

(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2005-195434

(P2005-195434A)

(43) 公開日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/532

GO 1 N 33/532

Z

GO 1 N 33/577

GO 1 N 33/577

Z

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2004-1384 (P2004-1384)

(22) 出願日 平成16年1月6日 (2004.1.6)

(71) 出願人 591258484

株式会社エイアンドティー

神奈川県藤沢市遠藤2023番地1

(74) 代理人 100080609

弁理士 大島 正孝

(72) 発明者 川野 充康

神奈川県藤沢市遠藤2023-1 株式会  
社エイアンドティー内

(72) 発明者 岩本 久彦

神奈川県藤沢市遠藤2023-1 株式会  
社エイアンドティー内

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法および免疫測定試薬

(57) 【要約】

【課題】高感度かつ広い測定範囲を有する免疫測定試薬および免疫測定方法を提供すること。

【解決手段】抗原に対する親和力が $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$  L / m o l の範囲にある第1標識モノクローナル抗体および該抗原に対する親和力が $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 未満 L / m o l の範囲にある第2標識モノクローナル抗体の組み合わせからなる免疫測定試薬およびこの免疫測定試薬を用いた免疫測定方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗原に対する親和力が  $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$  L / mol の範囲にある第1標識モノクローナル抗体および該抗原に対する親和力が  $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$  未満 L / mol の範囲にある第2標識モノクローナル抗体の組み合わせからなることを特徴とする免疫測定試薬。

## 【請求項 2】

固相に対して直接固定されたまたは固定剤を介して固定された抗原の存在する試料に、該抗原に対する第1標識モノクローナル抗体および第2標識モノクローナル抗体を添加し、得られた免疫反応物を該標識について測定することを特徴とする免疫測定法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、異なる2種類の標識モノクローナル抗体を使用する免疫測定法および異なる2種類の標識モノクローナル抗体を含有する免疫測定試薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、臨床検査や免疫学、生化学、分子生物学などの研究分野で、操作が簡便なことから免疫反応を利用した測定法が多用されている。その内、特に酵素免疫測定法や化学発光免疫測定法等が高感度化の観点から多用されている。

20

## 【0003】

これらの測定法は、通常、同一抗原上の異なったエピトープを認識する2種の抗体を、それぞれ、粒子や試験管壁に固定する抗体または標識抗体として用いるサンドイッチ法にて被検体中の抗原量を測定する。この測定法によって検量線を作成すると、ある抗原濃度以下では、抗原濃度が低下するに従って傾きが小さくなり、かつ、ある濃度以上でも抗原濃度が上昇するに従って傾きが小さくなる、といったシグモイド曲線を描く。傾きが小さい領域では抗原濃度変化の幅に対する出力変化の幅が小さく、正確な測定が困難となる。

## 【0004】

抗原濃度が高い被検体中の抗原濃度を正確に測定する手段としては、被検体量を減らしたり、抗原に対する親和力が低い抗体を使用する方法が用いられてきた。しかしながら、この方法では低濃度域の感度が得られず、高感度化が困難であった。一方、抗原濃度が低い被検体中の抗原濃度を正確に測定する手段として、被検体量を増やしたり、抗原に対する親和力が強い抗体を用いて高感度化する方法が用いられてきた。しかし、この方法では高濃度域において反応が飽和し、測定が困難であった。被検体を希釈すれば高濃度まで測定することはできるが、操作が煩雑になることによって誤差が生じたり、検体のマトリックス効果などで反応性が変化し、正確な測定値が得られなかったり、また、測定結果が得られるまでの時間が増加したりする、といった欠点がある。このように、これまで、低濃度域から高濃度域まで広い測定範囲を得ることはできなかった。

30

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

40

## 【0005】

本発明の目的は、希釈すること無しに広い濃度範囲を高感度で測定することのできる免疫測定試薬および免疫測定方法を提供することにある。

## 【0006】

本発明の他の目的は、抗原に対する親和力が異なる2種類以上の抗体を標識抗体に用いて、抗原が低濃度でも感度を維持しつつ、反応性を損なわずに高濃度まで測定できる免疫測定試薬及び免疫測定方法を提供することにある。

## 【0007】

本発明のさらに他の目的および利点は、以下の説明から明らかになるう。

## 【課題を解決するための手段】

50

## 【0008】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、抗原に対する親和力が  $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$  L/mol の範囲にある第1標識モノクローナル抗体および該抗原に対する親和力が  $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$  未満 L/mol の範囲にある第2標識モノクローナル抗体の組み合わせからなることを特徴とする免疫測定試薬および該免疫測定試薬を用いた免疫測定方法によって達成される。

## 【発明の効果】

## 【0009】

本発明の免疫測定試薬および免疫測定方法を用いることにより、被検体を希釈することなく高感度かつ広い範囲にわたって測定が可能となる。疾患の発見や再検率の減少などに有用である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0010】

本発明で用いられる標識モノクローナル抗体とは、標識物を化学的または物理的に結合したモノクローナル抗体を言う。標識方法は標識物に適した方法が用いられる。該モノクローナル抗体は一般的な方法で取得可能なものであり、市販品として購入できるものもある。該モノクローナル抗体のサブタイプは特に限定されるものではないが、IgG、IgMが好ましい。また、抗体は、それが認識する抗原の種類によって限定されることもない。抗体を取得する場合に用いられる動物種も特に限定されるものではない。とりわけ、マウス、ラットなど免疫学的測定において通常用いられる動物が好ましい。

## 【0011】

該モノクローナル抗体の抗原に対する親和力は、一方の抗体は  $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$  L/mol の範囲にあり、もう一方の抗体は  $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$  未満 L/mol の範囲にある。これら2種類の抗体は、親和力の差が10倍以上の組み合わせが好ましい。親和力の差が小さいと期待される効果は少ない。また、親和力が強い抗体と親和力が弱い抗体のモル比は前者対後者の比で、1:4~1:50の範囲が好ましい。これより比が小さいと低濃度での感度は高いが高濃度での反応性が低下し、比が大きいと高濃度での反応性は十分であるが、低濃度での感度が十分ではない。

## 【0012】

前記標識物としては、免疫測定法で一般的に使用されるものが用いられる。例えば放射性同位体、酵素、発光物質、蛍光物質などが挙げられる。特に限定されるものではないが、これらのうち酵素が好ましい。より好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ（以下HRPと表す）、アルカリフォスファターゼである。

## 【0013】

本発明の標識モノクローナル抗体を含有する試薬を使用して抗原の存在を測定する測定法において、固相としては、例えばポリスチレンビーズ、磁性粒子、ガラスフィルター、メンブレンなどの免疫測定法でそれ自体公知の物が使用できる。また、抗原を固相に固定する方法としては、例えば、固相表面への吸着といった物理的方法、固定剤を介して固定する化学的方法を挙げることができる。さらに、該固定剤としては、例えばビオチン-ストربتアビジン、抗体、種々の2価性試薬を利用したものなどが挙げられる。

## 【0014】

本発明の試薬には、好ましくは緩衝液が用いられる。かかる緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、バルビタール緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グッド緩衝液などのそれ自体公知の緩衝液が制限なく使用できる。緩衝液の緩衝剤の濃度やpHは特に限定されないが、濃度が高すぎると反応系に影響を及ぼす可能性があり、低すぎると反応が不安定になりやすい。反応系には生体由来のタンパク質が存在するため、中性から弱アルカリ性が良く、例えばpH7.0~8.5の範囲とするのがもっとも良好である。本発明の試薬には、その他添加剤が存在してもよく、例えば、牛血清アルブミンやカゼインなどのタンパク質、塩化ナトリウムや塩化カリウム等の無機塩、アジ化ナトリウムやマイクロサイド等の防腐剤等が含まれていてもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

標識の測定には、標識物に適した測定方法が用いられ、特に限定されるものではない。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 1 6 】

本発明を更に詳細に説明するために、以下実施例および比較例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【 0 0 1 7 】

本発明で用いられるモノクローナル抗体例えば抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体と該抗体が認識する抗原例えばヒトアルブミンとの親和力は、B I A c o r e 2 0 0 0 (ピアコア社製)を用いて測定した。

## 【 0 0 1 8 】

即ち、センサーチップCM5を活性化した後、アミンカップリング試薬(ピアコア社製)にて該抗体に対する抗体(以下、抗体Sと略す)例えば抗マウスIgG抗体をセンサーチップ上に固定した。続いて、ブロッキングバッファー(ピアコア社製)でセンサーチップをブロッキングした後、レスポンスが約1200RUとなるように、該抗体例えば抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体をインジェクションし、抗体S例えば抗マウスIgG抗体に結合させた。さらに、至適濃度の抗原溶液例えば50μg/mlになるように調製したヒトアルブミンを、10μLインジェクションし、該抗体例えば抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体と抗原例えばヒトアルブミンの結合と解離のセンサーグラムを得た。この結果から、該抗体の抗原との親和力を求めた。

## 【 0 0 1 9 】

なお、センサーチップCM5の再生は次のようにして行った。すなわち、抗体S例えば抗マウスIgG抗体からモノクローナル抗体例えば抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体をはずすために、200mmol/l塩化ナトリウムを含む200mmol/lグリシン塩酸溶液(pH2.7)を流した。その後、ランニングバッファーを流しセンサーチップの再生を完了した。

## 【 0 0 2 0 】

## 実施例 1

## 1. HRP標識抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体の調製

第1標識モノクローナル抗体として、親和力が $5 \times 10^{10}$  L/molである抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体(エイアンドティー社製)を用いた。該抗体1mgと西洋ワサビペルオキシダーゼ(東洋紡績社製)を用い、ナカネ法(Nakane PK et al. J Histochem Cytochem 22(12)1084-1091, 1974)によりHRP標識抗体Aを調製した。

## 【 0 0 2 1 】

第2標識モノクローナル抗体として、親和力が $3 \times 10^9$  L/molである抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体(Medix Biochemica社製)を用い、上記方法と同様に行ない、HRP標識抗体Bを調製した。

## 【 0 0 2 2 】

## 2. ビオチン標識抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体溶液の調製

ビオチンアミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ナカライテスク社製)10mgをジメチルスルホキシド1mLに溶解した(以下、ビオチン溶液と表す)。抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体(BioSpacific社製)を1mg/mLになるように10mmol/L HEPES緩衝液に溶解した。これに上記調製したビオチン溶液10μLを加え、さらによく混和し、25℃で4時間反応した。未反応のビオチンラベル化剤を除去するため、NAP-5(アマシャムバイオサイエンス社製)を用い、取扱説明書に従ってPBSでゲルろ過を行なった。ゲルろ過で回収したビオチン標識抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体溶液を1w/v%BSAおよび0.1%ProClin200(シグマアルドリッチ社製)を含むPBS(以下、標識抗体希釈液と表す)で5μg/mLになるように希釈した。これをビオチン標識抗ヒトアルブミンマウスモ

10

20

30

40

50

ノクロール抗体溶液（以下第1試薬と表す）とした。

【0023】

### 3. HRP標識抗体溶液の調製

標識抗体希釈液を用い、上記HRP標識抗体Aが $0.025 \mu\text{g/mL}$ 、HRP標識抗体Bが $0.5 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈し、混合した。これをHRP標識抗体溶液（以下第2試薬と表す）とした。

【0024】

### 4. 測定

測定には全自動酵素免疫測定装置MIO1（エイアンドティー社製）を使用し、アルブミン標準液（エイアンドティー社製）を測定し、検量線を作成した。実際の測定の流れは次の通りである。検体 $20 \mu\text{L}$ と第1試薬 $40 \mu\text{L}$ を混合して免疫複合体溶液を調製し、45で5分間インキュベーションした。一方で、抗ビオチン抗体担持反応剤（エイアンドティー社製）を45でインキュベーションした。なお、このインキュベーションは測光終了まで継続した。該反応剤へMIO1用ブロック液（エイアンドティー社製）を $50 \mu\text{L}$ 滴下した。ついで、インキュベーションが終了した免疫複合体溶液を $35 \mu\text{L}$ 滴下し、さらに第2試薬を $20 \mu\text{L}$ 滴下した。2分後、MIO1用洗浄液（エイアンドティー社製） $160 \mu\text{L}$ を $80 \mu\text{L}$ ずつ滴下し、さらに1分後、MIO1用発色液（エイアンドティー社製）を $30 \mu\text{L}$ 滴下した。発色液滴下から7～8秒後の1秒間に、反応剤の固相表面へ $670 \text{nm}$ のレーザー光を照射したときの反射強度（K/S）を測定した。

10

【0025】

20

### 比較例1

第2試薬中のHRP標識抗体の濃度を、HRP標識抗体A： $0.525 \mu\text{g/mL}$ 、HRP標識抗体B： $0.0 \mu\text{g/mL}$ とした以外は実施例1と同様の操作を行なった。

【0026】

### 比較例2

第2試薬中のHRP標識抗体の濃度を、HRP標識抗体A： $0.0 \mu\text{g/mL}$ 、HRP標識抗体B： $0.525 \mu\text{g/mL}$ とした以外は実施例1と同様の操作を行なった。

【0027】

### 比較例3

実施例1と同様に、第2標識モノクロール抗体として、親和力が $5 \times 10^9 \text{ L/mol}$ である抗ヒトアルブミンマウスモノクロール抗体（Medix Biochemica社製）を用いてHRP標識抗体Cを調製した。第2試薬中のHRP標識抗体の濃度を、HRP標識抗体A： $0.025 \mu\text{g/mL}$ 、HRP標識抗体C： $0.5 \mu\text{g/mL}$ とした以外は実施例1と同様の操作を行なった。

30

【0028】

実施例1および比較例1、2、3で測定したK/S変化量を表1に示した。

【0029】

【表 1】

アルブミン濃度 [μg/mL]	K / S 変化量			
	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3
0.0	31	34	28	30
0.2	135	215	63	151
1.0	474	1268	122	830
5.0	2460	7103	438	5196
20.0	11523	26380	2560	18292
50.0	29087	50048	10231	37963
100.0	58027	67241	32562	60185
200.0	113016	81294	90574	85992

10

## 【0030】

また、表1のデータを図示した検量線を、図1（実施例1）、図2（比較例1）、図3（比較例2）および図4（比較例3）に示した。

## 【0031】

図1から明らかなように、実施例1の測定値から作成された検量線は、アルブミン低濃度域から高濃度域まで良好な直線性を示した。これに対し、親和力が  $5 \times 10^{10}$  L/mol である抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体のみを第2試薬に用いた試薬による比較例1の検量線はヒトアルブミン低濃度では強いシグナルを示すが、高濃度域においては反応性が低下し、直線性を示さなかった。また、親和力が  $3 \times 10^9$  L/mol である抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体のみをHRP標識抗体溶液に用いた試薬による比較例2の検量線はヒトアルブミン低濃度域において、本発明による方法よりも感度が低いため、良好な直線性を示さなかった。さらに、親和力が  $5 \times 10^{10}$  L/mol である抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体と親和力が  $5 \times 10^9$  L/mol である抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体を用いた試薬による比較例3の検量線は比較例1と同様に、ヒトアルブミン高濃度における反応性が低下し、本発明による方法のような直線性を示さなかった。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0032】

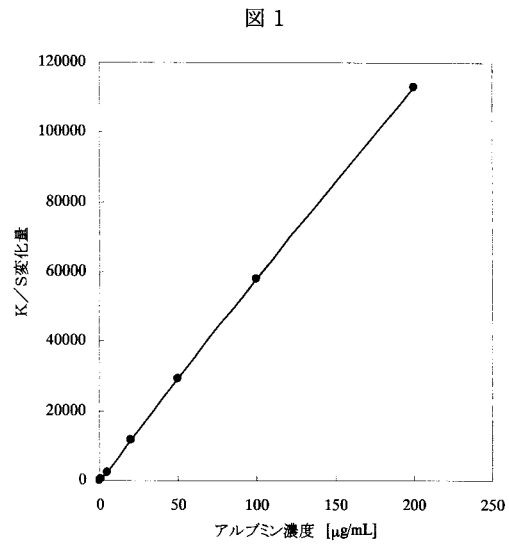
【図1】実施例1により得られた検量線。

【図2】比較例1により得られた検量線。

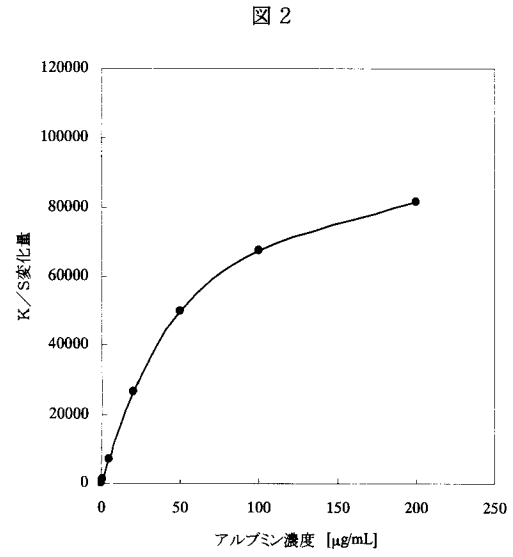
【図3】比較例2により得られた検量線。

【図4】比較例3により得られた検量線。

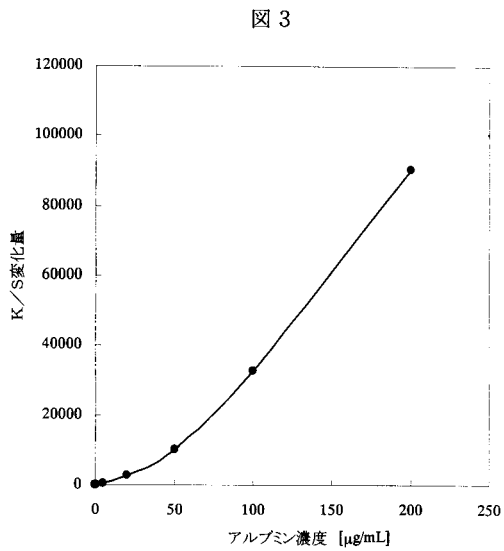
【図 1】



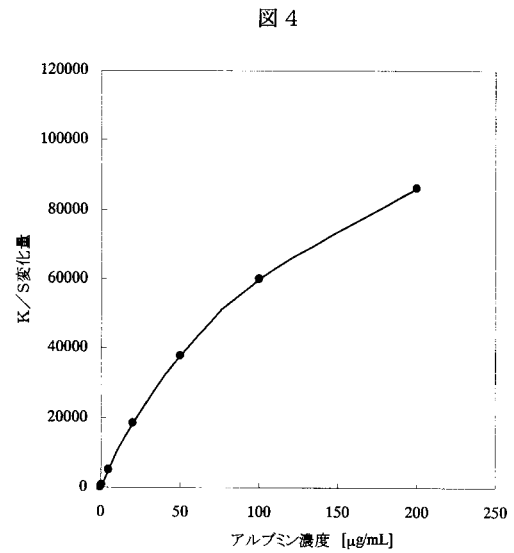
【図 2】



【図 3】



【図 4】



专利名称(译)	免疫测定法和免疫测定试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005195434A</a>	公开(公告)日	2005-07-21
申请号	JP2004001384	申请日	2004-01-06
申请(专利权)人(译)	株式会社エイアンドティー		
[标]发明人	川野 充康 岩本 久彦		
发明人	川野 充康 岩本 久彦		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/532.Z G01N33/577.Z		
代理人(译)	大岛正孝		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

# 摘要(译)

要解决的问题：提供具有高灵敏度和宽测量范围的免疫测定试剂和免疫测定方法。 解决方案：第一个标记的单克隆抗体对抗原的亲合力在 $5 \times 10^9$  至 $1 \times 10^{11}$  L / mol范围内，对抗原的亲合力为 $1 \times 10^8$  至 $5 \times 10^9$  L / mol，以及包含该第二标记单克隆抗体组合的免疫测定试剂免疫分析方法。 【选择图】无

777'シ濃度 [μg/mL]	K / S 変化量			
	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3
0.0	31	34	28	30
0.2	135	215	63	151
1.0	474	1268	122	830
5.0	2460	7103	438	5196
20.0	11523	26380	2560	18292
50.0	29087	50048	10231	37963
100.0	58027	67241	32562	60185
200.0	113016	81294	90574	85992