

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001 - 264331

(P2001 - 264331A)

(43)公開日 平成13年9月26日 (2001.9.26)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	B
33/53			33/53	F
33/543	511		33/543	511 M

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 数)

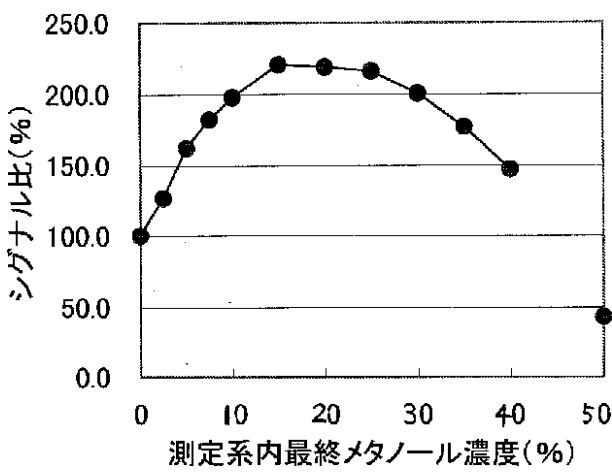
(21)出願番号	特願2000 - 76347(P2000 - 76347)	(71)出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県新南陽市開成町4560番地
(22)出願日	平成12年3月14日 (2000.3.14)	(72)発明者	丸尾 直子 神奈川県横浜市西区戸部本町49 - 15 - 408

(54)【発明の名称】 免疫反応増強方法及び増強剤

(57)【要約】 (修正有)

【課題】ワンステップ競合的免疫反応において、該免疫反応を増強する方法及びそれに用いる反応増強剤を提供する。

【解決手段】ワンステップ競合法を原理とする免疫反応において、水に混和可能なエタノール、アセトニトリル、またはメタノール等の有機溶媒を抗原抗体反応系に共存させることにより免疫反応の増強をはかる方法及びメタノール、エタノール、またはアセトニトリルを含有することを特徴とする、ワンステップ競合的免疫反応増強剤。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】ワンステップ競合的免疫反応において、免疫反応時に、エタノール、アセトニトリル、または 1 ~ 25 % のメタノールを反応系に共存させることを特徴とする、免疫反応の増強方法。

【請求項 2】請求項 1 に記載の方法において、免疫反応がステロイド骨格を有する物質とそれに対する抗体との反応であることを特徴とする方法。

【請求項 3】請求項 1 または 2 に記載の方法において、免疫反応が、17β エストラジオール及び酵素標識 17β エストラジオールを、抗 17β エストラジオール抗体上で競合させるものであることを特徴とする方法。

【請求項 4】請求項 1 または 2 に記載の方法において、免疫反応が、17α エチニルエストラジオール及び酵素標識 17α エチニルエストラジオールを、抗 17α エチニルエストラジオール抗体上で競合させるものであることを特徴とする方法。

【請求項 5】請求項 1 ~ 4 いずれかに記載の方法において、1 ~ 30 % のエタノール、または 1 ~ 20 % のアセトニトリルを共存させることを特徴とする方法。

【請求項 6】請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の方法において、1 ~ 20 % のメタノール、1 ~ 10 % のエタノール、または 1 ~ 10 % のアセトニトリルを共存させることを特徴とする方法。

【請求項 7】メタノール、エタノール、又はアセトニトリルを含有することを特徴とする、ワンステップ競合的免疫反応増強剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ワンステップ競合法を原理とする免疫反応において、水に混和可能な有機溶媒の共存により抗原抗体反応の増強を行う方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】環境問題に対する社会的関心の増大の中で、生体内エストロゲン受容体と結合することなどによりエストロゲン作用を持つ化学物質、いわゆる環境ホルモンが注目を集めている。この中で、乳がん細胞を用いたスクリーニング試験によりもっとも強い効果を発揮するのは、17β - エストラジオール (E2) をはじめとする天然エストロゲンと、すでに使用中止になったジェチルステロイドや 17α - エチニルエストラジオールなどの合成エストロゲンであることが示されている (山下成人ら、臨床検査 43 巻 11 号 P1375 - 1382、1999 年)。天然エストロゲンは必要に応じて内分泌腺からごく微量分泌され、標的組織で細胞中のエストロゲンレセプターを介して情報伝達を行う。また、合成エストロゲンは、主に医薬品として、天然エストロゲンの作用を代替するため、あるいは補充するために投与されるものである。これらの物質は、エストロゲ

ンレセプターに対する結合活性が強く、したがって不用意に環境中に放出され高濃度に存在した場合は、それを摂取したヒトあるいは他の動物体内において蓄積し、女性ホルモンとして作用を発揮する可能性がある。この危険を回避するためには、常に環境中のこれらの物質量をモニターし濃度変化を監視しておくことが必要である。

【0003】さらに前述の天然エストロゲンや合成エストロゲンだけでなく、近年ビスフェノール A やノニルフェノール、ポリ塩化ビニル (PCB) などの化学物質も弱いながら女性ホルモン作用を有することが報告されはじめ、これら化学物質量の測定及びモニタリング、生体に及ぼす影響も大きな関心を集めている。

【0004】これらの環境ホルモンと呼ばれる化学物質の測定方法としては、従来 GC/MS、HPLC/MS、バイオアッセイ (エストロゲン依存性増殖を示す乳腺腫瘍細胞 (MCF-7) をエストロゲンフリー培養液中で培養し、エストロゲン様作用を持つ化学物質曝露による増殖活性をみる評価方法) 及び酵素免疫測定が報告され、使用されている。当然のことであるが、環境中におけるこれら物質の濃度は非常に小さいため、環境中から取得したサンプル中のこれら化学物質を濃縮することなしに測定に供することは、これら測定の検出感度から考えて不可能である。そこで、通常は、河川水などの環境サンプルより、有機溶媒を用いた抽出を行ったり、オクタデシル基への疎水結合を利用した固相抽出により化学物質の濃縮を行い測定に供している。各種測定の中でもっとも検出感度が高いのは、機器分析よりもむしろ酵素免疫測定あるいは乳がん細胞を用いたバイオアッセイであるが、バイオアッセイは特別な煩雑な操作を必要とし、特殊な機器や高度の技術を必要とする。それに対し、酵素免疫測定は、特殊な機器と必要とせず、一度に多数のサンプルの処理が可能であり、環境ホルモン測定における高感度で処理能力の高い簡便な定量法であるとされている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】酵素免疫測定には、競合的免疫測定 (競合法) とサンドイッチ免疫測定が知られており、一般的に低分子物質の場合は 2 つの抗体で抗原をはさむためには抗原が小さすぎ立体障害が生じるため、通常競合法により測定される。競合法においては、特異的抗体と酵素標識抗原の結合を測定サンプル中の抗原が競合阻害する程度を測定する。本法においては、競合すべき抗原が存在しないときにもっとも大量の酵素標識抗原が抗体に結合し、結合酵素量すなわち検出シグナル量は最大となる。この時得られる値を B0 とする。非標識抗原の量が増加するにしたがって結合酵素量が減少した結果、検出されるシグナル量 B が低下する。測定系構築においては、まず酵素標識抗原と競合すべき測定抗原が存在しないときに得られる検出シグナル量 B0 がある程度大きくなければ、検出シグナル量の減少をとらえ

ることは難しい。また、酵素標識抗原と競合すべき測定抗原が存在しないときに得られる検出シグナル量 B_0 がある程度大きくなければ、検出器のふらつきなどに起因する測定値の変動が測定値に与える影響が大きくなり、測定精度が失われることになる。最初に加える酵素標識抗原量を多くすれば、競合すべき抗原が存在しないときに検出されるシグナル量も大きくなるが、測定すべき非標識抗原が標識抗原で希釈されてしまうために、微量の測定抗原によるシグナル量変化 B/B_0 を検出することが難しくなり、結果として検出感度が低下する。したがって、検出感度を低下させずに B_0 量を上昇させるためには、酵素標識抗原の量を変化させることなく、検出されるシグナル量を増強することが必要である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題に関して鋭意検討した結果、本発明に到達した。すなわち本発明は、ワンステップ競合的免疫反応において、免疫反応時に、エタノール、アセトニトリル、または 1～25% のメタノールを反応系に共存させることを特徴とする、免疫反応の増強方法である。

【0007】また本発明は、メタノール、エタノール、又はアセトニトリルを含有することを特徴とする、ワンステップ競合的免疫反応増強剤である。以下本発明をさらに詳細に説明する。

【0008】本発明では、免疫反応の増強のためにメタノール、エタノール、又はアセトニトリルが使用され、それを免疫反応時に反応系に共存させる。特にメタノールが好ましい。また、免疫反応の増強に有効な濃度は、それぞれの免疫反応によって異なるが、一般的にはメタノールでは 1～25%、好ましくは 1～20%、更に好ましくは 15～20% であり、エタノールでは好ましくは 1～30%、さらに好ましくは 1～10% であり、アセトニトリルでは好ましくは 1～20%、さらに好ましくは 1～10% である。

【0009】免疫反応には、対象物質とそれに対する抗体とが用いられる。対象物質には特に限定はないが、ステロイド骨格を有する物質であることが好ましく、特に 17 β エストラジオールまたは 17 α エチニルエストラジオールが好ましい。用いられる抗体としては、対象物質に対して特異的に反応するものであれば特に限定はなく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよい。また、遺伝子工学的に作製されたものや、抗体フラグメントなどでもよい。

【0010】本発明の免疫反応の増強方法を、ワンステップ競合的免疫測定に利用することができる。このとき、対象物質は標識されていることが好ましい。標識の種類は通常免疫反応において用いられるものであれば限定はないが、特に酵素が好ましい。例えば西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼ標識をあげることができる。

【0011】また本発明を免疫測定に利用する際には、使用される抗体は固相に固定化されていることが好ましい。このとき抗体は直接固相に固定してもよいが、間接的に固相に固定化することが好ましい。間接的に固相に固定化する方法としては、免疫した動物種のイムグロブリンを特異的に認識する異種動物の抗体を用いた間接固相化、あるいは抗体に低分子の物質を結合させ、その低分子物質に対する抗体を固相に固定化した間接固定化法等が例示される。直接固相よりは間接的に固相化する方法が使用抗体量の低減につながるためコスト的に好ましい。

【0012】上述のような免疫反応の増強方法を行うために、メタノール、エタノールまたはアセトニトリルを含有する免疫反応増強剤を用いることができる。この際には、他に適当な添加剤などを添加してもよい。

【0013】

【発明の効果】本発明によれば、使用材料の量を変えなくとも抗原抗体反応を増強することができる。これを免疫反応測定に利用すれば、例えば酵素標識抗原量を増加させることなく、検出できるシグナル強度を増強することができる。測定系構築においては、まず酵素標識抗原と競合すべき測定抗原が存在しないときに得られる検出シグナル量 B_0 がある程度大きくなければ、検出シグナル量の減少をとらえることは難しい。また、酵素標識抗原と競合すべき測定抗原が存在しないときに得られる検出シグナル量 B_0 がある程度大きくなければ、検出器のふらつきなどに起因する測定値の変動が測定値に与える影響が大きくなり、測定精度が失われることになる。最初に加える酵素標識抗原量を大きくすれば、競合すべき抗原が存在しないときに検出されるシグナル量も大きくなる。しかし実測定において、競合する非標識抗原が存在すると、この測定されるべき非標識抗原が標識抗原で希釈されてしまうために、微量の測定抗原存在下のシグナル量 B が B_0 に近づき、検出感度が低下する。検出感度を低下させずに B_0 量を上昇させるためには、したがって、酵素標識抗原の添加量を増量させることなく、検出されるシグナル量のみを増強することが必要である。

【0014】逆に、検出されるシグナル量を増強することにより、同じシグナル量を実現するために使用する酵素標識抗原の量を低減することができる。これは、測定コストの低減に有効である。また、それだけでなく、上述の理由により、使用する酵素標識抗原量を低減できれば、測定すべき抗原との競合によるシグナル量変化がより大きく見えることにより、検出感度を改良することができる。

【0015】

【実施例】以下実施例により本発明を記述する。しかし、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

50 【0016】実施例 1

ワンステップ競合法エストラジオール測定系におけるメタノールの効果

ポリスチレンビーズ80000個にヤギ抗ウサギIgG（ケミコン社製）を16mg、0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を160mL加えて、ゆるやかに回転しながら30分で16時間放置し、抗体固定化を行った。16時間後、抗体液を除去し、0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）にてビーズを洗浄後、0.5%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を200mL加えて533時間ブロッキング処理を実施した。終了後、ブロッキング液を除去し、0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）で洗浄して、0.5%ウシ血清アルブミン含有0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）に懸濁し、使用時まで4にて保存した。

【0017】カップ内に上記で作製したビーズを12個入れ、さらにアルカリ性ホスファターゼ標識17βエストラジオールを0.2mA含む（1mAは280nmでの吸光度1.0）コンジュゲート希釈液を50μL加え凍結した。ここでいうコンジュゲート希釈液とは、50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）、2.5%グリゼート（ベクトンディッキンソン社製）、2%シュクロース（和光純薬製）、5mM塩化マグネシウム、0.1mM塩化亜鉛、0.1%アジ化ナトリウムからなる溶液である。凍結コンジュゲート含有液50μLの上に、ウサギ抗17βエストラジオール抗血清をコンジュゲート希釈液で60000倍に希釈した液を50μL加えて凍結した。その後凍結乾燥を行い、凍結乾燥物を作製して測定開始まで4にて保存した。

【0018】この凍結乾燥物に、AIA-21用分注液（0.01%のトライトンX-100、0.01%のアジ化ナトリウムを含む精製水）75μLおよび各濃度のメタノールを含む50mMりん酸緩衝液（pH7.0）を75μL加えて、市販の全自動免疫診断装置（AIA-21、東ソー（株）製）上で40分インキュベーションを行い、抗エストラジオール抗体へ酵素標識抗原の結合反応を実施した。B/F分離を行い、ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ量を、4-メチルウンベリフェリルりん酸を基質として測定した。このとき結合している酵素量は、1秒あたりの4-メチルウンベリフェリルりん酸分解活性で表示し、これをシグナル強度とした。

【0019】結果を図1に示す。図1の縦軸は、メタノール添加時のシグナル強度と非添加時のシグナル強度の比〔（各濃度のメタノール存在下でのシグナル強度/メタノール非添加時のシグナル強度）×100〕を示し、横軸は測定系内最終メタノール濃度（%）を示す。測定系内のメタノール濃度を0%から50%まで変化させて、4-メチルウンベリフェリルりん酸分解活性を測定したところ、メタノール濃度を増加させるにしたがって

4-メチルウンベリフェリルりん酸分解活性は増加し、反応容器中最終メタノール濃度15%から25%で最大となった。容器中最終メタノール濃度を25%以上にすると、4-メチルウンベリフェリルりん酸分解活性は再び減少したが、最終濃度40%においてもなお0%で得られる値の147%であり、免疫反応の増強作用があることが示された。

【0020】実施例2

ワンステップ競合法エストラジオール測定系におけるエタノールおよびアセトニトリルの効果

実施例1に示すワンステップ競合法エストラジオール測定系において、エタノール及びアセトニトリルの効果を検討した。結果を図2に示す。図中、縦軸は図1と同様のシグナル比を示し、横軸は測定系内最終エタノール濃度（黒丸）または測定系内最終アセトニトリル濃度（四角）を示す。エタノール、アセトニトリルとも実施例1のメタノールと同様に免疫反応増強作用が認められた。エタノールの場合、測定系内最終濃度上昇とともにシグナル、すなわち4-メチルウンベリフェリルりん酸分解活性の上昇が認められ、測定系内最終濃度7.5%において、174.5%と最も高い増強作用が認められた。エタノール測定系内最終濃度7.5%以上では免疫反応増強作用が低下していくが、測定系内最終濃度20%までは、非添加時より高いシグナルが観察された。アセトニトリルについては、添加とともにシグナル増強が認められ、測定系内最終濃度15%において、200.8%と最も高い効果が得られ、測定系内最終濃度30%においてもなお、非添加時より高いシグナルが観察された。これらの結果から、メタノール以外にも、エタノール、アセトニトリルで免疫測定における免疫反応増強効果が認められることが明らかとなった。

【0021】実施例3

ワンステップ競合法エストラジオール免疫測定におけるメタノール存在下での標準曲線の作成

実施例1に示したワンステップ競合法エストラジオール測定系において、メタノール非添加ならびにメタノールを測定系内最終濃度20%で添加した場合の標準曲線を作成した。すなわち、はじめに、50mMりん酸緩衝液（pH7.0）あるいはメタノール/50mMりん酸緩衝液（pH7.0）=40/60を用いて、0、9.4、18.8、37.5、75、150pg/mlのエストラジオールを含むサンプル溶液を作製した。次に、実施例1に示した凍結乾燥物に、AIA-21用分注液（0.01%のトライトンX-100、0.01%のアジ化ナトリウムを含む精製水）75μLおよび上記サンプル溶液75μLを加えて、市販の全自動免疫診断装置（AIA-21、東ソー（株）製）上で40分インキュベーションを行い、抗エストラジオール抗体への競合反応を実施した。その後B/F分離を行い、ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ量を、4-メチルウンベ

リフェリルりん酸を基質として測定した。

【0022】各測定値を表1、2に、またそれに基づき作成した標準曲線を図3、4に示す。表1はメタノール非添加時の、表2はメタノール添加時のシグナル強度測定値(3回)及びその平均のB/B0である。図3はメタノール非添加時の、図4はメタノール添加時の標準曲線であり、縦軸はB/B0(%)、横軸はエストラジオール濃度(log)である。表1、2、図3、4より明らかなように、メタノールを添加した場合、すべてのエ*

*ストラジオール濃度においてそのシグナル強度はメタノール非添加の約2倍となっている。他方、メタノール添加時、メタノール非添加時のどちらの場合でも、各エストラジオール濃度において同じようにB/B0が減少していることより、抗エストラジオール抗体に対する酵素標識エストラジオールと非標識エストラジオールの親和性が同じように増強されていることが示されている。

【0023】

【表1】

エストラジ オール濃度 (pg/mL)	4-MU分解 速度平均値	標準偏差	変動係数 (%)	4-MU分解速 度測定値1	4-MU分解速 度測定値2	4-MU分解速 度測定値3	B/B0 (%)	
1	0.000	38.987	0.283	0.73	39.288	38.946	38.726	100.00
2	9.40	32.965	1.808	5.49	35.047	32.063	31.785	84.55
3	18.8	28.849	0.619	2.14	29.56	28.558	28.43	74.00
4	37.5	24.411	0.375	1.53	24.820	24.085	24.327	62.61
5	75.0	18.079	0.298	1.65	18.198	18.299	17.740	46.37
6	150.0	12.571	0.501	3.99	12.166	13.131	12.415	32.24

【0024】

【表2】

エストラジ オール濃度 (pg/mL)	4-MU分解 速度平均値	標準偏差	変動係数 (%)	4-MU分解速 度測定値1	4-MU分解速 度測定値2	4-MU分解速 度測定値3	B/B0 (%)	
1	0.000	84.650	0.143	0.17	84.731	84.484	84.734	100.00
2	9.40	74.802	0.606	0.81	74.876	74.163	75.368	88.37
3	18.8	65.508	0.615	0.94	65.939	64.804	65.781	77.39
4	37.5	55.221	0.406	0.74	55.190	54.832	55.642	65.24
5	75.0	42.052	0.790	1.88	41.646	42.963	41.548	49.68
6	150.0	29.383	0.828	2.82	30.103	29.569	28.478	34.71

【0025】実施例4

ワンステップ競合法17αエチニルエストラジオール測定系におけるメタノールの効果

カップ内に実施例1で作製したヤギ抗ウサギIgG固定化ビーズを12個入れ、さらにアルカリ性ホスファターゼ標識17αエチニルエストラジオールを0.2mA含む(1mAは280nmでの吸光度1.0)コンジュゲート希釈液を50μL加え凍結した。ここでいうコンジュゲート希釈液とは、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、2.5%ゲリゼート(ベクトンディッキンソン社製)、2%シュクロース(和光純薬製)、5mM塩化マグネシウム、0.1mM塩化亜鉛、0.1%アジ化ナトリウムからなる溶液である。凍結コンジュゲート含有液50μLの上に、ウサギ抗17β-エストラジオール抗血清をコンジュゲート希釈液で60000倍に希釈

した液を50μL加えて凍結した。その後凍結乾燥を行い、凍結乾燥物を作製して測定開始まで4にて保存した。

【0026】この凍結乾燥物に、AIA-21用分注液(0.01%のトライトンX-100、0.01%のアジ化ナトリウムを含む精製水)75μLおよび各濃度のメタノールを含む50mMりん酸緩衝液(pH7.0)を75μL加えて、市販の全自動免疫診断装置(AIA-21、東ソー(株)製)上で40分インキュベーションを行い、抗エストラジオール抗体へ酵素標識抗原の結合反応を実施した。B/F分離を行い、ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ量を、4-メチルウンベリフェリルりん酸を基質として測定した。このとき結合している酵素量は、1秒あたりの4-メチルウンベリフェリルりん酸分解活性で表示した。

【0027】結果を図5に示す。図中、縦軸は図1と同様のシグナル比を示し、横軸は測定系内最終メタノール濃度を示す。実施例1のエストラジオール測定系に比較するとその増強効果は小さいが、メタノール添加による免疫反応増強効果が認められ、測定系内最終濃度5%から10%のとき120%と最大効果を発揮した。メタノール濃度をさらに上昇させると、免疫反応増強効果は低下するが、容器内最終濃度20%まで非添加時よりも高いシグナル強度、すなわち4-メチルウンベリフェリリン酸分解活性を示した。この結果から、実施例1に示したワンステップ競合法エストラジオール測定系だけでなく、ワンステップ競合法17 α -エチニルエストラジオール測定系においても、メタノールを添加することにより*

*免疫反応増強効果があることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1において測定された、メタノール濃度とシグナル比との関係を示す図である。

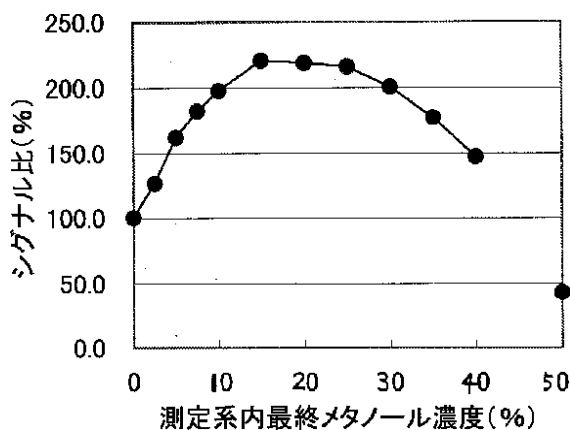
【図2】実施例2において測定された、エタノール又はアセトニトリル濃度とシグナル比との関係を示す図である。

【図3】実施例3において測定された、メタノール非添加時の標準曲線を示す図である。

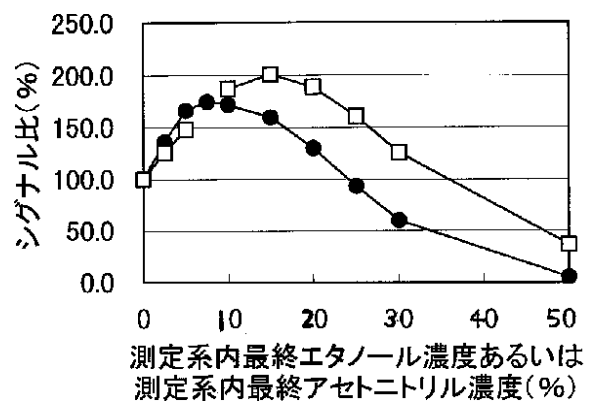
【図4】実施例3において測定された、メタノール添加時の標準曲線を示す図である。

【図5】実施例4において測定されたメタノール濃度とシグナル比との関係を示す図である。

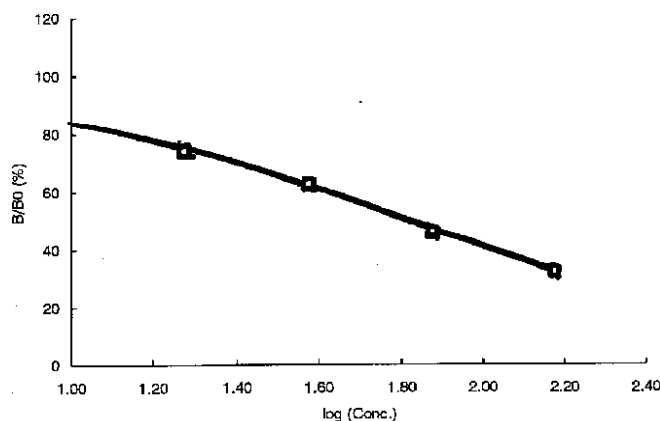
【図1】



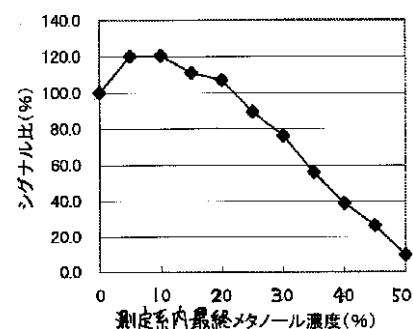
【図2】



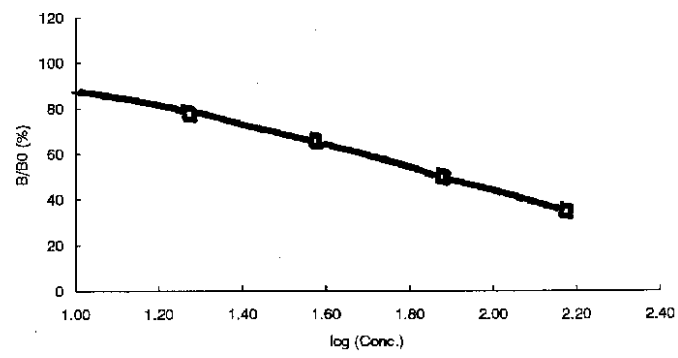
【図3】



【図5】



【図 4】



专利名称(译)	免疫应答增强方法和增强剂		
公开(公告)号	JP2001264331A	公开(公告)日	2001-09-26
申请号	JP2000076347	申请日	2000-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	丸尾直子		
发明人	丸尾 直子		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.F G01N33/543.511.M		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种在一步竞争性免疫反应中增强免疫反应的方法和用于该方法的增效剂。解决方案：在该方法中，通过制备与抗原 - 抗体反应体系共存的有机溶剂如水混溶性乙醇，乙腈，甲醇等，免疫反应在一步法竞争方法中增强免疫反应作为原理。用于一步竞争性免疫反应的增效剂包括甲醇，乙醇或乙腈。

