

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-45384

(P2004-45384A)

(43) 公開日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/536	GO 1 N 33/536	F 4 B O 2 4
CO 7 K 16/06	CO 7 K 16/06	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02	GO 1 N 33/53	D 4 H O 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/577	B
GO 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00	C

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-131790 (P2003-131790)	(71) 出願人	000005821 松下電器産業株式会社
(22) 出願日	平成15年5月9日 (2003.5.9)		大阪府門真市大字門真1006番地
(31) 優先権主張番号	特願2002-148297 (P2002-148297)	(74) 代理人	100077931 弁理士 前田 弘
(32) 優先日	平成14年5月22日 (2002.5.22)	(74) 代理人	100094134 弁理士 小山 廣毅
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100110939 弁理士 竹内 宏
		(74) 代理人	100110940 弁理士 嶋田 高久
		(74) 代理人	100113262 弁理士 竹内 祐二
		(74) 代理人	100115059 弁理士 今江 克実

最終頁に続く

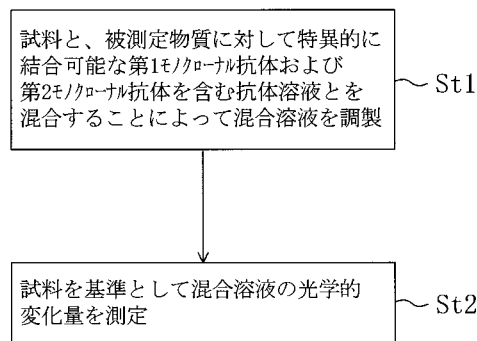
(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法、免疫学的測定装置、生体成分測定用トイレ、抗アルブミンモノクローナル抗体、それを産生する細胞株、およびアルブミン検出キット

(57) 【要約】

【課題】 試料中の特定成分の測定結果の信頼性が高い免疫学的測定方法を提供する。

【解決手段】 本発明の免疫学的測定方法は、試料中の被測定物質の含有量を測定する免疫反応測定方法であって、図1に示すように、試料と、被測定物質に対して特異的に結合可能な第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する工程St1と、上記混合溶液の光学特性を測定する工程St2とを含む。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中の被測定物質の含有量を測定する免疫反応測定方法であって、  
上記試料と、上記被測定物質に対して特異的に結合可能な第 1 モノクローナル抗体および  
第 2 モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する工  
程 ( a ) と、

上記混合溶液の光学特性を測定する工程 ( b ) とを含み、

上記第 1 モノクローナル抗体は、上記被測定物質の第 1 エピトープに結合可能であり、

上記第 2 モノクローナル抗体は、上記被測定物質の上記第 1 エピトープとは異なる第 2 エ  
ピトープに結合可能であり、

上記第 1 エピトープおよび上記第 2 エピトープは、それぞれ上記被測定物質に 1 つずつ存  
在する、免疫学的測定方法。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の免疫反応測定方法において、

上記光学特性は、散乱光強度または透過光量である、免疫反応測定方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の免疫学的測定方法において、

上記工程 ( a ) において、上記第 1 モノクローナル抗体および上記第 2 モノクローナル抗  
体のインヒビションの半値は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の範囲内にあるものの中  
から選択される、免疫学的測定方法。

20

**【請求項 4】**

請求項 1 に記載の免疫学的測定方法において、

上記抗体溶液中における上記第 1 モノクローナル抗体と上記第 2 モノクローナル抗体との  
分子数比を変更する、免疫学的測定方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の免疫学的測定方法において、

上記被測定物質は、アルブミンである免疫学的測定方法。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載の免疫学的測定方法において、

上記工程 ( a ) において、上記抗体溶液は、第 3 モノクローナル抗体をさらに含み、

上記第 1 モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
受託番号 F E R M B P - 7 9 3 7 号から産生されるモノクローナル抗体であり、

上記第 2 モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
受託番号 F E R M B P - 7 9 3 8 号から産生されるモノクローナル抗体であり、

上記第 3 モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
受託番号 F E R M B P - 8 3 0 7 号から産生されるモノクローナル抗体である、免疫比  
濁測定方法。

30

**【請求項 7】**

請求項 5 に記載の免疫学的測定方法において、

上記工程 ( a ) において、上記抗体溶液は、第 3 モノクローナル抗体をさらに含み、

上記第 1 モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
受託番号 F E R M B P - 7 9 3 8 号より産生されるモノクローナル抗体であり、

上記第 2 モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
受託番号 F E R M B P - 8 3 0 8 号より産生されるモノクローナル抗体であり、

上記第 2 モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
受託番号 F E R M B P - 8 3 0 9 号から産生されるモノクローナル抗体である、免疫比  
濁測定方法。

40

**【請求項 8】**

試料中の被測定物質の含有量を測定するための免疫反応測定装置であって、

上記試料と、上記被測定物質に対して特異的に結合可能な第 1 モノクローナル抗体および

50

第2モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する調製手段と、

上記混合溶液の光学特性を測定する光学的測定手段とを備え、

上記第1モノクローナル抗体は、上記被測定物質の第1エピトープに結合可能であり、

上記第2モノクローナル抗体は、上記被測定物質の上記第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合可能であり、

上記第1エピトープおよび上記第2エピトープは、それぞれ上記被測定物質に1つずつ存在する、免疫学的測定装置。

【請求項9】

排泄物中の被測定物質の含有量を測定するための生体成分測定トイレであって、

排泄物または洗浄水と排泄物との混合物を、試料として採取する排泄物採取手段と、

上記試料と、上記被測定物質に対して特異的に結合可能な第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する調製手段と、

上記混合溶液の光学特性を測定する光学的測定手段とを備え、

上記第1モノクローナル抗体は、上記被測定物質の第1エピトープに結合可能であり、

上記第2モノクローナル抗体は、上記被測定物質の上記第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合可能であり、

上記第1エピトープおよび上記第2エピトープは、それぞれ上記被測定物質に1つずつ存在する、生体成分測定トイレ。

【請求項10】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である細胞株により産生される抗アルブミンモノクローナル抗体。

【請求項11】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である細胞株により産生される抗アルブミンモノクローナル抗体。

【請求項12】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である細胞株により産生される抗アルブミンモノクローナル抗体。

【請求項13】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である細胞株により産生される抗アルブミンモノクローナル抗体。

【請求項14】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である細胞株により産生される抗アルブミンモノクローナル抗体。

【請求項15】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である細胞株。

【請求項16】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である細胞株。

【請求項17】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である細胞株。

【請求項18】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である細胞株。

【請求項19】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である細胞株。

10

20

30

40

50

**【請求項 20】**

試料中のアルブミンを検出するためのアルブミン検出キットであって、  
第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含み、  
上記第1モノクローナル抗体は、抗アルブミンモノクローナル抗体であり、  
上記第2モノクローナル抗体は、抗アルブミンモノクローナル抗体で、且つ、標識物質により標識されており、  
上記第1モノクローナル抗体および上記第2モノクローナル抗体の少なくともいずれか一方は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である細胞株、および独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である細胞株からなる群から選択される、細胞株から産生される抗アルブミンモノクローナル抗体である、アルブミン検出キット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、試料中の特定成分の測定を行なう免疫学的測定方法に関する。

**【0002】****【従来技術】**

従来、試料中の特定成分（被測定物質）を、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に測定する方法として、抗体を用いた様々な免疫学的測定方法が提案されている。

**【0003】**

免疫学的測定方法の1つに免疫比濁法が知られている。免疫比濁法に用いられる測定用キット（マイクロアルブミン-HAテストワコー、和光純薬製）が市販されている。この測定用キットの構成は、緩衝液（50mMグッド緩衝液pH7.4）と抗体溶液とから構成されている。抗体溶液には、ウサギ由来抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体（1.5mgAb/ml）とマウス由来抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（4.0mgAb/ml）とが含まれている。測定の際には、緩衝液中で試料と抗体溶液とを作用させる。このとき、試料中にアルブミンが含まれる場合、アルブミンが抗ヒトアルブミン抗体と特異的に抗原抗体反応を起こして濁りを生じる。濁りの度合い（濁度）は試料中のアルブミン濃度に比例するので、濁度を測定することにより試料中のアルブミン量を求めることができる。

**【0004】**

上述の測定用キットで、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とを同時に用いるのは、前者の「濁度が高くなる」という特徴と、後者の「プロゾーン現象を起こしにくい」という特徴を組み合わせるためであると言われている。つまり、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とを組み合わせると同時に用いることによって、免疫比濁法の弱点である抗原過剰領域のプロゾーン現象を回避しながら、広い測定範囲を実現している（非特許文献1を参照）。

**【0005】**

上記のような免疫比濁法は、測定対象物質ごとに結合する抗体を選択することによって、様々な物質を測定することが原理的には可能である。例えば、抗体として、抗ヒトアルブミン抗体を選択すると、試料液中のアルブミン濃度を測定するセンサを作製することができる。

**【0006】**

アルブミンは、血液から血球などの有形成分を除いた残りである血漿中のタンパク質の約50%を占めるタンパク質である。アルブミンは、血液の浸透圧の維持、イオン、脂肪酸、一部のビタミン、色素および薬物の運搬、および末梢組織へのアミノ酸供給等の作用が

あることが知られている。しかし、糖尿病の合併症のひとつである糖尿病性腎症などによって腎機能に障害がおこると、アルブミンが尿中に漏出することが知られている。

【0007】

従って、尿中のアルブミン量を測定すれば、病態スクリーニング、治療効果の確認、予後の判定などが可能となる。このため、尿中のアルブミン量の測定が、糖尿病性腎症の早期発見のため、ならびに糖尿病の予後を診断するための重要な日常検査として近年広く普及している。尿中のアルブミン量の測定は、アルブミンに特異的に結合する抗体を用いる免疫学的手法によって実施することができる。

【0008】

従来、アルブミンに対する抗体として、ポリクローナル抗体である抗ヒトアルブミン血清が用いられてきた。従来のアルブミンの測定法のほとんどは、抗血清とアルブミンとの凝集反応による沈降線の有無または濁度の増加によってアルブミンを測定するものである。しかし、未精製の抗血清は、血清中の種々の抗原に対する種々の抗体を含むことが多いため、アルブミン以外の抗原に結合する可能性がある。そこで、測定において、アルブミン以外の抗原に誤って結合することを防ぐために、抗血清の精製を行ない、ヒト標準血清においてアルブミン以外の抗原に由来する反応が起こらないようにする。抗血清の精製は、未精製の抗血清中からヒト標準血清中のタンパク質に結合する抗体を取り除くために、通常、アフィニティークロマトグラフィーなどの手法を用いる。

10

【0009】

【非特許文献1】初田和由ほか、第28回日本臨床化学会要旨集、63、125ページ、(1988)。

20

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上述のような構成の免疫比濁法では、ポリクローナル抗体(つまり、抗血清)が使われている。通常、ポリクローナル抗体は免疫した動物の血液より採取した血清を精製したものである。そのため、作製方法は簡便であるが免疫した動物の系統、環境、体調などに抗体の特性が影響を受ける可能性が大きい。例えば、抗ヒトアルブミン血清を用いる場合、作製される抗ヒトアルブミン血清毎に含まれる抗ヒトアルブミン抗体の種類が異なる(例えば、エピトープが異なる)可能性があり、抗ヒトアルブミン血清毎にアルブミンとの反応性が変動するおそれがある。

30

【0011】

新たにポリクローナル抗体を作製するたびに得られる抗体の反応性が変動すれば、継続して同質の抗体を得ることが困難になる。従って、免疫比濁法により被検物質の測定を試みても、再現性のある結果が得られないおそれがある。

【0012】

本発明は、上記事情を鑑みてなされたものであり、試料中の特定成分の測定結果の信頼性が高い免疫学的測定方法を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明の免疫反応測定方法は、試料中の被測定物質の含有量を測定する免疫反応測定方法であって、上記試料と、上記被測定物質に対して特異的に結合可能な第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する工程(a)と、上記混合溶液の光学特性を測定する工程(b)とを含み、上記第1モノクローナル抗体は、上記被測定物質の第1エピトープに結合可能であり、上記第2モノクローナル抗体は、上記被測定物質の上記第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合可能であり、上記第1エピトープおよび上記第2エピトープは、それぞれ上記被測定物質に1つずつ存在する。

40

【0014】

モノクローナル抗体を産生する細胞株は、ほぼ永久に同一の抗体を作り続ける。このため、常に特性の均質な抗体が得られ、抗体溶液のロット間の差による特性のバラツキが抑制

50

される。従って、本発明によれば、被測定物質の測定結果の再現性が高く、得られる測定値の信頼性も向上する。

【0015】

上記光学特性は、散乱光強度または透過光量である構成としてもよい。

【0016】

上記工程(a)において、上記第1モノクローナル抗体および上記第2モノクローナル抗体のインヒビションの半値は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ の範囲内にあるものの中から選択される構成としてもよい。

【0017】

上記抗体溶液中における上記第1モノクローナル抗体と上記第2モノクローナル抗体との分子数比を変更する構成としてもよい。 10

【0018】

このことによって、測定可能な被測定物質の濃度範囲、検出感度を必要に応じて変更することができる。従って、測定可能な被測定物質の濃度範囲、検出感度を自在に設計することが可能となる。

【0019】

上記被測定物質は、アルブミンである構成としてもよい。

【0020】

上記工程(a)において、上記抗体溶液は、第3モノクローナル抗体をさらに含み、上記第1モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号から産生されるモノクローナル抗体であり、上記第2モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号から産生されるモノクローナル抗体であり、上記第3モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号から産生されるモノクローナル抗体である構成としてもよい。 20

【0021】

上記工程(a)において、上記抗体溶液は、第3モノクローナル抗体をさらに含み、上記第1モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号より産生されるモノクローナル抗体であり、上記第2モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号より産生されるモノクローナル抗体であり、上記第3モノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号から産生されるモノクローナル抗体である構成としてもよい。 30

【0022】

本発明の免疫反応測定装置は、試料中の被測定物質の含有量を測定するための免疫反応測定装置であって、上記試料と、上記被測定物質に対して特異的に結合可能な第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する調製手段と、上記混合溶液の光学特性を測定する光学的測定手段とを備え、上記第1モノクローナル抗体は、上記被測定物質の第1エピトープに結合可能であり、上記第2モノクローナル抗体は、上記被測定物質の上記第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合可能であり、上記第1エピトープおよび上記第2エピトープは、それぞれ上記被測定物質に1つずつ存在する。 40

【0023】

本発明の生体成分測定トイレは、排泄物中の被測定物質の含有量を測定するための生体成分測定トイレであって、排泄物または洗浄水と排泄物との混合物を、試料として採取する排泄物採取手段と、上記試料と、上記被測定物質に対して特異的に結合可能な第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する調製手段と、上記混合溶液の光学特性を測定する光学的測定手段とを備え、上記第1モノクローナル抗体は、上記被測定物質の第1エピトープに結合可能であり、上記第2モノクローナル抗体は、上記被測定物質の上記第1エピトープとは異なる第2 50

エピトープに結合可能であり、上記第1エピトープおよび上記第2エピトープは、それぞれ上記被測定物質に1つずつ存在する。

【0024】

本発明の抗アルブミンモノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である細胞株により産生される。

【0025】

本発明の別の抗アルブミンモノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である細胞株により産生される。

【0026】

本発明の別の抗アルブミンモノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である細胞株により産生される。

10

【0027】

本発明の別の抗アルブミンモノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である細胞株により産生される。

【0028】

本発明の別の抗アルブミンモノクローナル抗体は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である細胞株により産生される。

【0029】

本発明の細胞株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である。

20

【0030】

本発明の別の細胞株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である。

【0031】

本発明の別の細胞株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である。

【0032】

本発明の別の細胞株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である。

【0033】

本発明の別の細胞株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である。

30

【0034】

本発明の試料中のアルブミンを検出するためのアルブミン検出キットは、第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含み、上記第1モノクローナル抗体は、抗アルブミンモノクローナル抗体であり、上記第2モノクローナル抗体は、抗アルブミンモノクローナル抗体で、且つ、標識物質により標識されており、上記第1モノクローナル抗体および上記第2モノクローナル抗体の少なくともいずれか一方は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である細胞株、および独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である細胞株からなる群から選択される、細胞株から産生される抗アルブミンモノクローナル抗体である。

40

【0035】

モノクローナル抗体を産生する細胞株は、ほぼ永久に同一の抗体を作り続ける。このため、常に特性の均質なモノクローナル抗体が得られる。従って、本発明のアルブミン検出キットによれば、キットのロット間での特性のバラツキが抑制され、被測定物質の検出結果の再現性、信頼性が向上する。

50

## 【 0 0 3 6 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下、図を参照しながら本発明の実施の形態を説明する。図 1 は、本実施形態の免疫学的測定方法を表すフローチャートである。なお、本明細書中では、「免疫学的測定方法」との用語は、免疫比濁法および免疫比ろろ法を含む測定方法の総称である。

## 【 0 0 3 7 】

本実施形態の免疫学的測定方法は、試料中の被測定物質の含有量を測定する免疫反応測定方法であって、図 1 に示すように、試料と、被測定物質に対して特異的に結合可能な第 1 モノクローナル抗体および第 2 モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する工程 S t 1 と、上記混合溶液の光学特性を測定する工程 S t 2 とを含む。

10

## 【 0 0 3 8 】

次に、各工程を詳細に説明する。

## 【 0 0 3 9 】

まず、工程 S t 1 では、試料と抗体溶液を用意する。

## 【 0 0 4 0 】

試料としては、特に限定されないが、種々の疾病の診断のためには、尿、血液、排泄物、唾液などが挙げられる。

## 【 0 0 4 1 】

抗体溶液は、被測定物質に対して特異的に結合可能な第 1 モノクローナル抗体および第 2 モノクローナル抗体を含む。第 1 モノクローナル抗体は、被測定物質の第 1 エピトープに結合可能であり、第 2 モノクローナル抗体は、被測定物質の第 1 エピトープとは異なる第 2 エピトープに結合可能である。また、第 1 エピトープおよび第 2 エピトープは、それぞれ被測定物質に 1 つずつ存在し、複数箇所に存在するものではない。

20

## 【 0 0 4 2 】

このことによって、被測定物質が試料中に含まれているときには、被測定物質と第 1 モノクローナル抗体および第 2 モノクローナル抗体との抗原抗体反応による凝集複合体が生じる。被測定物質が試料中に含まれていないときには、被測定物質と第 1 モノクローナル抗体および第 2 モノクローナル抗体との抗原抗体反応による凝集複合体が生じない。

## 【 0 0 4 3 】

次に、工程 S t 2 では、混合溶液の光学特性を測定する。このとき、上記工程 S t 1 で凝集複合体が生じる場合には、上記反応系に濁りが生じ、散乱光強度および透過光量などに変化が生じる。従って、散乱光強度または透過光量などを測定することによって、混合溶液の濁りの程度を見積もることができる。ここで上記反応系から特異結合物質が除かれているものを基準にしながら、上記反応系の光学的变化量、つまり散乱光強度または透過光量の変化量を測定することが好ましい。また、反応系から試料が除かれているものを基準としてもよい。なお、混合溶液の光学特性は、散乱光強度または透過光量である。混合溶液の散乱光強度を測定すれば免疫比濁法、透過光量を測定すれば免疫比ろろ法となる。

30

## 【 0 0 4 4 】

一般に、ポリクローナル抗体は、ヤギやウサギなどの大型動物に免疫して、抗体価、アフィニティーが飽和したのを確認後、数ヶ月間、数回に分けてその血清を採取しこれを精製することによって得られる。従って、飽和アフィニティー以上のポリクローナル抗体ではもちろんのこと、飽和アフィニティー以下のポリクローナル抗体でもまた、品質を維持するのは難しい。このため、ポリクローナル抗体を用いる従来の方法では、抗体溶液の品質にバラツキが生じ、測定結果の再現性および測定値の信頼性も低くなる。

40

## 【 0 0 4 5 】

一方、モノクローナル抗体を産生する細胞株は、ほぼ永久に同一の抗体を作り続ける。このため、常に特性の均質な抗体が得られ、抗体溶液のロット間の差による特性のバラツキが抑制される。従って、本実施形態では、被測定物質の測定結果の再現性が高く、得られる測定値の信頼性も向上する。

50

## 【0046】

また、第1エピトープおよび第2エピトープは、それぞれ被測定物質に1つずつ存在し、複数箇所に存在しないので、1種類のモノクローナル抗体では免疫学的測定方法に不可欠な抗原抗体反応による凝集複合体がほとんど形成されない。本実施形態では、被測定物質におけるエピトープが互いに異なる2種類のモノクローナル抗体を混合して抗体溶液を用いている。勿論、被測定物質におけるエピトープが互いに異なる3種類以上のモノクローナル抗体を混合して抗体溶液を用いてもよい。なお、抗体溶液の製造の観点から、抗体溶液に含まれるモノクローナル抗体の種類を、20種類以下に抑えることがコスト的に好ましい。

## 【0047】

また、本実施形態の免疫学的測定方法において用いられるモノクローナル抗体のインヒビションの半値は、 $1 \times 10^{-11} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ の範囲内にあるものの中から選択されることが好ましい。

10

## 【0048】

なお、「インヒビションの半値」とは、インヒビションELISA法において、固相に固定された被測定物質に結合するモノクローナル抗体の量が、競合物質（インヒビター：ここでは被測定物質と同じもの）の添加によって、インヒビターの不存在下と比較して減少するときに、インヒビターの不存在下での吸光度（抗体結合量を反映する）の半分の吸光度が測定されるインヒビターの濃度をいう。

## 【0049】

さらに、被測定物質におけるエピトープおよびアフィニティーがそれぞれ互いに異なる3種類以上のモノクローナル抗体を含む抗体溶液を用いると、各モノクローナル抗体のエピトープおよびアフィニティーが複雑に絡み合って抗原-抗体複合物を形成する。このため、各モノクローナル抗体の分子数比によって凝集複合体の大きさ、濃度に差が生じる。従って、測定可能な被測定物質の濃度範囲、検出感度を必要に応じて変化させることができる。このことにより、測定可能な被測定物質の濃度範囲、検出感度を自在に設計することが可能となる。

20

## 【0050】

具体的には、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体である、抗体独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号（以下、7938株と称する）である細胞株が産生するモノクローナル抗体、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号（以下、8308株と称する）である細胞株が産生するモノクローナル抗体、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号（以下、8309株と称する）である細胞株が生産するモノクローナル抗体を混合した抗体溶液を用いてヒトアルブミンを測定すると、その分子数比によりヒト血清アルブミン濃度が低濃度であるときの感度を変化させることができる。

30

## 【0051】

なお、ELISAプレートに $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ にコートしたヒト血清アルブミンに対する上記各抗体の結合を阻害するアルブミン濃度の半値（インヒビションの半値）は、7938株由来のモノクローナル抗体（以下、7938抗体と称する）は $3.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、8308株由来のモノクローナル抗体（以下、8308抗体と称する）は $3.2 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、8039株由来のモノクローナル抗体（以下、8309抗体と称する）は $1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ である。

40

## 【0052】

また、アフィニティーが互いに異なる3種類以上のモノクローナル抗体を混合する場合、アフィニティーに互いに大きな差がある3種類以上のモノクローナル抗体を用いることがプロゾン現象を制御しやすい。

## 【0053】

具体的には、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体である、独立行政法人産業技術総合研

50

研究所特許生物寄託センター受託番号 F E R M B P - 7 9 3 8 号 (以下、7 9 3 8 株と称する) である細胞株が産生するモノクローナル抗体、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号 F E R M B P - 7 9 3 7 号 (以下、7 9 3 7 株と称する) である細胞株が産生するモノクローナル抗体、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号 F E R M B P - 8 3 0 7 号 (以下、8 3 0 7 株と称する) である細胞株が生産するモノクローナル抗体を混合した抗体溶液を用いてヒト血清アルブミンを測定すると、その分子数比によって、プロゾーン現象が生じるヒト血清アルブミン濃度を、1 0 m g / d l ~ 5 0 m g / d l の範囲内で変化させることができる。

【0054】

なお、E L I S A プレートに  $1 \times 10^{-7}$  M にコートしたヒト血清アルブミンに対する上記各抗体の結合を阻害するアルブミン濃度の半値 (インヒビションの半値) は、7 9 3 8 株由来のモノクローナル抗体 (以下、7 9 3 8 抗体と称する) は  $3.0 \times 10^{-9}$  M、7 9 3 7 株由来のモノクローナル抗体 (以下、7 9 3 7 抗体と称する) は  $5.5 \times 10^{-7}$  M、8 3 0 7 株由来のモノクローナル抗体 (以下、8 3 0 7 抗体と称する) は  $7.0 \times 10^{-8}$  M である。 10

【0055】

なお、本発明における「抗アルブミンモノクローナル抗体」には、その結合特性を保持した断片も含まれる。これらの断片は、それらが由来するインタクトな抗体とアルブミンへの特異的結合について競合し得、少なくとも  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup> の親和性で結合し得る。抗体の断片は、免疫グロブリンの重鎖、軽鎖、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F a b c および F v を含み得る。抗体の断片は、インタクトな免疫グロブリンの酵素的または化学的分離によって生じ得る。例えば、F ( a b' )<sub>2</sub> 断片は、H a r l o w および L a n e、A N T I B O D I E S : A L A B O R A T O R Y M A N U A L、C O L D S P R I N G H A R B O R L A B O R A T O R Y、N e w Y o r k ( 1 9 8 8 ) に記載されたような標準的な方法を用い、p H 3 . 0 ~ 3 . 5 においてペプシンでタンパク質消化することによって I g G 分子から得ることができる。F a b 断片は、限定的還元によって F ( a b' )<sub>2</sub> 断片から、あるいは還元剤の存在下パパイン消化によって全抗体から得ることができる ( P a u l、W . 編、F U N D A M E N T A L I M M U N O L O G Y 第 2 版 R a v a n P r e s s、N . Y .、1 9 8 9、第 7 章を参照のこと)。 20 30

【0056】

図 2 は、本実施形態の免疫学的測定方法に用いる測定装置を示す上面概略図である。

【0057】

本実施形態の測定装置 2 0 は、試料と、被測定物質に対して特異的に結合可能な第 1 モノクローナル抗体および第 2 モノクローナル抗体を含む抗体溶液とを混合することによって混合溶液を調製する調製手段 2 0 a と、上記混合溶液の光学特性を測定する光学的測定手段 2 0 b とを備える。第 1 モノクローナル抗体は、被測定物質の第 1 エピトープに結合可能であり、第 2 モノクローナル抗体は、被測定物質の第 1 エピトープとは異なる第 2 エピトープに結合可能であり、第 1 エピトープおよび第 2 エピトープは、それぞれ被測定物質に 1 つずつ存在する。 40

【0058】

本実施形態では、調製手段 2 0 a は、図 2 に示すように、固定ベース 2 とサンプルベース 3 とからなるサンプルセル 1 と、サンプルベース 3 にチュービングコネクタ 6 を介して接続された抗体溶液注入用チューブ 4 と、サンプルセル 1 内に配置された攪拌子 5 とから構成されている。

【0059】

固定ベース 2 にはマイクロスターラー 7 が組み込まれており、サンプルセル 1 内に配置された攪拌子 5 が回転するようになっている。固定ベース 2 の上面にサンプルセル 1 を固定することによって液体を保持できるサンプルセル 1 (光路長 1 0 m m) が形成される。サンプルセル 1 内には抗体溶液注入用チューブ 4 から、チュービングコネクタ 6 を介して抗 40 50

体溶液を注入できる構成となっている。

【0060】

光学的測定手段20bは、半導体レーザーモジュール8と、半導体レーザーモジュール8からサンプルセル1に向けて照射されるレーザービーム(波長:680nm、出力15mW、ビーム径約1.2mm)の45度前方散乱光(Sc45)と90度側方散乱光(Sc90)とを検出できるように配置されたフォトダイオードアレイ9および10とを備える。

【0061】

本実施形態では、それぞれの散乱光の検出感度を向上させるため、レーザービームを周波数270Hzでパルス変調して、散乱光を検出する各フォトダイオード9および10の出力信号を、各ロックインアンプ11および12で位相敏感検波する構成としている。これらのロックインアンプの出力信号を、各散乱光強度に相当する信号として測定することができる。

【0062】

(実施形態2)

近年の健康志向により、健康状態を家庭でリアルタイムにチェックができるニーズは大きな高まりを見せている。このニーズに対応するために、尿、血液などの体液中の健康指標物質をワンステップで、しかもニーズに対応した測定範囲、感度で測定できることが求められている。

【0063】

そこで、本実施形態では、健康状態を家庭でリアルタイムにチェックができる生体成分測定トイレを、図3を参照しながら説明する。

【0064】

本実施形態の生体成分測定トイレ30は、図3に示すように、排泄物(尿および便など)中の被測定物質の含有量を測定するための生体成分測定トイレであって、排泄物または洗浄水と排泄物との混合物を、試料として採取する排泄物採取手段30aと、上記実施形態2で説明した測定装置20とを備える。

【0065】

本実施形態では、排泄物採取手段30aは、洗浄水を出す洗浄ノズル31と、洗浄ノズル31から出た洗浄水で洗浄した中に含まれる使用者33から排泄された排泄物(便または尿)35を収納する排泄物収納手段34と、排泄物35を収納した排泄物収納手段34から測定装置20のサンプルセルに排泄物35を搬送するための搬送手段36とから構成されている。

【0066】

また、本実施形態では、測定装置20からの出力を、排泄物中における被測定物質の濃度に演算する演算装置37が設けられている。

【0067】

演算手段37で得られた生体成分の濃度等を表示するリモコンおよび通信手段を備える表示手段40、便座42、便器43、タンク44である。なお、図3では便座42に使用者33が座って排尿を行なう場合を示している。

【0068】

動作例として、本実施形態の生体成分測定トイレを使用して、尿中に含まれるアルブミンの測定を行なうための動作を説明する。

【0069】

使用者33からの排泄物35は、落下途中に設けてある排泄物収納手段34で収納され、搬送手段36により測定装置20のサンプルセル1に搬送され、あらかじめ抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体混合溶液(抗体の混合分子数比、7937抗体:7938抗体:8307抗体=4:3:3)をセットしておいた測定装置20でアルブミンを測定する。得られた測定値は、演算手段37に予め記憶されている検量線に基づいて濃度に換算され、表示手段40に表示される。

10

20

30

40

50

## 【0070】

なお、表示手段40に届いたアルブミン濃度は、必要に応じて、通信手段により健康管理センターなど使用者33の健康情報を管理する医療施設等に送られ、アドバイスなどを作成し、使用者33に健康アドバイスを送ることもできる。また、使用者33と医療施設等との契約により、作成されたアドバイスに基づいて、健康状態に適した食事、消耗品、サービスなどを医療施設等の管理下で使用者3に届けることもできる。

## 【0071】

(実施形態3)

本実施形態では、上記実施形態1で使用したモノクローナル抗体を用いたアルブミン検出キットを説明する。

## 【0072】

本実施形態のアルブミン検出キットは、試料中のアルブミンを検出するためのアルブミン検出キットであって、第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体を含み、第1モノクローナル抗体は、抗アルブミンモノクローナル抗体であり、第2モノクローナル抗体は、抗アルブミンモノクローナル抗体で、且つ、当該分野で公知の方法によって標識物質により標識されている。標識物質の例としては、酵素、色素、磁性体、放射性物質および着色粒子(金コロイド、ラテックスなど)などが挙げられる。

## 【0073】

また、第1モノクローナル抗体および第2モノクローナル抗体の少なくともいずれか一方は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7938号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8307号である細胞株、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8308号である細胞株、および独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-8309号である細胞株からなる群から選択される、細胞株から産生される抗アルブミンモノクローナル抗体である。

## 【0074】

上述の細胞株のうちのいくつかは、アルブミンに対して高い結合能を有するモノクローナル抗体を産生する。代表的な抗アルブミンモノクローナル抗体としては、受託番号FERM BP-7938号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体(7938抗体)が挙げられる。このようなモノクローナル抗体のアルブミンに対する結合能は、後述する実施例に記載されたインヒビションELISA法と実質的に同一の条件での測定においてインヒビションがかかり、インヒビションの半値が約 $1 \times 10^{-8}$  M以下であり得る。本実施形態のアルブミン検出キットで、上述のようなインヒビションの半値を有するモノクローナル抗体を使用する場合、溶液中のアルブミンを高感度で検出できる。さらに、従来では検出できなかった濃度のアルブミンを測定することができるため、臨床分野において新たな知見を得る有効な手段となり得る。なおここで「溶液」とは、尿、血液のような体液を含み得るが、これらに限定されない。

## 【0075】

一般には、溶液中の濃度が最高で約0.05~5.0 mg/Lの範囲のアルブミンを測定できることが知られている。しかしながら、例えば、本実施形態のアルブミン検出キットで7938抗体を用いた場合、溶液中の濃度が約0.0066~0.66 mg/Lのアルブミンを検出可能な感度を得られる。

## 【0076】

また、上記実施形態で説明した細胞株のうちのいくつかは、本実施形態のアルブミン検出キットに用いる場合に、溶液中の濃度が約30~300 mg/Lの範囲を超える濃度範囲のアルブミンの定量を可能にするモノクローナル抗体を産生する。代表的な抗アルブミンモノクローナル抗体としては、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター受託番号FERM BP-7937号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体(79

10

20

30

40

50

37抗体)が挙げられる。このようなモノクローナル抗体のアルブミンに対する結合能は、後述する実施例に記載されたインヒビションELISA法と実質的に同一の条件での測定においてインヒビションがかかり、インヒビションの半値が約 $1 \times 10^{-7}$  M ~ 約 $1 \times 10^{-5}$  Mである。特に、モノクローナル抗体のインヒビションの半値が $1 \times 10^{-6}$  M前後が好ましい。より好ましくは、インヒビションの半値は約 $1 \times 10^{-6.3}$  Mである。本実施形態のアルブミン検出キットで、上述のようなインヒビションの半値を有するモノクローナル抗体を使用する場合、溶液中の濃度が約30 ~ 300 mg/Lの範囲を超える濃度範囲のアルブミンの測定が可能である。

#### 【0077】

一般には、溶液中のアルブミン濃度の測定可能な範囲は、30 ~ 300 mg/Lであることが知られている。しかしながら、例えば、本実施形態のアルブミン検出キットで7937抗体を用いた場合、溶液中の濃度が約6.6 ~ 660 mg/Lのアルブミンを定量することが可能である。従って、糖尿病性腎症の検査のために尿中のアルブミン濃度を測定する際に、早期腎症と顕性腎症の境界領域である濃度も十分に測定することができる。このため、臨床分野において新たな知見を得る手段となり得る。また、上述のようなインヒビションの半値を有するモノクローナル抗体を使用する場合、1種類のモノクローナル抗体でアルブミンの濃度の測定範囲を広くカバーするので、アルブミン測定にかかる費用を廉価にできる。

#### 【0078】

本実施形態のアルブミン検出キットは、当該分野で公知である免疫学的手法が採用される。免疫学的手法としては、具体的には、ELISA法、RIA法、蛍光抗体法などが挙げられる。

#### 【0079】

アルブミンを高感度で検出するためには、高感度の抗体を用いたELISA法等が利用される。特にELISA法では、高アフィニティー抗アルブミン抗体が必要である。しかしながら、免疫した動物の体調や動物の周囲の環境によって、抗アルブミン抗血清の品質を一定に維持することが困難である。

#### 【0080】

一方、モノクローナル抗体を産生する細胞株は、ほぼ永久に同一の抗体を作り続ける。このため、常に特性の均質なモノクローナル抗体が得られ、キットのロット間での特性のバラツキが抑制される。従って、本実施形態では、被測定物質の検出結果の再現性、信頼性が向上する。

#### 【0081】

##### 【実施例】

以下に、具体的な実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明する。なお、本発明は本実施例に限定されるものではない。なお、本実施例で記載される用語「ALB」は、アルブミンを指す。

#### 【0082】

##### (実施例1)

上記実施形態1で説明した図2の測定装置20を用いて、サンプルセル1内に抗原として9  $\mu$ lのhSA(ヒト血清アルブミン)溶液を攪拌しながら注入した後、50 mMコハク酸buffer(pH5.0、含5%PEG6000)を145  $\mu$ l注入する。30秒以上経過後、測定を開始し、10秒後に40  $\mu$ lの抗体溶液を注入し、20秒後にスターラーを止め、開始から300秒までセル内溶液の濁度を測定した。抗体溶液の抗体濃度は0.1 mg/mlを保ちながら、7937株:8307株:7938株が、90:5:5、80:10:10、70:15:15、60:20:20、40:30:30、20:40:40および10:45:45の割合でそれぞれ混合した。抗原は最終濃度で0、5、10、30、50、100、300および500(mg/dl)になるように調製し、各分子数比の抗体について7種類の抗原濃度で測定を行なった。結果を図4に示す。

#### 【0083】

7937株の濃度が90%のとき、プロゾンは10mg/dlから始まり、40%では50mg/dlまでアルブミン濃度が上がるにつれて、比濁も上昇した。また、20%のときは30mg/dlまで比濁が上昇し、低濃度の感度が非常に高いことがわかった。この結果から、アフィニティーに差がある複数のモノクローナル抗体の混合される分子数比を変化させることにより、測定範囲および感度を制御することができることがわかる。

**【0084】**

(実施例2)

混合抗体の濃度を0.3mg/mlを保ちながら、8308抗体：8309抗体：7938抗体の分子数比を1：1：1、1：1：2または1：1：8の3種類について、抗原の最終濃度は0～30mg/dlになるように調製した。他は上記実施例1の条件と同様に、各分子数比の混合抗体溶液を用いて、免疫比濁測定を行なった。結果を図5に示す。図5に示すように、7937抗体の分子数比を増加させることによって、アルブミン30mg/dlまでの感度を上昇することができることがわかる。

10

**【0085】**

(実施例3)

<酵素免疫測定法(ELISA法)>

以下の実施例においては、得られた抗血清、培養上清およびモノクローナル抗体の評価は、ELISA法により行なった。その操作法を以下に記載する。

**【0086】**

(A) 抗原(ALB)のコーティング

ALB溶液を、PBS-Az(0.04重量%ナトリウムアジドPBS溶液)を用いて $1 \times 10^{-7}$ Mの濃度に調製した。マイクロプレート(ポリスチレン製高結合型平底#2580、コスター社製)にALB溶液を100 $\mu$ l/ウェル注入し、室温で飽和水蒸気中に一晩保存した。実験直前に、アスピレータでALB溶液を除去した。

20

**【0087】**

(B) ブロッキング

1重量%CASEIN-PBS-Az溶液を200 $\mu$ l/ウェル注入し、30分間室温で放置した。その後、アスピレータで1重量%CASEIN-PBS-Az溶液を除去した。以降の実験を即日に行わないときは、この状態で、飽和水蒸気中に室温で保存した。

**【0088】**

(C) 抗体の反応

1重量%CASEIN-PBS-Az溶液で種々の濃度に希釈した抗体溶液(抗血清、培養上清、精製抗体等)を50 $\mu$ l/ウェル、および1重量%CASEIN-PBS-Az溶液を50 $\mu$ l/ウェルで注入した。相対的なアフィニティー(親和性)を測定する目的でインヒビション(阻害)実験を行なう際には、インヒビター溶液(ALBを含む溶液)を50 $\mu$ l/ウェル注入した後、抗体溶液50 $\mu$ l/ウェルをさらに加え、振盪した。常温で1時間半放置した後、PBSで3回洗浄し、アスピレータで残存するPBSを除去した。

30

**【0089】**

(D) 標識抗体の反応

0.2 $\mu$ g/mlのペルオキシダーゼ標識したヤギ由来の抗マウスIgG抗体(KPL社製)を1重量%CASEINのPBS溶液に溶解したもの、または0.2 $\mu$ g/mlのペルオキシダーゼ標識したヤギ由来の抗マウスIgM抗体(KPL社製)を1重量%CASEINのPBS溶液に溶解したものを100 $\mu$ l/ウェル注入し、常温で30分放置した。PBSで3回洗浄し、さらにアスピレータで残存するPBSを除去した。

40

**【0090】**

(E) 基質の反応と停止

O-フェニレンジアミン(生化学用)40mgを10mlのクエン酸-リン酸バッファー(pH5)に溶解し、使用直前に30重量%過酸化水素水4 $\mu$ lを加えた溶液(基質溶液)を100 $\mu$ l/ウェル注入し、室温放置した。約2分後、4N硫酸を25 $\mu$ l/ウェル

50

注入して反応を停止した。

【0091】

(F)測定

マイクロプレートリーダー(東洋ソーダ社製)を用いて波長492nmの吸光度を測定した。得られた結果は、インヒビター濃度と固相抗原への結合率(%)との相関を示した。なお、固相抗原への結合率(%)は、吸光度の相対値(%)として求められる。

【0092】

また、本実施例では免疫測定法として酵素免疫測定法を用いたが、他にRIA法、蛍光抗体法等を用いてもよい。

【0093】

(実施例4)

本実施例においては、本発明者らの研究所で実績があることを考慮に入れ、A/J系統マウスを免疫に使用した。

【0094】

(免疫)

免疫原であるアルブミン(ALB)(Sigma INC.製)を、生理食塩濃度リン酸緩衝液(PBS)を用いて2mg/mlに調製した。このALBのPBS溶液に、同体積のアジュバント(ヒト結核死菌含有完全フロイントアジュバント、和光純薬製、H37Rv)を添加し、ホモジナイザで回転数1000rpmで十分に乳化することにより、免疫原を含むアジュバントエマルジョンを得た。

【0095】

生後約7週間の雌のマウス(A/J)5匹に、免疫原を含むアジュバントエマルジョンを100μlずつ腹腔内、あるいは皮下に注射した。3週間後、PBSを用いて2mg/mlに調製したALB溶液およびこれと同体積の不完全フロイントアジュバントをホモジナイザで乳化し、このエマルジョンをA/Jマウスに前回と同じ部位に100μlずつ注射した。

【0096】

その後、免疫開始より4週間後、6週間後、12週間後に、2週間後の免疫と同じ組成、濃度のALBを含む不完全フロイントアジュバントエマルジョンを、マウスに100μlずつ前回と同じ部位に注射した。2、3、4回目の注射の1週間後にそれぞれ採血し、以下に示す抗体産生を確認した。

【0097】

(抗体産生の確認)

採取した血液から血清を分離し、得られた血清を用いて、酵素免疫測定法(ELISA法)により抗体産生の確認をした。1×10<sup>-7</sup>MのALBを、100μl/ウェルずつ分注し、室温で一晩コートしたマイクロプレートを使用した。第2の抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体、またはペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体を使用した。ウェル中での発色により、抗体サンプル中にALBに結合する抗体が存在することが確認される。

【0098】

その結果、5匹すべてのマウスにおいて抗ALB抗体の産生が認められた。さらに、いずれのマウスにおいても、2回目の注射後に抗体産生がIgGからIgMへシフトしていることが確認され、3回目の注射後にはIgG/IgM比が100以上でありクラススイッチが充分起こっていることを確認した。

【0099】

(細胞融合)

免疫したマウスの中で特に力価の高かった3匹の脾臓を肥大させるために、最終免疫を行なった。免疫開始から10週間後、免疫原のALBを、PBSを用いて1mg/mlの濃度に調製し、アジュバントを加えずにマウスに100μlずつ注射した。

【0100】

10

20

30

40

50

最終免疫後3日を経過したマウスのうち1匹の脾臓細胞を摘出した。平均分子量1,500のポリエチレングリコールを用いて、常法により、脾臓細胞とマウス骨髄腫由来細胞株(P3X63-Ag8.653)とを融合させ、融合細胞を得た。

【0101】

融合細胞を、15重量%のウシ胎児血清(以下、FCS)を含むイシコフ培地で調製したヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン(HAT)培地に浮遊させた後、96ウェルプレート1枚にまいた(200 $\mu$ l/ウェル)。この際、フィーダー細胞(培養開始時に成長因子を供給する細胞)は同じマウス個体の脾臓細胞を用いた。CO<sub>2</sub>インキュベータ(CO<sub>2</sub>濃度:5体積%、温度:37、湿度:95%)内で培養を開始した。以下の培養では、他に示さない限り、これと同じ条件で培養を行なった。

10

【0102】

(細胞選別およびクローニング)

10日後、融合細胞の培養上清を100 $\mu$ l採取した後、融合細胞を含む残りの培養液を4枚の24ウェルプレートに継代し、各ウェルに1mlの15重量%のFCSを含むヒポキサンチン/チミジン(HT)培地を加えた。

【0103】

融合細胞を24ウェルプレートに継代した4日後、細胞培養上清を150 $\mu$ l/ウェルずつ採取した。この培養上清と、培養開始後1週間目に採取した培養上清を用いて以下に示すELISA法により、ALBに対する結合能を測定した。

【0104】

固相としてPBS-Azで $1 \times 10^{-7}$ Mの濃度に調製したALBを、100 $\mu$ l/ウェルずつ使用した。抗体液として、細胞培養上清を使用した。第2の抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を使用した。

20

【0105】

2回採取した培養上清のELISA法結果を合わせて、ALBに対して高い結合能を有する、増殖状態の良い30ウェルを確認した。第1段階の選択として、これらのウェルの細胞を、すべて5枚の6ウェルプレートに継代し、各ウェルに4mlの15重量%のFCSを含むHT培地を加えた。

【0106】

第1段階の細胞選別の2日後、培養上清を採取し、以下に示すELISA法(インヒビションELISA法)によりALBに対する結合能を測定した。

30

【0107】

固相としてPBS-Azで $1 \times 10^{-7}$ Mの濃度に調製したALBを、100 $\mu$ l/ウェルずつ使用し、インヒビターとしてALBを使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。標識抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を使用した。細胞培養上清中に、ALBに結合する抗体が存在すると、インヒビターとして添加された可溶性ALBと結合してインヒビションがかかる(固相ALBへの結合が阻害される)ので、ウェル中の発色は確認されない。

【0108】

この結果、第2段階の選択として、ALBに対して高い結合能を有し、インヒビションELISA法においてインヒビションがかかったウェルを、5ウェル選別した。これらのウェルの細胞を、それぞれ、中フラスコ(容量50ml)に継代した。培地は15重量%のFCSを含むHT培地を45mlずつ加えた。

40

【0109】

第2段階の選択を受けた細胞の継代3日後、培養上清を採取し、以下に示すELISA法によりALBに対する結合能を測定した。

【0110】

固相として、PBS-Azで $1 \times 10^{-7}$ Mの濃度に調製したALBを、100 $\mu$ l/ウェルずつ使用し、インヒビターとしてALBを使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。第2の抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を使用した。細胞

50

培養上清中に、インヒビターに結合する抗体が存在するとインヒビションがかかるので、ウェル上の発色は確認されない。A L Bでのみインヒビションがかかった13ウェル選別した。

【0111】

上記13ウェルの細胞について、4回に分けてクローニングを行った。15重量%のFCSを含むHT培地を用いて、1ウェルあたり1個の細胞が含まれる濃度に希釈（限界希釈）し、96ウェルのマイクロプレート各13枚に分注した。フィーダーとして生後4週の雌のマウス（A/J）の胸腺細胞を用いて初期増殖を促した。プレートのサイズを上げながら培養を進め、適時細胞培養上清について上記のELISA法によるスクリーニングを繰り返した。A L Bに対して高い力価を示し、かつ良好な増殖を示している細胞株を最終的に選別し、200mlの培地中で $5 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度に至るまで培養を進めた。

10

【0112】

最終的に、A L Bに対して高い結合能を有した株を1株選定した。この細胞株を13-3Bと命名し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成14年3月7日に寄託した（受託番号FERM BP-7938号）。本明細書中では、13-3B株（7938株）の産生する抗体を、7938抗体と称する。

【0113】

また、最終的に、A L Bに対して $1 \times 10^{-7}$  M ~  $1 \times 10^{-5}$  Mの間のA L B濃度で、固相アルブミンとの結合度の変化を生じる結合能を有する株を1株選定した。この細胞株を11-4Bと命名し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成14年3月7日に寄託した（受託番号FERM BP-7937号）。本明細書中では、11-4B株（7937株）の産生する抗体を、7937抗体と称する。

20

【0114】

またさらに、最終的に、A L Bに対して $1 \times 10^{-10}$  M ~  $1 \times 10^{-7}$  Mの間のA L B濃度で、固相アルブミンとの結合度の変化を生じる結合能を有する（つまり、インヒビションの半値が、 $1 \times 10^{-10}$  M ~  $1 \times 10^{-7}$  Mの範囲内）株を3株選定した。これらの細胞株をそれぞれ42DB1、56E'61および56FT4と命名した。

【0115】

42DB1株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成15年2月27日に寄託した（受託番号FERM BP-8307号）。本明細書中では、42DB1株（8307株）の産生する抗体を、8307抗体と称する。

30

【0116】

56E'61株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成15年2月27日に寄託した（受託番号FERM BP-8308号）。本明細書中では、56E'61株（8308株）の産生する抗体を、8308抗体と称する。

【0117】

56FT4株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成15年2月27日に寄託した（受託番号FERM BP-8309号）。本明細書中では、56FT4株（8309株）の産生する抗体を、8309抗体と称する。

40

【0118】

（細胞の保存）

最終的に選別された細胞株は、遠心分離して上清を取り除き、 $1 \times 10^7$ 細胞/mlの濃度でFCS：ジメチルスルフォキシド = 9：1（体積比）の溶液1mlに浮遊させ、-80で予備凍結した後、液体窒素中に移して長期保存状態にした。

【0119】

（抗体の精製）

選択した各株を、15重量% FCSを含むイシコフ培地で大量培養し、遠心分離して培養上清を得た。この培養上清を、プロテインA結合ゲル（プロテインAセファロース4FF、ファルマシア製）を用いたアフィニティークロマトグラフィにかけ、以下の条件で各モ

50

ノクローナル抗体（7938抗体および7937抗体）を精製した。

【0120】

プロテインA結合ゲルを充填したカラムを、結合緩衝液（1.5M グリシン・3M NaCl、pH 8.9）で平衡化した。培養上清あるいは腹水を、結合緩衝液で約3倍に希釈した後、平衡化したカラムにアプライした。カラムからの溶出液を280nmでモニターしながら、不純物の溶出が終了するまで、カラムを結合緩衝液で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液（100mMクエン酸、pH 4）をカラムにアプライ（線流速：約20cm/時間）し、IgG含有溶出液を回収した。回収したIgG含有溶出液について、吸光度計で280nmの吸光度を測定し、測定された吸光度を吸光係数で換算することにより、抗体の濃度を決定した。

10

【0121】

（抗体の評価）

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体のうち7938抗体について、種々の濃度のALB溶液を用いて、上記第2段階の選択におけるインヒビションELISA法の固相抗原濃度（ $1 \times 10^{-8}$  M）と抗体濃度（ $1 \times 10^{-10}$  M）以外は同一条件で抗体評価を行なった。

【0122】

図6は、7938抗体について、ALBに対する結合能を測定した結果を示すグラフである。図6において、縦軸は吸光度の相対値（%）を、横軸はALB抗原の濃度（mole/L（以下Mで表す））の対数値を示す。抗原の濃度と吸光度の相対値（%）との関連を実線に示した。

20

【0123】

図6に示すように、7938抗体では、インヒビションの半値が約 $1 \times 10^{-9.8}$  Mであり、約 $1 \times 10^{-9}$  ~  $1 \times 10^{-11}$  MのALBを検出できる可能性が示された。

【0124】

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体のうち7937抗体については、ALBの希釈系列を用いて、上記第2段階の選択におけるインヒビションELISA法の固相抗原濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M）と抗体濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M）以外は同一条件で抗体評価を行った。

【0125】

図7は、7937抗体について、ALBに対する結合能を測定した結果を示すグラフである。図7において、縦軸は吸光度の相対値（%）を、横軸はALB抗原の濃度（M）の対数値を示す。抗原の濃度と吸光度の相対値（%）との関連を実線に示した。

30

【0126】

図7に示すように、7937抗体では、インヒビションの半値が約 $1 \times 10^{-6.3}$  Mであり、約 $1 \times 10^{-7}$  M（6.6mg/L）から約 $1 \times 10^{-5}$  M（660mg/L）の範囲でALBを検出し得る可能性が示された。

【0127】

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体のうち8307抗体については、ALBの希釈系列を用いて、上記第2段階の選択におけるインヒビションELISA法の固相抗原濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M）と抗体濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M）以外は同一条件で抗体評価を行った。

40

【0128】

図8は、8307抗体について、ALBに対する結合能を測定した結果を示すグラフである。図8において、縦軸は吸光度の相対値（%）を、横軸はALB抗原の濃度（M）の対数値を示す。抗原の濃度と吸光度の相対値（%）との関連を実線に示した。

【0129】

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体のうち8308抗体については、ALBの希釈系列を用いて、上記第2段階の選択におけるインヒビションELISA法の固相抗原濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M）と抗体濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M）以外

50

は同一条件で抗体評価を行なった。

【0130】

図9は、8308抗体について、ALBに対する結合能を測定した結果を示すグラフである。図9において、縦軸は吸光度の相対値(%)を、横軸はALB抗原の濃度(M)の対数値を示す。抗原の濃度と吸光度の相対値(%)との関連を実線に示した。

【0131】

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体のうち8309抗体については、ALBの希釈系列を用いて、上記第2段階の選択におけるインヒビションELISA法の固相抗原濃度( $1 \times 10^{-7}$  M)と抗体濃度( $1 \times 10^{-7}$  M)以外は同一条件で抗体評価を行なった。

10

【0132】

図10は、8309抗体について、ALBに対する結合能を測定した結果を示すグラフである。図10において、縦軸は吸光度の相対値(%)を、横軸はALB抗原の濃度(M)の対数値を示す。抗原の濃度と吸光度の相対値(%)との関連を実線に示した。

【0133】

以上に述べた実施例では、ヒトアルブミンを被測定物質としているが、これに限定されない。例えば、ヒト以外のほ乳類のアルブミン、尿中ホルモンで女性の健康管理の指標となるhLH(ヒト黄体形成ホルモン)およびhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)などを被測定物質として測定することもできる。hLHまたはhCGを測定する際に、高い濁度が得られるように、コハク酸バッファーを試料に添加することが好ましい。このことによつて、hLHまたはhCGを測定する際にプロゾーン現象を抑えることができる。特に、コハク酸バッファーを試料に添加することによつて、試料をpH5.0に調製すると、最も濁度が高くなる。また、MOPSバッファーも、用いられるモノクローナル抗体によつては用いることができる。MOPSバッファーを用いる場合、試料をpH7.4に調製することが特に好ましい。

20

【0134】

【発明の効果】

本発明によれば、試料中の特定成分の測定結果の信頼性が高い免疫学的測定方法を提供される。

【図面の簡単な説明】

30

【図1】図1は、本発明の免疫学的測定方法を表すフローチャートである。

【図2】図2は、本発明の免疫学的測定方法に用いる測定装置を示す上面概略図である。

【図3】図3は、本発明の生体成分測定トイレを表す模式図である。

【図4】図4は、被測定物質(ヒトアルブミン)の濃度に対する濁度を3種類のモノクローナル抗体を混合して得た、抗体溶液の分子数比を変えたものについて比較したグラフである。

【図5】図5は、被測定物質(ヒトアルブミン)の濃度に対する濁度を3種類のモノクローナル抗体を混合して得た、抗体溶液の分子数比を変えたものについて比較したグラフである。

【図6】図6は、7938抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。

40

【図7】図7は、7937抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。

【図8】図8は、8307抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。

【図9】図9は、8308抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。

【図10】図10は、8309抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。

【符号の説明】

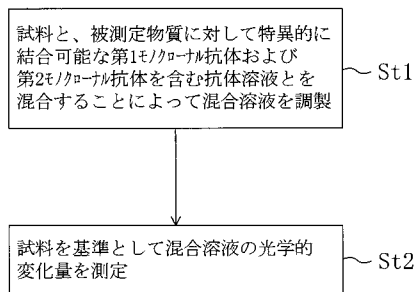
50

- 1 サンプルセル
- 2 固定ベース
- 3 サンプルベース
- 4 抗体溶液注入用チューブ
- 5 攪拌子
- 6 チューピングコネクタ
- 7 マイクロスターラー
- 8 半導体レーザーモジュール
- 9、10 フォトダイオードアレイ
- 11、12 ロックインアンプ
- 20 測定装置
- 20a 調製手段
- 20b 光学的測定手段
- 30 生体成分測定トイレ
- 30a 排泄物採取手段
- 31 洗浄ノズル
- 33 使用者
- 34 排泄物収納手段
- 35 排泄物（便または尿）
- 36 搬送手段
- 37 演算装置
- 40 表示手段
- 42 便座
- 43 便器
- 44 タンク

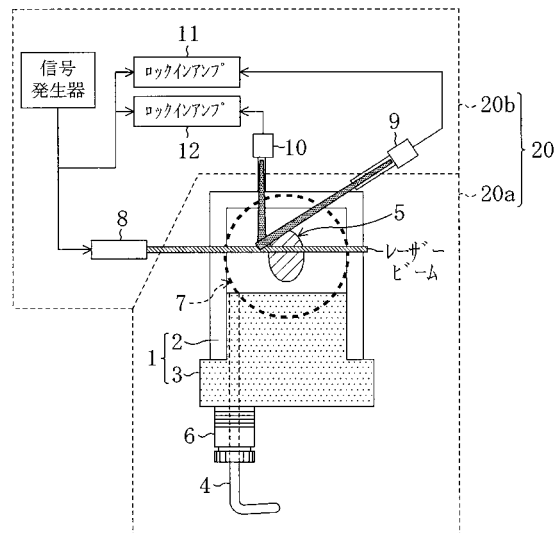
10

20

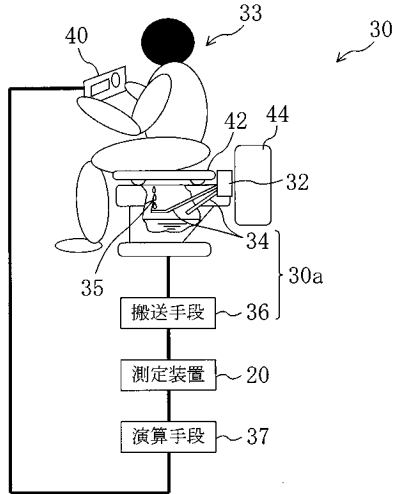
【図1】



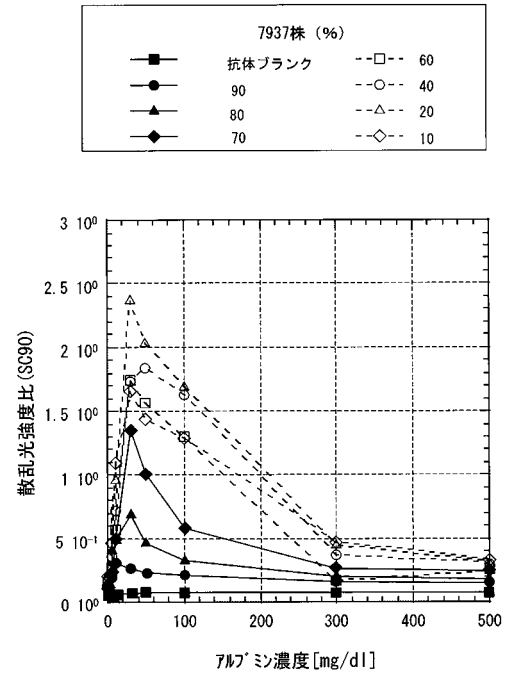
【図2】



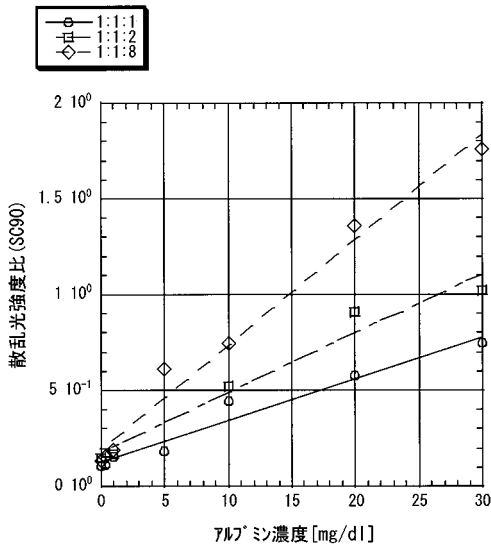
【 図 3 】



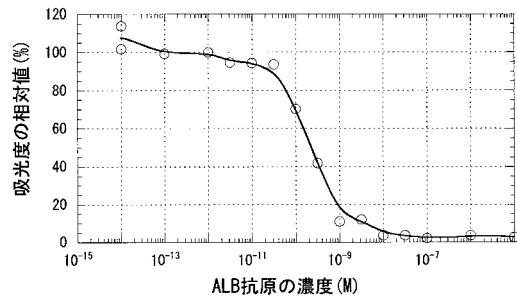
【 図 4 】



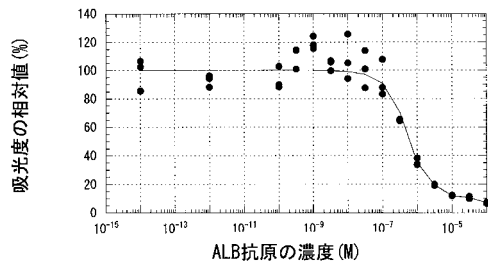
【 図 5 】



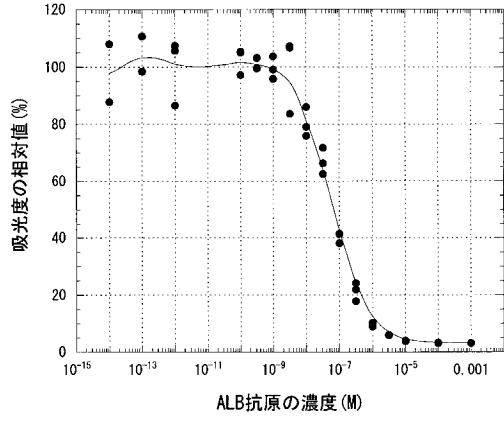
【 図 6 】



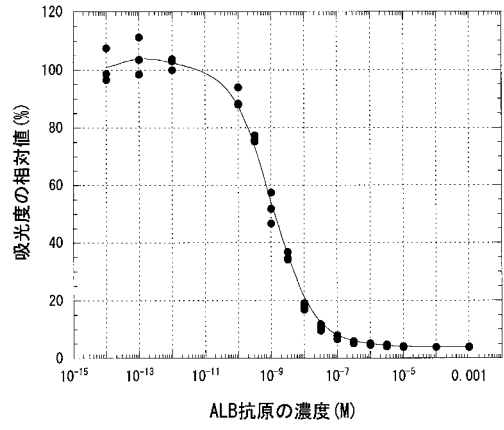
【 図 7 】



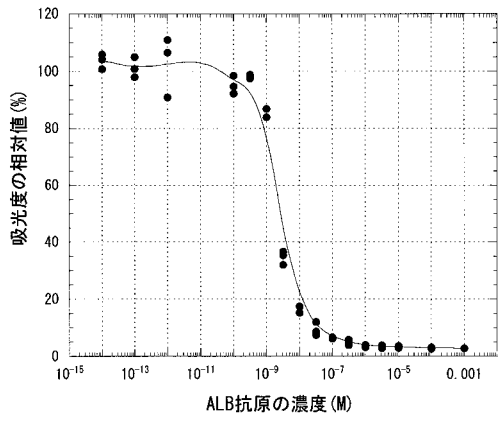
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
(74)代理人 100115691 弁理士 藤田 篤史		
(74)代理人 100117581 弁理士 二宮 克也		
(74)代理人 100117710 弁理士 原田 智雄		
(74)代理人 100121500 弁理士 後藤 高志		
(74)代理人 100121728 弁理士 井関 勝守		
(72)発明者 湯川 系子 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地		松下電器産業株式会社内
(72)発明者 亀井 明仁 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地		松下電器産業株式会社内
(72)発明者 河村 達朗 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地		松下電器産業株式会社内
(72)発明者 重藤 修行 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地		松下電器産業株式会社内
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA02 DA02 GA03 HA11 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13 4H045 AA11 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26		

专利名称(译)	免疫学测量方法，免疫学测量装置，用于生物成分测量的马桶，抗白蛋白单克隆抗体，产生其的细胞系和白蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004045384A</a>	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2003131790	申请日	2003-05-09
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	湯川系子 亀井明仁 河村達朗 重藤修行		
发明人	湯川 系子 亀井 明仁 河村 達朗 重藤 修行		
IPC分类号	G01N33/536 A61B5/20 A61B10/00 C07K16/06 C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61B5/415 A61B5/20 A61B10/0038 A61B10/007 C07K16/18 G01N33/577 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/536.F C07K16/06 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.C C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	前田弘 竹内浩 高久岛 竹内雄二 藤田淳 後藤 高志		
优先权	2002148297 2002-05-22 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供免疫学测量方法，其中样品中特定成分的测量结果是可靠的。ŽSOLUTION：免疫学测量方法是一种免疫学反应测量方法，用于测量样品中待测物质的含量。免疫学测量方法包括通过将样品与含有第一和第二单克隆抗体的抗体溶液混合来制备混合溶液的方法St1，所述第一和第二单克隆抗体可以特异性地组合到待测物质上；以及用于测量混合溶液中的光学特性的过程St2。Ž

