

(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2002 - 14098

(P2002 - 14098A)

(43)公開日 平成14年1月18日(2002.1.18)

(51)Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543 33/53	545		G 0 1 N 33/543 33/53	D U

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 8 数)

(21)出願番号 特願2000 - 195028(P2000 - 195028)

(22)出願日 平成12年6月28日(2000.6.28)

(71)出願人 000237204

富士レピオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 木崎 知則

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レピオ株式会社内

(72)発明者 青地 悟

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レピオ株式会社内

(74)代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

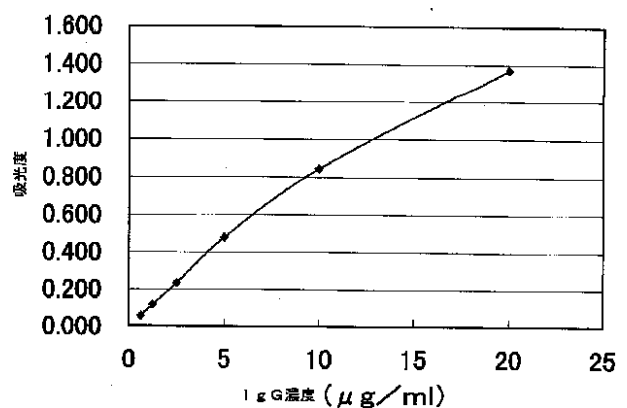
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫測定方法及びそのためのキット

(57)【要約】

【課題】 検体中の被検抗原濃度が高い場合であっても、希釈することなく又は少なくとも従来法よりも少ない希釈回数で、低濃度領域から高濃度領域まで正確に免疫測定することができる免疫測定方法を提供すること。

【解決手段】 複数のエピトープを有する被検抗原と、該被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該標識抗体と競合的に、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体とを液相中で反応させ、これと同時に又は該反応後に、前記固相特異結合性抗体を、これと特異的に結合する固相と反応させ、前記固相特異結合性抗体と前記被検抗原と前記標識抗体とを介して前記固相に結合された前記標識を測定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数のエピトープを有する被検抗原と、該被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該標識抗体と競合的に、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体とを液相中で反応させ、これと同時に又は該反応後に、前記固相特異結合性抗体を、これと特異的に結合する固相と反応させ、前記固相特異結合性抗体と前記被検抗原と前記標識抗体とを介して前記固相に結合された前記標識を測定することを 10 含む免疫測定方法。

【請求項 2】 前記固相特異結合性抗体は、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体に、ある物質に特異的に結合する特異結合性化合物を結合させた特異結合性化合物結合抗体であり、前記固相は、該特異結合性化合物と特異的に結合する特異結合性対応化合物が結合されたものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記特異結合性化合物はビオチンであり、前記特異結合性対応化合物はアビジン又はそのビオチン結合性誘導体である請求項 1 又は 2 に記載の方法。 20

【請求項 4】 前記固相特異結合性抗体と特異的に結合する固相上で、前記被検抗原と、前記標識抗体と、前記固相特異結合性抗体とを反応させる請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 前記固相特異結合性抗体及び前記標識抗体の少なくともいずれか一方は、ポリクローナル抗体である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】 複数のエピトープを有する被検抗原と、該被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、前記被検抗原と抗原抗体反応する 30 抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体と、前記被検抗原と抗原抗体反応する第 3 のフリー抗体とを液相中で反応させ、これと同時に又は該反応後に、前記固相特異結合性抗体を、これと特異的に結合する固相と反応させ、前記固相特異結合性抗体と前記被検抗原と前記標識抗体とを介して前記固相に結合された前記標識を測定することを含む免疫測定方法であって、前記標識抗体、前記固相特異結合性抗体及び前記第 3 のフリー抗体のうち少なくともいずれか二者が前記被 40 検抗原に対して競合的に反応する、免疫測定方法。

【請求項 7】 前記固相特異結合性抗体、前記標識抗体及び前記第 3 のフリー抗体の少なくともいずれか 1 つは、ポリクローナル抗体である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 前記標識は酵素標識である請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】 複数のエピトープを有する被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該標識抗体と競合的に、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体と、該固相特異結合性抗体と特異的\* 50

\*に結合する固相とを含む免疫測定用キット。

【請求項 10】 複数のエピトープを有する被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体と、前記被検抗原と抗原抗体反応する第 3 のフリー抗体と、該固相特異結合性抗体と特異的に結合する固相とを含む免疫測定用キットであって、前記標識抗体、前記固相特異結合性抗体及び前記第 3 のフリー抗体のうち少なくともいずれか二者が前記被検抗原に対して競合的に反応する、免疫測定用キット。

【請求項 11】 前記固相特異結合性抗体は、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体に、ある物質に特異的に結合する特異結合性化合物を結合させた特異結合性化合物結合抗体であり、前記固相は、該特異結合性化合物と特異的に結合する特異結合性対応化合物が結合されたものである請求項 9 又は 10 記載のキット。

【請求項 12】 前記特異結合性化合物はビオチンであり、前記特異結合性対応化合物はアビジン又はそのビオチン結合性誘導体である請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】 前記標識は酵素標識である請求項 9 ないし 12 のいずれか 1 項に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫測定方法及びそのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】高密度培養法でマウスのモノクローナル抗体を生産する際、得られる培養上清中には 5 mg / ml から 0.5 mg / ml のマウス IgG が含まれている。モノクローナル抗体の生産過程で、培養上清中の抗体量を調べるために、ELISA 法にて培養上清中の抗体濃度を測定するが、通常、ELISA 法の測定濃度範囲は、10 pg / ml から 100 ng / ml 程度であるため、従来は、培養上清を 1 万倍から 5 万倍程度に希釈して、抗体濃度測定を行っていた。この方法によると、最低、2 段階の希釈が必要であり煩雑であるし、希釈誤差が影響して、抗体濃度を正確に測定することが困難である。

【0003】この問題を解決するための方法として、測定系全体の感度を落とすために、反応液中に、被検抗原と抗原抗体反応する、遊離の抗体を添加する方法が知られている。しかしながら、この方法を ELISA 法に適用した場合、測定上限の検出シグナル(実施例では発色)を適度に抑えると、測定感度が必要以上に落ちてしまって低濃度領域での正確な測定ができなくなり、目的とする測定系を組むことはできなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、検体中の被検抗原濃度が高い場合であっても、希釈することなく又は少なくとも従来法よりも少ない希釈回

数で、低濃度領域から高濃度領域まで正確に免疫測定することができる免疫測定方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する抗体を用い、これと標識抗体とを液相中で競合させることにより、測定感度が適度に抑制され、被検抗原が高濃度に含まれる場合であっても、幅広い濃度範囲において正確に被検抗原を免疫測定することができることを見出し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、複数のエピトープを有する被検抗原と、該被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該標識抗体と競合的に、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体とを液相中で反応させ、これと同時に又は該反応後に、前記固相特異結合性抗体を、これと特異的に結合する固相と反応させ、前記固相特異結合性抗体と前記被検抗原と前記標識抗体とを介して前記固相に結合された前記標識を測定することを含む免疫測定方法を提供する。また、本発明は、複数のエピトープを有する被検抗原と、該被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体と、前記被検抗原と抗原抗体反応する第3のフリー抗体とを液相中で反応させ、これと同時に又は該反応後に、前記固相特異結合性抗体を、これと特異的に結合する固相と反応させ、前記固相特異結合性抗体と前記被検抗原と前記標識抗体とを介して前記固相に結合された前記標識を測定することを含む免疫測定方法であって、前記標識抗体、前記固相特異結合性抗体及び前記第3のフリー抗体のうち少なくともいずれか二者が前記被検抗原に対して競合的に反応する、免疫測定方法を提供する。さらに、本発明は、複数のエピトープを有する被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該標識抗体と競合的に、前記被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体と、該固相特異結合性抗体と特異的に結合する固相とを含む免疫測定用キットを提供する。さらに、本発明は、複数のエピトープを有する被検抗原と抗原抗体反応する、標識された又は後で標識される標識抗体と、該被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体と、前記被検抗原と抗原抗体反応する第3のフリー抗体と、該固相特異結合性抗体と特異的に結合する固相とを含む免疫測定用キットであって、前記標識抗体、前記固相特異結合性抗体及び前記第3のフリー抗体のうち少なくともいずれか二者が前記被検抗原に対して競合的に反応する、免疫測定用キットを提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の免疫測定方法は、後でそれぞれ詳しく説明する「標識抗体」と「固相特異結合性抗体」の2種類の抗体を使用する第1の免疫測定方法と、「標識抗体」「固相特異結合性抗体」及び「第3のフリー抗体」の3種類の抗体を使用する第2の免疫測定方法を包含する。まず、第1の免疫測定方法について説明する。

【0008】本発明の第1の免疫測定方法により免疫測定される被検抗原は、複数のエピトープを有するものである。ここで、「複数のエピトープ」とは、同一種類のエピトープが複数存在する場合及び異なる種類のエピトープが複数存在する場合並びに1種類又は2種類以上の同一のエピトープを複数含む、異なる種類のエピトープが複数存在する場合のいずれであってもよい。

【0009】本発明の第1の免疫測定方法では、被検抗原と抗原抗体反応する標識抗体を用いる。ここで、「標識抗体」は、標識された抗体であってもよいし、後の工程で標識される抗体であってもよい。

【0010】ここで「標識された抗体」とは、被検抗原と抗原抗体反応する抗体を標識することにより得られるものである。標識としては、従来から広く用いられている酵素標識、蛍光標識、放射標識等を用いることができ、これらの標識を抗体に結合する方法も周知である。

【0011】「後で標識される抗体」とは、被検抗原及び後述する固相特異結合性抗体との免疫反応時（以下、「一次反応」ということがある）には標識されていないが、後述の通り免疫複合体が固相に結合した後又は一次反応時に標識される抗体を意味する。例えば、「標識抗体」として、被検抗原と抗原抗体反応する、標識されていないヤギIgG抗体を用い、免疫複合体が固相に結合した後に、標識した抗ヤギIgG抗体を反応させて、固相に結合した標識を測定するような場合、一次反応に用いられたヤギIgG抗体は、後の工程で標識されるから本発明で言う「標識抗体」に該当する。なお、このように、被検抗原と抗原抗体反応する抗体を標識せずに、該抗体と抗原抗体反応する抗体を標識した抗体を用いる方法は、免疫測定分野において広く用いられているものである。この方法を採用すれば、被検抗原と抗原抗体反応する抗体をいちいち標識する必要がなく、例えば上の例では抗ヤギIgG抗体を標識しておけば、種々の被検抗原の測定に利用できるという利点がある。もっとも、用いる抗体の種類が1つ増え、免疫反応が1工程増えるか又は一次反応に参加する抗体が1つ増えるという不利益もある。

【0012】本発明の第1の免疫測定方法では、被検抗原と抗原抗体反応する抗体であって、さらに固相に特異的に結合する固相特異結合性抗体が用いられる。ここで、「固相特異結合性抗体」は、固相に特異的に結合できる抗体であればよく、好ましいものとして、ある物質に特異的に結合する特異結合性化合物を抗体に結合させ

た特異結合性化合物結合抗体を挙げることができる。ここで、「特異結合性化合物」の好ましい例としてビオチンを挙げることができ、この場合には、固相にはアビジン又はそのビオチン結合性誘導体（例えばストレプトアビジン等）が結合される。すなわち、好ましい例では、固相特異結合性抗体として、被検抗原と抗原抗体反応するビオチン化抗体が用いられ、固相としては、アビジン（又はその誘導体）化固相が用いられる。なお、抗体のビオチン化及び固相のアビジン化は周知の方法により行うことができ、下記実施例にも詳細に記載されている。もっとも、上記「特異結合性化合物」はビオチンに限定されるものではなく、特異的に結合する物質が存在するいかなる化合物であってもよい。この場合、「特異結合性化合物」に特異的に結合する、「特異結合性対応化合物」が固相化された固相が用いられる。また、固相特異結合性抗体としては、必ずしも「特異結合性化合物」が結合される必要はなく、抗原性を有する任意の化合物を結合させ、この任意の化合物と特異的に結合する抗体を固相化した固相を用いることも可能である。さらに、固相特異結合性抗体としては、通常の抗体を用い、該抗体のF<sub>c</sub>領域に特異的に結合する抗体を固相化した固相を用いてもよい。もっとも、この場合には、標識抗体が固相に結合されないようにする必要があり、これは固相特異結合性抗体と標識抗体とは異種動物起源の抗体を用いることにより達成可能である。

【0013】上記標識抗体及び固相特異結合性抗体は、前記被検抗原に対して競合的に反応する。ここで、被検抗原に対して「競合的に反応する」とは、両者の抗体の対応エピトープが同一の場合のみならず、一方の抗体が被検抗原と結合することにより、他方の抗体が立体障害のために結合できなくなる場合も包含される。さらに、前記標識抗体及び固相特異結合性抗体の少なくともいずれか一方が被検抗原に対するポリクローナル抗体である場合には、これら両者は「競合的に反応する」と言える。なぜなら、ポリクローナル抗体には、該被検抗原が有する種々のエピトープに対する種々の抗体が含まれているため、他方の抗体がモノクローナル抗体である場合でも、ポリクローナル抗体の中には該モノクローナル抗体と競合する抗体分子が必ず含まれるからである。前記標識抗体及び固相特異結合性抗体の両方とも被検抗原に対するポリクローナル抗体である場合にも、当然、これらは被検抗原に対して「競合的に反応する」ものである。標識抗体及び固相特異結合性抗体の少なくともいずれか一方はポリクローナル抗体であることが好ましい。なぜなら、そうすることにより、「競合的に反応する」という要件が必ず満足されるからである。もっとも、被検抗原が、同一エピトープを複数有する場合又はエピトープが異なるが立体障害により両抗体が同時に結合できないエピトープの組合せを複数有する場合には、これらのエピトープとそれぞれ特異的に反応するモノクローナ

ル抗体を上記標識抗体及び固相特異結合性抗体とすることも可能である。

【0014】なお、本発明の第1の免疫測定方法では、後で詳しく述べるように、被検抗原を固相特異結合性抗体と標識抗体とでサンドイッチして測定するので、被検抗原は、少なくとも1分子の固相特異結合性抗体と、少なくとも1分子の標識抗体とが同時に結合し得る複数のエピトープを有する必要がある。

【0015】本発明の第1の免疫測定方法では、被検抗原、上記標識抗体及び上記固相特異結合性抗体を液相で抗原抗体反応させる。この場合、標識抗体及び固相特異結合性抗体のいずれか一方のモル数を他方のモル数に対して少なくすることにより、少ない方の抗体が結合できない被検抗原の割合が増えるので、測定系全体の感度を下げることができる。標識抗体及び固相特異結合性抗体のうちのいずれの一方でも結合できなかった被検抗原は、後の工程で検出されないため、標識抗体及び固相特異結合性抗体のどちらを少なくした場合でも、感度の抑制は達成される。標識抗体及び固相特異結合性抗体の添加割合は、感度をどの程度抑制するのにかにより、ルーチンな予備実験に基づき適宜設定することができる。これは、抗原濃度が種々異なる標準試料を調製し、一方、標識抗体及び固相特異結合性抗体の濃度比率を種々変えた抗体系を用いて免疫測定を行い、所望の感度の抑制が達成される濃度比率を選択することにより容易に行うことができる。

【0016】固相に固相化する、固相特異結合性抗体をトラップする化合物（アビジン等、以下、「トラッピング化合物」ということがある）の量は、特に限定されないが、種々の被検抗原濃度に対応できるように、可能な限り多くしておくことが好ましい。これは、十分な濃度のトラッピング化合物溶液を固相と十分に接触させた後、十分に洗浄することにより達成できる。例えば、トラッピング化合物としてアビジン又はその誘導体を用いる場合、下記実施例に記載するように100 µg/ml程度の濃度のアビジン溶液を固相と接触させることができる。

【0017】一次反応は、固相特異結合性抗体が特異的に結合する固相上で行ってもよいし、他の容器中で反応を行った後に、反応液を、固相特異結合性抗体が特異的に結合する固相と接触させてもよい。もっとも、固相特異結合性抗体が特異的に結合する固相上で行った方が反応液を移す操作を省略できるのでより簡便である。

【0018】上記反応の結果、トラッピング化合物により固相には固相特異結合性抗体が結合され、固相特異結合性抗体には被検抗原が結合され、被検抗原には標識抗体が結合される。すなわち、被検抗原が固相特異結合性抗体と標識抗体にサンドイッチされた形の免疫複合体が固相に結合される。従って、固相を洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中の被検抗原を

定量することができる。標識の測定方法自体は周知である。なお、標識抗体として、後で標識される抗体を用いた場合には、上記の通り、固相に該免疫複合体が結合された後に、該抗体と特異的に反応する標識された抗体を反応させる。あるいは、後で標識される抗体と特異的に反応する、標識された抗体も一次反応系に含めておくことも可能である。

【0019】上記した本発明の方法では、一次反応において、標識抗体と固相特異結合性抗体が液相において競合的に反応する。このため、上記の通り、いずれか一方の抗体のモル数を他方の抗体のモル数よりも少なくすることにより、少ない方の抗体と結合しない被検抗原の割合が増える。どちらか一方の抗体と結合できなかった被検抗原は、固相に結合できないか、又は標識が固相に結合されないため、検出されない。よって、測定感度が低下するので、被検抗原が高濃度に含まれる場合であっても希釈をする必要がなくなり、又は少なくとも希釈回数を従来よりも減らすことができる。それでいて、下記実施例で具体的に示されるように、広い濃度範囲に亘って被検抗原を正確に定量することができる。

【0020】本発明の第2の免疫測定方法では、上記一次反応を行う液相中に、被検抗原と抗原抗体反応する第3のフリー抗体を存在せしめる。ここで、「フリー抗体」とは、固相に結合されておらず、固相特異結合性も有さず、上記標識も有さない抗体を意味し、要するに、被検抗原に対する通常の抗体でよい。第3のフリー抗体は、上記標識抗体及び固相特異結合性抗体の少なくともいずれか一方と競合するものである（競合しない場合には、上記した2種類の抗体のみを用いた方法と考えることができる）。なお、第2の免疫測定方法では、第3のフリー抗体が標識抗体及び固相特異結合性抗体の少なくともいずれか一方と競合するので、標識抗体と固相特異結合性抗体とは競合する必要はない（もちろん、競合するものであってもよい）。第3のフリー抗体が、標識抗体及び固相特異結合性抗体の少なくともいずれかと競合することを確保するために、標識抗体、固相特異結合性抗体及び第3のフリー抗体の少なくともいずれか1つはポリクローナル抗体であることが好ましい。第3のフリー抗体がポリクローナル抗体である場合には、標識抗体及び固相特異結合性抗体の両方共をモノクローナル抗体とすることもできる。もっとも、被検抗原が、同一エピトープを複数有する場合又は立体障害によりこれら3種類の抗体のうち少なくとも2種類が同時に結合できないエピトープの組合せを複数有する場合には、モノクローナル抗体を上記標識抗体、固相特異結合性抗体及び第3のフリー抗体とすることも可能である。なお、第2の免疫測定方法でも、第1の免疫測定方法と同様、被検抗原を固相特異結合性抗体と標識抗体とでサンドイッチして測定するので、被検抗原は、少なくとも1分子の固相特異結合性抗体と、少なくとも1分子の標識抗体とが同時

に結合し得る複数のエピトープを有する必要がある。

【0021】標識抗体、固相特異結合性抗体及び第3のフリー抗体の三者を用いる場合には、これら三者の合計に対する標識抗体及び/又は固相特異結合性抗体のモル数を少なくすることにより、これら2つの抗体の少なくともいずれか一方と結合できない被検抗原の割合が増え、それによって測定感度が抑制される。標識抗体、固相特異結合性抗体及び第3のフリー抗体の添加割合は、第1の免疫測定法の場合と同様、感度をどの程度抑制するのかにより、ルーチンな実験に基づき適宜設定することができる。例えば、抗原濃度が種々異なる標準試料を調製し、一方、標識抗体、固相特異結合性抗体及び第3のフリー抗体の濃度比率を種々変えた抗体系を用いて免疫測定を行い、所望の感度の抑制が達成される濃度比率を選択することにより容易に行うことができる。なお、第3のフリー抗体を用いることにより、固相特異結合性抗体及び/又は標識抗体の使用量を少なくすることができ、コストの節約を図ることができるので、第3のフリー抗体の比率を多くしてルーチンな予備実験を行うことにより、使用抗体が3種類でも予備実験を単純化できる。

【0022】第3のフリーの抗体を用いる場合でも、他の条件は上記した2種類の抗体を用いる場合と同様である。

【0023】なお、抗体は、ペプシンやパピンのようなタンパク質分解酵素で分解することにより、抗原に対する結合性を維持した、FabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような、抗原結合性断片を生じることが広く知られている。このような抗原結合性断片は、抗体と同様に抗原抗体反応を行うことができるので、本発明において「抗体」に代えてこのような抗原結合性抗体断片を用いることができることは明らかであり、下記の実施例でもこのような抗原結合性抗体断片を用いている。従って、本明細書において、単に「抗体」という語は、特に断りがなければ又は文脈上明らかにそうではない場合を除き、抗原結合性抗体断片をも包含する。特に、特許請求の範囲中の「抗体」という語は、抗原結合性抗体断片をも包含する。

【0024】

【実施例】以下、本発明を実施例及び比較例に基づきより具体的に説明する。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。

【0025】参考例1 抗マウスIgG抗体の調製  
マウスIgG(ザイメット社)初回2mg、2回目以降1mgをフロイントの完全アジュバントと共に1週間間隔で11回ヤギの皮下に免疫し、抗マウスIgG抗血清を得た。400mlの抗血清を硫酸塩析し、マウスIgG( )及びマウスIgA( )固定化カラムによるアフィニティークロマトグラフィーの後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行って抗マウスIgG抗体14

0 mg を調製した。

【0026】参考例2 ペルオキシダーゼ (POD) 標識抗体及びビオチン化抗体の調製

参考例1で調製した抗マウスIgG抗体100mgをペプシン消化し、37mgのF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを得た。POD (ペルオキシダーゼ、ペーリンガー社) 50mgに架橋剤EMCC (同仁化学社) を導入し、マレイミド法にてPOD標識抗マウスIgG抗体 (標識抗体) を調製した。

【0027】同様に、ビオチン-BMCC (ピアース社) とFab' からビオチン標識抗マウスIgG抗体 (固相特異結合性抗体) を調製した。

【0028】参考例3 抗体固定化プレートの作成

参考例1で調製した抗マウスIgG抗体をリン酸緩衝液pH7.5で70μg/mlとし、96穴マイクロプレートに100μlずつ分注して37℃、一晩放置して抗マウスIgG抗体の固定化を行った。マイクロプレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、1%BSAを含むリン酸緩衝液300μlを分注して37℃、一晩放置した。翌日1%BSAを含むリン酸緩衝液を吸引除去して抗マウスIgG抗体固定化プレートとした。

【0029】実施例1

(1) アビジン固定化プレートの作成

Neutravidin (ピアース社) をリン酸緩衝液pH8.5で100μg/mlとし、96穴マイクロプレートに100μlずつ分注して37℃、一晩放置して抗マウスIgG抗体の固定化をおこなった。マイクロプレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、1%カゼインを含むリン酸緩衝液300μlを分注して37℃、一晩放置した。翌日1%カゼインを含むリン酸緩衝液を吸引除去してアビジン固定化プレートとした。

【0030】(2) アビジン固定化プレートを用いたマウスIgGの測定

1%カゼインを含むリン酸緩衝液pH7.5を用い、参考例1で調製した抗マウスIgG抗体を71μg/ml、参考例2で調製したビオチン標識抗マウスIgG抗体を7.1μg/ml、POD標識抗マウスIgG抗体を0.045μg/mlとなるように混合液を調製した。この混合液100μlと自家製マウスIgG標準液 (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20μg/ml) 10μlを、(1)で作成したアビジン固定化プレートにそれぞれ分注し、37℃1時間反応させた。マイクロプレートを、0.1%Tween (商品名) を含むPBS (以下、「PBST」で5回洗浄後、TMBZ (テトラメチルベンチジン) / 過酸化水素水を100μlずつ分注し、25℃、30分反応させた。反応停止液を100μlずつ分注後、450nmで吸光度を測定した。

【0031】結果を図1に示す。検量線は測定範囲全体にわたって定量性のある応答を示した。この測定条件で

は、測定対象であるマウスIgGを介して、POD標識抗マウスIgG抗体とビオチン標識抗マウスIgG抗体が複合体を形成し、この複合体がアビジン固定化プレートに結合するが、複合体形成において、フリーの抗マウスIgG抗体が、POD標識抗マウスIgG抗体及びビオチン標識抗マウスIgG抗体に対して同じ液相で競合するため、反応系全域において、同等の抑制がかかったもの考えられる。

【0032】実施例2 ビオチン標識抗体添加によるマウスIgGの測定

実施例1の混合液中、抗マウスIgG抗体の代わりにビオチン標識抗マウスIgG抗体を用い、実施例1と同じ条件でマウスIgGの測定を行った。結果を図2に示す。フリーの抗マウスIgG抗体を用いなくても、ビオチン標識抗マウスIgG抗体によって、アビジン固定化プレートに結合するPOD標識抗マウスIgG抗体量が抑制されるため、実施例1と同様、低濃度域の測定感度を保ったまま、検量線全域において定量性のある応答が得られた。

【0033】比較例1 抗マウスIgG抗体添加によるマウスIgGの測定

マウスIgGを以下のような条件で測定した。参考例3で作成した抗マウスIgG固定化プレートに、参考例1で調製した抗マウスIgG抗体溶液 (0.6mg/ml) と、自家製マウスIgG標準液 (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20μg/ml) を50μlずつ分注し、37℃1時間反応させた。プレートを、0.1%Tweenを含むPBS pH7.5 (以下、PBSTと記載する) で5回洗浄後、参考例2で調製した3.2μg/mlのPOD結合抗マウスIgG抗体を100μlずつ分注し、37℃1時間反応させた。マイクロプレートをPBSTで5回洗浄後、ABTS (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) / 過酸化水素水を100μlずつ分注し、25℃30分反応させた。反応停止液100μlを添加し、波長420nmの吸光度を測定した。

【0034】結果を図3に示す。検量線は、低濃度域での感度が低く、高濃度域にいくに従って緩やかになる傾向がみられた。この条件では、抗原の濃度変化と発色の度合いが相関はあるがパラレルではないため、定量をするのに適していないと判断した。

【0035】このように、測定系全体の感度を落とすために、第一反応液中にフリーの抗体を添加する方法を試みたが、この条件では設定した測定範囲の間、直線的な推移をしめず検量線が得られなかった。低濃度域を測定できる量の抗マウスIgG抗体の添加では、高濃度域が測定できず、高濃度域を十分に抑制するだけの抗マウスIgG抗体を添加すると、低濃度域の感度が不足してしまうため、フリーの抗マウスIgG抗体を添加する方法では、必要な測定範囲が確保できないと考えられる。

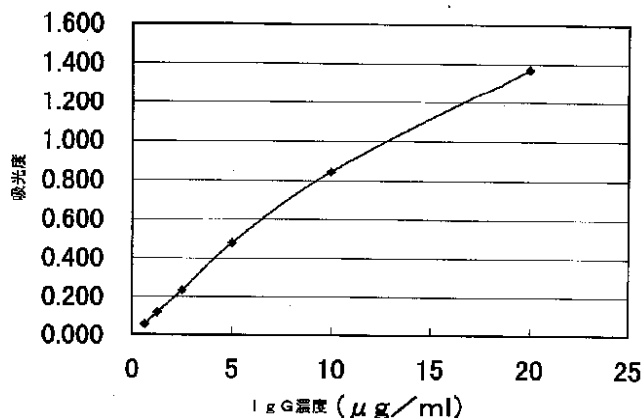
【0036】この条件で低濃度域の測定感度が低下する原因としては、第一次反応中における、フリーの抗マウスIgG抗体と測定対象であるマウスIgGとの複合体形成による固定化抗体に対する免疫反応の阻害、固定化抗体と測定対象であるマウスIgGとフリーの抗マウスIgG抗体との複合体形成によるPOD標識抗体との免疫反応の阻害などが考えられる。

【0037】**比較例2** ピオチン標識抗体添加によるマウスIgGの測定

参考例1で調製した抗マウスIgG抗体溶液(0.44 mg/ml)と、参考例2で調製したピオチン標識抗マウスIgG抗体(0.44 mg/ml)とを混合し、0.625%ピオチン標識物を含む抗マウスIgG抗体溶液(0.44 mg/ml)を調製した(この分配比は予備実験により決定した)。参考例3で作成した抗マウスIgG抗体固定化プレートにピオチン標識化物混合抗マウスIgG抗体溶液と、自家製マウスIgG標準液(0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg/ml)を50 μlずつ分注し、37 1時間反応させた。プレートを、PBSTで5回洗浄後、0.34 mg/mlのPOD標識アビジン(自社製)を100 μlずつ分注し、37 1時間反応させた。マイクロプレートをPBSTで5回洗浄後、ABTS/過酸化水素水を100 μlずつ分注し、25 30分反応させた。反応停止液100 μlを添加し、波長420 nmの吸光度を測定した。

【0038】結果を図4に示す。検量線は比較例1の結果と同様の形を示した。POD標識アビジンを用いても測定レンジが拡大しなかったことから、原因は、固定化抗体とマウスIgGとフリーの抗マウスIgG抗体との複合体形成による標識抗体に対する免疫反応阻害ではなく、フリーの抗マウスIgGとマウスIgGとの複合体\*

【図1】



\*形成による固定化抗体に対する免疫反応阻害であると解釈した。

【0039】**実施例3**

1%カゼインを含むリン酸緩衝液pH7.5を用い、参考例1で調製した抗マウスIgG抗体を429 μg/ml、参考例2で調製したピオチン標識抗マウスIgG抗体を7.1 μg/ml、ナカネ法で調製したPOD標識抗マウスIgG抗体を7.5 μg/mlとなるように混合液を調製した。この混合液50 μlと自家製マウスIgG標準液(0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg/ml)50 μlを、(1)で作成したアビジン固定化プレートにそれぞれ分注し、37 1時間反応させた。マイクロプレートを、PBSで5回洗浄後、ABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸/過酸化水素水を100 μlずつ分注し、25、30分反応させた。反応停止液を100 μlずつ分注後、420 nmで吸光度を測定した。

【0040】結果を図5に示す。検量線は測定範囲全体にわたって定量性のある応答を示した。

【0041】

【発明の効果】以上のように、本発明により、検体中の被検抗原濃度が高い場合であっても、希釈することなく又は少なくとも従来法よりも少ない希釈回数で、低濃度領域から高濃度領域まで正確に免疫測定することができ免疫測定方法が初めて提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1で作成された検量線を示す。

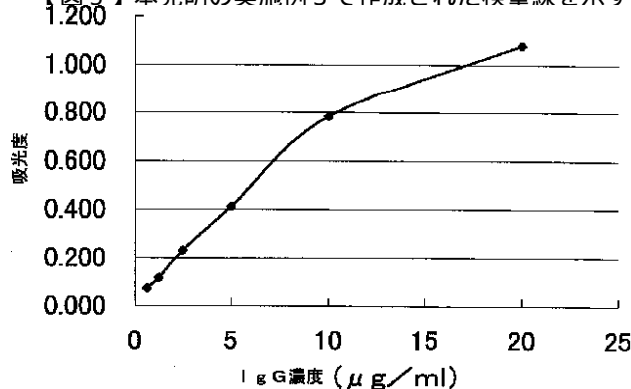
【図2】本発明の実施例2で作成された検量線を示す。

【図3】本発明の比較例1で作成された検量線を示す。

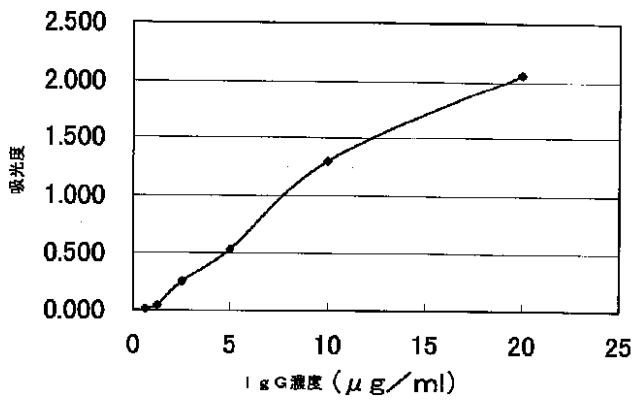
【図4】本発明の比較例2で作成された検量線を示す。

【図2】

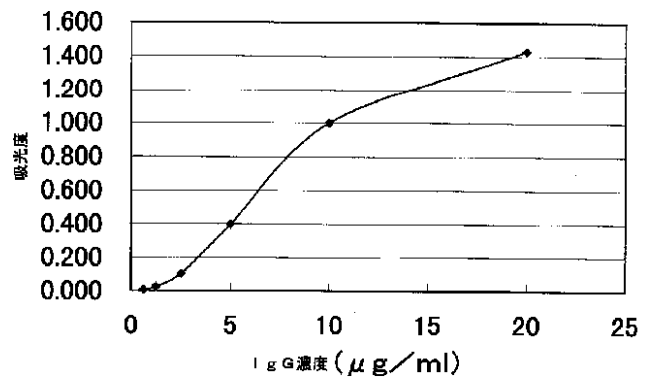
【図5】本発明の実施例3で作成された検量線を示す



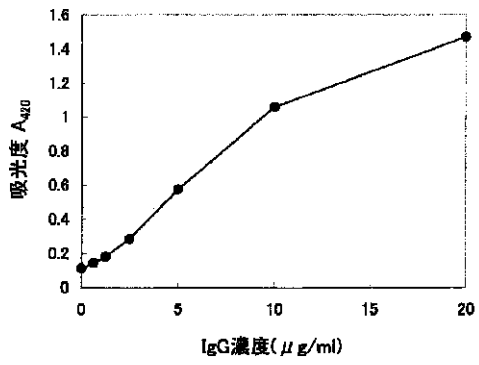
【図3】



【図4】



【図5】



专利名称(译)	免疫测定方法及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002014098A</a>	公开(公告)日	2002-01-18
申请号	JP2000195028	申请日	2000-06-28
[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	木崎知則 青地悟 中村悟		
发明人	木崎 知則 青地 悟 中村 悟		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.545.D G01N33/53.U		
代理人(译)	谷川荣次郎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：即使样品中的测试抗原浓度很高，也要比常规方法准确地从低浓度区域到高浓度区域进行免疫测定，而无需稀释或至少使用较少的稀释度。提供一种测量方法。解决方案：具有多个表位的测试抗原，通过抗原抗体与测试抗原反应的标记抗体或稍后标记的标记抗体，以及与标记抗体竞争的测试抗原与抗原反应并进一步与固相特异性结合抗体反应的抗体，该固相特异性结合抗体在液相中与固相特异性结合，并且在反应的同时或之后，固相特异性结合抗体它与特异性结合该固相的固相反应，并通过固相特异性结合抗体，测试抗原和标记抗体来测量与固相结合标记。

