

(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2007-286053
(P2007-286053A)

(43) 公開日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 L	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 F	
	GO 1 N 33/543 5 8 7	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2007-101769 (P2007-101769)	(71) 出願人	507116695 オリンパス ライフ アンド マテリアル サイエンス ヨーロッパ ゲーエムペー ハー ドイツ国、20097 ハンブルク、ベン デンシュトラーセ 14-18
(22) 出願日	平成19年4月9日(2007.4.9)	(74) 代理人	100099139 弁理士 光来出 良彦
(31) 優先権主張番号	06007803.7	(72) 発明者	ドクター ゲルハルド グンター アイルランド国、エニス、アベイ コート リメリック ロード 8
(32) 優先日	平成18年4月13日(2006.4.13)	(72) 発明者	マルコ キャバレリ アイルランド国、クレア州、チャーチ ロ ード ツラ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

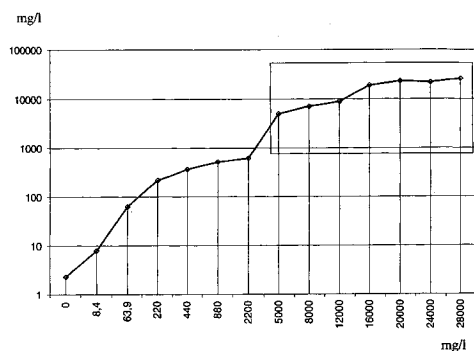
(54) 【発明の名称】 免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】 プロゾーン陽性試料の検定を簡易化する免疫測定方法を提供する。

【解決手段】 試料を所定の分析対象物質に特異的に結合できる免疫反応性物質、とりわけ抗体と混合することによって測定用試料を調製し、この試料を所定の反応時間にわたり反応させ、その反応時間にわたっての前記試料中での免疫反応性物質と分析対象物質との相互作用に関する信号を測定し、異なる時刻に測定した信号に基づいて当該試料中でプロゾーン効果が生じたか否かを調べ、それに応じてプロゾーン陽性試料を選定し、前記反応時間の間に測定した信号の少なくとも一つからプロゾーン効果を生じる分析対象物質濃度をカバーする一つの検量線または検量線の一つの部分をプロゾーン陽性試料に、プロゾーン効果を生じない分析対象物質濃度をカバーするもう一つの検量線または検量線のもう一つの部分は残りの試料に用いて、試料中の分析対象物質の濃度を算出することを包含する免疫測定方法。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の諸工程を包含する免疫測定方法：

- (a) 異なる複数の部分を含む検量線を作成するかまたは異なる複数の検量線を作成することであり、それぞれ、一つの部分または一つの検量線はプロゾン効果を生じない分析対象物質濃度をカバーし、もう一つの部分またはもう一つの検量線はプロゾン効果を生じる分析対象物質濃度をカバーするものとし、
- (b) 試料を、所定の分析対象物質に特異的に結合できる免疫反応性物質、とりわけ抗体と混合することによって測定用試料を調製すること、
- (c) 該試料を所定の反応時間にわたり反応させること、
- (d) 該反応時間にわたって、該試料中で該免疫反応性物質と該分析対象物質との相互作用に関する信号を測定すること、
- (e) 該工程 d)における異なる時刻に測定した信号に基づいて、該試料中でプロゾン効果が生じたか否かを調べること、およびそれに応じてプロゾン陽性試料を選定すること、並びに、
- (f) 前記工程 d)において測定した信号の少なくとも一つから、好ましくは、前記反応時間の終了時に取得した値から、前記工程 a)で作成した適切な検量線または適切な検量線の部分を用いて試料中の分析対象物の濃度を測定することであり、一つの検量線または検量線の一つの部分はプロゾン陽性試料に用いられ、他方は残りの試料に用いられるものとする。

10

20

【請求項 2】

前記工程 (a) から (f) までの少なくともいくつかを自動分析器によって実施することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

免疫反応性物質と分析対象物質との間の相互作用を濁度測定法によって検出することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (d) における信号が、光度計測法により、とりわけ濁度測定法により、測定できる光学的信号であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

使用する免疫反応性物質としての抗体または抗原が粒子、とりわけポリマービーズ、に結合されていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 6】

試料がプロゾン陽性であるか否かに応じて、当該方法を異なる条件下で実施することを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、免疫反応性物質、通常は抗体を試料に加えて、該試料中に含まれている可能性のある特定の分析対象物質を検出および/または定量する免疫測定方法に関する。

40

【背景技術】**【0002】**

ほとんどの場合、免疫測定方法に使用される免疫反応性物質は特定の抗体である。しかし、抗体が関心のある分析対象物質である場合には、抗原を用いることも可能である。

【0003】

両場合とも、使用される免疫反応性物質は、問題の分析対象物質と、例えば、抗原抗体複合体を形成することによって、特異的に相互作用することができる。試料中のこのような複合体の形成（凝集）は、所定時間経過後の、例えば、濁度測定法によって、モニターすることができる。例えば、濁度測定によって測定された凝集の度合いが、試料中の当該分析対象物質の濃度を表示するものとなる。

50

【0004】

通常、分析に先立って検量線などを作成し、濁度測定で得られた値を用いて、この検量線によって分析対象物質の濃度を算出する。

【0005】

分析対象物質を高濃度に含有する試料において、凝集が起らない、あるいは低減することが時折観察される。このような試料を十分に希釈するならば、正常な凝集が起る。

【0006】

高い分析対象物質濃度で凝集が起らない、または減少することは、プロゾン（前地帯）効果または「フック（かぎ）効果」と呼ばれ、例えば、試料中の抗原が過剰なために、可視的凝集を生じるほどには群れ集まることのない小さい抗体抗原複合体が形成されることと関係している。一般に、抗体の濃度に比較して抗原の濃度が高いほど、観測される信号は小さくなると言える。

10

【0007】

抗原濃度が増大が、抗体集団の認識する相対能力、及び、結合する相対能力を超えると、該信号が減少する。この結果は動的で、抗原抗体反応から、より高い確率で非凝集形態が支配的となるまでの、反応の平衡の変化を表わしている。

【0008】

既知の免疫分析法は、プロゾン効果が生じる試料を同定・確認するための種々のアプローチ法を提供している。既知のそれらの方法の大部分が、反応速度論を確立するために、所定時間にわたる試料の濁度測定を用いている。その反応速度論から、例えば、異なる時刻に得られた値を比較することによって、試料中でプロゾン効果が生じたか否かを推論することが可能である。

20

【0009】

プロゾン効果を検出する方法について、ほんの2、3の例を挙げれば、例えば、特開2000-221195号公報、特開平6-213893号公報または特開平6-094717号公報に開示されている。

【0010】

現在のところ、免疫分析法のプロトコールは、プロゾン効果が明確に検出される試料（プロゾン陽性試料）を希釈し、希釈した試料を用いて新しく分析を行なうことと規定している。しかし、分析対象物質の濃度は未知であるから、与えられた試料についての適正な希釈率を見出すために、いくつかの希釈系列について実験しなければならない。かかる希釈系列は、試験の実施および結果の解析のための時間、分析機器のための空間ならびに追加の試薬および試料材料を要するために、不利である。

30

【0011】

【特許文献1】特開2000-221195号公報

【特許文献2】特開平6-213893号公報

【特許文献3】特開平6-094717号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

それゆえ、本発明の目的は、プロゾン陽性試料の検定を簡易化する方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0013】

前記の目的は、請求項1の方法によって達成される。

即ち、本発明の免疫測定方法は以下の諸工程を包含する：

(a) 異なる複数の部分を含む検量線を作成するかまたは異なる複数の検量線を作成することであり、それぞれ、一つの部分または一つの検量線はプロゾン効果を生じない分析対象物質濃度をカバーし、もう一つの部分またはもう一つの検量線はプロゾン効果を生じる分析対象物質濃度をカバーするものとし、

50

- (b) 試料を、所定の分析対象物質に特異的に結合できる免疫反応性物質、とりわけ抗体と混合することによって測定用試料を調製すること、
- (c) 該試料を所定の反応時間にわたり反応させること、
- (d) 該反応時間にわたって、該試料中で該免疫反応性物質と該分析対象物質との相互作用に関する信号を測定すること、
- (e) 該工程 d における異なる時刻に測定した信号に基づいて、該試料中でプロゾン効果が生じたか否かを調べること、およびそれに応じてプロゾン陽性試料を選定すること、並びに、
- (f) 前記工程 d において測定した信号の少なくとも一つから、好ましくは、前記反応時間の終了時に取得した値から、前記工程 a で作成した適切な検量線または適切な検量線の部分を用いて試料中の分析対象物の濃度を測定することであり、一つの検量線または検量線の一つの部分はプロゾン陽性試料に用いられ、他方は残りの試料に用いられるものとする。

10

【0014】

既知の諸方法と同様に、本発明の方法も下記の諸工程を包含する：

- 試料を分析対象物質と特異的に結合できる免疫反応性物質、とくに抗体と混合することによって測定用試料を調製する工程、
- 前記試料を所定の反応時間にわたって反応させる工程、
- 前記反応時間にわたっての前記免疫反応性物質と分析対象物質との相互作用に関連した信号を、例えば、濁度測定法によって測定する工程、および
- 時を異にして測定された信号に基づいて、当該試料においてプロゾン効果が生じたか否かをチェックし、それに従ってプロゾン陽性試料を選び出す工程。

20

【0015】

既知の方法とは異なって、本発明は、当該試料がプロゾン陽性であるか否かに応じて、異なる複数の検量線もしくは単一の検量線の異なる複数の部分を用いて、分析対象物質の濃度を算出することを規定する。

【0016】

単一の検量線を使用する既知の方法に比して、本発明の方法は、1つはプロゾン陽性試料用、他方は残りの試料用の、2つの異なる、検量線（校正曲線）または校正システムを使用する。

30

【0017】

驚くべきことに、プロゾン効果を惹起する高濃度の分析対象物質を含有する試料を例えば、濁度測定に付しても、プロゾン域内の異なる濃度について、依然として濃度に依存した値が再現性をもって得られることが判明した。

【0018】

従って、プロゾン陽性試料中の分析対象物質の少なくとも概略計算を可能にする特定の検量線を作成することが可能であった。

【発明の効果】**【0019】**

プロゾン陽性試料について本発明の方法によって得られた濃度値は、直接使用することができ、あるいは適正な希釈率を算出するために用いることができる。

40

【0020】

最適なことに、本発明の方法によれば、例えば、概略結果でも試験に対する医療上の要求にこたえられる場合には、プロゾン陽性試料の再試験が回避される。再試験が必要と考えられたとしても、プロゾン陽性試料について得られた濃度値は、希釈系列を実施することなく試料を正規の濃度範囲へ適正に希釈することが可能なほどに正確である。

【0021】

本発明の方法には、例えば、分析対象物質濃度の算出のために適切な検量線を選択することが必要なだけである。これは、反応の速度論の解析を通じて遂行する。これにより、分析がずっと容易に、迅速になる。

50

【0022】

本発明の免疫分析法は、粒子エンハンスメント（粒子による増強）を行なうまたは行わないすべての既知の凝集または赤血球凝集試験について有効に作用する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明の方法には、例えば、抗体と抗原との間の相互作用を測定するために濁度測定法を使用することが好ましい。しかし、該相互反応を定量することを可能ならしめ、プロゾン効果を経験する他の手法、ほんのいくつかの例を挙げれば、例えば、化学発光法、酵素免疫測定法、蛍光法、ネフェロメトリーも利用できる。そのため、本明細書では主として濁度測定法に言及するが、本発明がこの手法の使用に限定されるものではない。

10

【0024】

本発明の方法によって分析可能な典型的な試料は、例えば、血液、血清、尿である。一般に、免疫測定方法で試験可能な試料なる語には、あらゆる体液または組織抽出物が含まれる。

【0025】

典型的な反応時間は、30秒間～10分間の間で変動する。

濁度測定は、分光光度計または濁度計を用いて実施できる。使用される波長は分析方法に依存する。一般に、凝集は、340nm～800nmの範囲内でもっともよく測定できる。

【0026】

試料におけるプロゾンを検出し、それに従って試料を選別するための既知のいずれの方法も、本発明において使用できる。

20

試料を用いてプロゾンを検出できる自動分析器で本発明の方法を用いれば、とくに有利である。その分析器は、例えば、試料がプロゾン陽性であるという情報を得た場合に、一方の検量線から他方の検量線へ切り替わるようにプログラム制御することができる。

【0027】

本発明のさらなる具体化態様では、免疫反応性物質をマイクロ粒子に、特に、例えば、ラテックスビーズなどのポリマービーズに、固定化する旨を規定することができる。しかし、通常の免疫分析法またはマイクロ粒子増強光散乱凝集検定法でそれぞれ使用できるあらゆる粒子が適している。直接凝集法と比較しての利点は、マイクロ粒子に結合させた免疫反応性物質を用いることにより、検定法の感度が向上することである。

30

【0028】

実際、「フック効果」の反応速度論に該当するいずれの免疫検定検出法でも、本明細書に記載したものに類似の任意のソフトウェア介在フラグgingプロセスを用いて適合させることができる。これには、非競合免疫分析法の大部分が含まれ、そのうちのいくつかは、神経回路網分類器システムを用いて検出が行なわれている（Clin Chem Lab Med（臨床化学と検査室医学）、1999年4月；37（4）：471-6参照）。

【0029】

さらなる実施態様は、ある試料がプロゾン陽性であると確認されたならば、異なる設定で当該試料のさらなる処理を行なうことを規定する。

40

【0030】

例えば、プロゾン陽性試料の濁度測定を正常試料に対して用いた波長とは異なる波長で行なうことを規定することができる。上述のように、試料中のプロゾン現象は、解離した凝集体が大部分を占めている可能性が増加するために、形成された複合体の量が減少することによって惹起される。波長の変更は、すでに測定段階の間に、あるいはその後の測定で実施できる。特定の状況では、観察された現象が、試験における試料のプロゾン現象に似ていることがあるが、実際には、形成された複合体の寸法の増大によって惹起されているという場合がある。これらの複合体は、適切なことに、最適条件未満のデバイ（Debye）またはミー様（Mie-like）光散乱効果による測定波長において干

50

涉できないので、観測された効果は、あたかもこれが形成された複合体の寸法の減少によって惹起されたごとく類似している。それゆえ、波長も増大させれば、より定量的な信号の測定が、これらの条件下で可能である。

【0031】

上述の波長の変更に加えて、プロゾン陽性試料について異なる反応時間またはインキュベーション時間を用いることも可能である。

【実施例】

【0032】

以下、図面を参照しながら、実施例によって本発明を説明する。

2つの検量線を作成した。正常検量線（第一の検量線）は、直線領域をカバーする濃度のマイクロアルブミン材料を用いて作成した（図1参照）。第二の検量線は、この検定法のプロゾン領域の中にある濃度の材料を用いて作成した。この第二の検量線を「プロゾン検量線」として用いた（図2参照）。図1および図2において、最低線（横軸）は検量線作成に用いた試料の異なる濃度（単位：mg/l）を示している。左側（縦軸）には、波長340nmおよび二次波長800nmで測定したOD（光学濃度）信号が示されている。

10

【0033】

本発明に従った方法の信頼性を示すために、種々濃度のマイクロアルブミン（ヒト尿中アルブミン）を含有する試料を用いて免疫検定を実施した。免疫反応性物質としては、ヤギ抗ヒトアルブミン抗体を適切な濃度の0.5mg/lで用いた。

20

【0034】

上記試料を上記抗体と混合し、試料の濁度測定を約5分間にわたり、一次波長340nmおよび二次波長800nmで実施した。

結果を図3に示す。最低線（横軸）は、検定した試料中の異なるマイクロアルブミン濃度（単位：mg/l）を示している。左側（縦軸）には、正常検量線およびプロゾン検量線を用いて算出した実際の回収量が示されている。

【0035】

図3の曲線の最初の部分（0~2200mg/lの間）は、濁度測定のOD値を図1の正常検量線により計算して得ることのできる濃度値を示している。この曲線は、5~300mg/lの間の直線範囲を示しており、信頼できる結果を得ることのできる正常測定範囲を表わしている。300mg/lを超えると、値の信頼できる計算はもはや可能ではなくなる。

30

【0036】

ほぼ2200mg/lの試料濃度から始まって、試料がプロゾン効果を示し始める。これらの試料については、図2に示したプロゾン検量線を用いて結果を再計算した。再計算結果を、図3の曲線の枠内部分によって示す。プロゾン検量線を用いて結果を再計算すると、試料の濃度になおほぼ対応する濃度値が得られることが理解できる。少なくとも、再計算結果は実際の試料濃度に余りにも近接しているので、希釈系列を実行することなく5~300mg/lの間の濃度までの適正な希釈が可能であろう。

【0037】

プロゾン検量線範囲の効果は、このマイクロアルブミン測定の範囲を少なくとも85倍（300mg/lから26000mg/lまで）に事実上拡大することにある。

40

【産業上の利用可能性】

【0038】

プロゾン陽性試料の検定を簡易化する免疫測定方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】正常検量線を示す。

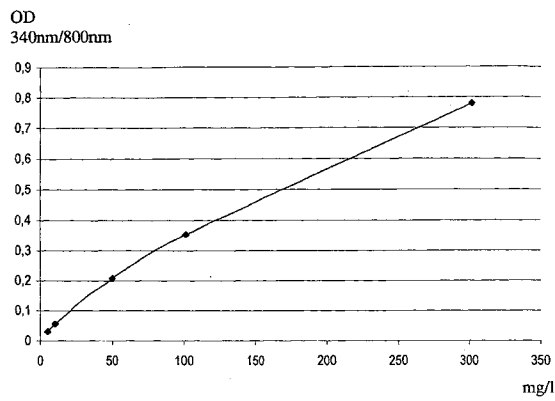
【図2】プロゾン検量線を示す。

【図3】正常検量線によって算出した濃度値とプロゾン検量線によって再計算した値（

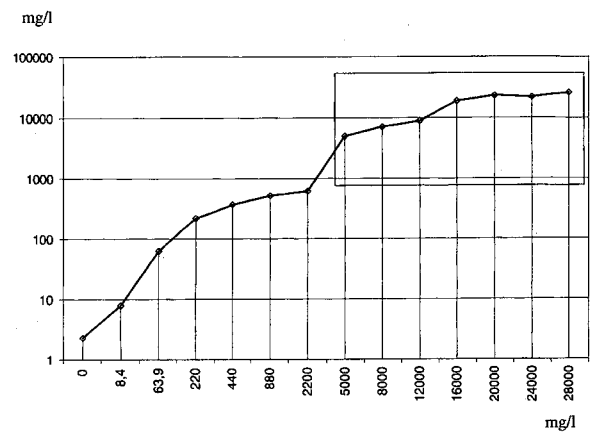
50

枠内)との比較を示す。

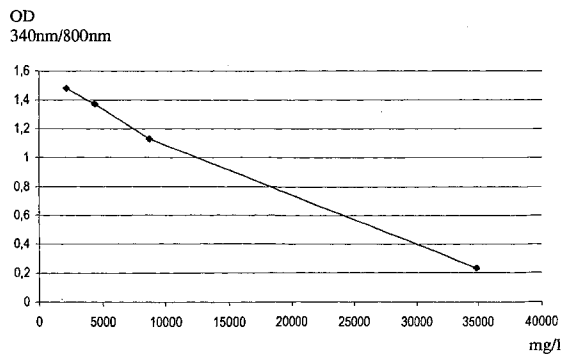
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 マッチュー ムカスカー
アイルランド国, エニス, ゴート ナ ムプラス ツラ ロード 4

专利名称(译)	免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2007286053A	公开(公告)日	2007-11-01
申请号	JP2007101769	申请日	2007-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	奥林巴斯生命与材料科学欧洲门的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	奥林巴斯生命与材料科学欧罗巴有限公司		
[标]发明人	ドクターゲルハルドグンター マルコキャバレリ マツチュームカスカー		
发明人	ドクター ゲルハルド グンター マルコ キャバレリ マツチュー ムカスカー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/543.581.L G01N33/536.F G01N33/543.587		
优先权	2006007803 2006-04-13 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供免疫测定方法，以简化亲区阳性样品的验证。
 ŽSOLUTION：在免疫测定方法中，通过将其与能够特异性结合样品的免疫反应性材料混合到预定的分析对象，特别是抗体，制备用于测量的样品，使样品反应预定的反应时间，发出关于相互作用的信号。测量样品中免疫反应物质和分析对象之间的反应时间，检查样品中是否出现前区效应，根据不同时间测得的信号，按区域选择亲区阳性样品。然后，可以使用一条校准曲线或一部分校准曲线从反应时间中测量的至少一个信号计算样品中分析物体的浓度，以覆盖产生该分析物的分析物的浓度。对于亲区阳性样品的区域效应，并使用另一个校准曲线或校准曲线的另一部分进行覆盖分析对象的浓度不会对剩余样品产生前区效应。Ž

