

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512091

(P2005-512091A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53
GO 1 N 33/542
GO 1 N 33/543
GO 1 N 33/577

F I

GO 1 N 33/53 Q
GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/53 U
GO 1 N 33/542 A
GO 1 N 33/543 5 7 5

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-551541 (P2003-551541)
(86) (22) 出願日 平成14年12月6日 (2002.12.6)
(85) 翻訳文提出日 平成16年6月7日 (2004.6.7)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/039111
(87) 国際公開番号 W02003/050539
(87) 国際公開日 平成15年6月19日 (2003.6.19)
(31) 優先権主張番号 10/006,483
(32) 優先日 平成13年12月6日 (2001.12.6)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

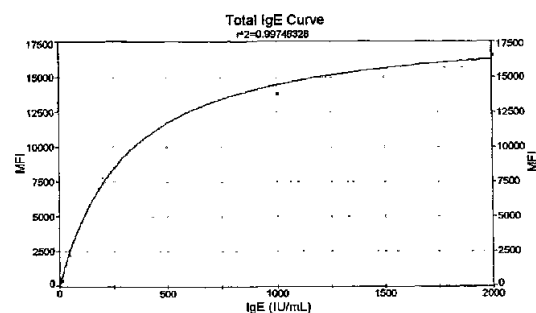
(71) 出願人 504218565
イミューンテック, インコーポレイティド
アメリカ合衆国, カリフォルニア 940
25, メンロ パーク, オークグローブ
アベニュー 888, スイート 4
(74) 代理人 100099759
弁理士 青木 篤
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敬
(74) 代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
(74) 代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74) 代理人 100082898
弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重アレルゲンに対する均質免疫分析

(57) 【要約】

複数のアレルゲンに対する全免疫グロブリンEと特異的抗体レベルを定量的に決定する均質免疫分析方法及びシステムであって、比較的少量の血液のサンプリングが必要とされない(図2)。本方法は、免疫計測サンドイッチ手順を用い、好ましくはビオチン-ストレプトアビジン信号増幅方法とR-フィコエリスリン蛍光ラベルを用いる。



Total IgE Assay Results

Sample	Measured IgE Level	Expected IgE Level
1	22	28
2	> 2000	>2000
3	76.3	79
4	<2	<2
5	64	100
6	35	50
7	5	4
8	652	880
9	431	756
10	>2000	1250

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液サンプル中の 2 ～ 約 100 のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを同時に測定する方法であって：

(a) 個体から約 10 ～ 約 100 μ L の血液サンプルを採取するステップ；

(b) 該血液サンプル又はその一部について均質免疫分析を行うステップ、ここで該免疫分析は 2 ～ 約 100 のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを決定することができる；及び

(c) 前記特異的免疫グロビン抗体レベルを決定するステップ；

を含む方法。

10

【請求項 2】

血液サンプル中の 2 ～ 約 100 のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを同時に測定する方法であって：

(a) 個体から約 10 ～ 約 100 μ L の血液サンプルを採取するステップ；

(b) 該血液サンプル又はその一部について均質免疫分析を行うステップ、ここで該免疫分析は 2 ～ 約 100 のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを決定することができる；及び

(c) 前記特異的免疫グロビン抗体レベルを決定するステップ；

を含む方法。

20

【請求項 3】

血液サンプル中のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体レベルの定量的な測定装置であって：

(a) 複数のアレルゲンに結合した複数の粒子、該粒子は約 1 ～ 約 50 μ L の水性媒質に懸濁し、粒子と特異的アレルゲンとの各組み合わせは粒子と他のアレルゲンとの組み合わせから区別可能である；

(b) 特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒト IgE 又は IgG 抗体を含む第一の接合体、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有し、該第一の接合体は 1 分子の抗ヒト抗体に 10 ～ 30 分子の第一の結合ペア・メンバーが接合している；

(c) 第一の特異的結合ペア・メンバーに結合する第二の特異的結合ペア・メンバーを含む第二の接合体、該第二のメンバーは蛍光体部分と結合している；を含み、

30

(d) 第一の接合体の第二の接合体に対するモル比は約 1 : 1 ～ 約 1 : 5 である；
ことを特徴とする前記装置。

【請求項 4】

該複数の粒子が約 5 ～ 約 100 のアレルゲンを含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 5】

該複数の粒子が約 10 ～ 約 40 のアレルゲンを含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 6】

該特異的抗体が免疫グロブリン E であることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

40

【請求項 7】

該特異的抗体が免疫グロブリン G 及びそのサブクラスを含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 8】

該抗ヒト抗体が抗ヒト IgE であることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 9】

該抗ヒト抗体が免疫グロブリン E と特異的に結合する抗ヒト IgE 断片であることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 10】

該抗ヒト抗体が免疫グロブリン E と特異的に結合するモノクローナル抗体であることを

50

特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 1 1】

該抗ヒト抗体が抗ヒト I g Gであることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 1 2】

該抗ヒト抗体が免疫グロブリン G と特異的に結合する抗ヒト I g G 断片であることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 1 3】

該抗ヒト抗体が免疫グロブリン G と特異的に結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 1 4】

該蛍光体がフィコビルリン・タンパク質であることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 1 5】

該フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリン、フィコシアニン、及びアロフィコシアニンから選択されることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の装置。

【請求項 1 6】

該フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の装置。

【請求項 1 7】

該フィコエリスリンが R-フィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の装置。

【請求項 1 8】

該第二の接合体が 400,000 から約 1,000,000 ダルトンまでの間の分子量を有することを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 1 9】

該第一の特異的結合ペア・メンバーがビオチン及びジゴキシンから選択されることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 2 0】

該第一の特異的結合ペア・メンバーがビオチンであることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 2 1】

該ビオチンが抗ヒト抗体に約 10 : 1 ~ 約 30 : 1 のモル比で接合していることを特徴とする、請求項 2 0 に記載の装置。

【請求項 2 2】

該ビオチンが抗ヒト抗体に約 15 : 1 ~ 25 : 1 のモル比で接合していることを特徴とする、請求項 2 0 に記載の装置。

【請求項 2 3】

該ビオチンが抗ヒト抗体に 20 : 1 のモル比で接合していることを特徴とする、請求項 2 0 に記載の装置。

【請求項 2 4】

該第二の特異的結合ペア・メンバーがアビジン、ストレプトアビジン、及び抗ジゴキシンから選択されることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 2 5】

該第二の特異的結合ペア・メンバーがストレプトアビジンであることを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 2 6】

該粒子の懸濁液が約 1 ~ 10 μ L の体積を有することを特徴とする、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 2 7】

さらに、約 1 ~ 約 5 μ L の体積を有するテストされる血液サンプルを含む、請求項 3 に

10

20

30

40

50

記載の装置。

【請求項 28】

血液サンプル中の複数のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体レベルを同時に検出し、定量化する均質免疫分析方法であって：

(a) 約 1 ～ 約 25 μ L の体積の血液サンプルを複数のアレルゲンと結合した複数の粒子に接触させるステップ、該粒子は約 1 ～ 約 50 μ L の水性媒質に懸濁されており、粒子と特異的アレルゲンとの各組み合わせは、1 つ以上のアレルゲンに特異的に結合する血液サンプル中に存在する免疫グロブリン抗体が該粒子に結合している状態で、粒子と他のアレルゲンとの組み合わせから区別可能である；

(b) その後、ステップ (a) からの物質を、特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒト IgE 又は IgG 抗体を含む第一の接合体と接触させるステップ、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅させる能力を有する； 10

(c) その後、ステップ (b) からの物質を、該第一の特異的結合ペア・メンバーと結合する第二の特異的結合ペア・メンバーに結合した蛍光体部分を含む第二の接合体と接触させるステップ；及び

(d) その後、ステップ (c) からの物質における特異的免疫グロブリン抗体のレベルを、粒子サブセットの蛍光放出信号を決定し、同時に蛍光体部分の蛍光放出信号を測定することによって決定するステップ；

を含む前記方法。

【請求項 29】

ステップ (a) が該サンプルを約 5 ～ 約 100 の特異的アレルゲンと結合した複数の粒子と接触させることによって行われることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。 20

【請求項 30】

ステップ (a) がサンプルを約 10 ～ 約 40 の特異的アレルゲンと結合した複数の粒子と接触させることによって行われることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

該抗体が特異的免疫グロブリン E を含むことを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

該抗体が特異的免疫グロブリン G とそのサブクラスを含むことを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。 30

【請求項 33】

該第一の接合体がビオチン又はジゴキシンと結合した抗ヒト抗体を含むことを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

該第一の接合体における抗ヒト抗体のビオチン又はジゴキシンに対するモル比が約 1 : 10 ～ 約 1 : 30 であることを特徴とする、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

該第一の接合体における抗ヒト抗体のビオチン又はジゴキシンに対するモル比が約 1 : 15 ～ 約 1 : 25 であることを特徴とする、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

該第一の接合体における抗ヒト抗体のビオチン又はジゴキシンに対するモル比が 1 : 20 であることを特徴とする、請求項 33 に記載の方法。 40

【請求項 37】

該第二の接合体の蛍光体部分がフィコビリリン・タンパク質であることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 38】

該フィコビリリン・タンパク質がフィコエリスリン、フィコシアニン、及びアロフィコシアニンから選択されることを特徴とする、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

該フィコビリリン・タンパク質がフィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 37 50

に記載の方法。

【請求項 40】

該フィコビルン・タンパク質が R-フィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

該第二の接合体の該第二の特異的結合ペア・メンバーがアビジン、ストレプトアビジン、及び抗ジゴキシンから選択されることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 42】

該第二の接合体の該第二の特異的結合ペア・メンバーがストレプトアビジンであることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 43】

該第二の接合体が 400,000 と約 1,000,000 ダルトンの間の分子量を有することを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 44】

該第一の接合体の該第二の接合体に対するモル比が 1:1 ~ 約 1:5 であることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 45】

該複数の粒子が約 1 ~ 約 10 μ L の体積を有することを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 46】

該血液サンプルが約 1 ~ 約 5 μ L の体積を有することを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 47】

該アレルゲン特異的抗体が該血液サンプルを希釈することなしに決定されることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 48】

該血液サンプルが、この方法で使用するための血液サンプルを得ることを可能にするように血液採取キットを用意し、皮膚を刺して血液を取り、前記血液のサンプルを採取し、この方法で使用するためにサンプルを提出することによって得られることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 49】

血液サンプルにおける全免疫グロブリン E レベルを定量的に決定するための装置であって：

(a) 抗ヒト IgE 抗体に結合した複数の粒子、該粒子は約 1 ~ 約 50 μ L の水性媒質に懸濁している；

(b) 抗ヒト抗体と特異的結合ペアの第一のメンバーを含む第一の接合体、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有する；

(c) フィコビルン・タンパク質と、該第一の特異的結合ペア・メンバーに特異的に結合し蛍光信号出力を増幅する第二の特異的結合ペア・メンバーとを含む第二の接合体；を含み

(d) 該第一の接合体の該第二の接合体に対するモル比が約 1:1 ~ 約 1:5 であることを特徴とする装置。

【請求項 50】

粒子と結合した抗体がポリクローナル抗ヒト IgE から選択されることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 51】

粒子と結合した抗体が免疫グロブリン E と特異的に結合する抗ヒト IgE 断片であることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 52】

粒子と結合した抗体が免疫グロブリン E と特異的に結合するモノクローナル抗体である

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 53】

該抗ヒト抗体が抗ヒト IgE であることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 54】

該抗ヒト抗体が免疫グロブリン E と特異的に結合する抗ヒト IgE 断片であることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 55】

該抗ヒト抗体が免疫グロブリン E と特異的に結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 56】

該フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリン、フィコシアニン、及びアロフィコシアニンから選択されることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 57】

該フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 56 に記載の装置。

【請求項 58】

該フィコエリスリンが R-フィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 57 に記載の装置。

【請求項 59】

該第二の接合体が 400,000 ～ 約 1,000,000 ダルトンの分子量を有することを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 60】

該第一の特異的結合ペア・メンバーがビオチン及びジゴキシンから選択されることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 61】

該第一の特異的結合ペア・メンバーがビオチンであることを特徴とする、請求項 60 に記載の装置。

【請求項 62】

該ビオチンは抗ヒト抗体に約 10 : 1 ～ 約 30 : 1 のモル比で接合していることを特徴とする、請求項 61 に記載の装置。

【請求項 63】

該ビオチンは抗ヒト抗体に約 15 : 1 ～ 25 : 1 のモル比で接合していることを特徴とする、請求項 61 に記載の装置。

【請求項 64】

該ビオチンは抗ヒト抗体に 20 : 1 のモル比で接合していることを特徴とする、請求項 61 に記載の装置。

【請求項 65】

該第二の特異的結合ペア・メンバーがアビジン、ストレプトアビジン、及び抗ジゴキシンから選択されることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 66】

該第二の特異的結合ペア・メンバーがストレプトアビジンであることを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 67】

該粒子の懸濁液が約 1 ～ 25 μ L の体積を有することを特徴とする、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 68】

さらに、約 1 ～ 約 2 μ L の体積を有するテストされる血液サンプルを含む、請求項 49 に記載の装置。

【請求項 69】

血液サンプル中の全免疫グロブリン E 抗体を検出し定量化するための均質免疫分析方法

10

20

30

40

50

であって：

(a) 約 0.5 ～ 約 10 μ L の体積を有する血液サンプルを抗ヒト免疫グロブリン E と結合した複数の粒子と接触させるステップ、該粒子は約 1 ～ 約 50 μ L の水性媒質に懸濁されている；

(b) その後、ステップ (a) からの物質を、特異的結合ペアの第一のメンバーに接合された抗ヒト IgE 抗体を含む第一の接合体と接触させるステップ、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有する；

(c) その後、ステップ (b) からの物質を、該第一の特異的結合ペア・メンバーと結合する第二の特異的結合ペア・メンバーに結合した蛍光体部分を含む第二の接合体と接触させるステップ；及び

(d) その後、ステップ (c) からの物質中の特異的免疫グロブリン抗体のレベルを、該粒子の蛍光放出信号を決定し、同時に該粒子に結合した蛍光体部分の蛍光放出信号を測定することによって決定するステップ；

を含む前記方法。

【請求項 70】

該第一の接合体がビオチン又はジゴキシンと結合した抗ヒト IgE 抗体を含むことを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

該第一の接合体における抗ヒト IgE 抗体の第一の結合ペア・メンバーに対するモル比が約 1 : 10 ～ 約 1 : 30 であることを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 72】

該第一の接合体における抗ヒト IgE 抗体の第一の結合ペア・メンバーに対するモル比が約 1 : 15 ～ 約 1 : 25 であることを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 73】

該第一の接合体における抗ヒト IgE 抗体の第一の結合ペア・メンバーに対するモル比が 1 : 20 であることを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 74】

該第二の接合体の蛍光体がフィコビルリン・タンパク質であることを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 75】

該フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリン、フィコシアニン、及びアロフィコシアニンから選択されることを特徴とする、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

該フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

該フィコビルリン・タンパク質が R-フィコエリスリンであることを特徴とする、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 78】

該第二の接合体の第二の特異的結合ペア・メンバーがアビジン、ストレプトアビジン、又は抗ジゴキシンを含むことを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 79】

該第二の接合体の第二の特異的結合ペア・メンバーがストレプトアビジンであることを特徴とする、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

該第二の接合体が 400,000 ～ 約 1,000,000 ダルトンまでの間の分子量を有することを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 81】

該第一の接合体の該第二の接合体に対するモル比が 1 : 1 ～ 約 1 : 5 であることを特徴とする、請求項 69 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 2】

該粒子が約 1 ～ 約 2 5 の体積を有することを特徴とする、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 8 3】

該血液サンプルが 1 ～ 約 5 μ L の体積を有することを特徴とする、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 8 4】

全 I g E 濃度がサンプルを希釈することなく決定されることを特徴とする、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記方法で使用する血液サンプルを得ることを可能にするように血液採取キットを用意し、皮膚を刺して血液を取り、前記血液のサンプルを採取し、前記方法で使用するためにサンプルを提出することによって該血液サンプルが得られることを特徴とする、請求項 6 9 に記載の方法。 10

【請求項 8 6】

サンプル中のアレルゲンに対する特異的抗体の存在又は全 I g E に関するテストの実施及び提供方法であって：

(a) 皮膚を刺して血液を吸引し、前記血液のサンプルを採取し、該方法で使用するために前記サンプルを提出することにより、該方法で使用する血液サンプルを個体が提供できるようにする血液採取キットを用意するステップ；

(b) ステップ (a) からのサンプルにおける特異的アレルゲンに対する抗体の存在又は全 I g E を検出する均質免疫分析を行うステップ； 20

(c) ステップ (b) からの免疫分析の結果をデータベースに入力するステップ；及び

(d) ステップ (c) のデータベース内の免疫分析の結果へのアクセスをグローバル・コンピュータ・システムのウェブサイト又はウェブページによって該個体に提供するステップ；

を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願へのクロス・レファレンス 30

本出願は、2001年12月6日に出願した米国出願第10／006,483号の一部継続出願である。

発明の背景

1. 発明の属する技術分野

[01] 本発明は、アレルギー診断のために血液サンプルからの多数のアレルゲンに対する特異抗体レベルを決定するための、又は血液サンプルにおける全免疫グロブリン E のレベルを決定するための均質免疫分析方法及びシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

2. 背景及び従来技術 40

[02] 「アレルギー」とは、アトピー又は過敏症と同義語であって、アレルゲンと呼ばれるいろいろな抗原物質に対して免疫的に誘発される個体の反応を指す。アレルギーがある人は、吸入又は嚥下される花粉、かび、ふけ、又は食品からの通常は無害な物質、への曝露に応答してアレルゲン特異的な免疫グロブリン、I g E と I g G、を生成する。生成された抗体は放出されて血液中で循環し、ときには組織の特定細胞に固着する。アレルゲンへの曝露は、一般に即時的な反応又は遅延した反応を生じ、それはいくつかのよく見られる症状、例えば、くしゃみ、目の刺激、鼻水、及び肺や鼻の気道の炎症として発現する。「アレルギー」という用語はまた、一般に、枯草熱、鼻炎、湿疹、じんま疹、と同義であり、喘息の発現と結びつけられる。アレルギーの診断には、患者の病歴の検討、理学的検査、そして患者の症状がアレルギーに起因するかどうかを決定する確認的な診断テスト 50

を行うことが必要になる。症状の原因がアレルギーである場合、原因になっているアレルゲンを同定しなければならない。アトピー又はアレルギー疾患がある患者は1つのアレルゲンに対してだけ感受性がある場合もある；しかし、複数のアレルゲンに対して感作があるというのがもっと普通である。アレルゲンに対する人の反応は、不快 (annoying) 程度から、深刻、さらには致死的なものにまで及ぶ。したがって、ある人にアレルギーがあるかどうかということだけではなく、アレルギーがあるとしたら、どんなアレルゲンに対してどれほど深刻なアレルギーがあるかを決定し、薬物治療又は免疫治療の方法によって曝露を回避したり、最小にしたり、軽減したりできることが望ましい。

【0003】

[03] 確認診断テストは、in vivo皮膚テスト、in vivo誘発テスト、又は血液サンプルからの循環するアレルゲン特異的抗体の存在を調べるin vitroテストによって行うことができる。可能な攻撃的アレルゲンの直接吸入又は嚥下による直接誘発テストは不快であり、危険である可能性もあり、多数のアレルゲンについて同時に行うことはできない。

10

【0004】

[04] 皮膚テスト (皮膚乱刺 (prick) テスト又は引っかきテストともいう) は、アレルゲン・サンプルを、もっと一般的には多数のアレルゲンを、皮膚を小さな針で引っかくことによって患者の前腕部又は背中に塗布し、塗布された皮膚の場所における炎症反応のサイズを測定するというin vivoテスト方法である。皮膚乱刺 (prick) テストは、広く用いられ、最適な条件下では信頼性が高いが、苦痛を与えることがあり、技能や解釈によって大きな差異が生じ、ある種の薬を服用している患者や皮膚に問題がある患者には用いることができない。さらに、誘発テスト及び皮膚乱刺in vivo診断方法はどちらも、新しいアレルゲンに対して患者を敏感にし、極端な場合は攻撃的なアレルゲンへの直接曝露によって生命の危険があるアナフィラキシー反応を誘発する可能性がある。

20

【0005】

[05] in vitro診断テスト方法は、患者から得られる血液サンプルで、アレルゲン特異的抗体の血中レベルを直接測定する。この方法は一般に、再現性が高く、その感度と特異性に関しては良く行われた皮膚乱刺テストと同等であり、2つのin vivoテストのいずれかの使用を妨げる因子によっても影響されることがなく、アナフィラキシー反応を誘発しない免疫分析法である。単一のアレルゲンに対する特異抗体レベルを測定できる免疫分析法はずっと前から用いられている (Johansson, S.G.O, and Yman, L., In vitro assay for immunoglobulin E, Clin. Rev. Allergy 6, 93-109, 1988)。それと異なり、複数のアレルゲンに対するアレルゲン特異的なレベルを測定する方法は、例えば、米国特許第4,459,360号、同第5,082,768号に記載されているように、アレルギーをスクリーニングする有用な方法になっている。米国特許第6,087,188号は、サンプル中の抗体を常磁性粒子とアビジン又はストレプトアビジンに結合した化学発光アクリジニウム化合物を用いて検出する方法を記載している。この特許に記載されている方法はアレルゲンの検出に有用であると述べられている。しかし、この方法は、あるサンプルにおける単一アレルゲンの検出に限定される。

30

【0006】

[06] 臨床診断の分野では、拡大しつつあるリストに載っている臨床的に関連ある分析物について判定するためにいろいろなカテゴリーの方法が利用できる。そのようなカテゴリーの1つが免疫分析法であり、現在、生物サンプルにおけるいろいろな分析物の存在や濃度を好適にかつ高い信頼性で決定するために用いられている (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, M., Stockton Press, 1994)。免疫分析は、流体中の標的分析物に対する特異結合因子を利用するものであり、一般にそのような結合因子の少なくとも1つが、放射性同位元素、酵素、及び蛍光又は化学発光化合物、など、放射性崩壊、酵素で誘発される色を生ずる物質、蛍光の発生又は抑制、化学発光出力、によって測定できるいろいろな化合物で標識される。このような特異結合因子は、普通、分析物特異的な抗体 (免疫グロブリン) 及び抗体断片、レセプター、レクチン、及び遺伝子工学又は化学的に設計された人工的抗体を含む。注目すべき免疫分析法としては、例えば、放射免疫測定法 (R

40

50

I A)、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I Z A) (Enzyme Immunoassay, Edward T. Maggio, CRC Press, 1980)、蛍光免疫測定法 (F I A)、及び化学発光分析法 (C L A) (Luminescent Assays, Perspective in Endocrinology and Clinical Chemistry, Vol. 1, Mario Serio and Mario Pazzagli, Raven Press, 1982)、(Bioluminescence and Chemiluminescence, Basic Chemistry and Analytical Applications, Marlene, A. DeLuca and William D. McElroy, Academic Press, 1981)、(Journal of Bioluminescence, Vol. 4, M. Pazzagli, et al., Proceedings of the Vth International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Wiley, 1989)、etc. これらの分析法を実行するための方法のバリエーションや装置が多数あって、当業者には公知であり、科学文献や特許文献で見出される。

10

【0007】

[07] 免疫分析は、不均質であるか又は均質である。不均質免疫分析は、分子量が小さい分析物にも大きい分析物にも応用され、(検出又は決定すべき)結合した物質を(測定の妨害になることがある)自由な物質から分離する必要がある。不均質免疫分析は、プラスチックのマイクロタイタ・プレート、ビーズ、チューブなどの固体表面又はガラス、ナイロン、セルロースなどの膜シート、チップ、ピースに固定される抗原又は抗体を含む (Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptide, Howard H. Weetall, Marcel Dekker, Inc., 1975)。不均質免疫分析では、固体相に結合した抗原-抗体錯体が、溶液中の未反応の、非特異的な分析物から一般に遠心分離、濾過、沈殿、磁気的分離、又は固体相からの流体の吸い上げなどによって分離され、その後固体相に結合した抗原-抗体錯体が繰り返し洗浄される。特に興味深いのは、免疫計測「サンドイッチ」分析法である (Immunochemistry of Solid Phase Immunoassay, John E. Butler, CRC Press)。これはまず、固定された抗原又は抗体を生物サンプルからの標的分析物と結合させる必要がある。固定されたペアを分離し、その後繰り返し洗浄した後、その分析物に特異的な二次結合物質が導入される。この二次結合物質は、通常、放射性同位元素、酵素、蛍光又は科学発光ラベル(標識)と化学的に結合している。典型的な二次結合物質は、免疫グロブリン抗体、抗体断片、モノクローナル抗体、又は組み換え抗体である。分析物は、最初の抗原又は抗体と標識された二次結合物質の間に「サンドイッチ」される。未結合の標識された二次結合物質を除去するために、その後の分離と洗浄が必要である。次に、標識結合した固定された錯体の直接測定又は基質を用いた間接測定が行われる。固体相の免疫分析の実行に精通している人であれば、この方法が厄介であり、時間がかかり、固定された結合物質及び分析物を分離するために特別な設備や装置が必要であることを理解するであろう。

20

30

【0008】

[08] 均質分析は、一般に、液層での分析方法であり、固体物質に固定された抗原又は抗体を用いない。この方法は、蛍光標識された抗原又は抗体を使用することが多く、これらが標的分析物と結合すると、結合したペアが空間的に近接しているために、励起されて蛍光を放出したり蛍光の放出が停止したりする。均質分析方法は、普通、ハプテン、薬、ホルモン、ペプチドなどの小さな分子を検出するために開発されてきた。巨大分子の分析物、例えば、分子量が5000を超えるタンパク質やペプチドは、通常、分析感度が低すぎるので均質方法によって測定されない。タンパク質の検出のための均質方法は米国特許第5,807,675号で報告されたが、両方の結合物質に化学的な修飾が必要であり、しかも単一の分析物の検出に限定される。

40

【0009】

[09] アレルギー診断のためには、全免疫グロブリンEレベルの測定が有用であるが、さらに重要なのは、1つ以上のアレルゲンがアレルギー症状の発現の原因になっている場合に、一連のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体レベルを同時に測定できる好適で信頼性の高い免疫分析方法が必要であるということである。さらに、免疫分析手順が容易に実行でき、自動化に適合していることが望ましい。現在利用できるin vitroでの方法は不均質免疫分析方法を用いるものであり、分離と洗浄を必要とし、そのため手間と時

50

間がかかり、自動化することが難しい。固体相不均質分析方法の汎用性と感度を均質プロトコルの容易さと組み合わせることが有利になるであろう。さらに、一連のアレルゲンに対する *in vitro* アレルギー試験を行うためには患者の静脈血から相当量のサンプル、一般に 3-5 ミリリットルのサンプルを採取する必要がある。実際、患者は血液サンプルを採取してもらうという目的だけのために検査室又は病院に行かなければならない。

【0010】

[10] 免疫分析の最近の進歩は、小さな固体相を用い必要なサンプルの量も少ないマイクロ技術を導入した。一例は、米国特許第 5, 981, 180 号に記載されている、複数の生体分子の分析と検出を行うためのマイクロ免疫分析法である。この汎用タイプの装置は Luminex Corporation によって Flow Matrix (商標) という商品名で市販されている。このテクノロジーは、フロー・サイトメトリーの手法を組み込み、小さな 5.6 ミクロンのポリスチレン・ビーズ・セットを用い、各セットは内部蛍光シグナチャー (signature) を含み、複数の分析物の検出を可能にしている。抗体の特異的レベルが循環する血液中で低い場合の *in vitro* アレルギー・テストでは、ミリリットルあたりナノグラム以下、又はピコグラムというレベルにある抗体の検出を可能にするためには希釈されない血液又は血清が必要である。現在まで、既存の *in vitro* アレルギー・テスト方法では均質免疫分析法ではなく不均質免疫分析法が用いられている。それは、希釈されない血液又は血清は多くの場合マイクログラム・レベルの自由な又は非特異的 (全) 抗体を含み、それが均質分析による測定を妨げるからである。

10

【0011】

[11] 希釈されない血液又は血清を用いてミリリットルあたりナノグラム以下、又はピコグラムというレベルの抗体を測定する均質分析方法では、希釈されない血清における自由な又は非特異的な抗体レベルがミリリットルあたりマイクログラムという領域にある場合にサンプル中の特異的抗体のレベルが誤って低く、又は誤って検出不可能なレベルにあると示されるということが知られている。このような誤った結果は、「フック (hook) 効果」と呼ばれている。フック効果は、Robard, D. によって (Radioisotopes: 37, (10), 1988)、Immunoassay Handbook (David Wild, M 編、Stockton Press, 1994) において、また American Society for Microbiology が刊行した Manual of Clinical Laboratory Immunology (4th ed., Rose et al. Editors) (Chapter 2, page 5)、に記載されている。これには、量-応答曲線の高い方の端における分析物の量の予期しない低下が関わっており、そのために分析物が大きく過小評価される結果になる。フック効果は、生の血清又は血液サンプル中の高濃度の自由な、すなわち結合しない分析物が二次結合物質に結合し、そのために固体相と結合した分析物が利用できる二次結合物質が不足することによって起こり、その結果誤った低い信号が生じ、分析物の濃度が誤って低く示される。不均質分析方法は、具体的には免疫計測サンドイッチ分析法は、一般にその手順に内在している分離と洗浄ステップによってこの妨害を回避する。

20

30

【0012】

[12] 上記の参照文献は、検査室がこのフック効果に対処するいくつかの方法をあげている。あげられた戦略の 1 つは、この問題に関するスクリーンとして全ての患者サンプルを 2 つの希釈度で試験するということである。より希釈されたサンプルが著しく高い分析物レベルを示した場合、検査室はフック効果の可能性を疑わなければならない。その場合いろいろな希釈度で試験を行って、サンプル中に存在する分析物の量を正確に決定することができる。このやり方では、もちろん、ある患者からのサンプルについて試験を行うための作業が重複し、時間が長くかかり、コストも増加する。あるいはまた、結合した及び結合していない特異的及び非特異的分析物抗体の両方と結合するのに十分なほど大量に過剰な二次結合物質を用いるというやり方もある。しかし、このやり方は、希釈されない血液中の結合していない特異的及び非特異的分析物抗体の濃度が大きくなり、*in vitro* アレルギー・テストを行うのに普通必要な血清又は血液の量が比較的大きくなり、使用する二次結合物質のコストが高くなるので実用的でないことが分かった。

40

【0013】

50

[13] 多数のアレルゲンに対する特異的抗体の存在を一回のテストで同時に検出するための、又は血液サンプル中の全IgE抗体の量を決定するための均質分析方法であって、フック効果が発生しにくい方法を提供することは有益であろう。また、アレルギーの患者からの血液サンプルをテストする方法であって、患者が検査室や病院に行く必要がなく、またこのテストのためにより多量の血液を採取する必要もない方法を提供することは有益であろう。ここに記載される発明は、そのような利点、ならびに以下の記載から明らかになるその他の利点を提供するものである。

【発明の開示】

【0014】

発明の要約

10

[14] きわめて一般的に言うと、本発明は、アレルギーを診断するために非常に少量の血液サンプリングを用いて複数のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体のレベルを同時に検出し定量化する方法及びシステムを提供する。本発明はまた、そのように少量の血液サンプリングによって全免疫グロブリンEのレベルを検出し定量化する方法及びシステムを提供する。

【0015】

[15] 一般に、本発明の方法は、血液サンプル中の2乃至約100のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体レベルを同時に測定するものであって、この方法は：

(a) 個体から約10乃至約100 μ Lの血液サンプルを採取するステップ；

(b) その血液サンプル又はその一部に対して均質免疫分析を行うステップ、ここで免疫分析は2乃至約100のアレルゲンに対する免疫グロブリン抗体レベルを決定することができる；及び

20

(c) 前記特異的免疫グロブリン抗体レベルを決定するステップ、

を含む。本発明のシステムは、均質免疫分析を用いて複数の特異的免疫グロブリン抗体レベルを同時に測定するシステムであって、前記システムは：

(a) 2乃至約100のアレルゲンと結合する複数の粒子；

(b) 特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した（conjugated）抗ヒトIgE又はIgG抗体を含む第一の接合体（conjugate）；及び

(c) 第一の特異的結合ペア・メンバーに結合した第二の特異的結合ペア・メンバーを含む第二の接合体；

30

を含み、システムは均質免疫分析によって2乃至約100のアレルゲンに対する特異免疫グロブリン抗体レベルの同時定量的決定を行うことができる。

【0016】

[16] このシステム及び方法は、このように比較的少量の血液サンプルで複数の（2乃至約100の）アレルゲンの同時決定を行うことを、初めて、可能にする。

【0017】

[17] 1つの好ましい方法は、血液サンプルにおける複数のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体を同時に検出し決定するための免疫分析を含み：

[18] (a) 約1乃至約25 μ L、好ましくは1-10 μ L、さらに好ましくは1-5 μ L、の体積の血液サンプルを複数のアレルゲンと結合した複数の粒子と接触させるステップ；該粒子は約1乃至約50 μ L、好ましくは約1乃至約10 μ L、の水性媒質に懸濁し、粒子と特異的アレルゲンとの各組み合わせは、血液サンプル中に存在するアレルゲン特異的な免疫グロブリン抗体が粒子に結合した1つ以上のアレルゲンに特異的に結合している状態で、粒子と他のアレルゲンの組み合わせから区別できる；

40

[19] (b) その後ステップ(a)からの物質を、特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒトIgE又はIgG抗体を含む第一の接合体（conjugate）と接触させるステップ、抗ヒト抗体が免疫グロブリン抗体と結合している状態で前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有する；

[20] (c) その後、ステップ(b)からの物質を特異的結合ペアの第二のメンバーと結合した蛍光体部分を含む第二の接合体と、該特異的結合ペアの第二のメンバーがペアの第一の

50

メンバーと結合する条件の下で、接触させるステップ；及び

[21] (d) その後ステップ(c)の生成物から放出される蛍光を測定するステップ、を含む。

【0018】

[22] 第二の方法は、血液サンプルの全免疫グロブリンEのレベルを検出し定量化する均質免疫分析を含み、その方法は：

[23] (a) 約0.5乃至約10 μ L、好ましくは約1乃至約5 μ L、さらに好ましくは約1乃至約2 μ L、の体積を有する血液サンプルを、抗ヒト免疫グロブリンEと結合した複数の粒子と接触させるステップ、粒子は約1乃至約50 μ Lの水性媒質に懸濁している；

[24] (b) その後、ステップ(a)からの物質を、特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒトIgE抗体を含む第一の接合体と接触させるステップ、前記特異的結合ペアは抗ヒト抗体が抗ヒト免疫グロブリンEに結合している状態で蛍光信号出力を増幅する能力を有する；

[25] (c) その後、ステップ(b)からの物質を、該特異的結合ペアの第二のメンバーと、該特異的結合の第二のメンバーがペアの第一のメンバーに結合する条件の下で接触させるステップ；及び

[26] (d) その後、ステップ(c)の生成物から放出される蛍光を測定するステップ、を含む。

【0019】

[27] 同様に、本発明の1つのシステムは血液サンプルにおけるアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン(IgE又はIgG)の定量的決定のためのシステムを含み、該システムは：

[28] (a) 複数のアレルゲンに結合した複数の粒子、該粒子は約1乃至約50 μ Lの水性媒質に懸濁し、粒子と特異的アレルゲンとの各組み合わせは、粒子と他のアレルゲンとの組み合わせから区別できる；

[29] (b) 特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒトIgE又はIgG抗体を含む第一の接合体、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有し、該第一の接合体は抗ヒト抗体の1分子に接合した10乃至30分子、好ましくは15乃至25分子の第一の結合ペア・メンバーを有する；

[30] (c) 該特異的結合ペアの第一のメンバーに特異的に結合した第二のメンバーを含む第二の接合体、第二の接合体は蛍光体部分と結合している；を含む

[31] (d) 第一の接合体の第二の接合体に対するモル比が約1：1乃至約1：5、好ましくは約1：1乃至約1：2である。

【0020】

[32] 本発明はさらに、血液サンプル中の全免疫グロブリンEレベルを定量的に決定するためのシステムを含み、該システムは：

[33] (a) 抗ヒトIgE抗体と結合した複数の粒子、該粒子は約1乃至約50 μ Lの水性媒質に懸濁している；

[34] (b) 特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒトIgE抗体を含む第一の接合体、該特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有し、該第一の接合体は抗ヒト抗体の1分子に接合した10乃至30分子、好ましくは15乃至25分子の第一の結合ペア・メンバーを有する；

[35] (c) フィコビルリン・タンパク質と該第一の特異的結合ペア・メンバーに特異的に結合した第二の特異的結合ペア・メンバーを含む第二の接合体；を含む

[36] (d) 第一の接合体の第二の接合体に対するモル比が約1：1乃至約1：5、好ましくは約1：1乃至約1：2である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

[39] 本発明は、アレルギー診断のための、個体の血液サンプル中のアレルゲンに対する特異的抗体を検出し定量化する方法及びシステムに関する。これまで、アレルギーの *in vitro* テストでは、アレルゲンの組についてのテストを可能にするような静脈からの血液サンプル採取を必要とする免疫分析方法を用いている。普通、5つ以上のアレルゲンの組について特異的抗体のレベルを決定するために、現在の方法で必要なサンプルの量は血液で1乃至3ミリリットルになる。このような従来技術に比べて、本発明は必要なサンプルの体積を10マイクロリットル以下に制限し、それを用いて2つ以上のアレルゲン、好ましくは10, 20, 40以上のアレルゲン、をテストすることができる。必要なサンプルの量は十分に小さく、遠隔の場所で指に刺す針を用いて個人が採取できる程度である。本発明によって、医院、病院の検査室、又は臨床検査機関における静脈採血手順によって血液サンプルを採取する必要がなくなる。 10

【0022】

[40] 本発明のある好ましい実施の形態では、血液をテストすべき人に対して、血液サンプルを採取し、郵送その他の仕方で提出するためのキットが提供される。キットには、普通、指又は他の体部分の皮膚に針を刺してある量の血液を採取するための器具（例えば、「フィンガーブリック」又は「フィンガースティック」装置）、針を刺す部分を清潔にするためのアルコールその他の消毒用綿棒、血液を入れて密封するバイアルその他の容器、そしてテストする検査機関に血液サンプルを郵送するための適当な容器、が含まれる。キットはまた、その他の品、例えば、傷を保護する接着剤、説明書、及び個人識別ナンバー付きのサンプル用ラベル（例えば、PIN）、なども含めることができる。いずれにしても、このキットの形や内容の細かい点は、検査機関の希望に応じて変えることができ、本発明の一部を成すものではない。このようなキットのいろいろな成分は、いろいろな目的での血液の採取及び／又はテスト（例えば、家庭でのテスト）のために容易に入手できる。 20

【0023】

[41] さらに、医院や検査機関へ行かずに個人が血液サンプルを提供できるということは、本発明を限定する特徴ではなく、単にその利点であるにすぎない。血液サンプルは、医院へ外来で来たときに採取し、検査機関に提出してテストすることもできる。このような場合にも、本発明の他の利点、例えば、希釈することなしに及び／又はテストの重複なしに少量のサンプルをテストできること、は生かされる。 30

【0024】

[42] このように限られたサンプル量を用いることで、分析の際に大量の自由なIgEが存在することが回避され、結果的にアレルギーの *in vitro* テストで均質分析の障害になっていたフック効果が回避される。アレルギーを診断するための *in vitro* テスト方法では、これまで不均質免疫分析方法を用いており、もっと一般に、二点（two site）免疫計測サンドイッチ分析法を用いており、分離と洗浄のステップを実行する必要があった。また、この方法では、 10^{-9} 乃至 10^{-12} というモル・レベル又はナノグラム/mL乃至ピコグラム/mLという低い特異的抗体の血中循環レベルを測定するために必要な感度を達成するためには、生の（neat）血清、血漿、又は血液サンプルが必要である。アレルギーのある人の生の血液サンプルには一般に高レベルの特異的抗体及び非特異的抗体が存在し、これらの分析で高い量（high dose）でのフック効果が発生するために、均質分析はこれまで用いられなかった。本発明は、固体相サンドイッチ免疫分析法を均質分析形式と組み合わせた分析方法を提供し、物質の分離、洗浄、などの必要がなく、サンプル希釈の必要もない。 40

【0025】

[43] この分析方法は、アレルギー診断で不可欠の、そして既知のアレルゲンに対するアレルギー応答の度合い又は強さの判定に関して本質的に重要な全IgEのレベル及び特異的抗体のレベルを定量化する。

【0026】

[44] この方法を実行し、本発明で用いるシステムを構成するための予備ステップは、 50

複数のアレルゲンと結合した複数の固体粒子を調製し寄せ集めて、例えば、ある個人のアレルギー症状が1つ以上の調べているアレルゲンによって起こっているかどうかを決定するためにテストすべきアレルゲンの組 (panel) を用意することである。

【0027】

[45] 粒子と特異的アレルゲンの各組み合わせは、粒子と他のアレルゲンとの組み合わせから区別可能である。特異的アレルゲンは、抽出されたタンパク質、クロマトグラフィー法又はアフィニティー・クロマトグラフィー法によって精製されたタンパク質断片、組み換えタンパク質、又はそれらの組み合わせ、から成る。アレルゲンのミックス、例えば、2つ以上の草、木、又は食品、も利用できる。粒子といろいろなアレルゲンの組み合わせを区別する能力は異なるタイプの複数の粒子を用意することによって実現される。すなわち、粒子はサブセット (部分集合) に分けられ、各サブセットは特定の性質、特徴 (単数又は複数) によって他のサブセットから区別できる。例えば、米国特許第5,981,180号に記載されているように、粒子はサブセットに分けられ、各サブセットは内部又は表面に組み込まれた蛍光体又は蛍光体の組み合わせによって得られる特定の色又は放出スペクトルによって区別できるようにすることができる。粒子の各サブセットは特異的アレルゲンと結合し、粒子と特異的アレルゲンの組み合わせは、問題の粒子又はビーズを用いられる他の粒子又はビーズから区別する具体的な特徴 (単数又は複数) によって粒子と他のアレルゲンの組み合わせから区別できる。アレルゲンとビーズ又は粒子との結合は、当業者には周知であり特許や科学文献に記載されている共有結合又は吸着法によって達成される (例えば、Immunochemistry of Solid Phase Immunoassay, John E. Butler, CRC Press, 1991, 及び Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides, Ed. By Howard H. Weetall, Marcel Dekker, Inc., New York, 1975, を見よ)。

10

20

【0028】

[46] 粒子そのものは普通、球形であり (すなわち、「ビーズ又はマイクロスフェア」)、表面は粗い又はなめらかであり、当業者に公知の仕方で調製される。粒子は、いろいろな材料から作られるが、通常、非多孔質のガラス、ポリスチレン、ラテックス、又はその他の高分子材料から作られ、一般に直径が0.05ミクロン乃至90ミクロン、好ましくは直径が0.5ミクロン乃至10ミクロン、であり、密度は約1乃至2 g/mLの範囲にあり、好ましくは水の密度に近い。

【0029】

[47] 粒子/アレルゲンの組み合わせは、タンパク質安定剤と静菌剤を含む緩衝溶液に貯蔵して、必要に応じて使用することが好ましい。

[48] 個々のアレルゲン/粒子組み合わせのサブセットを調製したら、そのサブセットを単独で使用することもできるし、一緒に混合して粒子と結合したアレルゲンの単一集合体を形成することもできる。これを分析を行う前に実行して、一般的に使用するために予め集められたアレルゲンの組として用意することもできるし、例えば、何人かの患者の地理的な場所や環境に合わせて1つ以上の分析を構成することが望ましい場合には、個々の分析の度毎に実行することもできる。粒子の濃度は従来の計数装置を用いて測定し調整することができ、分析のために所望の数の粒子を取り分ける (aliquot) ことができる。懸濁液中の粒子の数は限定された量で限定された体積にあることが、分析の感度、スピード、及び自動化された微量分析形式への適合性 (自動化された分析を用いる場合) を確保するために好ましい。懸濁液中の粒子は、密度が水の密度に近く、分子運動及び分子接触を可能にし、かつ微量分析形式に適合するのに十分な体積の緩衝又は水性媒質に懸濁されなければならない。

30

40

【0030】

[49] テストのための組は、全体で、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも5つ、から約100までの特異的アレルゲン又はアレルゲンの混合を含むことができる;しかし、10から40までのアレルゲンの組がよく用いられる。各テストでサンプルは、粒子と結合したアレルゲン又はアレルゲンの混合の各セットに約1000乃至約4000の粒子を、好ましくは小さな体積に、例えば、約1乃至約50 μ Lという体積、好ましくは約5~25

50

μLという体積に含む懸濁液に加えられることが好ましい。したがって、例えば、10のアレルゲンの組についてのテストは、5～20マイクロリットルの緩衝溶液に約10,000の粒子を含む。同様に、20アレルゲンの組についてのテストは、5～20マイクロリットルの体積に約20,000の粒子を組み込むことになる。分析における粒子の数を増やすことは、粒子を同定し、読み取るために必要な時間を減少させる。

【0031】

[50] こうして調製された粒子に、個人の血液サンプルを接触させる。血液サンプルは、体積が約1乃至約25 μL、好ましくは約1乃至約10 μL、最も好ましくは約1乃至約5 μLである。抗原又は抗体と分析物の結合はインキュベーション条件、例えば、時間、温度、pH、反応物質のイオン強度など、によって影響されることは当業者に認識されており、分析の条件は当業者に公知の仕方で、テストの感度と特異性を最適化するように、一般に手順を実行する容易さと自動化への適合性に合うように選択される。一般に、この条件は、約18乃至37℃の範囲の温度、好ましくは約18乃至25℃の範囲の周囲温度、及び約15分乃至約24時間、好ましくは1時間以下の時間を含む。最初のインキュベーション段階で、個人血液サンプルからの特異的抗体は粒子上の特異的アレルゲンと通常の抗原-抗体結合力によって結合する。懸濁液は自由な特異的抗体と自由な非特異的抗体の両方、並びに粒子に結合した特異的抗体を含む。

10

【0032】

[51] 血液サンプルにおける全免疫グロブリン抗体の決定では、粒子に結合した抗ヒト抗体に個人のサンプルを接触させる。サンプルは、体積が約0.5乃至約10 μL、好ましくは約1乃至約5 μL、最も好ましくは約1乃至約2 μL、である。インキュベーション時間及び条件は本明細書に記載されるように決定される。本発明のある実施の形態では、全免疫グロブリンのテストでは、4800 ng/mLのレベルまでの全免疫グロブリンを測定できる。

20

【0033】

[52] 次に、特異的結合ペアの第一のメンバーと結合した、抗ヒトIgEなど、特異的分析物に対する抗体を含む第一の接合体が、順次混合物に加えられる。反応媒質及びサンプルからの固体相粒子の分離は必要ない。特異的結合ペアは、互いに対する結合特異性がある分子のペアである。特異的結合ペアのタイプの例としては、ビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、ジゴキシン-抗ジゴキシン、ホモポリヌクレオチド・ポリ(dA)-(dT) (米国特許第6,245,513号に記載)などがあげられる。ビオチン-ストレプトアビジン特異的結合ペアは本発明の好ましい実施の形態である。ある好ましい実施の形態では、複数の特異的結合ペアの一方のメンバー(例えば、ビオチン)が抗体(例えば、抗ヒトIgE)に結合(接合)される。以下で述べるように、その特異的結合ペアの第二のメンバー、例えばストレプトアビジン、は蛍光ラベル又は蛍光体部分に結合される。抗体に接合された複数のビオチンとの第二の特異的結合ペア・メンバーの結合は蛍光信号を増幅して分析感度を高める。抗体のビオチン化は、当業者に周知の方法によって行うことができる。普通、商業的に入手した又は調製した抗体-ビオチン接合体は、1抗体分子あたり5乃至10ビオチン分子を含む。この好ましい形態では、最適の分析感度は、1抗体分子あたり約10乃至約30ビオチン分子、好ましくは1抗体分子あたり約15～25ビオチン分子、が結合したときに得られる。

30

40

【0034】

[53] 繰り返しになるが、抗原又は抗体と分析物の結合はインキュベーション条件、例えば、時間、温度、pH、反応物質のイオン強度など、によって影響されることは当業者に認識されており、分析の条件は当業者に公知の仕方で、テストの感度と特異性を最適化するように、一般に手順を実行する容易さと自動化への適合性に合わせて選択される。一般に、この条件は、約18乃至37℃の範囲の温度、好ましくは約18乃至約25℃の範囲の周囲温度、及び約15分乃至約24時間、好ましくは1時間以下の時間を含む。二次インキュベーション段階で、第二の結合物質は通常の抗原-抗体結合力によって分析物-粒子複合体に結合する。

50

【0035】

[54] 接合体の選択は、分析の性能と感度を高める目的で、 10^{-9} 乃至 10^{-12} モル領域で蛍光の消滅とフック効果を引き起こさないように行われる。

【0036】

[55] 粒子及びサンプルと第一の接合体の混合物との適当なインキュベーション期間の後、蛍光体と接合された特異的結合ペアの第二のメンバーを含む第二の接合体がこの混合物に加えられる。第二の結合ペア・メンバーは、好ましくはアビジン又はストレプトアビジン、最も好ましくはストレプトアビジン、であるが、上述のように、抗ジゴキシン又は米国特許第6,245,513号に記載された物質であってもよい。アビジン又はストレプトアビジンへの蛍光ラベルの共有結合による付着は、特許及び科学文献にすでに記載されたいろいろな方法によって行うことができる (Haugland, R. P., Bhalagat, M. K., Preparation of avidin conjugates, Methods Mol. Biol. 1998; 80:185-96)。典型的な蛍光部分は、前出のManual of Clinical Laboratory Immunology, のChapter 3に記載されている。あるいは又、接合体は商業的な源から入手することもできる。蛍光染料、例えば、フルオレセイン、アリールスルフォネート・シアニン染料、フィコビリリン・タンパク質染料、bodipy染料など、を用いてもよい。粒子サブセットが組み込まれた蛍光色素によって互いに区別される場合、接合体で用いる染料は、蛍光放出が粒子サブセットの放出スペクトルとはっきり異なっていてそれを妨害しないように選ばれる。好ましいタイプの蛍光物質は、フィコビリリン・タンパク質として知られている化合物のクラス、具体的にはフィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、最も好ましくはフィコエリスリン、である。フィコエリスリン接合体は、対応するフルオロセイン接合体の感度よりも感度が5倍から10倍高く、量子収量が0.98に達し、吸光係数が $2.40 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ に達する。これらのうち最も好ましいのはR-フィコエリスリンである。第二の接合体で、第二の結合ペア・メンバーに対する蛍光染料のモル比は約1:1から約5強:10までの範囲にあり、分子量は約300,000乃至約3,000,000ダルトン以上の範囲にある。第二の接合体の好ましい分子量は、一般に、約400,000乃至約1,000,000ダルトンである。

10

20

【0037】

[56] 物質は、結合ペア・メンバーが結合するのに好適な条件の下でインキュベートされる。当業者に知られているように、この条件は普通、約18℃から約45℃まで、好ましくは約18℃から約25℃まで、という温度、及び約15分から約24時間まで、好ましくは約15分から約3時間まで、という時間を含む。

30

【0038】

[57] このプロセス全体で、蛍光ラベルされた抗体は第一及び第二の結合パートナーによって、そして抗体の分析物抗原への結合によって粒子に結合する。選ばれた蛍光ラベルを励起させるように選択された波長を有する励起エネルギーを印加することによってそれらが検出、測定される。発生される放出スペクトルは粒子に組み込まれている放出スペクトルとは異なる。

【0039】

[58] 本発明の方法全体の重要な特徴は、サンプルの希釈なしに免疫分析を行うことができるということである。さらに、小さな体積のサンプルを使用できるようにしたことにより、固体相粒子による均質分析の形が、適当な分析範囲と感度で可能になった。

40

【0040】

[59] 特異免疫グロブリン分析と全免疫グロブリン分析の両方に適用される本発明の実施の形態では、サンプルを提出した人又は彼又は彼女の許可によって行動する別の人は、インターネットによって、又は同様な全世界的なコンピューター・システムによって、例えば、ウェブ・サイトからウェブ・サーバーを介して、テスト結果にアクセスできる。

【0041】

[60] 本明細書で用いられる「ウェブ・サーバー」という用語は、あるウェブ・サーバ

50

ーへの多数のリクエストを処理するために組織された複数のサーバー、すなわち、分布ウェブ・サーバー、も指す。「ウェブ・サイト」という用語は、しばしば、ある企業体又はその他の団体によって、自分たちの目的のために組織されたウェブ・サーバーの集まりを指す形で用いられる。ユーザーが、彼又は彼女のウェブ顧客に指示してあるサイトのウェブ・サーバーにリクエストさせ、その回答をユーザーに対して表示させるとき（ユーザーとウェブ顧客は実際に物理的に移動しなくても）、そのウェブ・サイトに「行く」又は「アクセスする」と言われる。ユーザーの認識では、ウェブ上にこのウェブ・サイトが存在する場所があるということであるが、「ウェブ・サイト」はしばしば、ウェブ顧客からのリクエストに応えるウェブ・サーバー（単数又は複数）を指している（たとえ、「サイト」が必ずしもウェブ・サーバーの物理的な場所を指していなくても）ことは言うまでもない。実際、多くの場合に、あるウェブ・サイトを運営するサーバーは、局所的な電力の停止やネットワーク・サービスの停止が起きたときにダウンすることを避けるために物理的に分布している。 10

【0042】

[61] 「ウェブ・サイト」という用語は、普通、ビジターに提示するために共通管理者が管理しているページの集まりを指し、その集まりが1つの物理的場所で1人の物理的サーバーによって管理されているか、多くの場所及び／又はサーバーに分布しているかどうかによらない。それらのページ（又は、ページをダイナミックに発生するために必要なデータ／プログラム・コード）は、ページの集まりの共通管理者によって作成される必要はない。このようなページの集まりの管理者は普通、ウェブ・サイト運営者と呼ばれる。 20

【0043】

[62] 「ウェブ・サイト」という用語は、また、イントラネット、無線アクセス・プロトコル（WAP）ネットワーク、構内ネットワーク（LAN）、広域ネットワーク（WAN）、仮想閉域網（VPN）、又はその他のネットワーク形態によってウェブ顧客に結合されたウェブ・サイトも含む。「ウェブ」は普通、「ワールド・ワイド・ウェブ」（又は単に「WWW」）を指し、これはHTTPによってインターネットでアクセスできるハイパーリンクによる文書の集まりに与えられた名称である。本明細書で用いられる場合、「ウェブ」はワールド・ワイド・ウェブ、ワールド・ワイド・ウェブのサブセット、ハイパーリンクされたページの局地的な集まり、などを指すことができる。

【0044】

[63] 本発明のこの実施の形態では、サンプルの提出者（又は、提出者から許可を受けた他の誰か、例えば、親類、医師、またはその他の医療提供者）はウェブ・サイト、ウェブ・ページ、などでテスト結果に関する情報にアクセスすることができる。ウェブ・ページは、普通、ある情報から成っている。ウェブ・ページは、静的なページと動的なページを含む。静的なページとは、リクエストの前にはサーバー上に保管され、又はサーバーがアクセスできる保管場所にあり、そのページに対するリクエストに応じて保管場所から送られるページである。動的なページとは、リクエストを受けたときに生成されるページである。例えば、ページがデータベースからのデータの図である場合、サーバーはルール又はテンプレートとデータベースからのデータを用いてそのページを動的に生成することができ、使用される具体的なデータは出された具体的なリクエストによって決まる。 40

【0045】

[64] ウェブ・ページ上の、又はテスト機関（例えば、試験所）によって、又はその代わりに、管理されているデータベース内の彼又は彼女のテスト結果へのアクセスを許可するパスワード又はコード（PIN）を提出者に付与することができる。したがって、この実施形態では、提出者は医院へ行かなくてもテスト結果を受け取ることができ、その後、彼又は彼女が選んだ医師に、彼又は彼女の都合に合わせてその情報を提供することができる。

【0046】

[65] このようなテスト結果を管理し、アクセスを提供するために用いられるコンピュータ・ソフトウェアは販売業者から入手できるものであり、本発明の一部を成すものでは 50

ない。

[66] 本明細書で記述される全ての実施例に関して次の分析手順が用いられた。

【0047】

[67] a. 抽出されたアレルゲン、普通は木、草、かび、食品、ふけ、などから抽出されたアレルゲンが、共有結合又は吸着法によってマイクロ粒子と結合される。各アレルゲン抽出物は、粒子のユニークなサブセットに結合され、各サブセットは組み込まれた蛍光放出又は粒子サイズによって、それらの異なる特性が適当な計測装置で認識できる場合には区別可能である。アレルゲンと結合した粒子サブセットは、個別に貯蔵されるか、複数のサブセットをアレルゲンの組としてタンパク質安定剤及び静菌剤と共に緩衝媒質中で一緒にする。例えば、10のアレルゲンの組に対して特異IgEレベルを決定するためには、一緒にされた粒子サブセット10 μ L、全体で10,000の粒子、各アレルゲン粒子サブセットを1,000の粒子で代表させたものを微量遠心機のチューブ又はマイクロタイタ・ウエルに入れる。全免疫グロブリンを決定するためには、抗ヒトIgEを共有結合又は吸着法によってマイクロ粒子と結合させて、各テストで1,000の粒子を微量遠心機チューブ又はマイクロタイタ・ウエルに入れる。

【0048】

[68] b. 本明細書に記載されたようなフィンガースティック採取キットによって、又はその他の採取方法によって、個体から採取した血液、血漿、又は血清は、適当にラベルしたりバーコードをつけたりして識別できるようにする。アレルゲンの組に対して特異IgEレベルを決定するためには、採取した血液、血漿、又は血清の数滴で十分である。微量遠心機チューブ又はマイクロタイタ・ウエルに入っているアレルゲンと結合した粒子に5 μ Lのサンプルが加えられる。一緒にした混合物を、短時間攪拌し（微量遠心機チューブ）又は振とうし（マイクロタイタ・ウエル）、室温で1時間インキュベートする。全免疫グロブリンの決定では、各テストで1 μ Lのサンプルが、微量遠心機チューブ又はマイクロタイタ・ウエルに入っている抗ヒトIgEと結合した粒子に加えられる。

【0049】

[69] c. 次に、すでに述べたようなある体積の緩衝溶液中の抗体-ビオチン接合体が、上述のサンプルとアレルゲンが結合した粒子の混合物に加えられる。全体をもう一度、短時間攪拌又は振とうして、周囲温度で1時間そのままインキュベートする。

【0050】

[70] d. すでに述べたようなある体積の緩衝溶液中のストレプトアビジン-R-フィコエリスリン接合体が次に混合物(c)に加えられ、得られた混合物をもう一度、短時間攪拌又は振とうして、周囲温度で1時間そのままインキュベートする。

【0051】

[71] このインキュベーションの後、得られた混合物を適当なフロー・サイトメトリック測定装置、例えば、Luminex Corporation Luminex 100 System（商標）又はBecton-Dickinson Immunocytometry FACSCAN（商標）などの装置によって読み取りを行う。この装置は、粒子に組み込まれた蛍光放出又は粒子サイズによって粒子サブセットを決定し、同時に、前述のように抗原-抗体及びビオチン-ストレプトアビジン結合によって粒子に付着したR-フィコエリスリンの放出スペクトルを測定する。アレルゲンに対する特異的抗体の濃度レベルを定量的に決定するために、世界保健機構の標準（例えば、WHO IgE標準75/502 IU/mL）にまでさかのぼることができる既知の標準で測定して標準曲線を作成し、それによって各アレルゲンに対する患者のサンプルにおける特異的IgEの濃度を外挿し、記録し、報告する。アレルゲンに対する抗体の個々のレベルは、濃度単位で、例えば、ミリリットル当たりの単位（Unit）で、及び／又は、in vitroアレルギー診断に精通している人には認識できるように、等級レベルで、報告することができる。

【実施例】

【0052】

[72] 以下は本発明を説明するための実施例である。

10

20

30

40

50

ビオチン化抗体の調製ビオチン化抗ヒト Ig E

【73】 ジメチルホルムアミド (Sigma) 中 25 mg/mL のビオチン (ビオチン・アミドカプロエート N-ヒドロキシスクシンイミド・エステル) (Sigma, MO, USA) $15 \mu\text{L}$ に 0.1 M の NaHCO_3 中で 3.0 mg/mL のアフィニティー精製された抗ヒト Ig E (Bethy Labs, TX, USA) 0.4 mL を加える。反応物質溶液を 25°C で 1 時間攪拌する。 0.1 M の NaHCO_3 中で 20 mg/mL のヒドロキシルアミン (Spectrum Quality Products, CA, USA) $20 \mu\text{L}$ を加え、溶液を短時間混合する。ビオチン化抗体溶液は、 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Sigma)、 $\text{pH } 7.2$ 、で平衡にされた Sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden) 脱塩カラムによって精製される。 10

【0053】

粒子へのアレルゲンの共有結合—一般的手順

【74】 カルボキシル化ポリスチレン微小球 (Luminex Corporation, TX, USA) を $80 \mu\text{L}$ の 0.1 M MES バッファー (Fisher Scientific, PA, USA) $\text{pH } 6.1$ に懸濁させる。この懸濁液に、 50 mg/mL の N-ヒドロキシスルホスクシンイミド・ナトリウム塩 (Pierce Chemicals, IL, USA) $10 \mu\text{L}$ と 5 mg/mL の 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (Pierce Chemicals, IL, USA) $10 \mu\text{L}$ を加える。溶液を攪拌し、暗所に周囲温度で 15–20 分間放置する。活性化された微小球を 5 分間 5000 g で遠心分離して上澄みを吸引する。次に、微小球を再び $250 \mu\text{L}$ の 0.1 M PHS 溶液 (0.1 M リン酸ナトリウム、 0.14 M NaCl) $\text{pH } 7.3$ に懸濁させる。混合物を攪拌し、活性化された微小球を前と同様に遠心分離して上澄みを吸引する。 20

【0054】

【75】 次に、活性化された微小球を再び $250 \mu\text{L}$ のアレルゲン抽出物、精製タンパク質又は組み換えタンパク質、に懸濁させる。混合物を少なくとも 1 時間、周囲温度で (光から保護して) 回転させ、5 分間 5000 g で遠心分離する。上澄みを吸引し、微小球を再び $250 \mu\text{L}$ の、 0.01 M PBS と 0.02 mg/mL のヒト血清アルブミンを含む PBS/HSA バッファー $\text{pH } 7.3$ (Sigma, MO, USA) に懸濁させ、攪拌して微小球から残留アレルゲン抽出物を洗浄する。上澄みを再び、前述のように遠心分離して吸引する。洗浄手順をさらに 2 回繰り返し、微小球を再び $250 \mu\text{L}$ の PBS/HSA に懸濁させる。溶液中の微小球の濃度がヘモサイトメーター (Fishert Scientific, PA, USA) と顕微鏡 (Nippon Kogaku, Japan) を用いた計数によって決定される。 30

【0055】

実施例 1：アレルゲンに対する特異 Ig E レベルの分析

【76】 Luminex Corporation から入手した蛍光ラベルされた微小球のサブセットに、Alternaria かび、Bermuda grass、Timothy grass、ネコのふけ、Mountain Cedar (スギ) の木、卵白、コムギ、ミルク、Ragweed (オグルマ) 及びダニから抽出されたタンパク質を共有結合させた。アトピー及び非アトピーの人から入手した血清サンプルがこの 10 のアレルゲンの組に対して分析された。 $5 \mu\text{L}$ のサンプルが、V-底部ポリプロピレン・マイクロタイター・ウエル (Evergreen Scientific, CA, USA) 又は 0.5 mL ポリプロピレン微量遠心機チューブ (Evergreen Scientific, CA, USA) に入れられた $10 \mu\text{L}$ の懸濁されたアレルゲン結合微小球に加えられた。6 点標準カーブを得るために $5 \mu\text{L}$ の血清標準 (WHO の Ig E 標準 75/502 に対して校正された二次標準) が、それぞれ、マイクロタイター・ウエル中の $10 \mu\text{L}$ の抗原をコーティングされた微小球に加えられた。マイクロタイター・プレートはマイクロタイター・プレート・シェーカー (Fisher Scientific, PA, USA) に載せられ、10–20 分間振とうされた。標準又はサンプルを加えた微小球は、上述のように、室温で 1 時間インキュベートされた。各ウエルの内容に $40 \mu\text{L}$ の体積の抗ヒト Ig E-ビオチン接合体が直接加えられた；プレートが前のように短時間振とうされ、内容物は周囲温度で 1 時間インキュベートされた。その後、 $40 \mu\text{L}$ の体積 40

のストレプトアビジン-R-フィコエリスリン接合体 (Advanced Biosystems, CA, USA) が各ウェルの内容物に加えられ、周囲温度で1時間インキュベートされた。次に、微小球はLuminex 100フローサイトメーターに直接導入され、計測器に吸引された。計測器は、サブセット粒子の放出信号と粒子上にあるR-フィコエリスリン蛍光ラベルを同時に同定する。4パラメータLorentizian累積非線形転移関数の式を用いて標準曲線が決定され、アレルゲンに対する特異IgEレベルが図1に示されるような標準曲線から内挿された。

[77] 図1は、非アレルギーの2人と、10のアレルゲンの組に対する特異IgE応答が陽性であったアレルギーの3人からの結果を示す。各人からの5 μ Lの体積のサンプルが、微小球に結合した10のアレルゲンに対する特異IgEレベルを同時に測定する3時間均質分析方法で用いられた。Luminex 100システムによる蛍光強度信号の測定を用いて、0.35 IU/mLからの6点標準曲線から内挿された結果がIU/mL又はクラス単位で報告された。得られたクラス・レベルに基づいて、応答の解釈は「ネガティブ」から「きわめて高い」までにわたる。

10

【0056】

実施例2：全IgE分析

[78] ヤギ抗ヒトIgE (Bethyl Laboratories, TX, USA) が、アレルゲンの結合に関して上で述べたと同じ手順に従って微小球粒子 (Luminex Corporation, TX, USA) に結合された。血清サンプルは、上で述べた方法によって入手した個人たちから得られた。1.0 μ Lの体積の標準 (WHOのIgE標準75/502に対して校正された二次標準) 又は個人サンプルがマイクロタイター・ウェル中の25 μ Lの抗体と結合した微小球の懸濁液に加えられ、上で述べたように短時間振とうされ、1時間インキュベートされた。その後、40 μ Lの体積の抗ヒトIgE-ビオチン接合体が各ウェルの内容物に加えられ、1時間インキュベートされた。その後、40 μ Lの体積のストレプトアビジン-リフィコエリスリン接合体が各ウェルの内容物に加えられ、マイクロタイター・プレートは短時間振とうされ、混合物は1時間インキュベートされた。次に、微小球は直接Luminex 100フローサイトメーターに導入され、計測器に吸引された。計測器は、サブセット粒子の放出信号と粒子上にあるR-フィコエリスリン蛍光ラベルを同時に同定する。4パラメータLorentizian累積非線形転移関数の式を用いて標準曲線が決定され、サンプルの全IgEレベルが図2に示されるような標準曲線から内挿された。

20

【0057】

[79] 図2は、全IgE標準曲線と10人の全IgEの結果を示す。各人からの1 μ Lの体積のサンプルが3時間の均質分析手順で用いられた。抗ヒトIgEが結合した微小球に結合した全IgEの量が、Luminex 100システムを用いて蛍光レポーター信号からの信号強度を測定して決定され、2~2000 IU/mLからの6点標準曲線から内挿された。サンプルについての予期された結果は、別の分析手順を用いるある基準検査所から提供されたものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1-1】本発明の実施例1に係わる10のアレルゲンの組に対する特異的IgE分析を表及びグラフによって示す図である。

40

【図1-2】本発明の実施例1に係わる10のアレルゲンの組に対する特異的IgE分析を表及びグラフによって示す図である。

【図1-3】本発明の実施例1に係わる10のアレルゲンの組に対する特異的IgE分析を表及びグラフによって示す図である。

【図2】実施例2に係わる全IgE分析を表及びグラフによって示す図である。

【図 1 - 1】

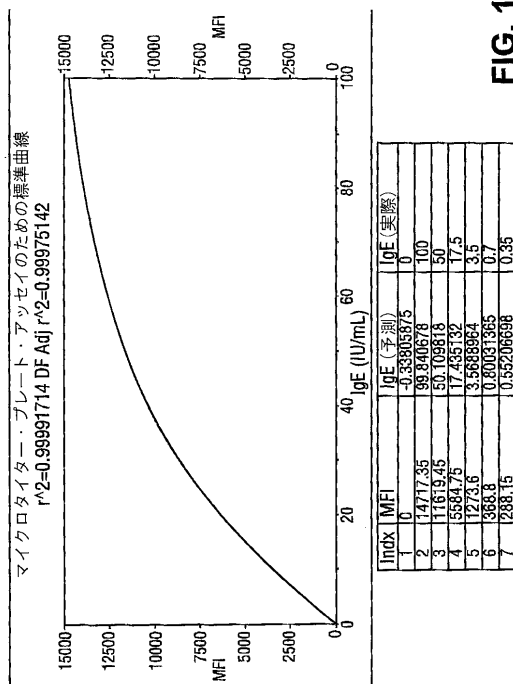


FIG. 1

【図 1 - 2】

アレルギー性個体											
アレルギー性個体			アレルギー性個体			アレルギー性個体			アレルギー性個体		
アレルギー	クラス	IU/mL	アレルギー	クラス	IU/mL	アレルギー	クラス	IU/mL	アレルギー	クラス	IU/mL
ハニミダ・グラス	2	3.21	ハニミダ・グラス	3	5.12	ハニミダ・グラス	4	43.16	ハニミダ・グラス	4	43.16
スギ	2	2.90	スギ	3	5.21	スギ	4	83.06	スギ	5	83.06
ブタクサ	3	17.49	ブタクサ	3	7.05	ブタクサ	4	30.13	ブタクサ	4	30.13
チモン・グラス	3	15.18	チモン・グラス	4	36.80	チモン・グラス	6	>100	チモン・グラス	6	>100
ネコ	3	13.84	ネコ	3	5.32	ネコ	4	20.12	ネコ	4	20.12
ハウスダスト・ダニ	5	59.60	ハウスダスト・ダニ	4	18.05	ハウスダスト・ダニ	4	<0.35	ハウスダスト・ダニ	0	<0.35
Alternaria (カビ)	3	5.45	Alternaria (カビ)	2	1.55	Alternaria (カビ)	2	<0.35	Alternaria (カビ)	0	<0.35
卵白	0	<0.35	卵白	3	5.06	卵白	3	<0.35	卵白	0	<0.35
牛乳	0	<0.35	牛乳	3	4.63	牛乳	3	<0.35	牛乳	0	<0.35
小麦	1	0.50	小麦	2	3.44	小麦	2	20.32	小麦	4	20.32

FIG. 1 (cont.)

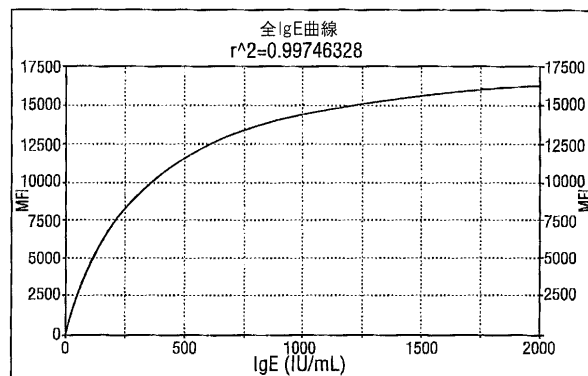
【図 1 - 3】

非アレルギー性個体											
結果の解釈											
アレルギー	クラス	IU/mL	アレルギー	クラス	IU/mL	アレルギー	クラス	IU/mL	アレルギー	クラス	IU/mL
ハニミダ・グラス	0	<0.35	ハニミダ・グラス	0	<0.35	ハニミダ・グラス	0	<0.35	ハニミダ・グラス	0	<0.35
スギ	0	<0.35	スギ	0	<0.35	スギ	0	<0.35	スギ	0	<0.35
ブタクサ	0	<0.35	ブタクサ	0	<0.35	ブタクサ	0	<0.35	ブタクサ	0	<0.35
チモン・グラス	0	<0.35	チモン・グラス	0	<0.35	チモン・グラス	0	<0.35	チモン・グラス	0	<0.35
ネコ	0	<0.35	ネコ	0	<0.35	ネコ	0	<0.35	ネコ	0	<0.35
ハウスダスト・ダニ	0	<0.35	ハウスダスト・ダニ	0	<0.35	ハウスダスト・ダニ	0	<0.35	ハウスダスト・ダニ	0	<0.35
Alternaria (カビ)	0	<0.35	Alternaria (カビ)	0	<0.35	Alternaria (カビ)	0	<0.35	Alternaria (カビ)	0	<0.35
卵白	0	<0.35	卵白	0	<0.35	卵白	0	<0.35	卵白	0	<0.35
牛乳	0	<0.35	牛乳	0	<0.35	牛乳	0	<0.35	牛乳	0	<0.35
小麦	0	<0.35	小麦	0	<0.35	小麦	0	<0.35	小麦	0	<0.35

アレルギー	クラス	IgE (予測)	IgE (実際)
1	0	0.3306875	0
2	1417.35	99.800876	100
3	11619.45	50.109818	50
4	3584.75	17.435132	17.5
5	1273.6	3.5688964	3.5
6	368.8	0.80031365	0.7
7	288.15	0.55206698	0.35

FIG. 1 (cont.)

【図 2】



全IgEアッセイ結果

サンプル	計測されたIgEレベル	予測されたIgEレベル
1	22	28
2	>2000	>2000
3	76.3	79
4	<2	<2
5	64	100
6	35	50
7	5	4
8	552	880
9	431	756
10	>2000	1250

FIG. 2

【手続補正書】

【提出日】平成16年8月9日(2004.8.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液サンプル中の2～約100のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを同時に測定する方法であって：

(a) 個体から約10～約100 μ Lの血液サンプルを採取するステップ；

(b) 該血液サンプル又はその一部について均質免疫分析を行うステップ、ここで該免疫分析は2～約100のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを決定することができる；及び

(c) 前記特異的免疫グロビン抗体レベルを決定するステップ；を含む方法。

【請求項2】

血液サンプル中の2～約100のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを同時に測定する装置であって：

(a) 個体から約10～約100 μ Lの血液サンプルを採取するステップ；

(b) 該血液サンプル又はその一部について均質免疫分析を行うステップ、ここで該免疫分析は2～約100のアレルゲンに対する特異的免疫グロビン抗体レベルを決定することができる；及び

(c) 前記特異的免疫グロビン抗体レベルを決定するステップ；を含む前記装置。

【請求項3】

血液サンプル中のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体レベルの定量的な測定装置であって：

(a) 複数のアレルゲンに結合した複数の粒子、該粒子は約1～約50 μ Lの水性媒質に懸濁し、粒子と特異的アレルゲンとの各組み合わせは粒子と他のアレルゲンとの組み合わせから区別可能である；

(b) 特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒトIgE又はIgG抗体を含む第一の接合体、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有し、該第一の接合体は1分子の抗ヒト抗体に10～30分子の第一の結合ペア・メンバーが接合している；

(c) 第一の特異的結合ペア・メンバーに結合する第二の特異的結合ペア・メンバーを含む第二の接合体、該第二のメンバーは蛍光体部分と結合している；を含み、

(d) 第一の接合体の第二の接合体に対するモル比は約1：1～約1：5である；前記装置。

【請求項4】

血液サンプル中の複数のアレルゲンに対する特異的免疫グロブリン抗体レベルを同時に検出し、定量化する均質免疫分析方法であって：

(a) 約1～約25 μ Lの体積の血液サンプルを複数のアレルゲンと結合した複数の粒子に接触させるステップ、該粒子は約1～約50 μ Lの水性媒質に懸濁されており、粒子と特異的アレルゲンとの各組み合わせは、1つ以上のアレルゲンに特異的に結合する血液サンプル中に存在する免疫グロブリン抗体が該粒子に結合している状態で、粒子と他のアレルゲンとの組み合わせから区別可能である；

(b) その後、ステップ(a)からの物質を、特異的結合ペアの第一のメンバーに接合した抗ヒトIgE又はIgG抗体を含む第一の接合体と接触させるステップ、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅させる能力を有する；

(c) その後、ステップ (b) からの物質を、該第一の特異的結合ペア・メンバーと結合する第二の特異的結合ペア・メンバーに結合した蛍光体部分を含む第二の接合体と接触させるステップ；及び

(d) その後、ステップ (c) からの物質における特異的免疫グロブリン抗体のレベルを、粒子サブセットの蛍光放出信号を決定し、同時に蛍光体部分の蛍光放出信号を測定することによって決定するステップ；

を含む前記方法。

【請求項 5】

血液サンプルにおける全免疫グロブリン E レベルを定量的に決定するための装置であって：

(a) 抗ヒト Ig E 抗体に結合した複数の粒子、該粒子は約 1 ～約 50 μ L の水性媒質に懸濁している；

(b) 抗ヒト抗体と特異的結合ペアの第一のメンバーを含む第一の接合体、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有する；

(c) フィコビルリン・タンパク質と、該第一の特異的結合ペア・メンバーに特異的に結合し蛍光信号出力を増幅する第二の特異的結合ペア・メンバーとを含む第二の接合体；を含む

(d) 該第一の接合体の該第二の接合体に対するモル比が約 1 : 1 ～約 1 : 5 である前記装置。

【請求項 6】

血液サンプル中の全免疫グロブリン E 抗体を検出し定量化するための均質免疫分析方法であって：

(a) 約 0.5 ～約 10 μ L の体積を有する血液サンプルを抗ヒト免疫グロブリン E と結合した複数の粒子と接触させるステップ、該粒子は約 1 ～約 50 μ L の水性媒質に懸濁されている；

(b) その後、ステップ (a) からの物質を、特異的結合ペアの第一のメンバーに接合された抗ヒト Ig E 抗体を含む第一の接合体と接触させるステップ、前記特異的結合ペアは蛍光信号出力を増幅する能力を有する；

(c) その後、ステップ (b) からの物質を、該第一の特異的結合ペア・メンバーと結合する第二の特異的結合ペア・メンバーに結合した蛍光体部分を含む第二の接合体と接触させるステップ；及び

(d) その後、ステップ (c) からの物質中の特異的免疫グロブリン抗体のレベルを、該粒子の蛍光放出信号を決定し、同時に該粒子に結合した蛍光体部分の蛍光放出信号を測定することによって決定するステップ；

を含む前記方法。

【請求項 7】

前記複数の粒子が、約 10 ～40 アレルゲンを含む、請求項 2 ～6 のいずれか 1 項に記載の方法又は装置。

【請求項 8】

前記特異的抗体が、免疫グロブリン E、免疫グロブリン G、及び免疫グロブリン G のサブクラスから選ばれる、請求項 2 ～4 のいずれか 1 項に記載の方法又は装置。

【請求項 9】

前記蛍光体がフィコビルリン・タンパク質である、請求項 3、4 又は 6 に記載の方法又は装置。

【請求項 10】

前記フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリンである、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 11】

前記フィコビルリン・タンパク質がフィコエリスリンである、請求項 9 に記載の方法又は装置。

【請求項 12】

前記第二の接合体が400,000から約1,000,000ダルトンまでの間の分子量を有する、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項13】

前記第一の特異的結合ペア・メンバーがビオチン及びジゴキシンから選択される、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項14】

前記ビオチンが抗ヒト抗体に約10:1～約30:1のモル比で接合している、請求項13に記載の方法又は装置。

【請求項15】

前記第二の接合体の第二の特異的結合ペア・メンバーがアビジン、ストレプトアビジン、及び抗ジゴキシンから選択される、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項16】

前記第1の特異的結合ペア・メンバーがビオチンであり、そして前記第2の特異的結合ペア・メンバーがストレプトアビジンである、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項17】

約1～約5 μ Lの容量をもつ、テストされるべき血液サンプルをさらに含む、請求項2、3又は5に記載の方法又は装置。

【請求項18】

前記ステップ(a)が、サンプルを、約2～約100特異的アレルゲンに結合させた複数の粒子と、接触させることにより行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項19】

前記第1コンジュゲート対第2コンジュゲートのモル比が、1:1～約1:5である、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項20】

前記の粒子に結合された抗体が、ポリクローナル抗ヒトIgEから選ばれる、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項21】

前記の粒子に結合された抗体が、免疫グロブリンEに特異的に結合する抗ヒトIgE断片である、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項22】

前記粒子に結合された抗体が、免疫グロブリンEに特異的に結合するモノクローナル抗体である、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法又は装置。

【請求項23】

前記アレルゲン特異的抗体が、前記血液サンプルを希釈せずに測定される、請求項4に記載の方法。

【請求項24】

前記方法で使用する血液サンプルを得ることを可能にするように血液採取キットを用意し、皮膚を刺して血液を取り、前記血液のサンプルを採取し、前記方法で使用するためにサンプルを提出することによって前記血液サンプルが得られる、請求項1、4又は6に記載の方法。

【請求項25】

前記第1コンジュゲート内の抗ヒトIgE抗体対第1結合ペア・メンバーのモル比が、約1:10～約1:30である、請求項6に記載の方法。

【請求項26】

サンプル中のアレルゲンに対する特異的抗体の存在又は全IgEに関するテストの実施及び提供方法であって：

(a) 皮膚を刺して血液を吸引し、前記血液のサンプルを採取し、該方法で使用するために前記サンプルを提出することにより、該方法で使用する血液サンプルを個体が提供で

きるようにする血液採取キットを用意するステップ；

(b) ステップ (a) からのサンプルにおける特異的アレルゲンに対する抗体の存在又は全 I g Eを検出する均質免疫分析を行うステップ；

(c) ステップ (b) からの免疫分析の結果をデータベースに入力するステップ；及び

(d) ステップ (c) のデータベース内の免疫分析の結果へのアクセスをグローバル・コンピュータ・システムのウェブサイト又はウェブページによって該個体に提供するステップ；

を含む前記方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/39111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : G01N 33/543, 551, 53

US CL : 436/518, 523, 524; 435/7.1, 975

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)

U.S. : 436/518, 523, 524; 435/7.1, 975

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EAST, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,268,222 B1 (CHANDLER et al.) 31 July 2001 (31.07.2001), see entire document.	1-86
Y	WILD et al. The Immunoassay Handbook, Signal Generation and Detection Systems. M stockton press. New York 1994, pages 63-82, see pages 76-77.	1-86
Y	WO 97/14028 A2 (LUMINEX CORPORATION) 17 April 1997 (17.04.1997), see pages 17-18, and 69-73.	1-86
A	US 5,981,180 A (CHANDLER et al.) 09 November 1999 (09.11.1999), see entire document.	1-86
A	US 6,087,188 A (JOHANSEN et al.) 11 July 2000 (11.07.2000), see entire document.	1-86
A	US 4,279,617 (MASSON et al.) 21 July 1981 (21.07.1981), see entire document.	1-86

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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 application or patent 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

"T"

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

10 March 2003 (10.03.2003)

Date of mailing of the international search report

31 MAR 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Gaby Collins *Helicia D. Robit*

Telephone No. 703-308-1235

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

G O 1 N 33/577

B

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,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,CH,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,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブラウン, クリストファー アール.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94403, サン マテオ, サラトガ ドライブ 3306

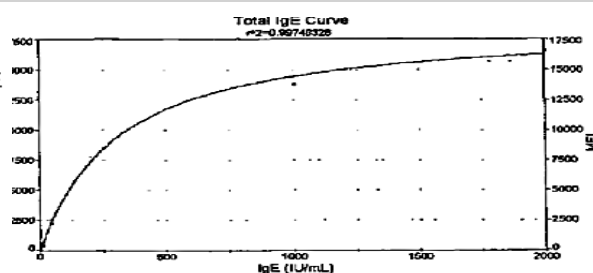
(72)発明者 ムライ, ジェイムス ティー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94066, サン ブルーノ, シークリフ ウェイ 2120

专利名称(译)	多种过敏原的均相免疫分析		
公开(公告)号	JP2005512091A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003551541	申请日	2002-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	李μ下来科技股份有限公司雷开球德		
申请(专利权)人(译)	李亩下来科技，Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ブラウンクリストファーアール ムライジェイムステイー		
发明人	ブラウン,クリストファー アール. ムライ,ジェイムス テイー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/582 G01N33/54313 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/53.U G01N33/542.A G01N33/543.575 G01N33/577.B		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘 西山雅也		
优先权	10/006483 2001-12-06 US		
其他公开文献	JP2005512091A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

均匀免疫测定方法和系统定量测定多种过敏原的总免疫球蛋白E和特异性抗体水平，仅需要相对少量的血液采样（图2）。该方法采用免疫测定夹心法，优选使用生物素 - 链霉抗生物素蛋白信号放大方法和R-藻红蛋白荧光标记。



Total IgE Assay Results		
Sample	Measured IgE Level	Expected IgE Level
1	22	28
2	> 2000	>2000
3	70.3	79
4	<2	<2
5	64	100
6	35	50
7	5	4
8	552	880
9	431	758