

(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2014-512535

(P2014-512535A)

(43) 公表日 平成26年5月22日(2014.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Q	4 B 0 6 3
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00 1 0 2	
<b>C 1 2 Q 1/28 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>C O 7 K 16/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 0 1 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-505716 (P2014-505716)  
 (86) (22) 出願日 平成24年4月17日 (2012.4.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月16日 (2013.12.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/050846  
 (87) 国際公開番号 W02012/143709  
 (87) 国際公開日 平成24年10月26日 (2012.10.26)  
 (31) 優先権主張番号 1106478.9  
 (32) 優先日 平成23年4月18日 (2011.4.18)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 513261587  
 マイクロテスト マトリシーズ リミテッド  
 イギリス, ロンドン エスタブリッシュメント  
 2 エーゼット, サウス ケンジントン  
 , エキシビション ロード, ベッセマー  
 ビルディング  
 (74) 代理人 100090033  
 弁理士 荒船 博司  
 (74) 代理人 100093045  
 弁理士 荒船 良男  
 (72) 発明者 クリザンティ, アンドレア  
 イギリス, ロンドン エスタブリッシュメント  
 9 ディービー, 29-31 アールズ  
 コート スクエア, フラット 3  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定法

(57) 【要約】

本発明は、試験試料に含まれる複数の抗原特異的免疫グロブリンを定量する方法であって、固相担体上に固定される抗免疫グロブリン抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体の段階希釈液を、標準免疫グロブリン試料の段階希釈液とともに使用して、複数の結合能曲線を作成する方法を提供する。これら抗原に対する反応度が既知の血清試料を用いて、結合能曲線と、試験対象である特定の抗原それぞれの用量反応曲線との照合を通して、試料中の抗原特異的免疫グロブリンのより正確な分析を可能にする校正システムを提供する。本発明はまた、固相担体上に固定された複数の抗原またはそのフラグメントに結合している複数の抗原特異的免疫グロブリンを測定する方法を提供する。更に、本発明は上記方法で使用するマルチアレルゲン試験システム及びキットを提供する。

【選択図】 図 2 A、図 2 B

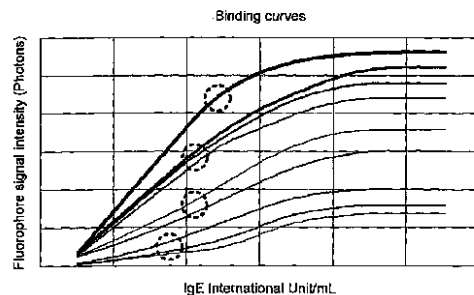


FIG. 2a

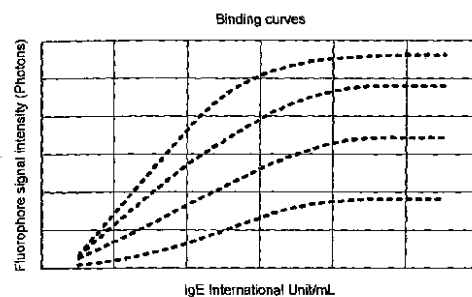


FIG. 2b

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試験試料中の複数の抗原特異的免疫グロブリンを定量する方法であって、

(i) 既知の抗原反応度を持つ免疫グロブリンを含む一連の試料と、第一の固相担体上に固定された複数の組換えもしくは精製抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、

(ii) 工程(i)で測定した結合度と前記既知の抗原反応度とを比較し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれの用量反応曲線を作成する工程、

(iii) 総免疫グロブリン量が既知の、工程(i)で使用された前記免疫グロブリンと同じサブタイプの標準免疫グロブリン試料の段階希釈液と、前記第一の固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液との結合を測定する工程、

(iv) 工程(iii)で測定した結合度と前記既知の総標準免疫グロブリン量とを比較し、前記抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液それぞれの結合能曲線を作成する工程、

(v) 工程(ii)で作成した前記用量反応曲線と工程(iv)で作成した前記結合能曲線とを対照し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて前記用量反応曲線と最も近似する結合能曲線を同定し、それに基づき結合能曲線を前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てる工程、

(vi) 前記試験試料中の前記抗原特異的免疫グロブリンと、前記第一の固相担体、前記第二の固相担体または第三の固相担体上に固定された前記組換えもしくは精製抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、及び

(vii) 前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて、工程(vi)で測定した結合度と工程(v)の前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てられた前記結合能曲線とを比較し、前記試験試料中の前記抗原特異的免疫グロブリンを定量する工程

を含む方法。

## 【請求項 2】

工程(iv)で作成した複数の前記結合能曲線を、異なる結合能、例えば超高結合能、高結合能、中結合能、及び低結合能をそれぞれ示す典型的ないくつかの結合能曲線に集約し、工程(v)の前記対照を、工程(iv)で作成した前記結合能曲線に代えて該典型的な結合能曲線と、工程(ii)で作成した前記用量反応曲線との間で行う、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

複数の抗原特異的免疫グロブリンと、固相担体上に固定された複数の抗原またはそのフラグメントとの結合を測定するのに適した装置を校正する方法であって、

(i) 既知の抗原反応度を持つ免疫グロブリンを含む一連の試料と、第一の固相担体上に固定された組換えもしくは精製抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、

(ii) 工程(i)で測定した結合度と前記既知の反応度とを比較し、前記抗原成分またはそのフラグメントのそれぞれについて用量反応曲線を作成する工程、

(iii) 総免疫グロブリン量が既知の、工程(i)で使用された前記免疫グロブリンと同じサブタイプの標準免疫グロブリン試料を含む段階希釈液と、前記第一の固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液との結合を測定する工程、

(iv) 工程(iii)で測定した結合度と前記既知の総標準免疫グロブリン量とを比較し、前記抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液それぞれの結合能曲線を作成する工程、

(v) 工程(ii)で作成した前記用量反応曲線と工程(iv)で作成した前記結合能曲線とを対照し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて前記用量反応曲線と最

10

20

30

40

50

も近似する結合能曲線を同定し、それに基づき結合能曲線を前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てる工程、及び

(vi) 工程(v)で得た結合能曲線を前記装置に入力し、各抗原の結合能曲線に、該抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを未知量含む試料からのシグナルを内挿できるようにする工程

を含む方法。

【請求項4】

工程(iv)で作成した複数の前記結合能曲線を、異なる結合能、例えば超高結合能、高結合能、中結合能、及び低結合能をそれぞれ示す典型的ないくつかの結合能曲線に集約し、工程(v)の前記対照を、工程(iv)で作成した前記結合能曲線に代えて該典型的な結合能曲線と、工程(ii)で作成した前記用量反応曲線との間で行う、請求項3に記載の方法。

10

【請求項5】

前記抗原はアレルゲンであり、前記免疫グロブリンはIgEであり、前記抗免疫グロブリン抗体は抗IgE抗体である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

固相担体上に固定された抗IgE抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液を含む、マルチアレルゲン試験システム。

【請求項7】

前記固相担体または第二の固相担体上に固定された組換えあるいは精製アレルゲン成分またはそのフラグメントを更に含む、請求項6に記載のシステム。

20

【請求項8】

請求項6または7に記載のシステム及び

i) 標準IgE試料

ii) 該IgEに結合する第一の抗体を含む第一の抗体調整物

iii) 前記第一の抗体に特異的に結合する第二の抗体を含む、第二の抗体調製物

iv) 前記第二の抗体に特異的に結合する第三の抗体を含む、第三の抗体調製物

の一以上を含むパーツのキットであって、

前記第二の抗体または前記第三の抗体が検出可能マーカーに結合している、キット。

【請求項9】

前記検出可能マーカーは酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)である、請求項8に記載のキット。

30

【請求項10】

前記検出可能マーカーが化学発光部分、放射性部分、または蛍光部分である、請求項8に記載のキット。

【請求項11】

前記固相担体がマイクロアレイチップである、請求項1～10に記載の方法、システムまたはキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、試料中のIgEを定量する免疫測定法、当該定量の実施に適した装置の校正方法、及び当該定量を行うためのシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

免疫測定法は、抗体の結合能を利用した方法であり、ある特定の抗原特異的抗体の試料中の存在について測定するため、よく利用される。この測定は、特定の抗原を表面に固定した固相担体上に試料を注いで洗い、次いで結合した抗体を種々の技術を用いて可視化することによって行われる。

【0003】

50

免疫測定法では通常、未知の試料についてその値や濃度を決定するための標準物質 (calibrators) の使用が必要である。旧来の免疫測定法では、1セットの標準物質を用い、シグナル対濃度の校正曲線 (検量線、calibration curve) を1つ作成し、未知の試料の濃度を当該校正曲線への内挿 (interpolation) によって決定する。

#### 【0004】

アレルギー状態は、無害な環境抗原に対する不適当で過剰な免疫応答であることを特徴とする。そのような抗原は、アレルゲンと総称される。アレルゲンへの免疫応答のうち感作相第1段階は、(i) 抗原提示細胞 (APCs) によるアレルゲンの処理、(ii) APCs による、処理されたアレルゲンのナイーブヘルパーT細胞 (ナイーブTh0細胞) への提示、(iii) ナイーブTh0細胞のTh2細胞への分化、及び(iv) Th2細胞によるB細胞の刺激とその刺激によるB細胞からのアレルゲン特異的IgEの産生と分泌、からなる。

10

#### 【0005】

アレルゲンは、自身に特異的なIgE産生を引き起こす刺激となる。IgE抗体は、2種類の細胞、すなわち、ヒスタミンを内包する顆粒を含む、肥満細胞及び好塩基球と相互作用可能な分子である。

#### 【0006】

感作相を引き起こしたアレルゲンと同じアレルゲンが2度目に個体内に入り対応する肥満細胞及び好塩基球に認識されると、そのアレルゲンは、惹起相として知られるアレルギー機序の第二段階を引き起こす。そのアレルゲンは、肥満細胞及び好塩基球の表面上に存在する自身に特異的なIgEに結合し、それら肥満細胞及び好塩基球の脱顆粒及びヒスタミンの分泌へとつながる機構の引き金となる。これは、典型的アレルギー反応である炎症反応の要因となる。それに続くアレルギー反応の重篤度は、当該個体の持つアレルゲン特異的IgEの量に応じたものとなる。従って、アレルギーを持つ (またはアトピーの) 個体を特定しそのアレルギー特性を把握するために、ある特定のアレルゲンによって生じた個体内のIgE検出とその濃度定量は重要である。

20

#### 【0007】

アレルギー診断における定量的免疫測定法では通常、世界保健機構 (WHO) の国際標準品 (International Reference Preparation) 75/502を用いてまたは参照して、校正システムを構築する。この国際標準品は、IgEの反応度が所与のヒト血清フリーズドライ試料である (Kontis K.ら(2006) Correlation of the Turbo-MP RIA with ImmunoCAP FEIA for Determination of Food Allergen-Specific Immunoglobulin-E. Ann Clin Lab Sci. 36(1):79-87; Bousquet J.ら(1990) Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: A new automated specific IgE assay. J Allergy Clin Immunol. 85(6):1039-43; 本標準品情報は以下参照:<http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/75-502.pdf>)。

30

40

#### 【0008】

アレルゲン特異的IgE抗体の反応測定値は、典型的には総IgE (total IgE) 校正曲線 (WHO国際標準品) に照らして求められ、リットルあたりのAllergen specific Units (kUA/l) を単位とした濃度で表される。IgE標準曲線 (参照曲線、reference curve) は、試験に供される全てのアレルゲンの用量反応曲線を描くために用いられるが、この際、IgEとアレルゲンの用量反応曲線が同じ傾向を示すよう、免疫測定用固相担体上に固定するアレルゲン成分の濃度を最適化する必要がある。用量反応曲線の観点からのアレルゲン濃度最適化は、異なる濃度のアレルゲンを既知の反応度を持つ複数試料のパネルを用いて試験し、得られた用量反

50

応曲線の形状と傾きが、総 I g E 曲線 ( W H O 国際標準品 ) を用いて作成したものと類似するようなアレルゲン濃度を決定することで行われる。

【 0 0 0 9 】

アレルギー性疾患の診断に現下使用されている免疫測定法には、放射性アレルゲン吸着法 ( R A S T )、酵素結合免疫吸着法 ( E L I S A )、及び I m m u n o C A P などがある。

【 0 0 1 0 】

R A S T では、固相のペーパーディスクにアレルゲン ( または他の抗原 ) を共有結合させ、次いでそのペーパーディスクを、アレルギー状態について試験する患者由来の血清とともにインキュベートする。上記共有結合したアレルゲンに対する抗体がその血清に含まれていれば、それら抗体はそのアレルゲンと反応し、その抗体結合は放射標識された抗 I g E 抗体によって可視化される。R A S T の原型では、試験結果は、異種抗シラカバ花粉 I g E 標準曲線への内挿で求められ、クラスまたは任意の単位を用いて表される。標準曲線は、ペーパーディスクに結合したシラカバアレルゲンを、既知の反応度を有する血清試料とともにインキュベートし、既知の I g E 濃度に対して得られたシグナルをプロットして得る。W H O / N I B S C ( 世界保健機構 / 英国立生物学的製剤研究所 ) 国際標準品 I g E は、上記のように、このシラカバアレルゲンを用いた標準系における校正によく使用される。

10

【 0 0 1 1 】

同様に、E L I S A ではアレルゲン ( または他の抗原 ) は固相 ( 典型的にはプラスチックのマルチウェルプレート ) に吸着され、試験対象の患者由来血清とともにインキュベートされる。血清試料に含まれる I g E と上記吸着されたアレルゲンとの結合は、上記吸着されたアレルゲンに結合した I g E と酵素結合抗 I g E 抗体とともにインキュベートし、次いで当該酵素に適した基質を加えることで可視化される。その基質の触媒作用によってプレート上で色の変化が起きる。発色の強さを測定しそれを標準曲線に内挿することで、血清中の I g E の定量が可能となる。標準曲線は、E L I S A 用ウェルを捕捉用抗 I g E 抗体でコーティングし、当該抗体をまず W H O / N I B S C 国際標準品 I g E スタンダード試料とともにインキュベートし、次いで酵素結合抗 I g E 抗体及び適当な基質とともにインキュベートすることで得る。捕捉用抗 I g E 抗体の濃度は標準用ウェル間で一定であり、標準品 I g E 量を漸増して標準曲線を得る。

20

30

【 0 0 1 2 】

E L I S A の例として、9 6 ウェルのフラットプレートの底部に配置したペーパーディスクに吸着された単一濃度のアレルゲン、及び単一濃度の捕捉用抗ヒト I g E でコーティングされたディスクからなる、A L L E R G O P H A R M A 社の E L I S A R V - 5 キットがある。アレルゲンでコーティングされたディスクは患者の血清とインキュベートされ、一方で、捕捉用抗 I g E 抗体でコーティングされたディスクは W H O / N I B S C 国際標準品由来のヒト I g E とハイブリダイズされる。標準曲線は、捕捉用抗 I g E でコーティングされたウェルから得られるシグナル強度を既知の W H O / N I B S C I g E 濃度に対してプロットすることで得る。H Y C O R 社のアレルギー試験用全自動酵素免疫測定法 ( E I A ) も、同じ原理によるものである。

40

【 0 0 1 3 】

P H A D I A 社による C A P 法 ( 標準法 ( r e f e r e n c e m e t h o d ) )、すなわち I m m u n o C A P は、上記の方法と、固相の性質において本質的に異なる。I m m u n o C A P では、固相は C N B r 活性化セルロース誘導体であり、これは他の基質より高い結合能を持つ ( D a v i d W . ( 2 0 0 6 )、T h e i m m u n o a s s a y h a n d b o o k、E l s e v i e r 社出版)。対象となるアレルゲンは、カプセル内に収められた親水性担体ポリマーと共有結合される。この担体は、高いタンパク質結合能を持つセルロース誘導体からなる。I m m u n o C A P は患者血清中の特定の I g E と反応でき、未結合の I g E を洗浄で除いた後、酵素標識抗 I g E 抗体を添加すると複合体が形成される。その複合体が蛍光基質とともにインキュベートされる。E L I S A の場合と

50

同様に、その発色強度を校正のための血清総異種 I g E 用量反応曲線に内挿し、血清中のアレルゲン特異的 I g E の量的指標が得られる。この測定は I g E の W H O 標準品に照らして校正を行うもので、2 セットの標準物質、すなわち 0 . 3 5 ~ 1 0 0 k U A / l ( 特定の I g E 抗体及び低濃度範囲の総 I g E 用 ) 及び 2 0 0 0 k U A / l ( 広範囲の総 I g E 用 ) を含む。抗 I g E は、用量反応曲線の初期傾斜を同じくしつつ広範囲の測定を可能にするように設計されている。全ての固相化アレルゲンは各々、その測定範囲に対して最大用量内、最大反応内、及び低バックグラウンドノイズとなるよう最適化される。

【 0 0 1 4 】

P H A D I A 社製 I m m u n o C A P I S A C キットは、マイクロアレイによるアレルギー診断試験である。これは昨今のバイオチップ技術に基づいている。I m m u n o C A P I S A C は小型の免疫測定プラットフォームであり、多様なアレルゲン成分に対する特異的 I g E 抗体を多重測定できる。精製された天然または組換えアレルゲン ( 4 0 の一般的なアレルゲンソース ) 成分は、固相担体 ( バイオチップ ) 上に固定される。この試験は 2 ステップアッセイである。まず、患者血清由来の I g E 抗体が、固定されたアレルゲン成分に結合する。次に、短時間の洗浄を経て、アレルゲンに結合した I g E 抗体が蛍光標識抗 I g E 抗体によって検出される。I m m u n o C A P I S A C は半定量分析であり、結果は I S A C 標準化単位 ( I S A C S t a n d a r d s U n i t s 、 I S U ) で表される。

10

【 0 0 1 5 】

D e i n h o f e r ら ( 2 0 0 4 ) M e t h o d s : 3 2 : 2 4 9 - 2 5 4 には、マイクロアレイ技術をマルチアレルゲン試験システムに適用することが記載されている。

20

【 0 0 1 6 】

E P 1 3 2 2 9 6 0 B 1 には、マイクロアレイを用いたアレルゲン試験システム記載されている。

【 0 0 1 7 】

本明細書に記載される先に発行された文献またはその議論は、必ずしもその文献が技術水準または技術常識であると認めるものではないと解釈されるべきである。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 8 】

本発明は上記の免疫測定法における課題を解決しようとするものである。本発明は、試験試料中の I g E の定量のためのより正確な免疫測定法を提供する。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 9 】

本発明の第一の側面によると、試験試料中の複数の抗原特異的免疫グロブリンを定量する方法であって、

( i ) 既知の抗原反応度を持ち、前記試験試料中の免疫グロブリンと同じサブタイプである免疫グロブリンを含む一連の試料、例えば一連の血清試料と、第一の固相担体上に固定された複数の組換えもしくは精製抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定 ( a s s a y ) する工程、

40

( i i ) 工程 ( i ) で測定した結合度 ( ( 量的 ) レベル、 l e v e l ) と前記既知の抗原反応度とを比較し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれの用量反応曲線を作成する工程、

( i i i ) 総免疫グロブリン量が既知の、工程 ( i ) で使用された前記免疫グロブリンと同じサブタイプの標準 ( r e f e r e n c e ) 免疫グロブリン試料の段階希釈液と、前記第一の固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液との結合を測定する工程と、

( i v ) 工程 ( i i i ) で測定した結合度と、前記既知の総標準免疫グロブリン量とを比較し、前記抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液それぞれの結合能曲線を作成する工程、

50

(v) 工程 (ii) で作成した前記用量反応曲線と工程 (iv) で作成した前記結合能曲線とを対照し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて前記用量反応曲線と最も近似する結合能曲線を同定し、それに基づき結合能曲線を前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てる工程、

(vi) 前記試験試料中の前記抗原特異的免疫グロブリンと、前記第一の固相担体、前記第二の固相担体または第三の固相担体上に固定された前記組換えもしくは精製抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、及び

(vii) 前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて、工程 (vi) で測定した結合度と工程 (v) の前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てられた前記結合能曲線とを比較し、前記試験試料中の前記抗原特異的免疫グロブリンを定量する工程

10

を含む方法が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0020】

既知の免疫グロブリン反応度を持つ試料は、特定の抗原に対する免疫グロブリンの反応度が既知である試料であれば任意である。好ましくは、試料は既知の I g E 反応度を持つ。試料の反応度は、本発明の方法に当該試料を使用する前に適当な免疫測定法によって決定される。当業者にはその方法はよく知られるものである。適当な免疫測定法は、例えば E L I S A 等の上述の方法が挙げられる。好ましくは、試料は血清試料、例えばヒト血清試料である。この反応度は、ミリリットル当たりの国際単位 ( I U / m l ) で表されてよい。用量反応曲線は例えば、免疫測定で得られた蛍光色素分子のシグナル強度を、国際単位 ( I U / m l ) で表される I g E 反応度に対しプロットして作成する。

20

【0021】

工程 (i) で使用される一連の試料は、複数試料のパネル ( a p a n e l o f s a m p l e s ) を含む。各試料は、一以上の固定された抗原またはほかの抗原と反応できる。この工程は、異なる試料間の相異なる性質、つまり同じ抗原に対し相異なるレベルの反応度を持つことが出来る点を利用しており、各抗原への結合度の違いが広範囲に亘るようにしている。例えば、試料 1 は抗原 A に対し反応度 x を持ち、試料 2 は抗原 A に対し反応度 y を持ち、試料 3 は抗原 A に対し反応度 z を持ってよい。これら試料 1 ~ 3 の抗原 A に対する反応度をそれぞれ曲線にプロットすると、用量反応曲線が得られる。従って、同じ抗原及び異なる抗原に対し相異なる反応度を持つこれら複数の試料は、本発明の方法において工程 (i) の後の工程で使用される固定された抗原それぞれの用量反応曲線を作成するのに使用される。

30

【0022】

既知の反応度を持つ試料、及び/または試験試料は、罹患体 ( p a t i e n t ) 、例えばヒトから得ることを想定しており、血清試料、全血試料、血漿試料、リンパ液試料、脳脊髄液試料、骨髄試料、肺吸引試料、尿試料、糞便試料、唾液試料、痰試料、組織試料、または免疫グロブリンを含むと考えられるその他の任意の試料であってよく、好ましくは、既知の I g E 反応度を持つ血清試料である。

【0023】

上記標準免疫グロブリン試料は、試験試料から検出したい免疫グロブリンのクラスに応じた適切なクラスの免疫グロブリンを含む。例えば、免疫測定法によって試験試料中の I g E を検出する場合、標準免疫グロブリン試料は既知総量の I g E を含む ( t o t a l I g E が既知である ) ことになる。標準免疫グロブリン試料は、免疫グロブリン総濃度が既知の免疫グロブリン試料であれば任意である。例えば免疫グロブリンが I g E の場合、標準 I g E 試料は W H O / N I B S C 国際標準品であってよい。総 I g E ( t o t a l I g E ) は、国際単位 ( I U ) / m l で表されてよい。

40

【0024】

免疫グロブリンは、I g G、I g A 及び/または I g M、または本発明の方法に使用可能なその他のサブクラスの免疫グロブリンであってよい。適切な抗免疫グロブリン抗体

50

を用いれば、上記異なるクラスの免疫グロブリンそれぞれについて、特定の抗原への結合能を示す結合能曲線が得られる。つまり、検出対象の免疫グロブリンのサブクラスが I g A である場合、標準免疫グロブリン試料と既知の反応度を持つ免疫グロブリン試料は適切な I g A を含み、抗免疫グロブリン抗体は抗 I g A である。

【 0 0 2 5 】

前記第一の側面の工程 ( i i i ) で使用される、第一の固相担体または別の固相担体上に固定された抗免疫グロブリン抗体のクラスは、検出対象である試験試料中の抗体のクラスに対応している。例えば、試験試料中のアレルゲン特異的 I g E 抗体が検出対象である場合、血清試料は既知の反応度を有する I g E を含み、標準試料は既知量の総 I g E ( t o t a l I g E ) を含むことになる。従って、抗免疫グロブリン抗体は抗 I g E 抗体とい  
10 うことになる。抗免疫グロブリン抗体の抗体サブクラスは、通常 I g G である。従って、抗免疫グロブリン抗体は抗 I g E、I g G 抗体であることが想定される。

【 0 0 2 6 】

本願において、用語「抗原」には、免疫グロブリンによって特異的に認識されるエピトープを含む任意の物質も含まれる。従って、抗原は天然抽出物由来であってよく、組換えタンパク質でも、天然抽出物またはその他の由来から精製されたタンパク質またはその他分子 ( 例えば多糖類など ) でもよい。抗原は、好ましくはアレルゲン、すなわち個体に接触した際その個体にアレルギー反応を起こし得ると認識されている抗原である。抗原は、特性の明らかにされたアレルゲンであっても、まだ特性の明らかにされていないアレルゲン  
20 であってもよい。また、抗原は I g E 分子に特異的に認識される任意の化合物でよい。

【 0 0 2 7 】

前述の固相担体上に含まれてよいアレルゲン成分として、例えば、チリダニの 1 種であるコナヒョウダニの主要アレルゲン分子 D e r p 1 及び D e r p 2、シラカバ花粉の主要アレルゲン分子 B e t v 1 及び B e t v 2、並びにオオアワガエリ花粉の主要アレルゲン分子 P h l p 1、P h l p 5、P h l p 2 及び P h l p 6 等が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

前記第一の側面の工程 ( i i ) では、固相担体上に含まれる抗原それぞれについて用量反応曲線を作成する。固相担体上の抗原の濃度は、適切な反応が得られるように最適化されてよい。抗原 ( 例えばアレルゲン ) の最適化は、最適な緩衝液を用いたタンパク質濃度の最適化でよい。抗原濃度の最適化と最適な緩衝液の選択は、本発明の方法を実施する前に  
30 予め行われる。各抗原について最適タンパク質濃度と当該タンパク質を希釈する最適緩衝液とを決定して、その抗原に対する既知の反応度を持つ試料と比較したとき反応度について最も近似するように、抗原最適化が行われる。固相担体上に固定される抗原を溶解し抗原濃度を最適化するのに適した緩衝液の例として、リン酸緩衝生理食塩水 ( p H 7 . 4 )、0 . 1 g / l の T w e e n 2 0 を含むリン酸緩衝生理食塩水 ( p H 7 . 4 )、及び / または 1 0 % グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水 ( p H 7 . 4 ) などが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

前記第一の側面の工程 ( i ) ~ ( i v ) が終わると、当業者は、固定された抗原それぞれの用量反応曲線、及び第一のまたはその他の固相担体上に存在する抗免疫グロブリン抗体  
40 の各濃度における結合能曲線を得ていることになる。つまり、2 つのグラフが作成されている。1 つ目は、各抗原への結合度と試料中の抗原特異的免疫グロブリンの既知の反応度との関係を表すもの ( 図 1 の I g E 含有試料の曲線例を参照 ) であり、二つ目は、抗免疫グロブリン抗体の希釈液それぞれへの結合度と標準試料中に存在する総免疫グロブリン濃度の増加との関係を表すもの ( 図 2 A の I g E 含有試料の曲線例を参照 ) である。

【 0 0 3 0 】

前記第一の側面の工程 ( v ) では、これら 2 種のグラフを対照し、各抗原の曲線に近似する各抗免疫グロブリン抗体濃度の曲線を決定する。この対照は目視で行ってもよいし、  
50 その他の手段、例えばコンピュータソフトウェアを使用して行ってもよい。

【 0 0 3 1 】

10

20

30

40

50

ある抗原試料がある抗免疫グロブリン抗体濃度と適合すれば、その免疫グロブリン濃度がその抗原に割り当てられ、のちに、その特定の抗原の結合能をより正確に示す、その抗原に係る標準曲線または校正曲線として使用される。従って、抗原に新たに割り当てられた結合能校正曲線を使用することで、その抗原に特異的な抗体の試験試料中の濃度がより正確に得られる。

#### 【0032】

本発明者らは、複数の抗原、特に複数のアレルゲンを免疫測定する際の校正にただ1つの標準曲線を使用するという当技術分野の標準的手法は、相異なる複数の抗原が示す相異なる結合能を描写するには適していないことを明らかにした。本発明者らは、既知のIgE反応度を持つ複数の血清試料の免疫測定を行う際、相異なる複数のアレルゲン抽出物とインキュベートして、各アレルゲンについて得られたデータから相異なる複数の用量反応曲線が得られることを発見した。これは、図1で例示するとおりである。例えばアレルゲン試験において、これまでのアレルゲン免疫測定法で使用されてきた校正システムは、複数のアレルゲンの多重測定において血清試料のIgE反応度に関する正確な定量的情報を得るには適していなかった。

10

#### 【0033】

本発明者らは、現行の免疫測定法の問題点に対処できる校正システムを提供し、より正確な定量的免疫測定法を提供することを目的とした。標準曲線を各抗原の結合能に基づいてそれぞれ各抗原に割り当てる本発明の工程は、試験試料中の特定の免疫グロブリンのより正確な定量を可能にする。アレルゲン試験等において、本発明は、これまでの方法に比べ用量反応の挙動をより正確に表すことが可能である。

20

#### 【0034】

上記結合能曲線を、免疫測定分析装置を制御するソフトウェアに今後のスタンダード(standard)として使用するためにロードしてよい。各定量に対する内部制御は、各定量におけるマイナーな環境由来変動を補うために使用できる。また一方で、新たな一群のアレルゲンを固相担体上に載置するための調製にあたって、本願で説明されるように、定量の正確性を確保するため結合能曲線を適切に調整、または新たな結合能曲線を作成してよい。このような精度調整作業は、当業者であればよく理解しているものである。

#### 【0035】

前記第一の側面の工程(vi)及び工程(vii)によって、その前の工程で作成された結合能曲線を利用して、試験試料中の抗原特異的免疫グロブリンを定量する。本発明の第一の側面において記載される固定された成分は全て、本発明の方法を実施するために使用される測定装置の要求に応じて、同じ固相担体上または異なる複数の固相担体上に固定されることが想定される。従って、抗原、捕捉用免疫グロブリン、ポジティブコントロール及びネガティブコントロール等の適切な固定された成分全てが、同じ固相担体、例えばチップ上に固定されてもよい。とはいうものの、クロスコンタミネーションを避けるために、各試料はそれぞれ異なる固相担体とともにインキュベートされることが想定される。従って、各測定(アッセイ)では複数の固相担体、例えばチップが使用されることになる。例えば、50の血清試料を固相担体上でインキュベートする場合、固定された適切な抗体/免疫グロブリン/コントロールを含む50個のそれぞれ独立した固相担体で使用されてよい。同様に、各標準試料も、クロスコンタミネーションを避けるためにそれぞれ異なる固相担体上でインキュベートされてよい。試料のインキュベーションの正確な手順は、当業者であれば理解するように、使用する測定装置に依存する。

30

40

#### 【0036】

好ましい態様では、標準免疫グロブリン試料(例えばWHO国際標準品IgE)が、最終免疫グロブリン濃度範囲が0.1~100 IU/mlとなるよう使用される。好ましくは、固相担体上に固定される抗免疫グロブリン抗体(例えば抗IgE抗体)は30~0.1 µg/mlの濃度範囲で使用される。

#### 【0037】

本願において、「免疫グロブリン」なる用語は「抗体」と同じ意味で用いられる。

50

## 【0038】

前記第一の側面は更に、工程(iv)で作成された複数の結合能曲線を、異なる結合能のレベル、例えば超高結合能、高結合能、中結合能及び低結合能を表す典型的な結合能曲線にグループ化して集約し、工程(v)の対照を、工程(iv)で作成された複数の結合能曲線に代えて工程(iv)で作成された前記典型的な結合能曲線と、工程(ii)で作成された複数の用量反応曲線との間で行う工程を含んでよい。

## 【0039】

上記更なる工程で少数の集約結合能曲線を作成することで、データ管理の簡単化が可能となり、従って校正の簡単化が可能となる。図2Bで例示されるようなこれら結合能曲線は、将来の試料分析のために免疫測定装置のソフトウェアに記憶されてよい。

10

## 【0040】

「抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体」との表現は、当該抗体には、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えばFab分子(Fab-like molecules)、Fv分子(Fv molecules)、 $V_H$ と $V_L$ のパートナードメインとが屈曲性(flexible)オリゴペプチドを介してリンクしている一本鎖Fv分子(ScFv molecules)、または単離されたVドメインを含む単ドメイン抗体(dAbs)なども含まれるという意味で用いられる。加えて、上述したような選択的結合特性を有する任意のリガンドも含まれる。

## 【0041】

本発明の第二の側面によると、本発明は、複数の抗原特異的免疫グロブリンと複数の抗原またはそのフラグメントとの結合を定量するのに適した装置の校正を行う方法であって、

20

(i) 既知の抗原反応度を持つ免疫グロブリンを含む一連の試料、例えば一連の血清試料と、第一の固相担体上に固定された複数の組換えもしくは精製抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、

(ii) 工程(i)で測定した結合度と前記既知の反応度とを比較し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて用量反応曲線を作成する工程、

(iii) 総免疫グロブリン量が既知の、工程(i)で使用された前記免疫グロブリンと同じサブタイプの標準免疫グロブリン試料の段階希釈液と、前記第一の固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液との結合を測定する工程、

30

(iv) 工程(iii)で測定した結合度と前記既知の総標準免疫グロブリン量とを比較し、前記抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液それぞれについて結合能曲線を作成する工程、

(v) 工程(ii)で作成した前記用量反応曲線と、工程(iv)で作成した前記結合能曲線とを対照し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて前記用量反応曲線と最も近似する結合能曲線を同定し、それに基づき結合能曲線を前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てる工程、及び

(vi) 工程(v)で得た結合能曲線を前記装置に入力し、前記各抗原の結合能曲線に、前記抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを未知量含む試料から得られたシグナルを内挿できるようにする工程

40

を含む方法を提供する。

## 【0042】

前記第二の側面は更に、工程(iv)で作成された結合能曲線を異なる結合能、例えば超高結合能、高結合能、中結合能、低結合能を示す典型的な結合能曲線に集団化して集約し、工程(v)の対照を、工程(iv)で作成された結合能曲線に代えて前記典型的な結合能曲線と、工程(ii)で作成された用量反応曲線との間で行う工程を含んでよい。

## 【0043】

装置を前記第二の側面の方法で校正すれば、試験試料中の抗原特異的免疫グロブリンの測定(アッセイ)と定量に利用することが出来る。

50

## 【0044】

例えば、抗体に結合した抗原の可視化のため適切に処理されたマイクロアレイスライド（固相担体）は、ADAM装置（Microtest Matrices Ltd.）を用いて読み取ることが出来る。未加工データが収集され、用量反応曲線の算出に使用される。この装置のアウトプットは、マイクロアレイの全てのドットを列挙したテキストファイルである。それらドットは、マイクロアレイ上の座標、及びマイクロアレイ上のドットから放出された光子数である数値を用いて表現されている。Matlabのような数値計算環境を用い、読み取り機から得られたデータ全てを計算し用量反応曲線を描くための要素セットを作成する。ADAM装置はこれら要素を用いて、内部マスター校正曲線（internal Master Calibration Curve）を作成し、構成ファイルに内挿する。

10

## 【0045】

前記第一及び第二の側面の好ましい実施形態では、抗原はアレルゲンであり、免疫グロブリンはIgEであり、抗免疫グロブリン抗体は抗IgE抗体である。従ってこのような実施形態においては、本発明の方法を、患者の持つある特定のアレルゲンに対するアレルギーを検出する際、固相担体上に固定されたアレルゲン成分またはそのフラグメントに対するIgE反応度について患者由来の試料を測定することで実施できる。このような情報は特定のアレルゲンに対するアレルギーの診断の助けになると考えられる。

## 【0046】

固相担体上に固定されてよいアレルゲンは、例えば表1に挙げたアレルゲン等でよい。

20

## 【0047】

表1：アレルゲンのリスト

【表1】

アレルゲンのリスト		
<b>薬物</b>	F44 (イチゴ)	M2 (クラドスポリウム・ヘルバルム) ( <i>Cladosporium herbarum</i> )
C1 (ペニシリンG)	F45 (パン酵母)	M3 (アスペルギルス・フミガツス) ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ) (コウジカビ)
C2 (ペニシリンV)	F46 (コショウ)	M4 (ムコール・ラセモサス) ( <i>Mucor racemosus</i> ) (ケカビ)
C214 (アモキシシリン)	F49 (リンゴ)	M5 (カンジダ・アルビカンス) ( <i>Candida albicans</i> )
<b>ダニ類</b>		M6 (アルテルナリア・テナース) ( <i>Alternaria tenuis</i> )
D1 (ヤケヒョウダニ)	F74 (鶏卵)	M7 (ボトリティス・シネレア) ( <i>Botrytis cinerea</i> )
D2 (コナヒョウダニ)	F76 ( $\alpha$ -ラクトアルブミン)	M9 (フザリウム・モニリフォルメ) ( <i>Fusarium moniliforme</i> )
D3 (ヒョウヒダニ)	F77 ( $\beta$ -ラクトグロブリン)	M13 (フォーマ・ベタ) ( <i>Phoma betae</i> )
D70 (コナダニ)		M20 (ムコール・ムセド) ( <i>Mucor mucedo</i> )
D71 (サヤアシクダニ)	F83 (鶏肉)	<b>木本花粉</b>
D72 (ケナガコナダニ)	F84 (キウイ)	T2 (ハンノキ)
D73 (イエニクダニ)	F85 (セロリ)	T3 (シラカバ花粉)
<b>動物上皮</b>	F92 (バナナ)	T4 (ハシバミ)
E1 (ネコ毛)	F95 (モモ)	T5 (ヨーロッパブナ)
E2 (イヌ毛)	<b>草本花粉</b>	T6 (マウンテンシダー)
E3 (ウマ毛)	G1 (ハルガヤ)	T7 (カシ)
	G2 (ギョウキシバ)	T9 (オリーブ)
E78 (セキセイインコ羽毛)	G3 (カモガヤ)	T11 (プラタナス)
E81 (ヒツジ上皮)	G4 (ヒロハシノウケグサ)	T14 (ポプラ)
E82 (ウサギ上皮)	G5 (ホソムギ)	T901 (セイヨウトネリコ)
<b>食物アレルゲン</b>	G6 (オオアワガエリ)	T904 (サルヤナギ)
F1 (卵白)	G8 (ケンタッキー ブルーグラス)	<b>雑草花粉</b>
F2 (牛乳)	G12 (ライ麦栽培種)	W1 (ブタクサ)
F3 (タラ)	G14 (オーツ麦栽培種)	W6 (オオヨモギ)
F4 (小麦粉)	G15 (コムギ)	W8 (セイヨウタンポポ)
F7 (オート麦粉)	G18 (オオムギ)	W9 (ヘラオオパコ)
F8 (トウモロコシ粉)	<b>昆虫</b>	W20 (イラクサ)
F13 (ピーナッツ)	I1 (ミツバチ毒)	W21 (ヒカゲミズ)
F14 (ダイズ)	I3 (スズメバチ毒)	W32 (セイヨウアブラナ)
F16 (クルミ)		<b>精製タンパク質</b>
F17 (ヘーゼルナッツ)	I71 (小昆虫/蚊/ブヨ)	Bet v 1
F23 (エビ)	<b>職業性アレルゲン</b>	Phl p 5 (G6V)
	K81 (ベンジャミン)	Phl p 1
F26 (豚肉)	K82 (ラテックス)	Der p 1 (D1-I)
F27 (牛肉)	K87 ( $\alpha$ -アマミラーゼ)	Der p 2 (D1-II)
F31 (ニンジン)	K905 (HSA)	Bet v 2
F33 (オレンジ)	<b>カビ類</b>	Phl p 2
F35 (ジャガイモ)	M1 (ペニシリウム・ノタム ( <i>Penicillium notatum</i> )) (アオカビ)	Phl p 6

10

20

30

40

第三の側面では、本発明は、固相担体上に固定された複数の抗 I g E 抗体、そのフラグメント、またはその誘導体の段階希釈液を含むマルチアレルゲン試験システムを提供する。このようなマルチアレルゲン試験システムは、先に述べてきた本発明の側面における方法で使用することが出来る。

【 0 0 4 9 】

前記第三の側面の実施形態では、前記試験システムは更に、前記固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の組換えもしくは精製アレルゲン成分またはそのフラグメントを含んでよい。

【 0 0 5 0 】

第四の側面では、本発明は、前記第三の側面によるマルチアレルゲン試験システム、及び

10

- i) 標準 I g E 試料、
  - ii) 当該 I g E を結合する第一の抗体を含む第一の抗体調製物、
  - iii) 前記第一の抗体を特異的に結合する第二の抗体を含む第二の抗体調製物、及び
  - iv) 前記第二の抗体を特異的に結合する第三の抗体を含む第三の抗体調製物
- のー以上を含むパーツのキットであって、前記第二の抗体または前記第三の抗体のどちらか一方は検出可能マーカーと結合している、キットを提供する。

【 0 0 5 1 】

前記第四の側面の実施形態では、前記検出可能マーカーは、当業者であれば分かるように、酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ ( H R P ) またはアルカリ性フォスファターゼでよい。H R P の適切な基質は、発色性基質 (例えば 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B )、3 , 3 ' - ジアミノベンジジン ( D A B ) 及び 2 , 2 ' - アジノ - ビス ( 3 - エチルベンズチアゾリン - 6 - スルホン酸 ) ( A B T S ) )、及び化学発光基質 (例えば S u p e r S i g n a l a 及び E C L ) などが挙げられる。特に好ましい基質は、A l e x a 5 5 5 フルオロフォア標識チラミドである。

20

【 0 0 5 2 】

前記第四の側面における他の実施形態では、前記検出可能マーカーは、化学発光部分 ( m o i e t y ) (例えばアクリジニウムエステル化合物)、放射性部分 ( m o i e t y ) (例えば  $^{32}P$ )、または蛍光部分 ( m o i e t y ) (例えばフルオロセイン ( F I T C ) ) であってよい。当業者には、そのほかの適切な検出可能標識、並びにそれらの検出方法及びそれらの抗体への結合方法も、よく知られている。

30

【 0 0 5 3 】

本発明のいずれの側面における実施形態でも、固相担体はマイクロアレイチップであってよい。適切なマイクロアレイチップは次のように構築されてよい。まず、タンパク質溶液 (すなわち抗原) を、タンパク質保存液を最適な緩衝液 (予め選択されている、先の記載参照) で最適な濃度まで希釈して調製する。当業者であれば理解するように、それぞれの抗原の最終濃度は互いに異なってよい。次いで、タンパク質溶液を 3 8 4 ウェルプレートに充填する。そしてこのプレート及び固相担体をプリンタ、例えば非接触ピエゾ式プリンタ内に設置する。このプリンタでウェルから上記溶液を吸い出すための複数のノズルを操作し、その後それらウェルからの溶液が液滴で上記固相基板 (すなわちマイクロアレイ) に分注される。各溶液が分注された後は前記ノズルが洗浄され、次の溶液処理への準備を整える。このプリンタは、ストロボスコープと呼ばれるカメラを備えている。このカメラは、分注されている液滴の写真を撮ることで溶液が正確に分注されているかを監視するものである。もし溶液が正確に分注されていないければ、ストロボスコープはその旨を報知する。マイクロアレイの作製にあたっては、任意の適切な光学担体を使用してよい。一般的には、ガラス担体またはその類似物が適切である。そのような担体は、多くの種類が当業者に知られている。

40

【 0 0 5 4 】

本発明の実施形態を、以下の図を参照し例を挙げて説明する。

【 図面の簡単な説明 】

50

【0055】

【図1】図1は、アレルゲン用量反応曲線を複数図示したものである。

【図2A】図2Aは、結合能曲線を複数図示したものである。

【図2B】図2Bは、本発明に係る統合した結合能曲線を図示したものである。

【0056】

#### 例1：結合能校正システムを利用した免疫測定法

マイクロアレイをプラットフォームとして使用した免疫測定法を用いた、血清中のアレルゲン特異的IgEの正確な定量に適した校正システムについて記載する。ここに記載する免疫測定法は、おおよそ100種含むアレルギーパネルに対応するおおよそ100種の相異なるアレルゲン性抽出物を含む。

10

【0057】

ここに記載する校正システムは、100種全てのアレルゲン性抽出物の用量反応の挙動を高い信頼度で表すことができる。各アレルゲン性抽出物は、互いに異なるIgE結合能を持つ、すなわち用量反応の傾きが異なる固有の化合物である。本発明の校正システムはこれら相異なる結合能を考慮に入れ、試料に含まれるアレルゲン特異的IgE量を正確に定量するものである。

【0058】

#### マイクロチップの例

ここに記載するシステムは、最大約103種のアレルゲンを測定するよう設計された小型化免疫測定法による、マイクロアレイを使用した試験である。これらアレルゲン性抽出物は化学的に活性化されたガラススライド上に固定され、複数のアレイが作成される。天然アレルゲン性抽出物はそれぞれ、最適な緩衝液（予め選ばれたもの）中に最適なタンパク質濃度で含まれ、マイクロアレイ上に配置される。加えて、このマイクロアレイは、ポジティブコントロール（例えばヤギ抗ネズミIgG）、ネガティブコントロール（例えばウシ血清アルブミンのような非特異的タンパク質）、及び捕捉用抗ヒトIgE（ヤギ抗ヒトポリクローナル抗体）の段階希釈液も複数含む。

20

【0059】

#### 抗原可視化プロトコルの例

以下は、血清試料または標準試料中のIgEの結合を可視化するプロトコル（この測定は、起こりうる環境条件のばらつきを制御するよう同時に、また用いる試薬を適宜同じくして行われる）の例であり、ここに記載するマイクロアレイに使用されてよい。

30

【0060】

個々のアレイはまずIgE試料（血清試料または標準試料）とともにインキュベートされ、次いで、IgEが血清試料または標準試料中に存在し且つスポット中のアレルゲンに結合した場合に当該ヒトIgEに結合する、抗ヒト（または、測定試料に応じた他の適切な抗体）IgEモノクローナル抗体（例えばマウス抗ヒトIgE IgG）とともにインキュベートされる。そして、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）と結合したヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体が上記アレイに加えられ、次にAlexa555フルオロフォア標識チラミドが加えられる。各抗体インキュベーション工程の間には、適切な洗浄が行われる。

40

【0061】

HRP酵素は、過酸化水素（ $H_2O_2$ ）の存在下、チラミド - Alexa555をHRP標的相互作用部位の周辺の求核残基と反応する高反応度で短寿命のチラミド - Alexa555ラジカルに変換する。これにより、結合したHRP酵素量に比例した強度で、特定波長（555 nm）の蛍光が発せられる。

【0062】

上述のポリクローナル抗体及びHRP - チラミド系（非線形シグナル増幅系）を使用することで、マイクロアレイ免疫測定試験の感度が著しく増加する。

【0063】

上記プロトコルによって、各アレルゲンスポットの蛍光強度が血清試料の濃度とともに

50

グラフ上にプロットされ、標準曲線へ内挿される曲線が得られ、I g E が定量される。

【0064】

本発明の校正方法

ここに記載する校正方法について、本発明のマイクロアレイチップを使用する下記の工程による例を挙げる。

【0065】

1. 各アレルゲンの用量反応曲線を同定する。既知のI g E 反応度を持つ複数の血清試料がマイクロアレイチップ上で試験に供される。アレルゲンから得られたシグナル強度が収集されアレルゲン用量反応曲線の作成に使用される。

【0066】

2. 一群の結合能曲線を作成する。複数のWHO/NIBSC国際標準品I g E (0.1 ~ 100 国際単位/ml) 段階希釈液がチップ上でインキュベートされる。I g E がスポットの捕捉用抗ヒトI g E に結合され、生じたシグナルの強度が測定され一群の結合能曲線の作成に使用される。曲線はそれぞれ捕捉用抗ヒトI g E の濃度の1つに対応しており、上記インキュベーションに使用されたWHO/NIBSC I g E 濃度を対応するシグナル強度に対してプロットしていくことで得られる。チップ上に存在する捕捉用抗ヒトI g E のスポット数に応じた数の結合曲線が得られる(図2A参照。図2Aでは、各曲線はアレイ上のスポットの捕捉用抗ヒトI g E の濃度の1つと対応しており、各曲線は、WHO/NIBSC I g E の濃度を対応するシグナル強度に対してプロットしたものである)。

【0067】

3. 結合能曲線を集約する。結合能曲線を、異なる結合能(例えば、超高結合能、高結合能、中結合能及び低結合能など)を表すグループごとに分ける。そして回帰曲線を各グループについて作成し、測定装置のソフトウェアに保存する(図2B参照。図2Bには、各グループに集約された結合能曲線が示されている)。

【0068】

4. アレルゲンに結合能曲線を割り当てる。上記1.に記載するアレルゲン用量反応曲線の傾きと形とに照らして、複数ある結合能曲線(マスターカーブ(合成曲線、Master Curves))から1つ決定され各アレルゲンに割り当てられる。

【0069】

5. アレルゲン特異的I g E の定量。この校正方法を使用し、マイクロアレイチップ上のスポットの特定のアレルゲンからのシグナル強度を前記対応付けられた結合能曲線に内挿することで、未知の患者血清の抗原特異的I g E 濃度を定量する。アレルギー反応度は、国際単位/ml及び/またはクラス値(Class Score)で表される。

【0070】

6. 各チップの内部制御(アジャスター)を使用することで、本システムは、上記4.に記載されるように作成されたマスター曲線(合成曲線、Master Curves)を調整して、スライドの保存条件及び環境条件を考慮に入れた用量反応内部曲線を作成することができる。アジャスターのシグナルに基づいてマスター校正曲線(合成校正曲線、Master Calibration Curve)を移動するアルゴリズムを実行することで内部校正を実行する。例えば、期待値が1000ユニットのシグナルが950であった場合、アルゴリズムによってマスター校正曲線が5%移動される。

【0071】

単一の校正曲線を使用する従来の典型的なアレルゲン免疫測定法と異なり、本発明の免疫測定システムは、各アレルゲンの結合能の違いを考慮に入れている。そのため、試料中のアレルゲン特異的I g E の定量のための測定の正確性が著しく向上する。

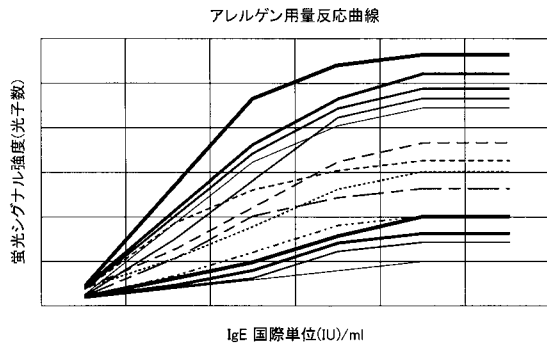
10

20

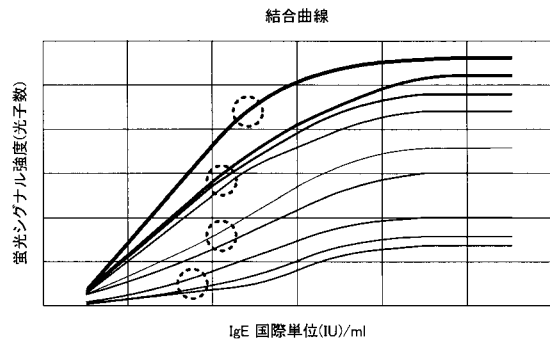
30

40

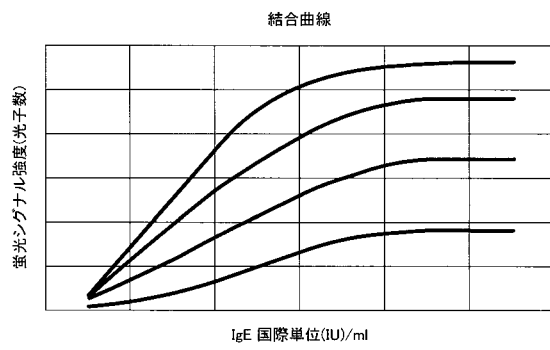
【 図 1 】



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成25年12月18日(2013.12.18)

## 【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】

試験試料中の複数の抗原特異的免疫グロブリンを定量する方法であって、

(i) 既知の抗原反応度を持つ免疫グロブリンを含む一連の試料と、第一の固相担体上に固定された複数の抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、

(ii) 工程(i)で測定した結合度と前記既知の抗原反応度とを比較し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれの用量反応曲線を作成する工程、

(iii) 総免疫グロブリン量が既知の、工程(i)で使用された前記免疫グロブリンと同じサブタイプの標準免疫グロブリン試料の段階希釈液と、前記第一の固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液との結合を測定する工程、

(iv) 工程(iii)で測定した結合度と前記既知の総標準免疫グロブリン量とを比較し、前記抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液それぞれの結合能曲線を作成する工程、

(v) 工程(ii)で作成した前記用量反応曲線と工程(iv)で作成した前記結合能曲線とを対照し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて前記用量反応曲線と最も近似する結合能曲線を同定し、それに基づき結合能曲線を前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てる工程、

(vi) 前記試験試料中の前記抗原特異的免疫グロブリンと、前記第一の固相担体、前記第二の固相担体または第三の固相担体上に固定された前記抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、及び

(vii) 前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて、工程(vi)で測定した結合度と工程(v)の前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てられた前記結合能曲線とを比較し、前記試験試料中の前記抗原特異的免疫グロブリンを定量する工程

を含む方法。

## 【請求項2】

工程(iv)で作成した複数の前記結合能曲線を、異なる結合能、例えば超高結合能、高結合能、中結合能、及び低結合能をそれぞれ示す典型的ないくつかの結合能曲線に集約し、工程(v)の前記対照を、工程(iv)で作成した前記結合能曲線に代えて該典型的な結合能曲線と、工程(ii)で作成した前記用量反応曲線との間で行う、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

複数の抗原特異的免疫グロブリンと、固相担体上に固定された複数の抗原またはそのフラグメントとの結合を測定するのに適した装置を校正する方法であって、

(i) 既知の抗原反応度を持つ免疫グロブリンを含む一連の試料と、第一の固相担体上に固定された抗原成分またはそのフラグメントとの結合を測定する工程、

(ii) 工程(i)で測定した結合度と前記既知の反応度とを比較し、前記抗原成分またはそのフラグメントのそれぞれについて用量反応曲線を作成する工程、

(iii) 総免疫グロブリン量が既知の、工程(i)で使用された前記免疫グロブリンと同じサブタイプの標準免疫グロブリン試料の段階希釈液と、前記第一の固相担体または第二の固相担体上に固定された複数の抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液との結合を測定する工程、

(iv) 工程 (iii) で測定した結合度と前記既知の総標準免疫グロブリン量とを比較して、前記抗免疫グロブリン抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液それぞれの結合能曲線を作成する工程、

(v) 工程 (ii) で作成した前記用量反応曲線と工程 (iv) で作成した前記結合能曲線とを対照し、前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれについて前記用量反応曲線と最も近似する結合能曲線を同定し、それに基づき結合能曲線を前記抗原成分またはそのフラグメントそれぞれに割り当てる工程、及び

(vi) 工程 (v) で得た結合能曲線を前記装置に入力し、各抗原の結合能曲線に、該抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを未知量含む試料からのシグナルを内挿できるようにする工程

を含む方法。

【請求項 4】

工程 (iv) で作成した複数の前記結合能曲線を、異なる結合能、例えば超高結合能、高結合能、中結合能、及び低結合能をそれぞれ示す典型的ないくつかの結合能曲線に集約し、工程 (v) の前記対照を、工程 (iv) で作成した前記結合能曲線に代えて該典型的な結合能曲線と、工程 (ii) で作成した前記用量反応曲線との間で行う、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗原は、任意に精製された、組換え抗原、天然抽出物由来抗原、またはその組み合わせである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗原はアレルゲンであり、前記免疫グロブリンは I g E であり、前記抗免疫グロブリン抗体は抗 I g E 抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

パーツのキットであって、

a) 固相担体上に固定された複数の抗 I g E 抗体、そのフラグメントまたはその誘導体の段階希釈液を含む、マルチアレルゲン試験システムであって、任意に前記固相担体または第二の固相担体上に固定された複数のアレルゲン成分またはそのフラグメントを更に含むシステム、及び

b) 下記の一以上

i) 標準 I g E 試料

ii) 該 I g E に結合する第一の抗体を含む第一の抗体調整物

iii) 前記第一の抗体に特異的に結合する第二の抗体を含む、第二の抗体調製物

iv) 前記第二の抗体に特異的に結合する第三の抗体を含む、第三の抗体調製物を含み、

前記第二の抗体または前記第三の抗体が検出可能マーカーに結合している、キット。

【請求項 8】

前記抗原は、任意に精製された、組換え抗原、天然抽出物由来抗原、またはその組み合わせである、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

前記検出可能マーカーは酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) である、請求項 7 または 8 に記載のキット。

【請求項 10】

前記検出可能マーカーが化学発光部分、放射性部分、または蛍光部分である、請求項 7 または 8 に記載のキット。

【請求項 11】

前記固相担体がマイクロアレイチップである、請求項 1 ~ 10 に記載の方法またはキット。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/050846

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/53 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2011/101670 A2 (MICROTEST MATRICES LTD [GB]; CRISANTI ANDREA [GB]; DOTTORINI TANIA [IT] 25 August 2011 (2011-08-25) page 22, line 25 - line 29 page 23, line 36 - page 24, line 7 ----- -/--	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 but 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		Date of mailing of the international search report
21 June 2012		28/06/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Routledge, Brian

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/050846
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARWANEGG CHRISTIAN ET AL: "Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, WALTER DE GRUYTER & CO, BERLIN, NEW YORK, vol. 43, no. 12, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 1321-1326, XP008137085, ISSN: 1434-6621, DOI: 10.1515/CCLM.2005.226 [retrieved on 2005-11-28] the whole document	6-11
X	DEINHOFER K ET AL: "Microarrayed allergens for IgE profiling", METHODS : A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 249-254, XP004488975, ISSN: 1046-2023, DOI: 10.1016/J.YMETH.2003.08.018 cited in the application the whole document	6-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/050846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011101670	A2	25-08-2011	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
 C 0 7 K 16/42 (2006.01) C 1 2 Q 1/28  
 C 0 7 K 16/00  
 C 0 7 K 16/42

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T  
 J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R  
 O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
 BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H  
 U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI  
 , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
 UZ, VC, VN

(72) 発明者 マッカーリ, マウロ  
 イギリス, ロンドン エスダブリュー 6 1 エスエル, 4 5 エー オンガー ロード

(72) 発明者 バルドラッチーニ, フランチェスカ  
 イギリス, ロンドン エヌ 1 2 エルダブリュー, 2 7 ヘアコート ロード, トップ フ  
 ロアー フラット

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ79 QQ96 QR48 QS26 QS33 QX02  
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA60 CA40 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	免疫测定法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014512535A</a>	公开(公告)日	2014-05-22
申请号	JP2014505716	申请日	2012-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
申请(专利权)人(译)	微量Matorishizu有限公司		
[标]发明人	クリザンティアンドレア マッカーリマウロ バルドラッチーニフランチェスカ		
发明人	クリザンティ, アンドレア マッカーリ, マウロ バルドラッチーニ, フランチェスカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 C12Q1/28 C07K16/00 C07K16/42		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/53 G01N33/6854 G01N2800/24		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/53.N G01N33/543.501.A C12Q1/28 C07K16/00 C07K16/42		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS26 4B063/QS33 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2011006478 2011-04-18 GB		
其他公开文献	JP5826917B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了定量包含的多个测试样本中的抗原特异性免疫球蛋白的一种方法，一种抗免疫球蛋白抗体或其片段或衍生物的系列稀释物被固定在固相支持物，免疫球蛋白标准与样品的连续稀释一起，产生多个结合能力曲线。针对使用已知的血清样品，并结合能力曲线，通过与特定抗原相匹配的剂量响应曲线，这些抗原的反应性将被测试的抗原特异性免疫球蛋白的一个更准确的分析样品中提供校准系统。本发明还提供了测量与固定在固体支持物或其片段上的多种抗原结合的多种抗原特异性免疫球蛋白的方法。此外，本发明提供了用于上述方法的多过敏原测试系统和试剂盒。（图2A），图2B

