

(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 - 330613
(P2001 - 330613A)

(43)公開日 平成13年11月30日(2001.11.30)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G O 1 N 33/543 581

G O 1 N 33/543 581 D

33/531 33/531 B

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 数)

(21)出願番号	特願2000 - 148346(P2000 - 148346)	(71)出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22)出願日	平成12年5月19日(2000.5.19)	(72)発明者	黒田 広志 大阪府三島郡島本町百山2 - 1 積水化学工業株式会社内
		(72)発明者	高原 誠 大阪府三島郡島本町百山2 - 1 積水化学工業株式会社内

(54)【発明の名称】 免疫測定試薬

(57)【要約】

【課題】 従来の免疫学的測定法の感度を向上させ、従来適用が困難であった低分子に対してラテックス凝集法を広く適用することができる免疫測定試薬を提供する。

【解決手段】 複数のリガンドが担持されたポリペプチドと複数のリガンドが担持された不溶性担体とからなる免疫測定試薬。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数のリガンドが担持されたポリペプチドと複数のリガンドが担持された不溶性担体とからなることを特徴とする免疫測定試薬。

【請求項 2】 ポリペプチドは、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン、リシン、ヒドロキシリシン、アルギニン、セリン、トレオニン、又は、システインの単一のアミノ酸からなることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定試薬。

【請求項 3】 不溶性担体は、ラテックス粒子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の免疫測定試薬。

【請求項 4】 ポリペプチドは、水溶性であることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の免疫測定試薬。

【請求項 5】 リガンドは、少なくとも一部がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 記載の免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中の抗原 - 抗体反応を起こす物質を測定する、多価リガンドからなる高感度な免疫測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫学的測定方法は、抗原 - 抗体反応を利用して、試料中の測定対象物質である抗原又は抗体を、測定対象物質に対する抗体又は抗原と特異的に反応させることにより、検出、測定する方法である。抗原 - 抗体反応の検出は、具体的には、発色物質と反応する酵素や放射性物質又はラテックスや赤血球等の微粒子等を利用して、抗原 - 抗体反応に伴って生じる紫外線、可視光線の吸光度や放射線量の変化を測定することにより行われる。

【0003】この免疫学的測定方法は、他の方法と比較して特異性や感度が高いので、生体試料の定量方法として汎用されている。この方法を利用した測定方法としては、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、ラテックス凝集法等がある。

【0004】しかしながら、この方法は、主に免疫グロブリン等の抗体を使用する方法であるので、測定対象物質の分子量が小さくなるほど、特に免疫グロブリンより小さい分子等に対しては、結合すべきエピトープが少なくなったり、エピトープが 2 種類以上必要な測定方法の場合、エピトープ間の距離や、エピトープの分子中の立体的な位置が複雑となり、抗体が測定対象物質に結合しにくくなったり、又は、結合しなくなる。その結果、感度や特異性が低下してしまうという問題点がある。

【0005】また、従来の免疫学的測定法を利用した試薬の検出感度は、その測定原理、測定項目によって異なるが、例えば、ラテックス凝集法では、 $1 \sim 10 \text{ ng/mL}$ 程度であり、酵素免疫測定法（EIA）や放射免疫測定法（RIA）では、 $0.1 \sim 1 \text{ ng/mL}$ 程度であ

り、より感度を上げることが求められていた。測定対象物質が低分子量の場合、特に分子量 10 万以下のものについては、EIA や RIA では測定が可能な技術もあるものの、より操作が容易なラテックス凝集法では、測定が困難であった。ラテックス凝集法でも、ハプテン等を用い、間接的に測定するような方法はあったが、直接抗体を利用して測定するような方法は見られず、低分子量の物質を容易に測定できる技術が求められていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記に鑑み、従来の免疫学的測定方法の感度を向上させ、従来適用が困難であった低分子に対してラテックス凝集法を広く適用することができる免疫測定試薬を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、複数のリガンドを担持されたポリペプチドと複数のリガンドを担持された不溶性担体とからなる免疫測定試薬である。以下に、本発明を詳述する。

【0008】本発明の免疫測定試薬は、抗原抗体反応を利用する免疫学的測定方法に用いるものであり、複数のリガンドが担持されたポリペプチドと複数のリガンドが担持された不溶性担体とからなる。上記免疫学的測定方法としては特に限定されず、例えば、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、ラテックス凝集法等が挙げられる。なかでも、ラテックス凝集法が好ましい。

【0009】上記リガンドとは、測定対象物質等の特定の物質と特異的に結合する物質を指す。上記リガンドとしては特に限定されず、例えば、上記測定対象物質が抗体であれば、上記リガンドとしては、これに対するエピトープを持つ物質が挙げられ、上記測定対象物質が抗原であれば、上記リガンドとしては、その抗原が有するエピトープと特異的に結合する抗体が挙げられ、その他の場合としては、例えば、上記測定対象物質を基質とする酵素、補酵素、レセプタ、レクチン、ホルモン、神経伝達物質等を用いても同様な特異的結合反応が得られる。なかでも、本発明の免疫測定試薬に用いられるリガンドは、抗体であることが好ましく、免疫グロブリン G であることがより好ましい。上記抗体の反応対象となる抗原やエピトープとしては特に限定されない。

【0010】また、本発明の免疫測定試薬に用いられる上記リガンドは、少なくとも一部がモノクローナル抗体であることが好ましい。上記モノクローナル抗体を用いると、エピトープを単一的、限定的に決定できるので、本発明の免疫測定試薬を用いた測定の再現性、特異性がより良好となる。また、本発明の免疫測定試薬では、後述のように複数の抗体を組み合わせるので、モノクローナル抗体の方がより性能が均一な試薬を得ることができる。

【0011】上記抗体が由来する動物種としては特に限定されず、例えば、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ等が挙げられる。上記抗体の純度としては特に限定されず、例えば、グロブリン画分であってもよく、アフィニティ精製画分であってもよい。

【0012】また、上記抗体は $F(ab')_2$ やFabといった断片化されたものでもよい。特に、測定試料が血液、血漿成分、血清成分である場合には、上記抗体は酵素等で切断し、Fc部分を除去し、 $F(ab')_2$ のみにして用いることが好ましい。上記のような測定試料を測定する場合、試料中にはリウマトイド因子(RF)が含まれることがある。RFは免疫グロブリンのFc部分に対する抗体であるので、上記抗体がFc部分を有すると、本発明の免疫測定試薬の構成要素である抗体に対しても結合し、後述のラテックス凝集反応において、反応の本体である凝集を増加させる。

【0013】本発明の免疫測定試薬は、上記リガンドの担体として、ポリペプチド及び不溶性担体を用いており、上記ポリペプチド1分子には、複数のリガンドが担持されている。上記ポリペプチドに担持されている複数のリガンドは、ポリペプチドを介して間接的に結合していることになるので、上記ポリペプチドは、1分子あたり、測定対象物質と特異的に結合する部分を少なくとも2つ有する。また、ポリペプチドに担持される複数のリガンドは、1種のみであってもよく、2種以上であってもよい。一般に従来のラテックス凝集法、EIA、RIA等の免疫学的測定方法は、不溶性担体とリガンドとを組み合わせたもので、測定対象物質をリガンドを介して不溶性担体に結合させることで反応が進行する。

【0014】本発明の免疫測定試薬においては、測定対象物質と結合するリガンドがポリペプチドに担持されているので、リガンドと測定対象物質との反応の際に、不溶性担体との立体障害等による反応阻害が抑えられ、リガンドと測定対象物質との反応が有利に進行し、高感度に測定対象物質を測定することができる。また、上記ポリペプチドは、複数のリガンドを担持しているので、測定対象物質を多数捉えることができる。そのため、上記複数のリガンドが担持されたポリペプチドは、ラテックス凝集法にあっては抗原抗体反応に伴うラテックス凝集をより多く生ぜしめ、EIAやRIAにあっては、より多くの測定対象物質を捉えることにより、感度を向上させることができる。

【0015】本発明の免疫測定試薬に用いられる上記ポリペプチドは、水溶性であることが好ましい。本発明の免疫測定試薬は、抗体等の生体成分を使用するので、有機溶媒等の親油性の溶媒では変性等を起こしやすく、その使用は好ましくない。従って、溶媒は水系溶媒を用いることが好ましい。

【0016】上記ポリペプチドは、生体高分子であるので、主として用いる反応物である血液由来検体や尿等と

も親和性がよく、残基等の処理は基本的にする必要がない。また、ポリペプチドは、生体材料として比較的入手等が容易である。他の水溶性高分子、例えば、ポリエチレングリコール等は、反応性が均一となる反面、未反応の残基等が測定対象物質と相互作用することが多い。また、完全に反応させて残基を消すことは困難である。

【0017】上記ポリペプチドとしては特に限定されず、例えば、牛血清アルブミン等のアルブミン類； γ -グロブリン等のグロブリン類；モノポリアミノ酸；コラーゲン類；ムチン等の糖タンパク質類； β -ガラクトシダーゼ等の酵素類；ヒストン等が挙げられる。なかでも、例えば、上記牛血清アルブミン等は、入手が容易であり、コスト的にも好ましい。また、本発明の免疫測定試薬で用いられる上記ポリペプチドは、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン、リシン、ヒドロキシリシン、アルギニン、セリン、トレオニン、システインのうちの単一のアミノ酸からなることが好ましい。上記のアミノ酸のうちの単一の種類からなるポリペプチドは、ペプチド結合として消費されたものを除くと単一の官能基のみを持つので、担持させるリガンドとの結合反応が非常に容易であり、かつ、性能的にも均一性のあるものが得られる。

【0018】上記ポリペプチドの分子量としては、5000~20万が好ましい。分子量が5000未満であると、ポリペプチド1分子あたりのリガンドの結合量が少ないので、反応する測定対象物質の数が少なくなり、結果として得られる免疫測定試薬は反応性に劣り、感度が向上しないことがある。また、分子量が20万を超えると、結合する測定対象物質量は多くなるが、凝集に有効に寄与する測定対象物質の割合が減るので、感度が向上しないことがある。分子量が5000~20万であると、最も感度が良好となる。

【0019】上記複数のリガンドがポリペプチドに担持される形態としては特に限定されず、例えば、上記リガンドは、複数のリガンドがポリペプチドを介して間接的に結合していてもよく、複数のリガンド同士が結合したものが、ポリペプチドに結合していてもよいが、複数のリガンドがポリペプチドを介して間接的に結合していることが好ましい。

【0020】上記ポリペプチドに、複数のリガンドを担持する手段としては、不可分に複数の上記リガンドを担持させることができれば特に限定されず、非可逆的であっても、可逆的であってもよく、例えば、共有結合等の化学結合による結合や、疎水性吸着、クーロン力等の電気的な力による結合等が挙げられる。なかでも、安定性の点で、共有結合が好ましい。但し、上記ポリペプチドに複数のリガンドを担持させる際に、リガンドの測定対象物質と特異的に結合する部分を不可逆的に変化させるように結合させることはできない。

【0021】上記リガンドを担持されたポリペプチド

は、反応液中で、分散又は溶解している必要がある。上記のポリペプチドが不溶状態であると、ポリペプチド自身の反応液中での自由度が小さいので、測定対象物質との反応が立体障害により妨げられ、十分な測定感度を得ることができなくなる。また、ポリペプチドは、溶解状態となっていることがより好ましい。

【0022】本発明の免疫測定試薬において、上記複数のリガンドが担持されたポリペプチドは、複数のリガンドが担持された不溶性担体と組み合わせて用いられる。本発明の免疫測定試薬において、上記不溶性担体に担持 10 されている複数のリガンドは、測定対象物質と特異的に結合する物質であることが必要であり、また、該リガンドは、より特異性を高めるために、上記ポリペプチドに担持されているリガンドとは異なるものであることが好ましい。また、上記不溶性担体に担持される複数のリガンドは、1種のみであってもよく、2種以上であってもよい。

【0023】上記不溶性担体としては、EIAやRIAにあっては、プレート、大粒径のビーズ等が好ましく、ラテックス凝集法において用いるラテックスとしては、 20 粒径が比較的一定であり、一定の品質、性能のものが工業的に大量生産できる有機系微粒子が好ましい。上記有機系微粒子としては特に限定されず、例えば、スチレン、塩化ビニル、アクリロニトリル、酢酸ビニル、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル等のビニル系モノマーの単一重合体及び/又は共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、メチルメタクリレート-ブタジエン共重合体等のブタジエン系共重合体等が挙げられる。なかでも、ポリスチレン系のラテックス粒子が好ましい。上記ポリスチレン系のラテックス粒子は、抗体や抗原等 30 の各種タンパク質の吸着性に優れており、かつ、抗体の生物学的活性を長期間安定に保持することができる。

【0024】上記ラテックス粒子の粒径は、0.01~1 μ mであるのが好ましい。粒径が0.01 μ m未満であると、微凝集が多発し、見かけの粒径が不均一となり、同時再現性等によくない影響を及ぼすことがある。また、抗体の数の割に十分な凝集が得られないことがある。粒径が1 μ mを超えると、自己凝集が進み、分散性が低下することがある。また、上記不溶性担体にリガンドを担持させる方法としては特に限定されず、例えば、 40 物理的又は化学的に吸着させる方法にて行うことができる。

【0025】上記複数のリガンドが担持された不溶性担体の濃度は、不溶性担体がラテックスである場合、凝集反応を行う反応液中で0.01~5重量%が好ましい。上記の不溶性担体の濃度が0.01重量%未満であると、凝集塊の形成が不充分となり、必要な感度が得られないことがある。5重量%を超えると、バックグラウンドとしての吸光度が高すぎるので、正確な定量が行えないことがある。

【0026】本発明の免疫測定試薬は、上記のように、複数のリガンドが担持されたポリペプチドと複数のリガンドが担持された不溶性担体とからなるものであるが、その他に、例えば、上記のリガンドを担持したポリペプチド及びリガンドを担持した不溶性担体を懸濁させるための緩衝液、反応時に使用される緩衝液等が含まれてもよい。

【0027】本発明の免疫測定試薬を用いて測定される検体としては特に限定されず、各種の生体試料又は非生体試料の測定に使用することができる。上記生体試料としては特に限定されず、例えば、血液、血清、血漿、尿等が挙げられる。上記非生体試料としては特に限定されず、例えば、食品、汚水等が挙げられる。

【0028】本発明の免疫測定試薬を用いる免疫学的測定法の測定対象物質としては特に限定されず、抗体であっても、抗原であってもよく、また、その他の基質、レセプター、ホルモン、神経伝達物質等であっても同様に測定することができる。上記抗体としては抗原による刺激の結果として生体内で産生される蛋白質であれば特に限定されず、例えば、免疫グロブリンが挙げられる。上記抗原としては上記抗体と特異的に結合できる部分(エピトープ)を有するものであれば特に限定されず、いかなる分子量であってもよく、いかなる分子構造を有していてもよい。

【0029】本発明の免疫測定試薬によれば、測定対象物質が分子量が15万以下と比較的小さいものである場合でも高感度で検出することができる。上記分子量が15万以下のものとしては特に限定されず、例えば、インスリン、チロトロピン、LH、LH-RH、ガストリン、ソマトスタチン、コルチコトロピン、バソプレッシン、オキシトシン、プロラクチン、FSH、グルカゴン等が挙げられる。

【0030】分子量が15万以下であるような比較的小さい物質は、比較的エピトープ同士が近いために従来の測定方法ではラテックス凝集法によっては捉え難かった。本発明の免疫測定試薬を用いれば、立体的な障害を防ぐことができるので、ラテックス凝集法を用いてもより反応しやすくなり、結果として感度を飛躍的に向上することができる。また、EIA、RIA等の測定法において、同様の理由で感度の向上をはかることができる。また、測定対象物質が分子量が15万を超えるものである場合でも、本発明の免疫測定試薬の立体障害軽減効果により、検出感度を向上することができる。

【0031】本発明の免疫測定試薬をラテックス凝集法に適用する場合には、感度向上又は反応促進のために、反応液中に水溶性高分子等を添加してもよい。上記水溶性高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プルラン等が挙げられる。上記水溶性高分子は、単独で用いられてもよく、2種以上併 50 用されてもよい。

【0032】上記水溶性高分子は、その平均分子量が1000～500万が好ましい。平均分子量が1000未満であると、感度向上又は反応促進の効果が不充分となることがある。平均分子量が500万を超えると、媒体への溶解度が著しく低くなり、溶解性の点で問題が生じることがある。

【0033】上記水溶性高分子の濃度は、凝集反応を行う反応液中で0.1～20重量%であることが好ましい。濃度が0.1重量%未満であると、感度が低いので、低濃度域での正確な測定ができないことがある。20重量%を超えると、非特異的反応による凝集が生じ、正確な測定が困難となることがある。

【0034】上記水溶性高分子は、適当な媒体に分散及び溶解して使用するのが好ましい。この場合、上記複数のリガンドが担持されたポリペプチドと上記複数のリガンドが担持された不溶性担体と水溶性高分子とは、同一の媒体に分散及び溶解して1液のラテックス試薬として使用してもよく、各々、別個に媒体に分散又は溶解させてラテックス試薬と溶液状の試薬との2液型又は3液型試薬として使用してもよい。

【0035】上記媒体としては特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。また、上記媒体のpHは、5.5～8.5が好ましい。より好ましくは、6.5～8.0である。

【0036】上記1液のラテックス試薬中には、更に、非特異的反応の防止、又は、保存安定性のための牛血清アルブミン、ショ糖、塩濃度調整のために塩化ナトリウム等を適宜溶解させてもよい。また、ラテックス試薬と溶液状の試薬との2液型又は3液型試薬として使用する場合には、ラテックス試薬及び溶液状試薬のそれぞれに牛血清アルブミン、ショ糖、塩濃度調整のために塩化ナトリウム等を適宜溶解させてもよい。

【0037】上記ラテックス凝集法を行う場合の反応条件としては特に限定されないが、例えば、不溶性担体、ポリペプチド及び試料の反応は、抗原抗体反応及びそれに伴うラテックス凝集反応であるので、5秒～15分間、恒温で行うのが好ましい。反応時間が5秒未満であると、反応が充分に進まず、正確な測定が困難となることがある。反応時間が15分を超えると、非特異的反応による凝集が生じ、正確な測定が困難となることがある。また、上記反応は、25～37℃で行うのが好ましい。

【0038】上記ラテックス凝集法では、ラテックス凝集反応の進行に伴う吸光度の増加を測定するのが好ましい。吸光度測定に用いられる波長としては特に限定されず、適切な波長を選択すればよいが、通常400～1000nmが好ましい。より好ましくは、500～800nmである。

【0039】上記測定に使用する機器としては、経時的

に反応液の吸光度を測定できるものであれば特に限定されないが、汎用の生化学自動分析装置が好ましい。上記の測定波長、検体量、試薬量等は、装置に合わせて適宜選択することができる。

【0040】測定対象物質の定量は、既知量の試料、例えば、標準血清とその希釈系列等について、上記の測定を行い、その測定値と既知濃度とから検量線を作成しておき、未知量の試料について同一条件で測定した測定値から、上記検量線において対応する量を求めることによって行うことができる。

【0041】本発明の1態様によれば、分子量5000～20万のポリグルタミン酸等のポリペプチドを介して2つ以上のリガンドを結合させたものと、上記リガンドとは別種のリガンドを複数個ラテックス微粒子等の不溶性担体に担持させたものを用い、これらと測定試料とを混合し、抗原-抗体反応を契機としたラテックス凝集反応を生ぜしめる。上記反応液の吸光度変化量を測定し、あらかじめ作成した検量線を用いて、濃度未知の試料中の測定対象物の量を正確に測定することができる。

【0042】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0043】実施例1～5、及び、比較例1～7
試薬及び材料

実施例1～5、及び、比較例1～7で使用した試薬及び材料は、以下の通りである。

ラテックス：平均粒径0.403μmのポリスチレンラテックス（固形分10%（W/V）、積水化学工業社製）を使用した。

ラテックス希釈用緩衝液：50mM Na_2HPO_4 と50mM NaH_2PO_4 とをpH7.50になるように混合し、ラテックス希釈用緩衝液として用いた。

抗プロラクチンモノクローナル抗体：当社でマウスの腹水から精製した3種のクローンの抗プロラクチンモノクローナル抗体A、B、Cを、プロテインGによるアフィニティクロマトグラフィーで精製し、集めたものを用いた。

抗α-フェトプロテインポリクローナル抗体（ウサギ）：DAKO社製のものを用いた。

抗α2-プラスミンインヒビターポリクローナル抗体（ウサギ）：DAKO社製のものを用いた。

抗体希釈用緩衝液：ラテックス希釈用緩衝液を、抗体希釈用緩衝液として用いた。

ブロッキング用緩衝液：100mM Na_2HPO_4 と100mM NaH_2PO_4 とをpH7.40になるように混合し、ウシ血清アルブミン（Bovine serum albumin、FractionV、Reagent Grade、Miles Corp.社製）を1%（W/V）になるように添加し、更に NaN_3 （試

薬特級、ナカライテスク社製)を0.1%(W/V)になるように添加したものを、ブロッキング用緩衝液として用いた。

血清検体：健康人の血清に、プロラクチン、 α -フェトプロテイン、 α 2-プラスミンインヒビターを適宜添加したものを用いた。

検体希釈液(R1調製用)：ブロッキング用緩衝液に、ポリエチレングリコール6000(平均分子量7500、和光純薬工業社製)を5%(W/V)になるように添加したものを、検体希釈液として用いた。

【0044】方法

(1) リガンド担持ポリペプチドの調製

〔1〕多価抗プロラクチンモノクローナル抗体

抗プロラクチンモノクローナル抗体A、B、Cの3種類について、そのタンパク濃度を1mg/mLに調製した。これとは別に、溶液中の濃度が1mg/mLであるポリグルタミン酸(分子量：1万～5万、ICN社製)に、酸性下(pH4.5)で塩酸-1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを溶液全体の濃度にして10%となるように加え、4下で3時間反応させた。これをゲルろ過カラムでイミド化ポリグルタミン酸の画分のみ分取し、これを減圧・濃縮し、10mg/mLのイミド化ポリグルタミン酸を得た。これを中性条件下(pH7.5)で、先の3種類のモノクローナル抗体をそれぞれ別々に添加し、イミド化ポリグルタミン酸1mg/mL、モノクローナル抗体1mg/mLの濃度に調整した。この液を4条件下で反応させ、反応終了後、ゲル透過クロマトグラフィーで分子量30万以上の画分のみを集め、これを濃縮した後に濃度調整を行い、100 μ g/mLの3種のリガンドが担持されたポリペプチド(リガンド担持ポリペプチド)を得た。

【0045】〔2〕多価抗 α -フェトプロテインポリクローナル抗体

抗 α -フェトプロテインポリクローナル抗体について、そのタンパク濃度を1mg/mLに調製した。これとは別に、溶液中の濃度が1mg/mLであるポリグルタミン酸(分子量：1万～5万、ICN社製)に、酸性下(pH4.5)で塩酸-1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを溶液全体の濃度にして10%となるように加え、4下で3時間反応させた。これをゲルろ過カラムでポリグルタミン酸画分のみ分取し、これを減圧・濃縮し、1%のイミド化ポリグルタミン酸を得た。これを中性条件下(pH7.5)で、ポリクローナル抗体をそれぞれ別々に添加し、イミド化ポリグルタミン酸1mg/mL、ポリクローナル抗体1mg/mLの濃度に調整した。この液を4条件下で反応させ、反応終了後、ゲル透過クロマトグラフィーで分

子量30万以上の画分のみを集め、これを濃縮した後に濃度調整を行い、100 μ g/mLの3種のリガンドが担持されたポリペプチド(リガンド担持ポリペプチド)を得た。

【0046】〔3〕多価抗 α 2-プラスミンインヒビターポリクローナル抗体

抗 α 2-プラスミンインヒビターポリクローナル抗体について、そのタンパク濃度を1mg/mLに調製した。これとは別に、溶液中の濃度が1mg/mLであるポリグルタミン酸(分子量：1万～5万、ICN社製)に、酸性下(pH4.5)で塩酸-1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを溶液全体の濃度にして10%となるように加え、4下で3時間反応させた。これをゲルろ過カラムでポリグルタミン酸画分のみ分取し、これを減圧・濃縮し、1%のイミド化ポリグルタミン酸を得た。これを中性条件下(pH7.5)で、ポリクローナル抗体をそれぞれ別々に添加し、イミド化ポリグルタミン酸1mg/mL、ポリクローナル抗体1mg/mLの濃度に調整した。この液を4条件下で反応させ、反応終了後、ゲル透過クロマトグラフィーで分子量30万以上の画分のみを集め、これを濃縮した後に濃度調整を行い、100 μ g/mLの3種のリガンドが担持されたポリペプチド(リガンド担持ポリペプチド)を得た。

【0047】(2) 抗体担持ラテックスの調製

平均粒径0.403 μ mのポリスチレンラテックス(固形分10%(W/V))1容に、ラテックス希釈用緩衝液3容を添加し、希釈して、2.5%(W/V)ラテックス液とした。表1に示す各モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、タンパク濃度が1mg/mLになるように抗体希釈用緩衝液で希釈し、抗体液とした。2.5%(W/V)ラテックス液200 μ Lを25のインキュベーター中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、抗体液800 μ Lを素早く添加し、25にて1時間攪拌した。その後、ブロッキング用緩衝液を2.0mL添加し、25にて続けて2時間攪拌した。その後、15、1500rpmにて15分間遠心分離した。得られた沈殿にブロッキング用緩衝液4.0mLを添加し、同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を2.0mL添加し、よく攪拌した後、超音波破砕機にて分散処理を行い、固形分0.25%(W/V)の3種のラテックス試薬とした。このようにして調製したラテックス試薬は、4にて保存した。実施例及び比較例について、R1及びR2の組み合わせを表1に示した。

【0048】

【表1】

	R1	R2
実施例1	検体希釈液中にリガンド担持ポリグルタミン酸Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬B
実施例2	検体希釈液中にリガンド担持ポリグルタミン酸Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
実施例3	検体希釈液中にリガンド担持ポリグルタミン酸Bを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
実施例4	検体希釈液中に α -フェトプロテイン抗体担持ポリグルタミン酸を5 μ g/mL含有する	α -フェトプロテインラテックス試薬
実施例5	検体希釈液中に α 2-プラスミンインヒビター抗体担持ポリグルタミン酸を5 μ g/mL含有する	α 2-プラスミンインヒビターラテックス試薬
比較例1	検体希釈液中に抗体Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬B
比較例2	検体希釈液中に抗体Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
比較例3	検体希釈液中に抗体Bを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
比較例4	検体希釈液以外含有しない	ラテックス試薬A+B
比較例5	検体希釈液以外含有しない	ラテックス試薬A+C
比較例6	検体希釈液以外含有しない	α -フェトプロテインラテックス試薬
比較例7	検体希釈液以外含有しない	α 2-プラスミンインヒビターラテックス試薬

・実施例1～3のR1中に含有されるリガンド担持ポリグルタミン酸A、Bはそれぞれ抗プロラクチン抗体A、Bを結合した多価リガンドを表す。

・実施例1～3、比較例1～5のR2中に含有されるラテックス試薬A、B、Cはそれぞれ抗体A、B、Cを結合したラテックス試薬を表す。

・ラテックス試薬は「リガンド担持ラテックスの調製」で製したものをそのまま用いる

・比較例1～3のR1中の抗体はモノクローナル抗体をそのまま用いる

・比較例4、5のR2中のラテックス試薬はラテックス試薬A+Bであれば、ラテックス試薬Aとラテックス試薬Bを容量比1:1で混合したものを表す。

【0049】(3)測定

実施例及び比較例で作製した試薬による免疫測定は、生化学用自動分析装置7150形(日立製作所社製)を用いて行った。上記(2)で得られた固形分0.25%(W/V)のラテックス試薬を、そのままR2液(固形分0.25%(W/V))として用いた。また、R1液には、前述の検体希釈液に前述のリガンド担持ポリペプチドを加えたものを用いた。検体希釈液への添加物の種類、量については表1に示した。測定条件は以下の通りである。

【0050】(1)プロラクチン測定条件

検体容量: 20 μ L

検体希釈液(R1液): 210 μ L

試薬(R2液): 30 μ L

測定波長: 570nm

測定温度: 37

【0051】(2) α -フェトプロテイン測定条件

検体容量: 20 μ L

検体希釈液(R1液): 210 μ L

試薬(R2液): 70 μ L

測定波長: 570nm

測定温度: 37

【0052】(3) α 2-プラスミンインヒビター測定

条件

検体容量: 20 μ L

検体希釈液(R1液): 210 μ L

試薬(R2液): 70 μ L

測定波長: 570nm

測定温度: 37

【0053】試薬(R2液)を添加してから約80秒後の吸光度と約320秒後の吸光度との差($\Delta OD570$)を測定し、この吸光度の差を1万倍したものを吸光度変化量とした。検体の代わりに、既知濃度の血液項目用標準血清で同様の測定を行って、あらかじめ検量線を作成しておき、上清検体の吸光度変化量を上記検量線に外挿して、検体中のプロラクチン量を算出した。

【0054】(4)検体と測定結果

各種抗原を添加した健常人男子のプール血清(プロラクチン、 α -フェトプロテインは1000ng/mL、 α 2-プラスミンインヒビターは10 μ g/mLに調製)を、何も添加しない同一の健常人男子のプール血清で倍々に希釈して、1024倍希釈までの希釈系列を調製した。この希釈系列をそれぞれ2回ずつ測定した結果を表2～4に示した。

【0055】

【表2】

12 プロラクチン濃度(ng/mL)												
	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	195	0.98	0
実施例1	2832	1878	1289	612	321	159	109	78	57	26	10	3
実施例2	2581	1843	1182	572	301	141	105	73	54	22	7	1
実施例3	2662	1852	1221	591	310	149	100	72	54	23	4	1
比較例1	289	219	100	54	29	12	11	11	10	5	1	0
比較例2	208	188	95	47	21	10	9	9	8	3	1	1
比較例3	228	206	99	52	27	11	11	10	9	4	1	1
比較例4	291	221	101	56	31	12	10	10	6	4	2	2
比較例5	209	189	96	48	22	9	9	10	7	2	2	1

【0056】

【表3】

α -フェトプロテイン濃度(ng/mL)												
	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	195	0.98	0
実施例4	2699	1881	1187	569	301	142	101	71	52	24	10	0
比較例6	511	210	97	50	27	12	10	10	7	2	1	2

【0057】

【表4】

α_2 -ブラスミンインヒビター濃度(μ g/mL)												
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157	0.078	0.039	0.019	0.01	0
実施例5	2798	1909	1260	604	319	157	108	75	57	23	8	2
比較例7	1410	832	401	221	113	44	21	19	20	10	2	1

【0058】表2～4より、比較例で作製した試薬に比べ、実施例1～5で作製した試薬は、いずれも最小検出感度が低く、飛躍的に感度が向上していた。

【0059】

【発明の効果】本発明の免疫測定試薬は、従来の免疫測定試薬に比べ、検出感度に優れている。そのため、迅速かつ簡便に多種多様な物質を高感度で定量することが可能である。

专利名称(译)	免疫试剂		
公开(公告)号	JP2001330613A	公开(公告)日	2001-11-30
申请号	JP2000148346	申请日	2000-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	黒田広志 高原誠		
发明人	黒田 広志 高原 誠		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/531.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫测定试剂，其能够提高传统的免疫测定方法的灵敏度，并且能够将胶乳凝集方法广泛应用于传统上难以应用的小分子。一种免疫测定试剂，其包含带有多个配体的多肽和带有多个配体的不溶性载体。

(7)

特開 2 0

	R1	R2
実施例1	検体希釈液中にリガンド担持ポリグルタミン酸Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬B
実施例2	検体希釈液中にリガンド担持ポリグルタミン酸Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
実施例3	検体希釈液中にリガンド担持ポリグルタミン酸Bを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
実施例4	検体希釈液中に α -フェトプロテイン抗体担持ポリグルタミン酸を5 μ g/mL含有する	α -フェトプロテインラテックス試薬
実施例5	検体希釈液中に α 2-プラスミンインヒビター抗体担持ポリグルタミン酸を5 μ g/mL含有する	α 2-プラスミンインヒビターラテックス試薬
比較例1	検体希釈液中に抗体Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬B
比較例2	検体希釈液中に抗体Aを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
比較例3	検体希釈液中に抗体Bを5 μ g/mL含有する	ラテックス試薬C
比較例4	検体希釈液以外含有しない	ラテックス試薬A+B
比較例5	検体希釈液以外含有しない	ラテックス試薬A+C
比較例6	検体希釈液以外含有しない	α -フェトプロテインラテックス試薬
比較例7	検体希釈液以外含有しない	α 2-プラスミンインヒビターラテックス試薬

・実施例1～3のR1中に含有されるリガンド担持ポリグルタミン酸A、Bはそれぞれ抗プロラクチン抗体A、Bを結合した多価リガンドを表す。
・実施例1～3、比較例1～5のR2中に含有されるラテックス試薬A、B、Cはそれぞれ抗体A、B、Cを結合したラテックス試薬を表す。
・ラテックス試薬は「リガンド担持ラテックスの調製」で製したものをそのまま用いる。
・比較例1～3のR1中の抗体はモノクローナル抗体をそのまま用いる。
・比較例4、5のR2中のラテックス試薬はラテックス試薬A+Bであれば、ラテックス試薬Aとラテックス試薬Bを容量比1：1で混合したものを表す。