，将56FT4株（8309株）产生的抗体称为8309抗体。

（细胞的保存）

最终选择的细胞株，离心分离去除上清液，以 $1 \times 10^7$ 细胞/ml浓度悬浮在FCS：二甲基亚砷=9：1(体积比)的溶液1ml中，在 $-80^\circ C$ 下预冷冻后，移至液氮中作为长期保存的状态。

30 （抗体的精制）

用含有15重量%FCS的ISHIKOFU培养基大量培养选择的各株，离心分离并得到培养上清液。将该培养上清液通过使用蛋白质A结合凝胶（蛋白质A琼脂糖4FF，FARUMASHIA制）的亲合色谱层析法，已以下的条件精制各单克隆抗体（7938抗体和7937抗体）。

- 5       以结合缓冲液（1.5M甘氨酸3M NaCl, pH8.9）平衡填充蛋白质A结合凝胶的柱子。将培养上清液或腹水用结合缓冲液稀释约3倍后上平衡后的柱子。在280nm边检测流出柱子的洗脱液，边用结合缓冲液清洗柱子，直到杂质的洗脱结束。清洗后用洗脱缓冲液（100mM柠檬酸，pH4）洗脱柱子(线流速：约20cm/小时)，回收含有IgG的洗脱液。对回收的含有IgG
- 10       的洗脱液，通过吸光光度计测定280nm的吸光度，通过将测定的吸光度用吸光系数换算，决定抗体的浓度。

（抗体的评价）

- 对于通过上述的亲合色谱层析法精制的单克隆抗体中的7938抗体，利用各种浓度的ALB溶液，除上述第2阶段的选择中的抑制ELISA法的固相抗原浓度（ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ）和抗体浓度（ $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ）以外，其余的在同一
- 15       条件下进行抗体评价。

- 图6是表示对于7938抗体测定对ALB结合能的结果曲线图。在图6中，纵轴表示吸光度的相对值（%），横轴表示ALB抗原浓度[mole/L（以下用M表示）]的对数值。抗原的浓度和吸光度的相对值（%）之间的关连
- 20       表示在实线上。

如图6所示，在7938抗体中，半数抑制值约为 $1 \times 10^{-9.8} \text{M}$ ，提示了有可能检测出约 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-11} \text{M}$ 的ALB。

- 对于通过上述的亲合色谱层析法精制的单克隆抗体中的7937抗体，利用ALB的稀释系列，除上述第2阶段的选择中的抑制ELISA法的固相抗原浓度（ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ）和抗体浓度（ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ）以外，其余的在同一条件下
- 25       进行抗体评价。

图7是表示对于7937抗体测定对ALB结合能的结果曲线图。在图7中，纵轴表示吸光度的相对值（%），横轴表示ALB抗原浓度（M）的对数值。抗原的浓度和吸光度的相对值（%）之间的关连表示在实线上。

- 30       如图7所示，在7937抗体中，半数抑制值约为 $1 \times 10^{-6.3} \text{M}$ ，提示了有

可能检测出约 $1 \times 10^{-7}$  M (6.6mg/ml)  $\sim$   $1 \times 10^{-5}$  M (660mg/ml) 范围的ALB。

对于通过上述的亲合色谱层析法精制的单克隆抗体中的8307抗体，利用ALB的稀释系列，除上述第2阶段的选择中的抑制ELISA法的固相抗原浓度 ( $1 \times 10^{-7}$  M) 和抗体浓度 ( $1 \times 10^{-7}$  M) 以外，其余的在同一条件下  
5 进行抗体评价。

图8是表示对于8307抗体测定对ALB结合能的结果曲线图。在图8中，纵轴表示吸光度的相对值 (%)，横轴表示ALB抗原浓度 (M) 的对数值。抗原的浓度和吸光度的相对值 (%) 之间的关连表示在实线上。

对于通过上述的亲合色谱层析法精制的单克隆抗体中的8308抗体，  
10 利用ALB的稀释系列，除上述第2阶段的选择中的抑制ELISA法的固相抗原浓度 ( $1 \times 10^{-7}$  M) 和抗体浓度 ( $1 \times 10^{-7}$  M) 以外，其余的在同一条件下进行抗体评价。

图9是表示对于8308抗体测定对ALB结合能的结果曲线图。在图9中，纵轴表示吸光度的相对值 (%)，横轴表示ALB抗原浓度 (M) 的对数值。抗原的浓度和吸光度的相对值 (%) 之间的关连表示在实线上。  
15

对于通过上述的亲合色谱层析法精制的单克隆抗体中的8309抗体，利用ALB的稀释系列，除上述第2阶段的选择中的抑制ELISA法的固相抗原浓度 ( $1 \times 10^{-7}$  M) 和抗体浓度 ( $1 \times 10^{-7}$  M) 以外，其余的在同一条件下进行抗体评价。

20 图10是表示对于8309抗体测定对ALB结合能的结果曲线图。在图10中，纵轴表示吸光度的相对值 (%)，横轴表示ALB抗原浓度 (M) 的对数值。抗原的浓度和吸光度的相对值 (%) 之间的关连表示在实线上。

在以上所述的实施例中，将人白蛋白作为被测物质，但是不限于这些。例如，也可以将人以外的哺乳类白蛋白、以尿中激素作为女性的健康管理指标的hLH (人黄体形成激素) 和hCG (人绒毛膜促性腺激素) 等  
25 作为被测物质而进行测定。在测定hLH或hCG时，优选在试样中添加琥珀酸缓冲液，以便能够得到高的浊度。由此，测定定hLH或hCG时，可以抑制前带现象。尤其是通过在试样中添加琥珀酸缓冲液，一旦将试样调至pH5.0，浊度可以变得最高。另外，也可以根据所用的单克隆抗体使用MOPS  
30 缓冲液。在使用MOPS缓冲液时，特别优选将试样调配为pH7.4。

---

根据本发明，可以提供一种试样中的特定成分的测定结果可靠性高的免疫学测定方法。

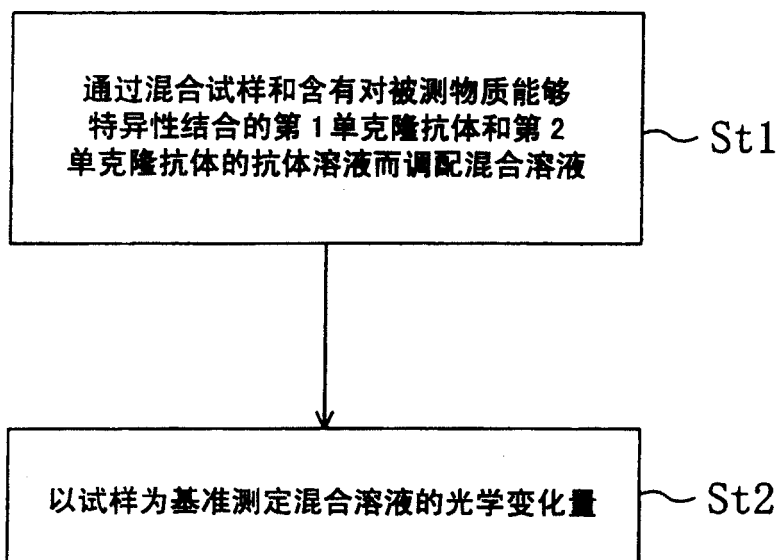


图 1

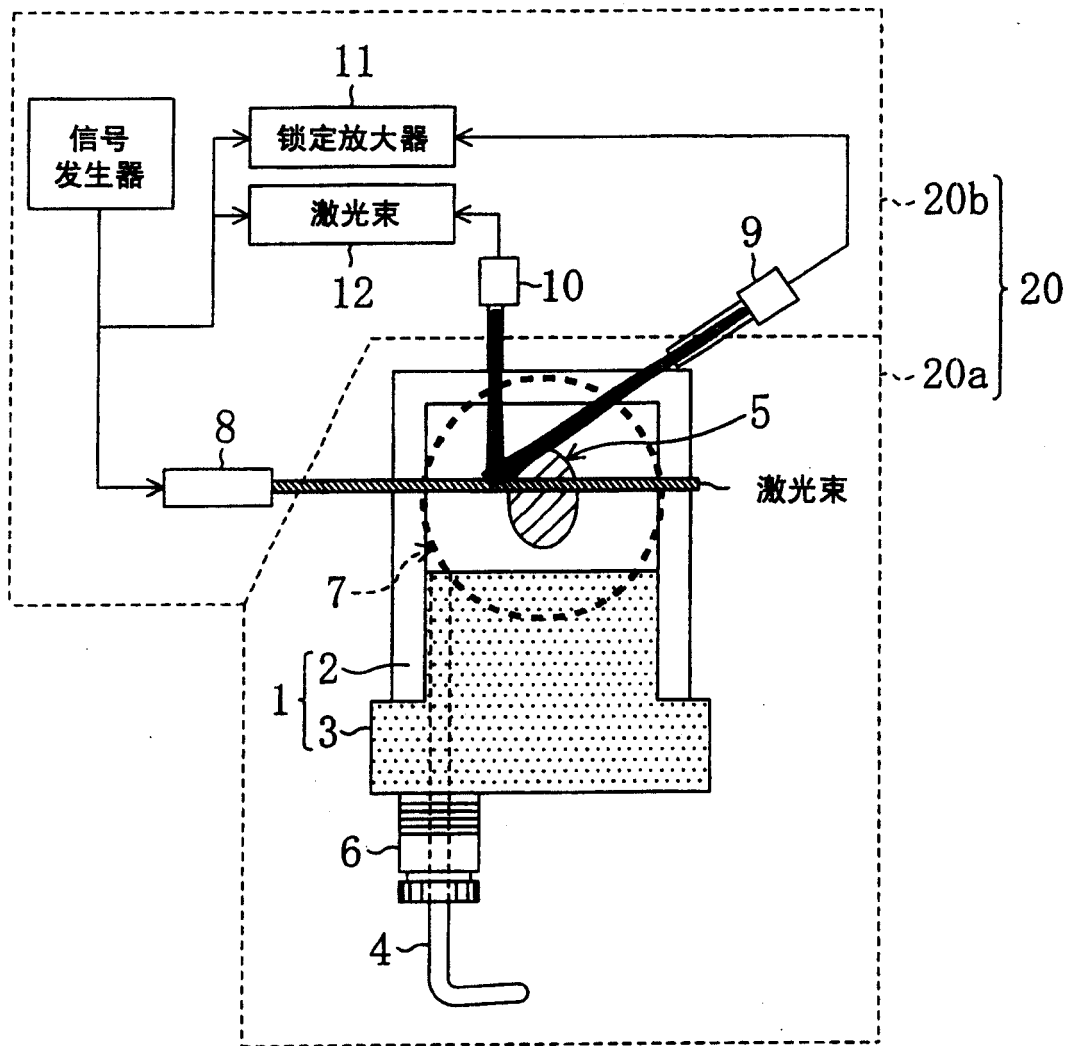


图 2

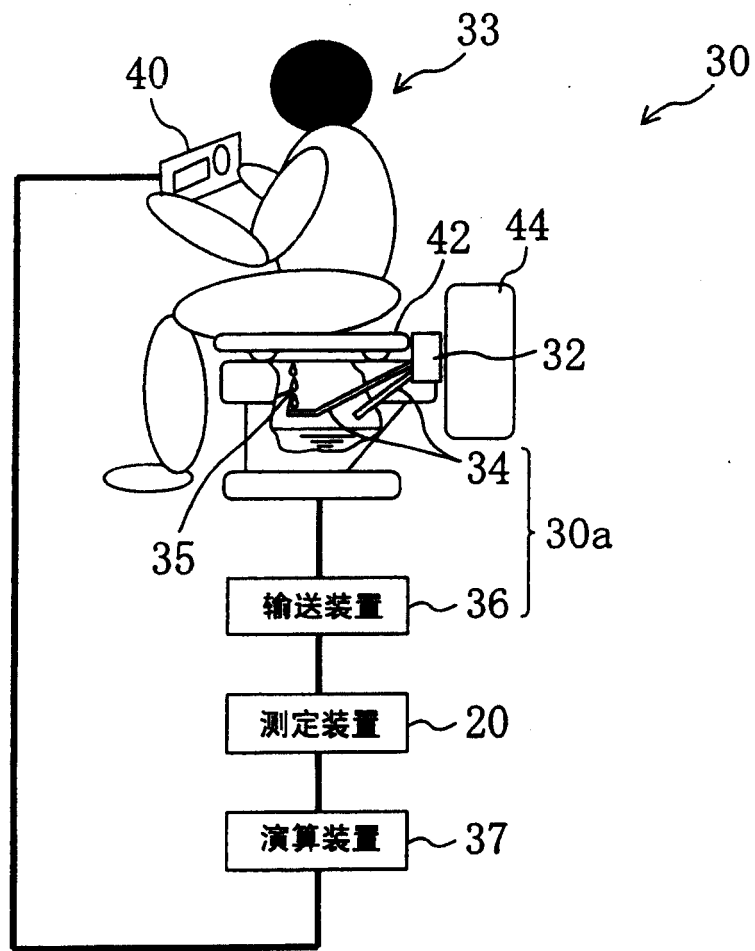


图 3

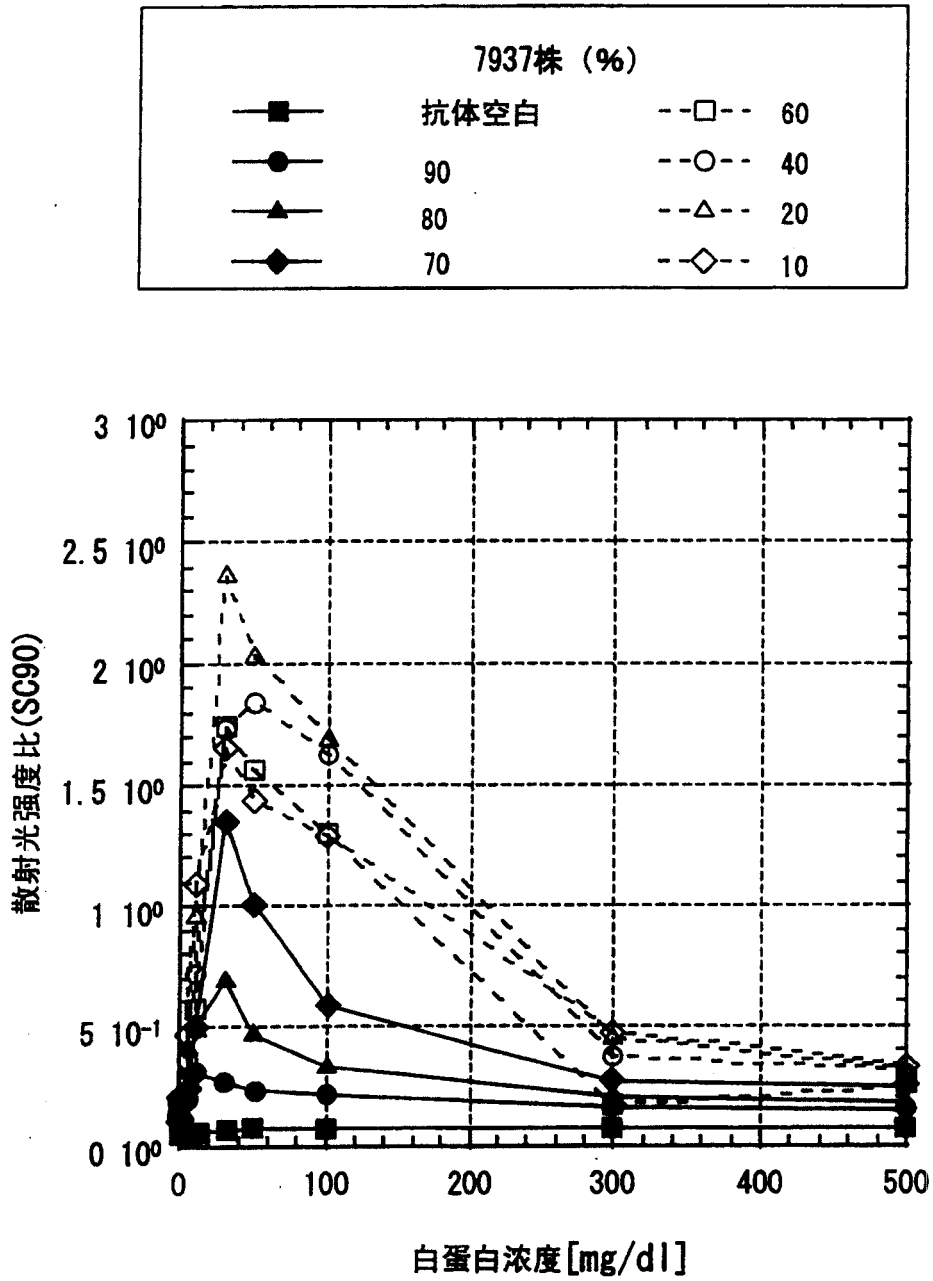


图 4

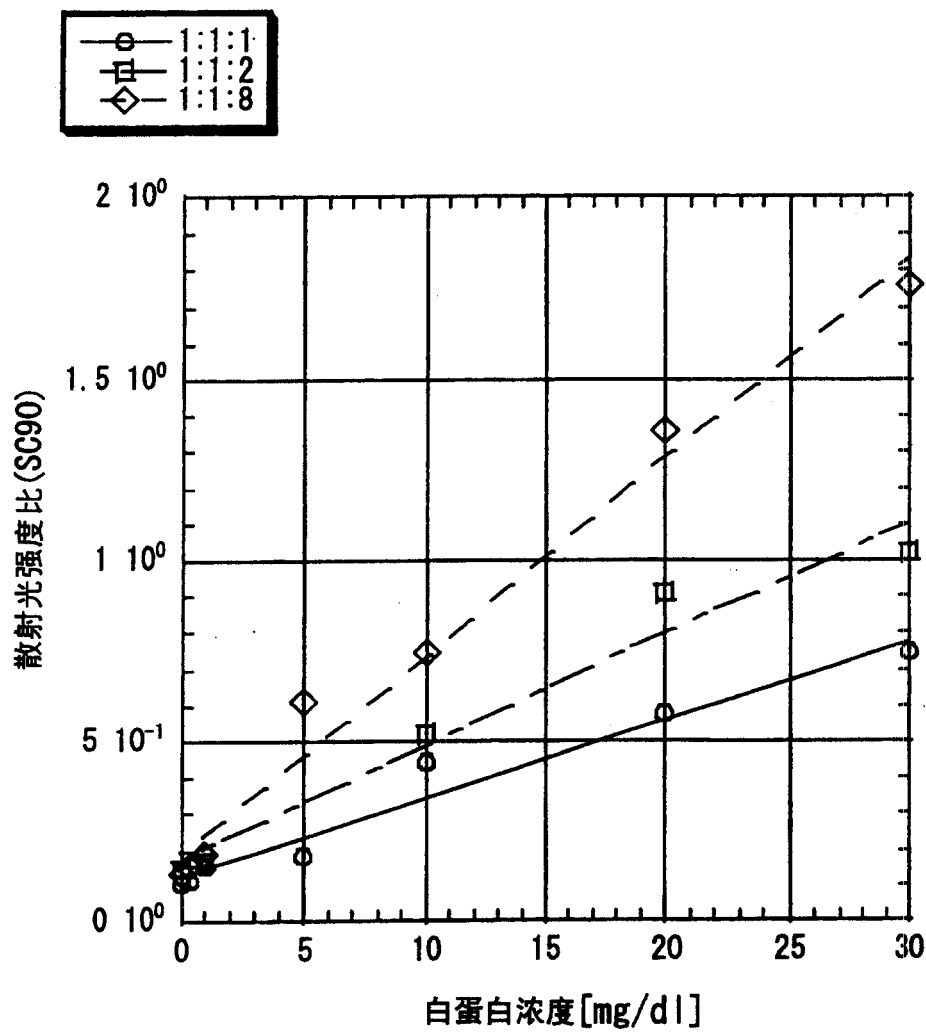


图 5

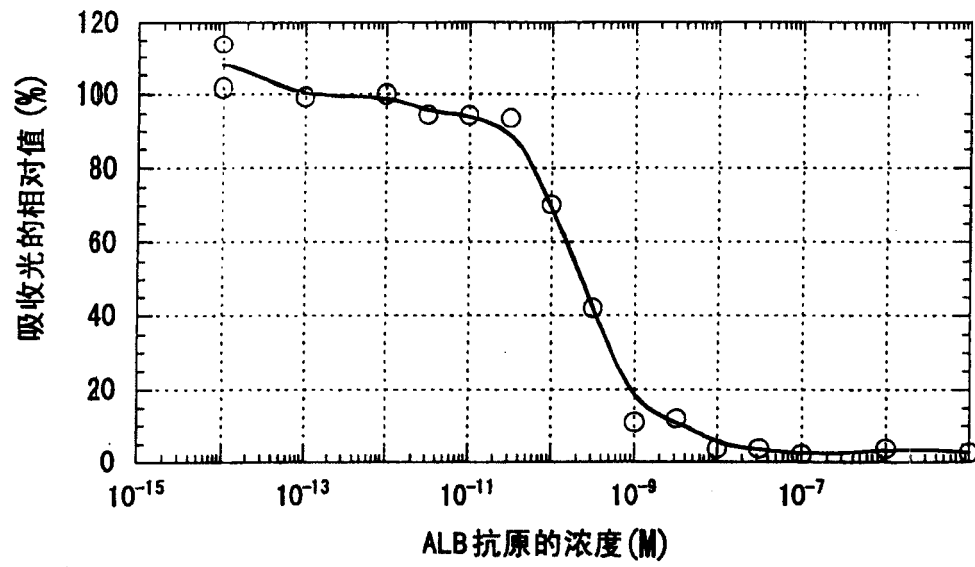
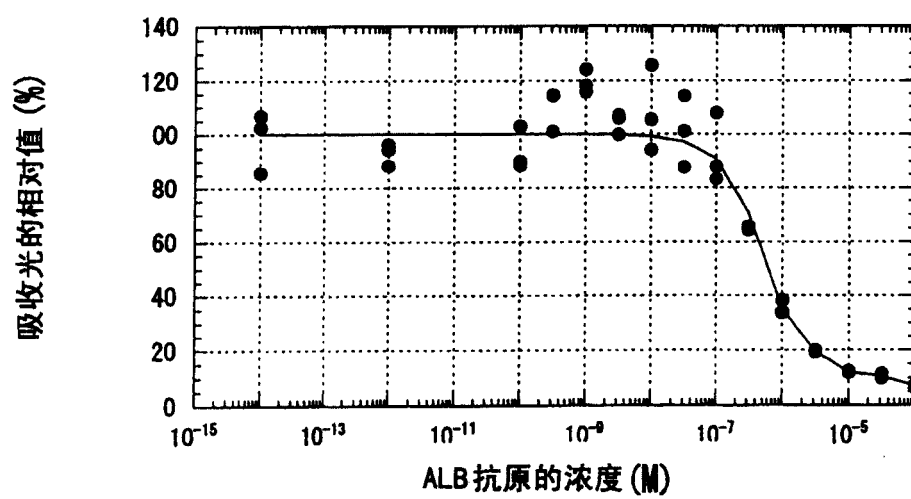


图 6



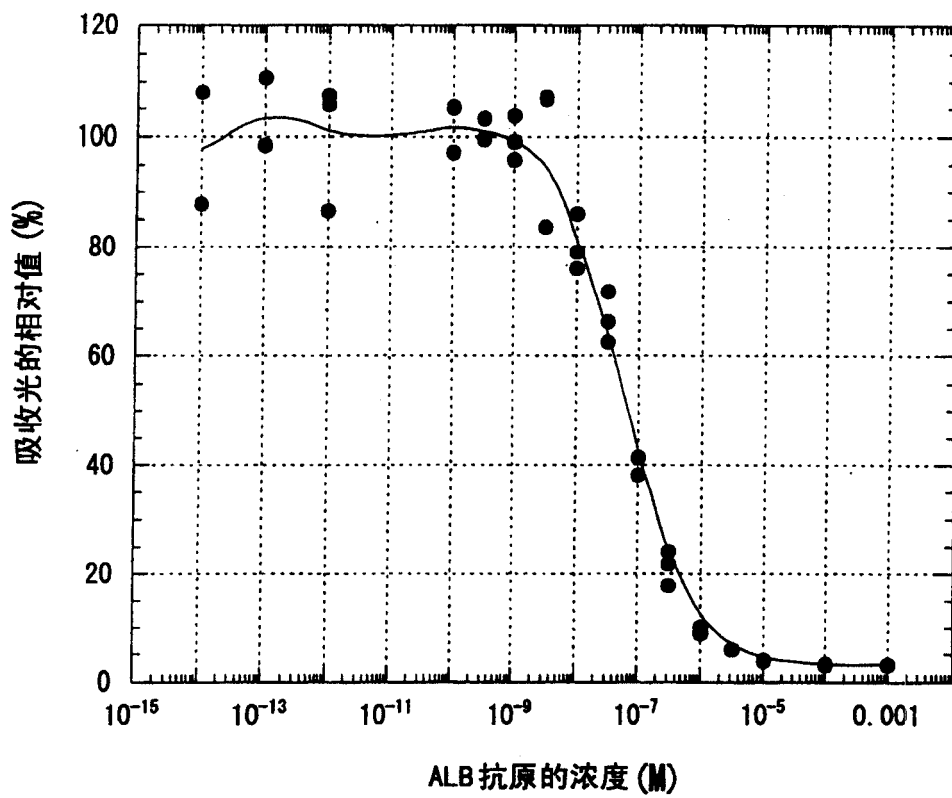


图 8

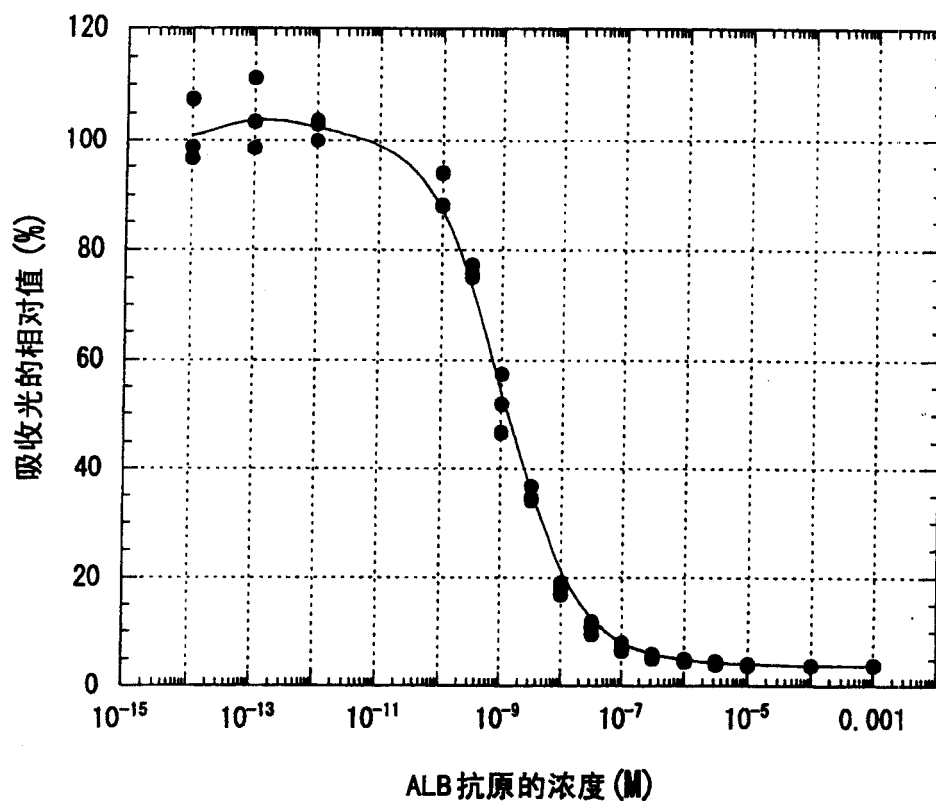


图 9

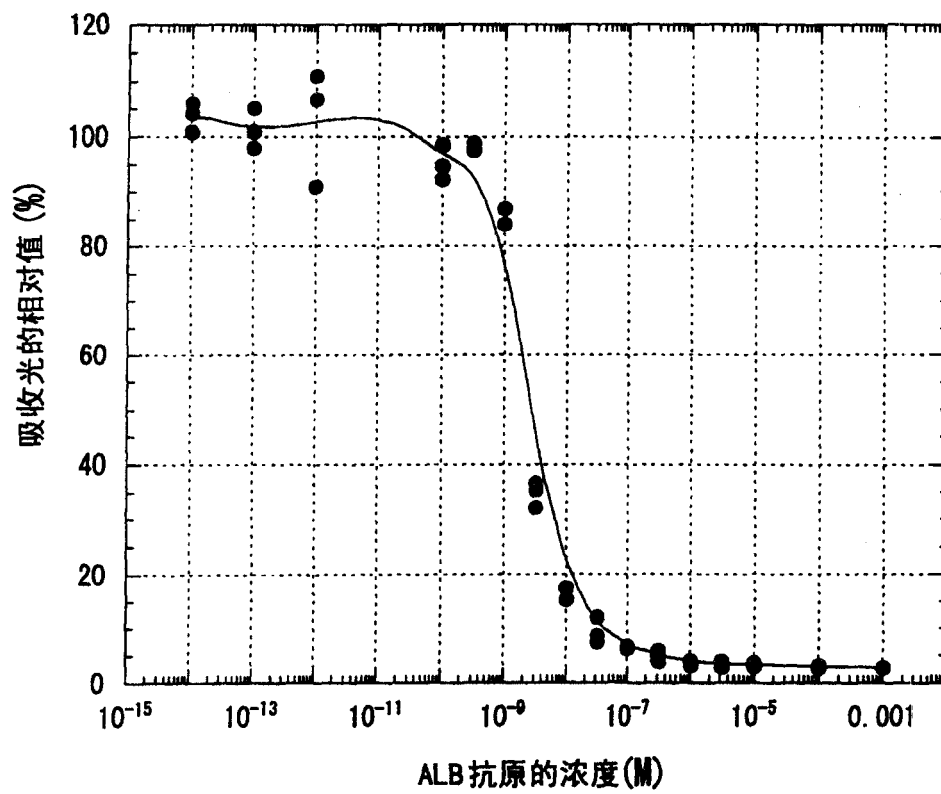


图 10

专利名称(译)	免疫学的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1314965C</a>	公开(公告)日	2007-05-09
申请号	CN03136494.2	申请日	2003-05-22
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	汤川系子 重藤修行 龟井明仁 河村达朗		
发明人	汤川系子 重藤修行 龟井明仁 河村达朗		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N21/17 G01N33/536 A61B5/20 A61B10/00 C07K16/06 C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/68 A61B10/0038 A61B5/415 A61B10/007 C07K16/18 A61B5/20		
优先权	2002148297 2002-05-22 JP 2003131790 2003-05-09 JP		
其他公开文献	CN1459634A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种免疫学测定方法，是测定试样中被测物质含量的免疫反应测定方法，包括：通过混合上述试样和含有对上述被测物质能够特异性结合的第1单克隆抗体和第2单克隆抗体的抗体溶液而调配混合溶液的工序(a)；测定所述混合溶液的光学特性的工序(b)，所述第1单克隆抗体，能够与所述被测物质的所述第1抗原决定簇结合，所述第2单克隆抗体能够与所述测物质的所述第1抗原决定簇不同的第2抗原决定簇结合，所述第1抗原决定簇和所述第2抗原决定簇在所述被测物质中各存在一个。

