

(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2017-90338

(P2017-90338A)

(43) 公開日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(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 1 5 J	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	4 H O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
CO 7 K 17/14 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 6 5 U	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-223091 (P2015-223091)
 (22) 出願日 平成27年11月13日 (2015.11.13)

(71) 出願人 306008724
 富士レビオ株式会社
 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
 (74) 代理人 110001656
 特許業務法人谷川国際特許事務所
 (72) 発明者 岡 朗弘
 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士
 レビオ株式会社内
 Fターム(参考) 2G045 CA25 CA26 DA37 FB03
 4H045 AA50 BA63 DA75 EA52 EA53

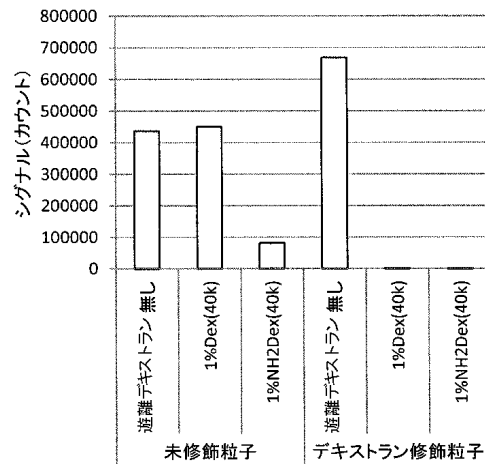
(54) 【発明の名称】 検体中の被検抗体の免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】 サンドイッチ法による免疫学的測定に用いられる固相への非特異吸着を大幅に抑制することができる、サンドイッチ法による被検抗体の新規な免疫学的測定方法を提供すること。

【解決手段】 検体中の被検抗体の免疫学的測定方法は、検体中の被検抗体と抗原抗体反応する抗原を固定化した固相と、被検抗体と抗原抗体反応する標識抗体とを用いたサンドイッチ法により、検体中の被検抗体を免疫学的に測定する方法である。固相が多糖類によって被覆されており、かつ、反応溶液中に遊離の多糖類が共存する状態で免疫学的測定を行う。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中の被検抗体と抗原抗体反応する抗原を固定化した固相と、前記被検抗体と抗原抗体反応する標識抗体とを用いたサンドイッチ法により、検体中の被検抗体を免疫学的に測定する方法であって、前記固相が多糖類によって被覆されており、かつ、反応溶液中に遊離の多糖類が共存する状態で免疫学的測定を行う、検体中の被検抗体の免疫学的測定方法。

【請求項 2】

前記抗原は前記多糖類上に固定化されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

固相を被覆する前記多糖類及び前記遊離の多糖類がデキストランである請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

固定化された前記多糖類が、共有結合のための官能基を持つ多糖類又は持たない多糖類である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

結合のための官能基を持つ前記多糖類が、アミノ多糖類である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記アミノ多糖類がアミノデキストランである請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記固相が粒子である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記粒子が磁性粒子である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記遊離の多糖類が、固相に固定化された、結合のための官能基を持つ前記多糖類と同じ官能基を持つ多糖類である請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

酵素免疫学的測定である請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記検体が、血清、血漿若しくは全血又はこれらの希釈物である請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血清等の検体中の被検抗体の免疫学的測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、ウイルスや細菌等による感染症の診断等のために、血液中に存在する、これらの病原体に対する抗体の検出を免疫学的測定により行うことが広く行われている。代表的な免疫学的測定の一つにサンドイッチ法があり、検体中の被検抗体を検出するサンドイッチ法では、標識抗体として、標識抗ヒト Ig G 抗体や標識抗ヒト Ig M 抗体が用いられている。

【0003】

しかしながら、これらの抗ヒトイムノグロブリン抗体を標識抗体として用いると、非特異吸着による高いバックグラウンドが生じるという問題がある。従来より、免疫学的測定に用いられる固相に対する非特異吸着を防止するために、BSA（ウシ血清アルブミン）やゼラチン等のブロッキング剤で固相を被覆することが広く行われており、様々なブロッキング剤が市販されている。サンドイッチ法による抗体検出のための免疫学的測定では、このようなブロッキング剤で固相を被覆することにより、ある程度は非特異吸着の防止によりバックグラウンドを低減することが可能となったが、更なるバックグラウンドの低減が求

10

20

30

40

50

められていた。

【0004】

固相を用いる免疫学的測定における固相への非特異吸着を抑制するために様々な提案がなされている。特許文献1では、凝集法において、非特異吸着抑制の目的で、デキストラン硫酸等のポリアニオンの存在下で抗原抗体反応を行うことが開示されている。特許文献2では、磁性粒子をゼラチン-アミノデキストランで被覆することが開示されており、ゼラチン被覆粒子と比較して、ゼラチンとアミノデキストランで粒子を被覆することにより非特異吸着がさらに抑制できることが記載されている。特許文献3には、従来技術として、デキストラン架橋抗AFP抗体結合粒子を用いたAFPの免疫学的測定法が記載されている。特許文献3記載の方法では、反応後、デキストラナーゼでデキストランを切断し、切断後の上清と粒子を測定している。特許文献4には、免疫学的測定用の多糖コーティング粒子とその製造方法が記載されている。特許文献5には、デキストラン硫酸から成る間接凝集免疫測定用の非特異反応吸収剤が開示されている。特許文献5には、デキストラン中の水酸基の少なくとも60%が硫酸エステル基で置換されているデキストラン硫酸が非特異反応抑制に有効であることが記載されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開昭57-182169号公報

【特許文献2】特開2004-3991号公報

20

【特許文献3】特開平10-197535号公報

【特許文献4】特表平4-501313号公報

【特許文献5】特開平9-89893号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記のとおり、免疫学的測定における非特異吸着を抑制する方法は種々提案されているが、その非特異吸着抑制効果は必ずしも満足できない。

【0007】

したがって、本発明の目的は、サンドイッチ法による免疫学的測定に用いられる固相への非特異吸着を大幅に抑制することができる、サンドイッチ法による被検抗体の新規な免疫学的測定方法を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、固相への非特異吸着を抑制すべく種々検討の結果、固相をデキストラン等の多糖類で被覆しても効果はなく、むしろ、逆に非特異吸着が増大することを見出した。しかしながら、さらに鋭意検討の結果、固相をデキストラン等の多糖類で被覆すると共に、反応液中にデキストラン等の多糖類を共存させることにより、固相への非特異吸着を大幅に抑制できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

40

すなわち、本発明は、検体中の被検抗体と抗原抗体反応する抗原を固定化した固相と、前記被検抗体と抗原抗体反応する標識抗体とを用いたサンドイッチ法により、検体中の被検抗体を免疫学的に測定する方法であって、前記固相が多糖類によって被覆されており、かつ、反応溶液中に遊離の多糖類が共存する状態で免疫学的測定を行う、検体中の被検抗体の免疫学的測定方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、サンドイッチ法による免疫学的測定に用いられる固相への非特異吸着を、従来のブロッキング剤と比較して大幅に抑制することができる。

【図面の簡単な説明】

50

【0011】

【図1】下記実施例1において、アミノデキストランで被覆した又は被覆していない磁性粒子に対する、遊離のデキストラン若しくはアミノデキストランの共存下又は非共存下での非特異吸着（シグナルカウント）を比較した結果を示す図である。

【図2（1）】下記実施例2で測定した、アミノデキストランで被覆した又は被覆していない磁性粒子と、遊離のデキストランの共存下又は非共存下で特異的に結合した抗gp41抗体の量（シグナルカウント）を示す図である。

【図2（2）】下記実施例2で測定した、アミノデキストランで被覆した又は被覆していない磁性粒子と、遊離のデキストランの共存下又は非共存下で特異的に結合した抗gp41抗体の量のS/N比を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

上記の通り、本発明の免疫学的測定方法は、固相を用いるサンドイッチ法による免疫学的測定方法であり、サンドイッチ法自体は周知である。用いられる固相自体も従来からサンドイッチ法に用いられている周知の固相を用いることができ、ポリスチレンビーズやラテックスビーズのようなビーズ（粒子）、ポリスチレン製のマイクロタイタープレートのウェル等を挙げることができる。これらのうち、磁性材料を含む磁性ビーズは、磁力によりビーズの収集を迅速、容易に行うことができるので好ましい。また、後述のようにデキストラン等の多糖類は、共有結合により固相に固定化することが好ましいので、共有結合に供される官能基を持つ固相を用いると便利である。このような官能基としては、カルボキシル基やアミノ基を挙げることができる。表面にこのような官能基を有する固相も市販されているので、市販品を好ましく用いることができる。例えば、下記実施例で用いた、表面にカルボキシル基を持つ磁気ビーズであるLife Technologies社のDynabeads（登録商標）等を例示することができる。

【0013】

本発明は、免疫学的測定方法に用いられる固相が、デキストラン等の多糖類で被覆されていることを1つの重要な特徴とする。多糖類としては、例えば、デキストラン、グリコーゲン、アミロース、アミロペクチン、アガロース、セルロース、デキストリン、グルカン、イヌリン、マンナン、キチン、カラギーナン、およびヒアルロン酸などを用いることができる。本発明に用いられる好ましい多糖類は、デキストランである。

【0014】

多糖類の分子量（重量平均分子量）は、特に限定されないが、通常、1kDa～2,000kDa、好ましくは、3kDa～300kDa程度である。各種分子量の多糖類が市販されているので、所望の分子量の市販品を好ましく用いることができる。また、多糖類は、共有結合のための官能基を有していてもよい。このような官能基の好ましい例として、アミノ基やカルボキシル基を挙げることができ、特にアミノ基が好ましい。例えば、デキストラン中の水酸基の一部がアミノ基になっているアミノデキストランをデキストランとして好ましく用いることができる。このように、本発明で言う、「デキストラン」には、アミノ基のような、共有結合のための官能基を持つものも包含する意味で用いている。なお、デキストラン硫酸は、硫酸基が共有結合のための官能基ではないので、本発明でいう「デキストラン」ではない。アミノデキストランは、市販されているので、市販品を好ましく用いることができる。

【0015】

多糖類による被覆量は、特に限定されないが、通常、固相1cm²当りに接触させる多糖類の量は、1μg～400μg、好ましくは、3μg～250μg程度である。

【0016】

多糖類は、物理吸着により固相に固定化してもよいが、多糖類が固相から離脱しないことを確保するために、共有結合により固定化することが好ましい。多糖類を共有結合で固相に結合させる方法自体は周知であり、例えば、固相として、カルボキシル基のような官能基を持つものを用い、例えば、デキストランとしてアミノデキストランのような、共有

10

20

30

40

50

結合のための官能基を持つものを用いることにより容易に行うことができる。下記実施例では、表面にカルボキシル基を持つ市販の磁気ビーズを固相として用い、デキストランして市販のアミノデキストランを用い、周知の縮合剤であるカルボジイミドを用いることにより、磁気ビーズ上のカルボキシル基とアミノデキストランのアミノ基をアミド結合させている。なお、デキストラン等の多糖類を固相に共有結合させる際の反応液にBSA、ゼラチン、カゼイン等の周知のブロッキング剤を含ませることにより、さらに非特異吸着を低減してもよい。この場合、通常、過剰量のブロッキング剤を用いる。

【0017】

本発明の免疫学的測定方法に用いられる固相には、被検抗体と抗原抗体反応する抗原が固定化されている。抗原は、被検抗体と抗原抗体反応するものであればよく、被検抗体を誘導した抗原の一部であってもよい。この抗原は、固相上に直接固定化されてもよいが、固相を被覆する多糖類上に固定化されていることが好ましい。

抗原を多糖類に固定化する場合、抗原は、物理吸着により多糖類に固定化してもよいが、多糖類からの離脱しないことを確保するために、共有結合により多糖類に結合することが好ましい。抗原を共有結合により多糖類に固定化する方法自体は周知であり、例えば、タンパク質から成る抗原を還元してチオール化し（タンパク質中のS-S結合を切断してチオール基（スルフヒドリル基(-SH基)に変換する）、マレイミド等のリンカーを用いて共有結合させることができる（下記実施例参照）。あるいは、抗原中のカルボキシル基を、カルボジイミド等の縮合剤の存在下、アミノデキストランのアミノ基と結合することも可能である。抗原の被覆量は、検体中の被検抗体の予想濃度等に応じて適宜選択することができ、通常、固相1cm²当たり0.003μg～10μg、好ましくは0.03μg～8μg程度である。

【0018】

抗原を固相上に直接固定化する場合、抗原を共有結合により固定化する方法自体は周知であり、例えば、固相として、カルボキシル基のような官能基を持つものを用い、抗原中のアミノ基等を利用して共有結合させることができる。抗原の被覆量は、検体中の被検抗体の予想濃度等に応じて適宜選択することができ、通常、固相1cm²当たり0.003μg～10μg、好ましくは0.03μg～8μg程度である。抗原を固相上に直接固定化する場合、多糖類を固相上に固定化した後に抗原を固定化してもよいし、抗原を固相上に固定化した後に多糖類を固定化してもよい。

【0019】

本発明のもう1つの重要な特徴は、抗原抗体反応を、遊離の多糖類の共存下で行うことである。ここで、利用可能な多糖類及び好ましい多糖類は、上記した、固相の被覆に用いられる多糖類と同様であり、アミノデキストランのような、共有結合のための官能基を持つものも好ましく用いることができる（もちろん、反応液中の多糖類は共有結合されるものではないが）。固相の被覆に用いた多糖類と同一の多糖類を反応液中に共存させることが好ましいが、異なる多糖類を共存させてもよい。反応液中の多糖類の濃度は、特に限定されないが、通常0.03質量%～8質量%程度、好ましくは、0.1質量%～1.0質量%程度である。また、サンドイッチ法における抗原抗体反応を、固相化抗原と被検抗体との抗原抗体反応と、被検抗体と標識抗体との抗原抗体反応との別個の計2段階で行う場合、2段階の抗原抗体反応のいずれにおいても遊離の多糖類の共存下で行ってもよいが、固相化抗原と被検抗体との抗原抗体反応を遊離の多糖類の存在下で行えば、十分な非特異吸着抑制効果を得ることができる。

【0020】

本発明の免疫学的測定は、上記した固相の多糖類による被覆及び遊離の多糖類の共存下で抗原抗体反応を行う点を除けば、周知の通常のスンドイッチ法と全く同様にして行うことができる。すなわち、上記の通り抗原を固定化した固相と、被検抗体を含む可能性がある検体とを接触させ、固定化抗原と検体中の被検抗体とを抗原抗体反応させる。抗原抗体反応の条件は、抗原抗体反応が起きる条件であれば特に限定されず、通常、25～42で1分間～30分間程度である。次いで、洗浄後、被検抗体と抗原抗体反応する標識抗

10

20

30

40

50

体を固相と接触させ、固相上に結合した被検抗体と標識抗体とを抗原抗体反応させる。反応の条件は、抗原抗体反応が起きる条件であれば特に限定されず、通常、25 ~ 42で1分間~30分間程度である。次いで、洗浄後、固相に結合した標識抗体の標識を測定する。種々の既知濃度の被検抗体を上記方法で免疫学的測定に供し、抗体濃度を横軸に、測定された標識量を縦軸にプロットして検量線を作成し、未知の検体について測定した標識量をこの検量線に当てはめることにより、未知の検体中の被検抗体を定量することができる。

【0021】

上記した一般的なサンドイッチ法を行う自動化装置も種々市販されているので、それらの市販の自動化装置を用いて本発明の免疫学的測定を行うことも可能である。

10

【0022】

本発明の免疫学的測定方法に供される検体は、何ら限定される物ではないが、非特異吸着が問題となる様々な物質を含む体液である場合に本発明の威力が特に発揮される。体液としては、血液（全血、血清及び血漿）、尿、ぬぐい液、唾液や痰等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、これらの体液を必要に応じて希釈したのも検体として供することができる。

【0023】

本発明の免疫学的測定方法により測定される被検抗体は、特に限定されないが、通常、感染症の病原体であるウイルス及び細菌並びにそれらの部分に対する抗体、および自己抗体であり、より具体的には、抗ヒト免疫不全ウイルス（HIV）抗体、抗B型肝炎ウイルス（HBV）抗体、抗C型肝炎ウイルス（HCV）抗体、抗ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV）抗体、抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体、抗サイログロブリン抗体、抗インスリン抗体、およびIgE等を例示することができるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

20

【0024】

標識抗体としては、酵素、蛍光色素、放射性物質等で標識した抗体が周知であり、種々市販されているので、市販の標識抗体を好ましく用いることができる。なお、標識抗体は、被検抗体と抗原抗体反応するものであるから、例えば、検体がヒト由来の体液等で、被検抗体がヒト抗体である場合には、標識抗体としては、標識抗ヒトIgG抗体や標識抗ヒトIgM抗体等の抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いることができる。これらの標識抗ヒトIgG抗体も市販されている。

30

【0025】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例中、「%」は全て「質量%」である。

【実施例】

【0026】

実施例1 デキストラン被覆粒子と遊離のデキストラン添加による非特異吸着抑制評価
1-1. デキストラン被覆粒子の調製

精製水で洗浄した2mgカルボキシル化磁性粒子（ダイナビーズ（登録商標）、ライフテクノロジーズ社製）に、2mg/mLアミノデキストラン（平均分子量約40kDa）の水溶液100μLを添加し、さらに水溶性カルボジイミド水溶液（19mg/mL）100μLを加えた。混合物を攪拌させた状態で25℃、一晚反応させた。混合物を精製水で3回洗浄し、50mMトリス緩衝液（pH7.2、NaCl、BSAを含む）で3回洗浄した後、この粒子を50mMトリス緩衝液に分散させて、デキストラン被覆粒子を得た。

40

【0027】

1-2. デキストラン被覆粒子と遊離のデキストラン添加による非特異吸着抑制評価

上記1-1. で得られたデキストラン被覆粒子を、キュベット内で、遊離の1%デキストラン（平均分子量約40kDa）（Dex（40k））、又は1%アミノデキストラン（平均分子量約40kDa）（NH₂Dex（40k））を加えた50mMトリス緩衝液

50

250 μ L に懸濁した。この粒子懸濁液に 20 μ L の脱脂血清を混合し、37、10 分間静置した。なお、本実施例では非特異吸着を検討するため、HIV 陰性の脱脂血清を用いた。

【0028】

このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この後、ルミパルス（登録商標）洗浄液（富士レピオ社製）を加え攪拌した。このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この操作を 4 回繰り返した。この粒子を含むキュベットに、250 μ L のアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体（0.2 μ g/mL）を混合し、37、10 分間静置した。このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この後、ルミパルス（登録商標）洗浄液を加え攪拌した。このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この操作を 6 回繰り返した。

10

【0029】

この粒子を含むカートリッジに、化学発光基質である 3 - (2' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3" - ホスホリルオキシ) フェニル - 1, 2 - ジオキセタン・2 ナトリウム塩 (AMP PD (登録商標)) を含むルミパルス (登録商標) 基質液 (富士レピオ社製) 200 μ L を加え 37 で反応させた。5 分間反応を行った後、ルミパルスフォルテ (富士レピオ社製) でカウント値を測定した。比較として、デキストラン被覆の無い粒子を用いて、デキストラン被覆粒子と同様に測定した。

【0030】

結果を、図 1 に示す。図 1 は、各条件で測定したカウント値を示す。図 1 に示される通り、デキストラン被覆のない粒子に遊離のデキストランを添加しない条件では、約 40 万カウントとなり、非特異吸着が高いことが確認された。この粒子の反応液に遊離のデキストランを添加しても、ほとんどカウント値が低下しなかった。遊離のアミノデキストランを添加すると、約 8 万カウントに低下するが、その非特異吸着抑制効果は小さいものであった。以上のことから、デキストラン被覆のない粒子では、遊離のデキストラン又はアミノデキストランの添加は、非特異吸着抑制に効果がないか、又は非常に小さい効果しかないことが分かった。

20

【0031】

他方、デキストラン被覆粒子では、遊離のデキストランを添加しないと、約 65 万カウントと、デキストラン被覆のない粒子に比べてカウント値が約 1.5 に上昇してしまった。つまり、遊離のデキストランを添加していない条件では、粒子をデキストランで被覆することによって、非特異吸着がむしろ増加することが分かった。

30

【0032】

これに対し、デキストラン被覆粒子の反応液中に遊離のデキストランを添加すると、約 900 カウントと、大幅にカウント値が低下した。アミノデキストランを添加した場合は、約 350 カウントとさらにカウント値の低下が確認された。

【0033】

これらの結果から、粒子をデキストランで被覆し、さらに反応液中に遊離のデキストランまたはアミノデキストランを共存させることによって、大幅に非特異吸着を抑制することができることが明らかとなった。

40

【0034】

実施例 2 . 抗 gp 41 抗体アッセイ

2 - 1 . HIV 由来 gp 41 抗原結合デキストラン被覆粒子の作製

精製水で洗浄した 2 mg カルボキシル化磁性粒子 (ダイナビーズ (登録商標)、ライフテクノロジーズ社製) に、2 mg/mL アミノデキストラン (平均分子量約 40 kDa) の水溶液 100 μ L を添加し、さらに水溶性カルボジイミド水溶液 (19 mg/mL) 100 μ L を加えた。混合物を攪拌させた状態で 25、一晩反応させた。混合物を精製水および 50 mM トリス緩衝液でそれぞれ 3 回洗浄した。得られた粒子を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.3) に懸濁し、160 μ L のエタノールに溶解させた N - スクシンイミジル - 4 - マレイミド酪酸溶液 (1 mg/mL) を加え 25、1 時間攪拌した。エタノー

50

ル、0.1 Mリン酸緩衝液で2回ずつ洗浄した後、0.1 Mリン酸緩衝液に懸濁し、チオール化したHIV由来gp41抗原を加えた。混合物を25℃で一晩攪拌させた。それを0.1 Mリン酸緩衝液で洗浄し、200 µLの0.1 Mリン酸緩衝液に溶解させたシステイン溶液(0.6 mg/mL)を加え25℃、3時間攪拌した。50 mMトリス緩衝液で3回洗浄した後、50 mMトリス緩衝液に分散させて、gp41抗原結合デキストラン被覆粒子とした。

【0035】

2 - 2. gp41抗原結合デキストラン被覆粒子による抗gp41抗体アッセイ

上記2 - 1. で得られたgp41抗原結合デキストラン被覆粒子37.5 µgを、キュベット内で、1%デキストラン(平均分子量約40 kDa)を加えた50 mMトリス緩衝液250 µLに懸濁した。この粒子懸濁液に20 µLのサンプルを混合し、37℃、10分間静置した。本実施例では、抗gp41抗体を含まないHIV陰性の血清を陰性サンプルとして、本HIV陰性の血清に所定の濃度の抗gp41抗体を添加したサンプルを陽性サンプルとして用いた。

10

【0036】

粒子懸濁液とサンプルを混合したキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この後、ルミパルス(登録商標)洗浄液を加え攪拌した。このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この操作を4回繰り返した。この粒子を含むキュベットに、250 µLのアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体(0.2 µg/mL)を混合し、37℃、10分間静置した。このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この後、ルミパルス(登録商標)洗浄液(富士レピオ社製)を加え攪拌した。このキュベットを磁石に接して粒子を集磁させ、上清を廃液した。この操作を6回繰り返した。

20

【0037】

この粒子を含むキュベットに化学発光基質である3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩(AMPPD(登録商標))を含むルミパルス(登録商標)基質液200 µLを加え37℃で反応させた。5分間反応を行った後、ルミパルスフォルテ(富士レピオ社製)で測定した。

【0038】

結果を、図2に示す。図2(1)は、gp41抗原結合デキストラン被覆粒子を用いて、遊離のデキストランの有無の条件で、陽性サンプルと陰性サンプルをそれぞれ測定したカウント値を示す。また、図2(2)は、それぞれのカウント値から求めたS/N比(陰性サンプルの測定値Nに対する陽性サンプルの測定値Sの比率×100)を示す。

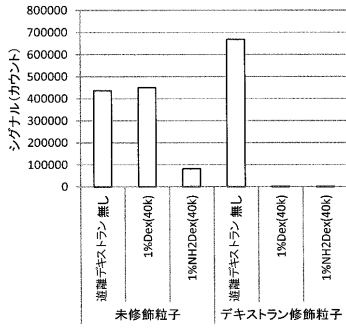
30

【0039】

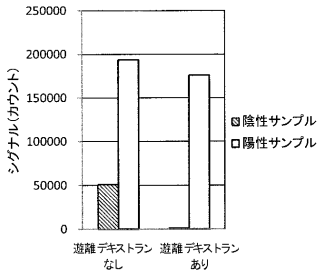
その結果、デキストラン被覆粒子を用いた抗gp41抗体アッセイでは、反応系に遊離のデキストランを共存させることによって、陰性サンプルにおけるカウント値が大幅に低下し、抗gp41抗体アッセイにおいても非特異吸着が抑制されていることが確認できた。これにより、S/N比が約30倍以上向上し、アッセイ系の感度が大幅に改善することが明らかとなった。

40

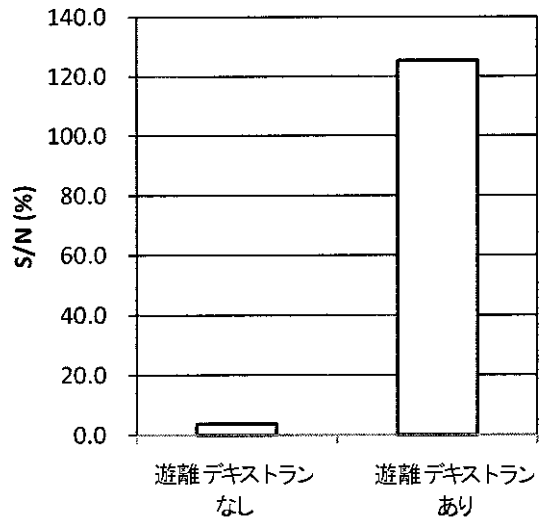
【 図 1 】



【 図 2 (1) 】



【 図 2 (2) 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/543	5 1 5 M
C 0 7 K	17/14	

专利名称(译)	标本中测试抗体的免疫学测定方法		
公开(公告)号	JP2017090338A	公开(公告)日	2017-05-25
申请号	JP2015223091	申请日	2015-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	岡朗弘		
发明人	岡 朗弘		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/50 C07K17/14		
FI分类号	G01N33/543.515.J G01N33/543.525.W G01N33/53.N G01N33/543.565.U G01N33/543.541.A G01N33/50.Z G01N33/543.515.M C07K17/14		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA37 2G045/FB03 4H045/AA50 4H045/BA63 4H045/DA75 4H045/EA52 4H045/EA53		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过夹心法免疫测量测试抗体的新方法，该夹心法能够通过夹心法大大抑制用于免疫测量的固相的非特异性吸附。解决方案：免疫测量样品中的测试抗体的方法包括固定有抗原的固相，其与抗原 - 抗体反应中的样品中的测试抗体反应，和与测试抗体经历抗原 - 抗体反应的标记抗体一种通过所用夹心法免疫测量样品中的测试抗体的方法。在固相用多糖包被并且游离多糖共存于反应溶液中的状态下进行免疫测量。 点域1

