

(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2003 - 222627

(P2003 - 222627A)

(43)公開日 平成15年8月8日(2003.8.8)

(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 33/53			G 0 1 N 33/53	Z

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 12数)

(21)出願番号 特願2002 - 23746(P2002 - 23746)

(22)出願日 平成14年1月31日(2002.1.31)

(71)出願人 000231394

株式会社アズウェル

大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号

(72)発明者 河地 豊

岐阜県可児市桜ヶ丘1丁目70番地

(72)発明者 小坂 美恵子

大阪府茨木市西河原1 - 18 - 613

(72)発明者 伊藤 重喜

大阪府高槻市高見台1 - 6

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆 (外3名)

(54)【発明の名称】 液吸収担体を試料とする免疫学的測定方法

(57)【要約】

【課題】 血液を吸収させた液吸収担体を試料として免疫学的測定を行う方法において、より簡便な方法で短時間に効率的に目的物質を抽出し正確な測定を行う方法を提供する。

【解決手段】 本発明の免疫学的測定方法は、マイクロプレートにおける免疫学的測定方法であって、目的物質と免疫反応する物質を含有させた、目的物質を該担体から抽出するための抽出液を用いて目的物質を抽出し同系にて免疫反応を行い、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液を吸収させた液吸収性担体を試料とする該体液に含まれる目的物質のマイクロプレートにおける免疫学的測定方法であって、目的物質と免疫反応する物質を含有させた、目的物質を該担体から抽出するための抽出液を用いて目的物質を抽出し同系にて免疫反応を行い、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法。

【請求項2】 該抽出液が緩衝剤、界面活性剤および非特異反応防止剤を含有する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 該免疫反応を行った後、マイクロプレートのウエルを緩衝液で一定量満たし、次いでマイクロプレートを逆さまにして緩衝液と共に抽出液および液吸収性担体を排出することを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 マイクロプレートのウエル中の抽出液を吸引除去後、緩衝液を該ウエル中に一定量満たし、次いでマイクロプレートを逆さまにして緩衝液と共に液吸収性担体を排出することを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項5】 マイクロプレートのウエル中に緩衝液を添加した後の最終液量が200～400 μ Lであることを特徴とする請求項3または4記載の方法。

【請求項6】 液吸収性担体が濾紙である、請求項1から5までのいずれか記載の方法。

【請求項7】 マイクロプレートのウエル中、抽出液または緩衝液とともに存在する体液を吸収させた液吸収性担体をウエルから除去するための方法であって、マイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、体液を吸収させた液吸収性担体を試料としてマイクロプレートにて免疫学的測定を行う方法に関し、詳細には特定の抽出液、好ましくは緩衝剤、界面活性剤および非特異反応防止剤を含有する抽出液を用いて目的物質を抽出し同系にて免疫反応を行い、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】目的物質を含む静脈血、耳朶血、指先血等の血液を濾紙等に滴下し吸収させて作製した乾燥濾紙血を試料として用いた当該目的物質の測定は、新生児のマスクリーニングとして先天性異常の検査項目、腫瘍マーカー、アレルギー検査、感染症項目、生化学的検査項目等に利用されている。ここで目的物質の測定のためには、得られた乾燥濾紙血から目的物質を抽出する必要がある。そのための操作は一般に、乾燥濾紙血を一定の

大きさに切り取ったものを容器に入れ、一定量の抽出液を添加し、一定時間放置することで、乾燥濾紙血から目的物質を抽出させる。その後、濾紙から抽出された目的物質を含む抽出液に対して免疫測定を適用する。

【0003】このような乾燥濾紙血を用いた、濾紙血液中の目的物質の測定方法は、特開昭64-63868、特許第3076699号、特開平8-304398およびJ.Clin.Chem.Clin.Biochem.Vol.24, 1986, pp.199-203に記載されている。特開昭64-63868は乾燥濾紙血液による肝炎ウィルスの検出方法について記載している。ここでは、乾燥濾紙血に緩衝液と抗体をコーティングしたビーズとを添加した後、肝炎ウィルスを検出している。ここに用いる緩衝液は例えば生理食塩水やトリス緩衝液、リン酸緩衝液など何れを用いてもよい、と記述されている。しかし、非特異反応防止剤や界面活性剤等の添加剤についての記載はない。

【0004】特許第3076699号は乾燥濾紙血中の前立腺特異抗原の測定方法である。ここでは、前立腺特異抗原(PA)を含む被検成分の抽出液について、Tris緩衝液、リン酸緩衝液等の緩衝液(Ph6.8~7.6)を用いること、抽出効率の点で界面活性剤、好ましくはTween-20等のノニオン界面活性剤を含有することが好ましく、濃度は0.1~0.5%程度であることが好ましい、と記載されている。しかし、ここでは、抽出操作と抗原抗体反応とを分けて実施していることから、濾紙からの前立腺特異抗原の抽出率を高める目的に界面活性剤の添加を行っているのみであり、抗原抗体反応に付随する非特異反応等の防止剤等を抽出液に添加していない。

【0005】特開平8-304398は、血液中に大量に存在する抗原を測定する場合における希釈誤差を伴う希釈測定操作を回避するために用いた濾紙血測定法において、乾燥濾紙血中の目的物質の抽出の際に、ブロッキング剤としてタンパク質を含む溶液で抽出している。しかし、抽出に用いる液のpHは5~6であることが記述されているのみであり、界面活性剤を用いた抽出は記載されていない。なお、ここに用いるブロッキング剤の添加目的は、血液中に大量に存在する目的抗原が非特異的に担体に吸着しないようにブロックするものであり、ngオーダーで存在する微量物質を測定する際に問題となる、血液中の目的物質以外の成分による担体への非特異反応や目的物質の抗原抗体反応に対する妨害反応等を防止するためではない。また、ここでは反応管中で抽出操作と同時に抗原抗体反応を行った後の不要となった濾紙を除去する点については一切記載されていない。

【0006】J.Clin.Chem.Clin.Biochem. Vol.24, 1986, pp.199-203は、乾燥濾紙血中のチロトロピン(TSH)の測定において、抗体をコーティングした試験管中にてTSHを抽出後、濾紙と抽出液をデカンテーションによって同時に排出している。しかし、マイクロプレートからの濾紙と抽出液の同時排出については一切記載されていない。

【0007】濾紙の除去方法については特開平8-189927において、多数の分析液中の固形物を同時に簡単に1回で除去できる装置が記載されている。この装置は、ウエル中の濾紙をざるのようにこし取る容器をマイクロプレートにセットしておき、濾紙と抽出液を入れ反応後、その装置を持ち上げて濾紙のみを除去するものである。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】血液を吸収させた濾紙を試料として免疫学的測定を行う方法において、より簡便な方法で短時間に効率的に濾紙より目的物質を抽出させ正確な測定を行うには、濾紙の除去法を含め従来法にはそれぞれに問題がある。即ち、濾紙からの目的物質の抽出と免疫反応とを別個に行う場合、別容器にて抽出および移し替えを行うこと等から、別容器の用意、抽出液の移し替え等、操作が複雑であり、そのための時間が余分に必要である。また、別容器で抽出する場合、測定に用いる液量よりも多い抽出液量で抽出を行うため、測定効率が悪く、検出限界を確保するためには添加濾紙を多く用いる必要がある。添加濾紙が多くなると添加濾紙が余分に必要となり、手間も増えることになる。他方、濾紙からの抗原抽出と免疫反応とを同系にて行う場合、抽出液中の目的抗原の濃度や存在形態によっては血液中の他成分による非特異反応や阻害反応等、不都合な反応が同時に生じることが考えられる。目的物質の正確な量を測定するには、これら不都合な反応は防止しなければならない。

【0009】ウエル中の濾紙の除去は、マイクロプレートのウエル中で抽出と免疫反応とを同系にて行うのであれば、抽出後の不要となった濾紙の除去が必須であることは当業者ならば容易に理解されよう。一般に、ウエル内に残された抽出済み濾紙の除去を行う方法として1ウエルずつピンセットやアスピレーター等を用いて取り除く方法がある。しかし、この方法は煩雑であり時間も手間もかかり、またピンセットやアスピレーターの先端でウエル内を傷つける可能性が高く正確な測定が行われないう可能性が高いことから、大量濾紙検体の処理方法としては不適切な濾紙除去方法である。この濾紙の除去方法として、特開平8-189927には除去器を使った方法が記載されている。これは、非常に簡単に一回で濾紙の除去を可能にするものであるが、濾紙からの抽出操作の間に、この除去器に抽出液中に抽出された目的物質やその他の成分が非特異的に吸着したりする可能性があり、微量な目的物質の測定には不向きである。本発明は、上記の種々の問題を一度に解決する測定方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、(1) 体液を吸収させた液吸収性担体を試料とする該体液に含まれる目的物質のマイクロプレートにおける免疫学的測定方法であって、目的物質と免疫反応する物質を含有さ

せた、目的物質を該担体から抽出するための抽出液を用いて目的物質を抽出し同系にて免疫反応を行い、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法；好ましくは、該抽出液が緩衝剤、界面活性剤および非特異反応防止剤を含有する、本発明の方法；より好ましくは、該免疫反応を行った後、マイクロプレートのウエルを緩衝液で一定量満たし、またはマイクロプレートのウエル中の抽出液を吸引除去後、緩衝液を該ウエル中に一定量満たし、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該担体が液表面にまで沈降する時間放置し、該マイクロプレートに衝撃を加えることにより、緩衝液と共に液吸収性担体を排出することを特徴とする、本発明の方法；および

【0011】(2) マイクロプレートのウエル中、抽出液または緩衝液とともに存在する体液を吸収させた液吸収性担体をウエルから除去するための方法であって、マイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法；好ましくはマイクロプレートを逆さまにし、該担体が液表面にまで沈降する時間放置し、次いで該マイクロプレートに衝撃を加えることにより、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】1) 免疫学的測定法

本発明に用いる液吸収性担体とは典型的には濾紙であるが、濾紙に限定されるものではなく、液を吸収可能な材質のものであればよい。例えば、綿棒、ガラス繊維、不織布、フェルト、フリース、織物布、編物布が挙げられる。濾紙であれば、一例としてWHATMAN社製のBFC-180濾紙が挙げられる。本発明における体液とは、血液、血清、血漿、汗、唾液、尿等、生体由来の分泌液である。

【0013】本発明は、目的物質の抽出操作と免疫反応とを同系にて行う。同系にて行うとは、目的物質の抽出操作と免疫反応とを同時に進行させる意味であり、典型的には抗原または抗体を固定化したマイクロプレートのウエル中にて、ウエル内に添加された濾紙から目的物質である抗原または抗体が抽出されるのと同時にウエルに固定化された抗体または抗原との反応が進行することである。これにより、以下の利点を享受できる：

- ・濾紙からの抽出、移し替えのための別容器は不要となり、抽出液の移し替え操作も省略され複雑な抽出操作を行わなくてよい。

- ・余分な濾紙および抽出液のデッドボリューム等が不要であり、必要最小限の濾紙および抽出液量での抽出が可能となり、抽出効率が高くなる。

- ・本発明は従来技術のように抽出操作および免疫反応のための時間設定を別個に行う必要がなく、抽出と免疫反応とを同系にて行うことから、そのための時間短縮がは

かられる。

・濾紙から抽出された目的物質がすべて免疫反応等に供されることになり抽出効率、反応性が高くなる。

【0014】目的物質の抽出操作と免疫反応とを同系で行うためには、抽出液として緩衝液の他に、界面活性剤および非特異反応防止剤を含有する抽出液を用いる。これにより、目的物質の抽出効率を高め、血液中の目的物質以外の成分による担体への非特異反応や目的物質の抗原抗体反応に対する妨害反応等が回避される。界面活性剤としては、Tween-20、Tween-40、10 ポリオキシエチレンラウリルエーテル等を用いるが、これらに限定されるものではなく、一般的に陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤等の中から任意に選択できる。非特異反応防止剤としては、市販のウシ血清アルブミン、ヤギ血清、ウシイムノグロブリン、マウスイムノグロブリン、スキムミルク等を用いるが、これらに限定されるものでない。

【0015】本発明は上記のように、抽出液に界面活性剤と非特異反応防止剤を添加し共存させることでそれぞれの持つ効果を得る事ができる測定方法を提供するもの20 である。しかし、ただ単に界面活性剤と非特異反応防止剤を添加すればよいという訳ではないと思われる。目的物質の種類によって最適な界面活性剤の種類、非特異反応防止剤の種類、およびそれらの抽出液中での濃度が異なる。抽出液中での濃度が最適でない場合、それらの効果が得られないばかりでなく、互いの効果を抑制することもある。例えば、ヘリコバクターピロリ抗体を測定する場合、界面活性剤としてはTween20、Tween40、ポリオキシラウリルエーテル等が挙げられ、好適な界面活性剤はポリオキシラウリルエーテルである。抽出液中の濃度30 は1g/L~10g/L、好ましくは2g/L~5g/L、より好ましくは3.26g/Lである。非特異反応防止剤としては新生子牛血清、ウシ血清アルブミン、ヤギ血清、ウシイムノグロブリン、マウスイムノグロブリン等が挙げられ、好ましくは新生子牛血清である。抽出液中の濃度は0.01L/L~0.1L/L、好ましくは0.01L/L~0.05L/L、より好ましくは0.02L/Lである。

【0016】また、C型肝炎ウイルス(HCV)抗体を測定する場合、界面活性剤としてはTween20、Tween40、ポリ30 オキシラウリルエーテル等が挙げられ、好適な界面活性剤はTeen20である。抽出液中の濃度は0.1~5%、好ましくは0.1~3%、より好ましくは1.05%である。非特異反応防止剤としては新生子牛血清、ウシ血清アルブミン、ヤギ血清、ウシイムノグロブリン、マウスイムノグロブリン等が挙げられ、好ましくはウシ血清アルブミン、ヤギ血清、それらの混合物である。ウシ血清アルブミンの抽出液中の濃度は、0.01~5%、好ましくは0.1~3%、より好ましくは1.6%であり、ヤギ血清の抽出液中の濃度は、0.1mg/ml~0.50

8mg/ml、好ましくは0.1mg/ml~0.6mg/ml、より好ましくは0.32mg/mlである。

【0017】抽出液に含有される緩衝液とはリン酸緩衝液、トリス緩衝液である。

【0018】目的物質と免疫反応する物質を含有させた抽出液における「目的物質と免疫反応する物質」とは、目的物質が抗原であれば、それに対する抗体を、目的物質が抗体であれば、それが認識する抗原を意味する。

【0019】本発明における免疫反応とは、通常の抗原抗体反応を意味し、ここでは、目的物質に対する抗体または抗原と目的物質との一次免疫反応、および得られた免疫複合体とそれに対する標識抗体または標識抗原との二次免疫反応の両者を含むことができる。本発明の免疫反応では、マイクロプレートなどの固相のウエルに抗体または抗原を固定化させたもの、あるいはウエルにアビジンまたはビオチンなどのハプテン化合物を結合させたものを利用できる。後者に用いる抽出液中にはビオチン標識抗体または抗原、アビジン標識抗体または抗原を含む抽出液を用いて抽出を行えばよい。この場合の一例としては、ウエル内に添加された濾紙から目的物質である抗原または抗体が抽出されるのと同系にて、目的物質抗原または抗体と抽出液中のビオチン標識抗体または抗原との免疫反応、およびウエル結合アビジンとビオチン標識抗体または抗原との反応が同時に進行する。あるいは抽出と同系にて、目的物質抗原または抗体と抽出液中のアビジン標識抗体または抗原との免疫反応、およびウエル結合ビオチンとアビジン標識抗体または抗原との反応が同時に進行する。

【0020】上述のように、正確な目的物質の測定には、抽出済み濾紙をウエルから除去する必要がある。この抽出後の濾紙の除去方法については以下に記述する。

【0021】2)濾紙の除去

一般に、濾紙の除去をピンセット等で1ウエルずつ取り除くとすれば、その時点でウエルの反応生成物を剥がしたりする可能性が高くなり、測定値の正確性に問題を生じることになる。本発明における濾紙の除去方法は、それ自身発明を構成するが、上記本発明の免疫測定方法におけるように、この濾紙の除去が完全に簡便に行われて始めて、測定操作法として一連の完成度が高くなる。

【0022】そこで、本発明者らは、抽出及び免疫反応等終了後に残された抽出済み濾紙の除去操作に関して鋭意研究した結果、以下の簡便な方法を見出した。即ち、本発明は、マイクロプレートのウエル中、抽出液または緩衝液とともに存在する体液を吸収させた液吸収性担体をウエルから除去するための方法であって、マイクロプレートを逆さまにし、該担体が液表面にまで沈降する時間放置し、次いで該マイクロプレートに衝撃を加えることにより、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法をも提供する。

【0023】具体的には、抽出済み濾紙を含むマイクロ

プレートのウエル中に緩衝液を一定量満たしマイクロプレートを逆さまにし、該担体が液表面にまで沈降する時間放置し、次いで該マイクロプレートに衝撃を加えることにより、液吸収性担体である濾紙と抽出液および緩衝液を同時に排出する。あるいは、抽出済み濾紙を含むマイクロプレートのウエル中の抽出液をピペット等を用いて吸引除去後、緩衝液をマイクロプレートのウエル中に一定量満たし、マイクロプレートを逆さまにして緩衝液と共に濾紙を排出する。つまり、マイクロプレートを逆さまにすることでウエル底面に沈降していた濾紙をウエル上部へ落下させ、緩衝液と共に抽出液と濾紙を排出することで濾紙の除去が短時間で効率よく簡便に完了するのである。

【0024】該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出するには、該担体がウエル上部に落下、即ち液表面にまで沈降する時間放置し、次いで該逆さまにしたマイクロプレートに衝撃を加えて行う。「衝撃」を加える手法としては、抽出液および担体を同時排出できる強度が得られるような、数センチから10数センチ幅の小さな振幅の振り下ろしを通常1回行うのが典型的である。あるいは、逆さまにしたマイクロプレートの低部をたたく等して抽出液および担体を同時排出してもよい。

【0025】ここに添加される緩衝液は、抽出の際に用いる緩衝液と同種の緩衝液を用いるのが好ましいが、生成している免疫複合体を破壊しない限り、他の緩衝液を用いることもできる。

【0026】マイクロプレートのウエル中より濾紙と抽出液を除去する方法において、マイクロプレートのウエル中における最終液量は100~400μL、好ましくは150~400μL、さらに好ましくは200~400μLである。よって、添加する緩衝液量はこれら最終液量とする液量を添加すればよい。緩衝液添加量は使用するマイクロプレートのウエル容積量にもよるが、一般的にELISA試薬に用いられる96穴マイクロプレートのウエル容積に応じて、そのウエルの最大容積量までの添加も可能である。

【0027】なお、目的物質を免疫学的に測定するためアイソトープを用いて検出する場合、操作の過程で不要となった濾紙の除去操作は必要でない。しかし、アイソトープでの検出は特殊な施設を必要とし、その取扱いにも制約が多く、一般的に用いることは困難である。かかる点からも、本発明における簡便な濾紙の除去方法は有益である。

【0028】ここまで説明してきた本発明の免疫測定方法の一態様は次の通りである。

(a) 目的物質と免疫反応する物質を含有させた、目的物質を該担体から抽出するための抽出液を用いて目的物質を、血液を吸収させた濾紙から抽出し同系にて一次免疫反応を行い、(b) マイクロプレートのウエル中より液吸収性担体と抽出液を同時に排出するに当たり、

(i) 緩衝液を該ウエル中に一定量満たし、または(i

i) マイクロプレートのウエル中の抽出液を吸引除去後、緩衝液を該ウエル中に一定量満たし、(c) マイクロプレートを逆さまにし、該担体が液表面にまで沈降する時間放置し、次いで該マイクロプレートに衝撃を加えることにより、液吸収性担体と抽出液および緩衝液を同時に排出し、そして(d) 一次免疫反応により得られた免疫複合体に対する標識抗体または標識抗原を用いて当該目的物質を免疫測定する。

【0029】血液が吸収された濾紙からの抽出操作と免疫反応の同系反応において、最終的に不要となった濾紙の除去方法については先行技術、特許には記載されておらず、本発明においてはじめて具体的に開示された。つまり、本発明はウエル内で濾紙からの抽出と同時に抗原抗体反応が行われた後の不要濾紙の除去操作方法までを一連の操作方法として、従来技術ではできなかった操作を可能とするものである。

【0030】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0031】実施例1

ペプシノゲンI測定

測定には、ペプシノゲンI測定用試薬キット、オートエースPGシリーズ ペプシノゲンI(アズウエル社製)を用いた。以下の測定1、比較測定例1および比較測定例2は、血清測定値が予め算出されている8検体について、それぞれ同一患者から濾紙血を作成し測定を行ったものである。被験者8人の指先より採血針またはランセットを用いて採取した血液を濾紙(WHATMAN BFC-180)の所定箇所へ滴下し吸収させ、十分乾燥させた乾燥濾紙血を用いた。

測定1

血液の付着した乾燥濾紙血を直径3mmの大きさの円に切り取り、これを2枚、ペプシノゲンIモノクローナル抗体結合マイクロプレートのウエル内へ添加した。これに抽出液B(リン酸緩衝液をベースとする液に0.1%Tween20、10g/L-牛アルブミン、2g/L-牛IgG、10mg/L-マウスIgGを添加調製した)100μLを添加した。1分間振とう後、室温下で2時間抽出と抗原抗体反応を行った。2時間後、反応液を除去し、洗浄液(リン酸緩衝液ベースのTween20 0.1%および塩化ナトリウム0.15M)をウエル内容積分十分量満たし、マイクロプレートを逆さに固定した。これによりウエル底面に沈降していた抽出済み濾紙が洗浄液の中をウエル上部へと移動する。次いで、逆さまにしたマイクロプレートを数センチの振幅で1回振り下ろし、洗浄液と共に抽出済み濾紙を排出させた。ペルオキシダーゼ標識ペプシノゲンIモノクローナル抗体液100μLを添加し室温下45分間第二反応を行った。洗浄後、基質液(テトラメチルベンチジン(TMBZ)、過酸化水素)100μLを添加し酵素反応10分

後、反応停止液（硫酸）100 μLを添加して酵素反応を停止させ、415/620nmでの吸光度を測定した。同様にペプシノゲンIの標準液を測定し、標準曲線を作製して濾紙血中のペプシノゲンI濃度を換算し算出した。

【0032】比較測定例1

血液の付着した乾燥濾紙血を直径3mmの大きさの円に切り取り、これを6枚、試験管等の容器に入れ、抽出液A（リン酸緩衝液にBSAを添加した液）を200 μL添加した。室温下で1分間振とう後2時間放置し乾燥濾紙血からペプシノゲンIを抽出させた。2時間後、ペプシノゲンIが抽出された抽出液を別の試験管に移し取り、この液を測定検体として測定を行った。この時、回収された抽出液量は約150 μLである。ペプシノゲンIモノクローナル抗体結合マイクロプレートにこの液100 μLを添加し室温下45分間第一反応を行った。洗浄操作後、ペルオキシダーゼ標識ペプシノゲンIモノクローナル抗体液を100 μL添加し室温下45分間第二反応を行った。洗浄操作後、基質液（TMBZ、過酸化水素）を100 μL添加し酵素反応10分後、反応停止液（硫酸）100 μLを添加して酵素反応を停止させ、415/620nmでの吸光度を測定した。同様にペプシノゲンI標準液を測定し、標準曲線を作製して濾紙血中のペプシノゲンI濃度を換算し算出した。

【0033】比較測定例2

抽出液Bの代わりに抽出液Aを用いること以外は、上記測定1と同様に操作した。

【0034】比較測定例1は濾紙を別に用意した試験管中へ入れ、抽出液Aで抽出を行ったものである。抽出後、この抽出液のみを、抗体が結合されたマイクロプレートのウエルに添加し、抗原抗体反応を行うものである。測定1は濾紙を直接、抗体が結合されたマイクロプレートのウエル中に入れ、さらに抽出液Bを添加し抽出と同時に抗原抗体反応を行うものである。この時用いる抽出液Bは界面活性剤、非特異反応防止剤が添加された液である。比較測定例2は比較測定例1で用いた抽出液Aを測定1の抽出方法に用いたものである。得られた結果を以下の表1に示す。なお、表中、血清測定とは、オートエースPGシリーズペプシノゲンI（アズエル社製）の操作方法に従い、対応する検体を用いて測定した結果である。

【表1】

No.	血清測定 ng/mL	測定1 ng/mL	比較 測定例1 ng/mL	比較 測定例2 ng/mL
1	56.60	51.96	49.30	43.38
2	41.10	42.10	32.80	39.24
3	34.70	35.34	31.30	25.68
4	108.40	108.46	98.90	72.24
5	69.40	70.08	70.00	52.56
6	112.10	114.28	104.00	87.66
7	137.80	137.76	110.40	98.34
8	52.00	59.82	55.50	64.74

【0035】また、血清測定値と各濾紙測定値との関係を示すための相関図を図1に示す。目的物質であるペプシノゲンIの血清測定値と最も相関性の良い測定法は本発明の測定1である。比較測定例1は抽出操作を試験管で行い、試験管中の抽出液の一部をマイクロプレートのウエルに添加して測定している。このため、比較測定例1では、抽出操作と免疫反応とを同時に行う測定1より反応性が低く、また抽出効率を高める界面活性剤が添加されていないことから、測定1より低値を示したと考えられる。比較測定例2は試験管中で抽出を行う抽出液Aを測定1で用いたものであるが、抽出液A中には非特異反応防止剤のBSAのみ添加しており、抽出効率を高める界面活性剤が添加されていないことから、測定感度が低下し測定1より低値を示す結果となった。

【0036】実施例2

ヘリコバクター ピロリIgG抗体の測定
測定には、ヘリコバクター ピロリIgG抗体測定用試薬キット、オートエースH・ピロリG（アズエル社製）を用いた。以下の測定2、比較測定3および比較測定例4は、血清測定値が予め算出されている10検体について、それぞれ同一患者から濾紙血を作成し測定したものである。被験者10人の指先より採血針またはランセットを用いて採取した血液を濾紙（WHATMAN BFC-180）の所定箇所へ滴下し吸収させ、十分乾燥させた乾燥濾紙血を用いた。

測定2

血液の付着した乾燥濾紙血を直径3mmの大きさの円に切り取り、これを1枚、ヘリコバクター ピロリ抗原結合マイクロプレートのウエル内へ添加し、抽出液D（リン酸緩衝液をベースとする液に3.3g/L-ポリオキシエチレンラウリルエーテル、20mL/L-新生子牛血清を添加添加し調製した液）100 μLを添加後、1分間振とうし、室温下で2時間抽出と抗原抗体反応を行った。2時間後、反応液を除去し、洗浄液（リン酸緩衝液ベースにポリオキシラウリルエーテル0.05%および塩化ナトリウム0.15M）をウエル内容積分十分量満たし、マイクロプ

レート逆さに固定する。これによりウエル底面に沈降していた抽出済み濾紙が洗浄液の中をウエル上部へと移動する。次いで、逆さまにしたマイクロプレート为数センチの振幅で1回振り下ろし、洗浄液と共に抽出済み濾紙を排出させた。ペルオキシダーゼ標識ヒトIgGモノクローナル抗体100μLを添加し37℃下45分間第二反応を行った。洗浄後、基質液(TMBZ、過酸化水素)を100μL添加し酵素反応10分後、反応停止液(硫酸)100μLを添加して酵素反応を停止させ、415/620nmでの吸光度を測定する。同様にヘリコバクターピロリ抗体標準液を測定し、標準曲線を作製して濾紙血中のヘリコバクターピロリ抗体濃度を換算し算出した。

【0037】比較測定例3

血液の付着した乾燥濾紙血を直径3mmの大きさの円に切り取り、これを6枚、試験管等の容器に入れ、抽出液C(リン酸緩衝液)を200μL添加した。室温下で1分間振とう後2時間放置し乾燥濾紙血からヘリコバクターピロリ抗体を抽出した。2時間後、ヘリコバクターピロリ抗体が抽出された抽出液を別の試験管に移し取った。この時、回収される抽出液量は約150μLである。この液をさらに、測定2に用いた抽出液Dで5倍希釈した液を測定検体として測定に用いた。ヘリコバクターピロリ抗原結合マイクロプレートに、この液100μL添加し37℃下45分間第一反応を行った。洗浄操作後、ペルオキシダーゼ標識ヒトIgGモノクローナル抗体*

液を100μL添加し37℃下45分間第二反応を行った。洗浄後、基質液(TMBZ、過酸化水素)を100μL添加し酵素反応10分後、反応停止液(硫酸)100μL添加して酵素反応を停止させ、415/620nmでの吸光度を測定した。同様にヘリコバクターピロリ抗体標準液を測定し、標準曲線を作製して濾紙血中のヘリコバクターピロリ抗体濃度を換算し算出した。

【0038】比較測定例4

抽出液Dの代わりに抽出液Cを用いる以外は、上記測定2と同様に操作した。

【0039】比較測定例3は濾紙を別に用意した試験管

中へ入れ、抽出液Cで抽出を行ったものである。濾紙抽出後、この抽出液のみ抗原が感作されたマイクロプレートのウエルに添加し、抗原抗体反応を行うものである。測定2は濾紙を直接、抗原結合マイクロプレートのウエル中に入れ、さらに抽出液Dを添加し抽出と同時に抗原抗体反応を行うものである。この時用いる抽出液Dは界面活性剤、非特異反応防止剤が添加された液である。比較測定例4は比較測定例3で用いた抽出液Cを測定2の抽出方法に用いたものである。

【0040】得られた結果を表2に示す。なお、表中、

血清測定とは、オートエースH・ピロリG(アズエル社製)の操作方法に従い、対応する検体を用いて測定した結果である。判定における+は陽性(16.5U/mL以上)を、-は陰性(3.5U/mL)を示す。

【表2】

No.	血清測定		測定2		比較測定例3		比較測定例4	
	U/mL	判定	U/mL	判定	U/mL	判定	U/mL	判定
1	144.24	+	144.62	+	136.95	+	139.37	+
2	2.82	-	2.10	-	0.00	-	63.91	+
3	69.25	+	68.37	+	59.17	+	117.25	+
4	60.91	+	58.18	+	51.01	+	131.30	+
5	1.23	-	1.00	-	0.00	-	56.75	+
6	55.12	+	55.15	+	51.54	+	119.36	+
7	156.38	+	150.34	+	128.74	+	163.73	+
8	174.90	+	167.96	+	135.35	+	172.52	+
9	130.56	+	131.92	+	119.29	+	137.51	+
10	3.69	-	3.20	-	0.00	-	64.99	+

【0041】また、血清測定値と各濾紙測定値との関係を示すため相関図を図2に示す。目的物質であるヘリコバクターピロリ抗体の血清測定値と最も相関性の良い測定法は本発明の測定2である。比較測定例3は抽出操作を試験管で行って、試験管中の抽出液の一部をマイクロプレートのウエルに添加して測定している。このため、比較測定例3では、抽出操作と免疫反応とを同時に行う測定2より反応性が低く、また抽出効率を高める界面活性剤が添加されていないことから、測定2より低値

を示したと考えられる。特に、高濃度域において、測定2よりも低値を示した。比較測定例4は試験管中で抽出を行う抽出液Cを測定2で用いたものであるが、抽出液C中には非特異反応防止剤BSAのみ添加しているが、この添加濃度では十分な非特異反応防止効果が得られず、血清測定値陰性検体がすべて比較測定例4では陽性判定結果となってしまった。さらには、抽出効率を高めたり、妨害反応を回避する界面活性剤が添加されていないことから、このような結果を示す結果となった。

【0042】実施例3

前立腺特異抗原：PSA測定
測定には、PSA測定用試薬キット、オートエースPSA（アズエル社製）を用いた。以下の測定3、比較測定例5および比較測定例6は、血清測定値が予め算出されている16検体について、それぞれ同一患者から濾紙血を作成し測定したものである。被験者16人の指先より採血針またはランセットを用いて採取した血液を濾紙（WHATMAN BFC-180）の所定箇所へ滴下し吸収させ、十分乾燥させた乾燥濾紙血を用いて行った。

測定3

血液の付着した乾燥濾紙血を直径3mmの大きさの円に切り取り、これを2枚、アビジン感作マイクロプレートのウエル内へ添加し、抽出液F（トリス緩衝液をベースとする液にビオチン標識抗PSAモノクローナル抗体、5g/L-牛アルブミン、0.5g/L-牛IgG、0.1g/L-Tween40等を添加し調製した液）100μLを添加した。1分間振とう後、室温下で2時間放置し、抽出と抗原抗体反応およびアビジン-ビオチン反応を行った。2時間後、反応液を除去し、洗浄液（リン酸緩衝液ベースにTween20 0.02%および塩化ナトリウム0.006M）をウエル内容積十分量満たし、マイクロプレートを逆さに固定した。これによりウエル底面に沈降していた抽出済み濾紙が洗浄液の中をウエル上部へと移動する。次いで、逆さまにしたマイクロプレートを数センチの振幅で1回振り下ろし、洗浄液と共に抽出済み濾紙を排出させた。ペルオキシダーゼ標識PSAモノクローナル抗体液100μLを添加し室温下1時間第二反応を行った。洗浄後、基質液（TMBZ、過酸化水素）を100μL添加し酵素反応10分後、反応停止液（硫酸）100μLを添加して酵素反応を停止させ、415/620nmでの吸光度を測定した。同様にPSA標準液を測定し、標準曲線を作製して濾紙血中のPSA濃度を換算し算出した。

【0043】比較測定例5

血液の付着した乾燥濾紙血を直径3mmの大きさの円に切り取り、これを9枚、試験管等の容器に入れ、抽出液E（リン酸緩衝液をベースとする液）を250μL添加する。室温下で1分間振とう後、2時間放置し乾燥濾紙血からPSAを抽出する。この時、回収される抽出液量は約150μLである。2時間後、PSAが抽出された抽出液を別の試験管に移し取り、この液を検体として測定に用いる。アビジン感作マイクロプレートにこの液50μLとビオチン標識抗PSAモノクローナル抗体液100μLを添加し、室温下1時間第一反応を行う。洗浄操作後、ペルオキシダーゼ標識PSAモノクローナル抗体液を100μL添加し室温下1時間第二反応を行った。洗浄後、基質液（TMBZ、過酸化水素）を100μL添加し酵素反応10分後、反応停止液（硫酸）100μL添加して酵素反応を停止させ、415/620nmでの吸光度を測定した。同様にPSA標準液を測定し、標準曲線*50

*線を作製して濾紙血中のPSA濃度を換算し算出した。

【0044】比較測定例6

抽出液Fの代わりに抽出液Eを用いる以外は、上記測定3と同様に操作した。

【0045】比較測定例5は濾紙を別に用意した試験管中へ入れ、抽出液Eで抽出を行ったものである。濾紙抽出後、この抽出液のみをアビジンが結合されたマイクロプレートのウエルに添加し、さらにビオチン標識抗体液を添加し抗原抗体反応を行うものである。測定3は濾紙を直接、アビジンが感作されたマイクロプレートのウエル中に入れ、さらに抽出液Fを添加し抽出と同時に抗原抗体反応を行うものである。この時用いる抽出液Dはビオチン標識抗体液、界面活性剤、非特異反応防止剤が添加された液である。比較測定例6は比較測定例5で用いた抽出液Eを測定3の抽出方法に用いたものである。

【0046】得られた結果を表3に示す。なお、表中、血清測定とは、オートエースPSA（アズエル社製）の操作方法に従い、対応する検体を用いて測定した結果である。

【表3】

Table with 5 columns: No., 血清測定 (ng/mL), 測定3 (ng/mL), 比較測定例5 (ng/mL), 比較測定例6 (ng/mL). Rows 1-16.

【0047】また、血清測定値と各濾紙測定値との関係を示すための相関図を図3に示す。目的物質であるPSAの血清測定値と最も相関性の良い測定法は本発明の測定3である。比較測定例5は抽出操作を試験管で行って、試験管中の抽出液の一部をマイクロプレートのウエルに添加して測定しており、さらにビオチン標識抗体液を添加することから、抽出液中のPSAが希釈され、血

清測定値より低値を示す。特に、高濃度域において、血清測定値よりも低値を示す。比較測定例6は試験管中で抽出を行う抽出液Eを測定3で用いたものであるが、抽出液E中には非特異反応防止剤BSAのみ添加しており、界面活性剤の添加は行っていない。このため、血清測定値よりも比較測定例6では低値を示す結果となった。

【0048】実施例4

マイクロプレートのウエル中で抽出操作と抗原抗体反応を行った後、抽出済み濾紙を除去する方法において、ウエル中に添加する緩衝液の最終液量と、ウエル中の濾紙が除去される割合を検討した。ウエル中に添加された緩衝液の最終液量を50 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L、350 μ L、400 μ Lとし、濾紙の枚数を1枚、2枚で添加し、マイクロプレートを逆さまにして濾紙の排出を確認した。各10回実施し、そのうち濾紙がウエル中に残されるウエル数を表に示した。

【0049】

【表4】

緩衝液添加液量	濾紙1枚 残るウエル/回数	濾紙2枚 残るウエル/回数
50 μ L	10/10	10/10
100 μ L	2/10	4/10
150 μ L	1/10	1/10
200 μ L	0/10	0/10
250 μ L	0/10	0/10
300 μ L	0/10	0/10
350 μ L	0/10	0/10
400 μ L	0/10	0/10

【0050】その結果、濾紙1枚、2枚の場合共に、緩衝液添加の最終液量が200 μ L以上であれば、完全にウエル中から濾紙が除去された。

【0051】実施例5

抽出液中における界面活性剤および非特異反応防止剤の最適配合比率の検定A.ヘリコバクターピロリIgG抗体測定ヘリコバクターピロリ抗体測定において、リン酸緩衝液に界面活性剤としてポリオキシラウリルエーテルを0.06125g/L、0.1225g/L、0.245g/L、0.49g/L添加し血清測定値を対照にその添加効果を確認した。得られた結果を表5に示す。

【表5】

界面活性剤の添加効果

血清値	濾紙面測定値	
	U/mL	判定
1	13.24	判定
2	1.23	判定
3	55.12	判定
4	3.69	判定
		界面活性剤:0.06125g/L
	99.17	判定
	51.69	判定
	43.59	判定
	128.35	判定
	97.03	判定
		界面活性剤:0.1225g/L
	36.96	判定
	16.87	判定
	113.74	判定
	25.37	判定
		界面活性剤:0.245g/L
	30.96	判定
	10.87	判定
	100.74	判定
	20.37	判定
		界面活性剤:0.49g/L
	判定	判定
	判定	判定
	判定	判定
	判定	判定

結果は、濃度依存的に測定値が低下し血清値に近づく傾向を示している。

【0052】次に、界面活性剤の濃度をさらに0.49g/L、2.45g/L、3.267g/L、4.9g/Lと高濃度に設定し、各液に新生子牛血清を0.02L/L添加し、測定した。得られた結果を表6に示す。

【表6】

界面活性剤および非特異反応防止剤の配合比率による効果

18

	血清値		濾紙血測定値		界面活性剤:0.49g/L 非特異反応防止剤:0.02L/L		界面活性剤:2.45g/L 非特異反応防止剤:0.02L/L		界面活性剤:3.267g/L 非特異反応防止剤:0.02L/L		界面活性剤:4.9g/L 非特異反応防止剤:0.02L/L	
	U/mL	判定	U/mL	判定	U/mL	判定	U/mL	判定	U/mL	判定	U/mL	判定
1	144.24	+	149.05	+	159.46	+	164.82	+	164.82	+	143.03	+
2	2.82	-	13.73	-	3.21	-	2.8	-	2.8	-	0	-
3	2.9	-	11.96	-	0	-	2.08	-	2.08	-	2.54	-
4	69.25	+	103.04	+	108.03	+	86.37	+	86.37	+	72.98	+
5	60.91	+	91.27	+	58.83	+	58.18	+	58.18	+	71.35	+
6	55.12	+	85.78	+	64.37	+	55.15	+	55.15	+	69.89	+
7	156.38	+	145.25	+	173.08	+	150.34	+	150.34	+	136.28	+
8	174.9	+	162.63	+	178.2	+	187.86	+	187.86	+	140.44	+
9	130.56	+	145.52	+	134.03	+	130.92	+	130.92	+	124.35	+
10	3.69	-	14.86	-	0.91	-	3.5	-	3.5	-	0	-
11	188.78	+	154.74	+	169.81	+	187.08	+	187.08	+	166.69	+
12	174.44	+	152.69	+	166.02	+	173.36	+	173.36	+	180.73	+

【0053】その結果、ポリオキシラウリルエーテル 3.267g/L、新生子牛血清0.02L/Lを添加した抽出液の濾紙測定値が血清値と最も良く一致し、判定も一致した。ポリオキシラウリルエーテル濃度が4.9g/Lと高濃度になると、血清値より低値を示す傾向があった。

【0054】B、C型肝炎ウイルス抗体測定
C型肝炎ウイルス抗体測定において、リン酸緩衝液に界面活性剤としてTween20（濃度1.125%、1.050%、1.025%、1.000%）および非特異反応防止剤としてウシ血清アルブミンおよびヤギ血清を種々の濃度で用い、測定した。得られた結果を表7に示す。

【表7】

界面活性剤および非特異反応防止剤の配合比率

	血清測定		濾紙血測定							
	INDEX	判定	Tween-20:1.125% ウシ血清アルブミン:1% ヤギ血清:0.2mL/mL		Tween-20:1.05% ウシ血清アルブミン:1.6% ヤギ血清:0.32mL/mL		Tween-20:1.025% ウシ血清アルブミン:1.8% ヤギ血清:0.36mL/mL		Tween-20:1% ウシ血清アルブミン:2% ヤギ血清:0.4mL/mL	
	INDEX	判定	INDEX	判定	INDEX	判定	INDEX	判定	INDEX	判定
1	10.4	+	9.46	+	10.53	+	8.95	+	7.72	+
2	26.31	+	21.4	+	26.11	+	24.78	+	25.78	+
3	2.35	+	2.84	+	2.36	+	2.56	+	2.44	+
4	24.58	+	21.12	+	24.9	+	23.48	+	26.52	+
5	4.11	+	7.23	+	4.87	+	7.29	+	8.02	+
6	19.01	+	15.32	+	17.01	+	14.75	+	15.67	+
7	0.41	-	1.42	+	0.64	-	1.19	+	1.5	+
8	0.26	-	0.63	-	0.41	-	0.58	-	0.7	-

【0055】その結果、Tween20;1.05%、ウシ血清アルブミン1.6%およびヤギ血清0.32mL/mLを添加した抽出液の濾紙測定値が血清値と最も良く一致し、判定も一致した。

【0056】以上AおよびBの結果より、界面活性剤と非特異反応防止剤を共存させることはその互いの効果を得られること、配合の際には最適な抽出液中の濃度があること、配合濃度によっては互いの効果を抑制すること

もあることが確認された。つまりは、界面活性剤が高濃度に存在することで、マイクロプレートのウェルに固定された抗原をはがしたりすることで抗原抗体反応を阻害する悪影響も及ぼすこと、さらには共存する非特異反応防止剤による非特異反応の防止効果を妨害する可能性もあると考える。

【0057】

【発明の効果】本発明は、体液を吸収させた液吸収性担体を試料として免疫学的測定を行う方法において簡便かつ短時間に効率的に担体から目的物質を抽出させ、正確*

*な免疫学的測定を可能とする方法である。また、本発明は緩衝液の添加という簡便な方法により、簡単に濾紙を除去できることからメリットは非常に高い。

【図面の簡単な説明】

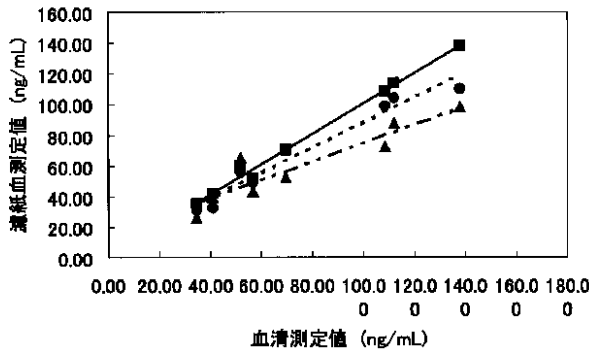
【図1】 ペプシノゲンIの血清測定値と各濾紙測定値との関係を示すための相関図である。

【図2】 ヘリコバクター ピロリ抗体の血清測定値と各濾紙測定値との関係を示すための相関図である。

【図3】 前立腺特異抗原：PSAの血清測定値と各濾紙測定値との関係を示すための相関図である。

【図1】

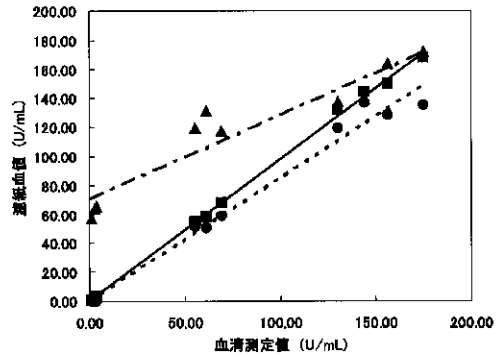
ペプシノゲンI 相関



■—■ 測定1	$y=0.9912x + 1.6394$ $r=0.9959$
●---● 比較測定例1	$y=0.8237x + 6.0036$ $r=0.9794$
▲---▲ 比較測定例2	$y=0.6107x + 13.75$ $r=0.9305$

【図2】

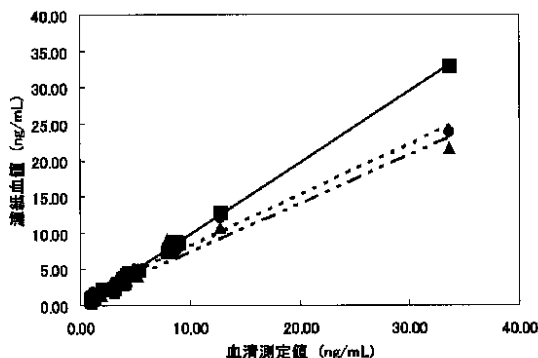
ヘリコバクター ピロリ相関



■—■ 測定2	$y=0.9789x + 0.0592$ $r=0.9942$
●---● 比較測定例3	$y=0.8540x - 0.0342$ $r=0.9915$
▲---▲ 比較測定例4	$y=0.5859x + 69.853$ $r=0.9467$

【図3】

PSA相関



■—■ 測定3	$y=0.9833x - 0.0265$ $r=0.9991$
●---● 比較測定例5	$y=0.7041x + 1.1409$ $r=0.9919$
▲---▲ 比較測定例6	$y=0.6669x + 0.7093$ $r=0.9741$

【手続補正書】

【提出日】平成14年4月26日(2002.4.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液を吸収させた液吸収性担体を試料とする該体液に含まれる目的物質のマイクロプレートにおける免疫学的測定方法であって、目的物質を該担体から抽出するための抽出液を用いて目的物質を抽出し同系にて免疫反応を行い、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法。

【請求項2】 マイクロプレートのウエルに抗原または抗体を固定化させたマイクロプレートを用いる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 マイクロプレートのウエルにアビジンまたはビオチンを結合させたマイクロプレートを用いる、請求項1記載の方法。

【請求項4】 該抽出液が緩衝剤、界面活性剤および非特異反応防止剤を含有する、請求項1から3までのいずれか記載の方法。

【請求項5】 該抽出液がビオチン標識抗体または抗原、あるいはアビジン標識抗体または抗原を含有する、請求項3記載の方法。

【請求項6】 該免疫反応を行った後、マイクロプレートのウエルを緩衝液で一定量満たし、次いでマイクロプレートを逆さまにして緩衝液と共に抽出液および液吸収性担体を排出することを特徴とする請求項1から5までのいずれか記載の方法。

【請求項7】 マイクロプレートのウエル中の抽出液を吸引除去後、緩衝液を該ウエル中に一定量満たし、次いでマイクロプレートを逆さまにして緩衝液と共に液吸収性担体を排出することを特徴とする請求項1から5までのいずれか記載の方法。

【請求項8】 マイクロプレートのウエル中に緩衝液を添加した後の最終液量が200~400 μ Lであることを特徴とする請求項6または7記載の方法。

【請求項9】 液吸収性担体が濾紙である、請求項1から8までのいずれか記載の方法。

【請求項10】 マイクロプレートのウエル中、抽出液または緩衝液とともに存在する体液を吸収させた液吸収性担体をウエルから除去するための方法であって、マイ

クロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、(1) 体液を吸収させた液吸収性担体を試料とする該体液に含まれる目的物質のマイクロプレートにおける免疫学的測定方法であって、目的物質を該担体から抽出するための抽出液を用いて目的物質を抽出し同系にて免疫反応を行い、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該抽出液とともに該液吸収性担体を同時に排出することを特徴とする方法； 一態様として、ウエルに抗原または抗体を固定化させたマイクロプレート、またはウエルにアビジンまたはビオチンを結合させたマイクロプレートを用いる本発明の方法； 好ましくは、該抽出液が緩衝剤、界面活性剤および非特異反応防止剤を含有する、または該抽出液がビオチン標識抗体または抗原あるいはアビジン標識抗体または抗原をさらに含有する本発明の方法； より好ましくは、該免疫反応を行った後、マイクロプレートのウエルを緩衝液で一定量満たし、またはマイクロプレートのウエル中の抽出液を吸引除去後、緩衝液を該ウエル中に一定量満たし、次いでマイクロプレートを逆さまにし、該担体が液表面にまで沈降する時間放置し、該マイクロプレートに衝撃を加えることにより、緩衝液と共に液吸収性担体を排出することを特徴とする、本発明の方法；および

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】マイクロプレートのウエル中より濾紙と抽出液を除去する方法において、マイクロプレートのウエル中における最終液量は100~400 μ L、好ましくは150~400 μ L、さらに好ましくは200~400 μ Lである。よって、添加する緩衝液量はこれら最終液量とする液量を添加すればよい。緩衝液添加量は使用するマイクロプレートのウエル容積量にもよるが、一般的にELISA試薬に用いられる96穴マイクロプレートのウエル容積に依りて、そのウエルの最大容積量までの添加も可能である。

专利名称(译)	免疫学测量方法使用液体吸收剂载体作为样品		
公开(公告)号	JP2003222627A	公开(公告)日	2003-08-08
申请号	JP2002023746	申请日	2002-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	AZUERU		
申请(专利权)人(译)	株式会社アズウエル		
[标]发明人	河地豊 小坂美恵子 伊藤重喜		
发明人	河地 豊 小坂 美恵子 伊藤 重喜		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.Z		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种使用吸收了血液作为样本的液体吸收载体进行免疫学测定的方法，该方法较为简单，可以在短时间内有效地提取目标物质并进行准确的测定。本发明的免疫分析方法是在微板中的免疫分析方法，其包含与靶标物质发生免疫反应的物质，并用于从载体提取靶标物质。使用靶提取物在同一系统中进行免疫反应，然后将微孔板倒置，同时将吸液载体与提取物一起排出。

10

No.	血清测定 ng/mL	測定 1 ng/mL	比較 測定例 1 ng/mL	比較 測定例 2 ng/mL
1	56.60	51.96	49.30	43.38
2	41.10	42.10	32.80	39.24
3	34.70	35.34	31.30	25.68
4	108.40	108.46	98.90	72.24
5	69.40	70.08	70.00	52.56
6	112.10	114.28	104.00	87.66
7	137.80	137.76	110.40	98.34
8	52.00	59.82	55.50	64.74