

(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2004-205504

(P2004-205504A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 33/53

S

GO 1 N 33/543

5 5 5 D

GO 1 N 33/543

5 7 5

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2003-415890 (P2003-415890)
 (22) 出願日 平成15年12月15日 (2003.12.15)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-361608 (P2002-361608)
 (32) 優先日 平成14年12月13日 (2002.12.13)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000006105
 株式会社明電舎
 東京都品川区大崎2丁目1番17号
 (74) 代理人 100096459
 弁理士 橋本 剛
 (72) 発明者 福岡 正芳
 東京都品川区大崎2丁目1番17号 株式
 会社明電舎内
 (72) 発明者 野瀬 勝利
 東京都品川区大崎2丁目1番17号 株式
 会社明電舎内
 (72) 発明者 高瀬 長武
 東京都品川区大崎2丁目1番17号 株式
 会社明電舎内

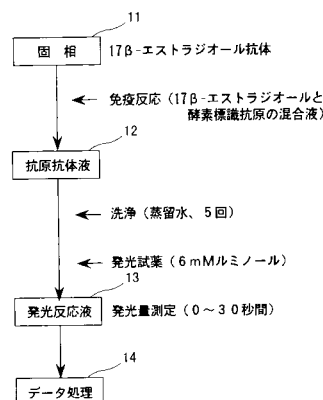
(54) 【発明の名称】 内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】 内分泌攪乱化学物質の測定を簡単、迅速、正確、かつ経済的に行う。

【解決手段】 試料中の内分泌攪乱化学物質と、酵素標識抗原とを固相調製した固相抗体に競合させて免疫反応させ、発光試薬を加えることにより起こる固相抗体により固相に固定された酵素標識抗原の酵素反応の発光量を求め、検量線を用いて間接的に試料中の内分泌攪乱物質の濃度を求める。

【選択図】 図1



測定プロセス(第1抗体固相法)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体を固相調製した後、前記固相に酵素標識抗原、および内分泌攪乱化学物質を添加して免疫反応を行わせ、

免疫反応終了後、前記固相を洗浄してから発光試薬を添加して、酵素反応による発光量から前記内分泌攪乱化学物質を測定することを特徴とする内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 2】

前記内分泌攪乱化学物質が 17β -エストラジオールであることを特徴とする請求項 1 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

10

【請求項 3】

前記抗体は 17β -エストラジオールに牛血清アルブミンを結合し、ウサギに免疫して調製したものであることを特徴とする請求項 2 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 4】

前記抗体の濃度が $0.75\mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする請求項 3 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 5】

前記抗体 1mL に対して添加する前記酵素標識抗原および 17β -エストラジオールの混合溶液の体積が $100\mu\text{L}$ であることを特徴とする請求項 4 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

20

【請求項 6】

前記混合溶液中の酵素標識抗原の濃度が $0.125\sim 0.25\mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする請求項 4 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 7】

前記免疫反応を 200rpm の回転数で振とうしながら行うことを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 8】

前記免疫反応を 1 時間以上行うことを特徴とする請求項 5 乃至 7 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

30

【請求項 9】

第 1 抗体を固相調製した後、固相に酵素標識抗原、内分泌攪乱化学物質、および第 2 抗体を添加して免疫反応を行わせ、

免疫反応終了後、前記固相を洗浄してから発光試薬を添加して、酵素反応による発光量から前記内分泌攪乱化学物質を測定することを特徴とする内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 10】

前記内分泌攪乱化学物質が 17β -エストラジオールであることを特徴とする請求項 9 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 11】

前記第 1 抗体が抗ウサギ IgG ヤギ抗体であり、前記第 2 抗体が抗 17β -エストラジオールウサギ抗体であることを特徴とする請求項 10 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

40

【請求項 12】

前記抗ウサギ IgG ヤギ抗体の濃度が $1.0\mu\text{g/mL}$ であり、前記抗 17β -エストラジオールウサギ抗体の濃度が $0.75\mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする請求項 11 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

【請求項 13】

免疫反応を 200rpm の回転数で振とうしながら行うことを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、内分泌攪乱化学物質である17β-エストラジオールを測定する酵素免疫測定法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

内分泌攪乱化学物質(以下、環境ホルモンと称す。)は、アメリカのシーア・コルボーンらが発刊した「奪われし未来」によって、地球規模の環境問題の一つとして注目を集め、幅広い関心と呼ぶこととなった。それ以来、環境ホルモン問題に対して我が国では、科学的に未解明な点が多いことから、関係行政機関や各種研究機関が様々な視点から調査、研究に取り組んでいる。

【0003】

内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質は多数あるが、我が国においては、1998年に環境省が67物質をリストアップしている。(SPEED98: Strategic programs on Environmental Endocrine Disruptors)そして、下記表1に示すとおり、その中から24物質に絞り込んでいる。

【0004】

【表1】

	環境ホルモン	環境ホルモン
1	ポリ塩化ビフェニル類(PCB)	13 2,4-ジクロロフェノール
2	ポリ臭化ビフェニル類(PBB)	14 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
3	トリブチルスズ	15 ベンゾフェノン
4	トリフェニルスズ	16 4-ニトロトルエン
5	アルキルフェノール	17 オクタクロスチレン
6	ビスフェノールA	18 フタル酸ジベンチル
7	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	19 フタル酸ジヘキシル
8	フタル酸ブチルベンジル	20 フタル酸ジプロピル
9	フタル酸ジ-n-ブチル	21 スチレンの2及び3量体
10	フタル酸ジシクロヘキシル	22 n-ブチルベンゼン
11	フタル酸ジエチル	23 スチレンモノマー
12	ベンゾ(a)ピレン	24 17β-エストラジオール

【0005】

環境ホルモンは、女性ホルモンと同様の働きを有し、微量でも生殖機能に悪影響を与えることから問題になっている。

【0006】

従来の環境ホルモンの測定方法として、高分解能のGC-MSやLC-MS/MS等による機器分析法(環境省暫定マニュアル等)がある。しかし高分解能のGC-MSやLC-MS/MS等の分析装置は高額であるため、自前で測定可能な研究室はごく僅かしかなく、煩雑な濃縮操作、抽出操作、及びクリーンアップ操作が必要である等の問題を有している。

【0007】

近年は、特別な設備を必要とせず、比較的短時間で高感度に測定対象を検出でき、さらに目的物質を特異的に検出でき、しかも経済的であるため環境中に残存する環境物質を監視するモニタリングに適している酵素免疫測定法により環境ホルモンの測定が行われている。

る。

【0008】

例えば、環境ホルモンを抗原とし、抗原を酵素で標識した標識抗原と競合法、または非競合により抗体との免疫反応を行い、反応終了後に発光基質試薬を添加して酵素と化学発光反応させ、発光量から環境ホルモンを測定する酵素免疫測定法が行われている(例えば、特許文献1参照。)

【特許文献1】特開2001-66311号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

環境ホルモンの測定に際して、高分解能のGC-MSやLC-MS/MS等の分析装置を用いて測定を行う場合は、装置が非常に高額であり、濃縮操作、抽出操作、及びクリーンアップ操作等の前準備を必要とし、簡単に速やかな測定が困難である。

【0010】

女性及び雌の動物の生殖器官の発育や性的特徴維持、機能調整等を司る女性ホルモンは、卵巣濾胞から分泌されるエストロゲンと卵巣黄体から分泌される黄体ホルモンとに大別される。エストロゲンは、主として生殖器官の発育や性的特徴の保持を司るのに対して、黄体ホルモンは、エストロゲンと協力して性周期を起こさせ、妊娠を継続させるものである。

【0011】

動物のエストロゲンの主要なものは、エストロン、17β-エストラジオール、エストリオールの3種類で、この3種類の中で17β-エストラジオールの作用が最も強い。

【0012】

17β-エストラジオールは環境ホルモンの中でも特に女性ホルモン作用が強く、17β-エストラジオールの実用的な測定方法の確立が急務である。

【0013】

本発明は、かかる事情に鑑みなされたもので、その目的は17β-エストラジオールを経済的に、誤差なく、簡単、迅速に測定できる方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

前記課題を解決するために、請求項1に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、抗体を固相調製した後、前記固相に酵素標識抗原、および内分泌攪乱化学物質を添加して免疫反応を行わせ、免疫反応終了後、前記固相を洗浄してから発光試薬を添加して、酵素反応による発光量から前記内分泌攪乱化学物質を測定することを特徴とする。

【0015】

請求項2に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項1において、前記内分泌攪乱化学物質が17β-エストラジオールであることを特徴とする。

【0016】

請求項3に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項2において、前記抗体は17β-エストラジオールに牛血清アルブミンを結合し、ウサギに免疫して調製したものであることを特徴とする。

【0017】

請求項4に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項3において、前記抗体の濃度が0.75μg/mLであることを特徴とする。

【0018】

請求項5に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項4において、前記抗体1mLに対して添加する前記酵素標識抗原および17β-エストラジオールの混合溶液の体積が100μLであることを特徴とする。

【0019】

請求項6に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項4において、前記

10

20

30

40

50

混合溶液中の酵素標識抗原の濃度が $0.125 \sim 0.25 \mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする。

【0020】

請求項7に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項5または6において、前記免疫反応を 200 rpm の回転数で振とうしながら行うことを特徴とする。

【0021】

請求項8に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項5乃至7において、前記免疫反応を1時間以上行うことを特徴とする。

【0022】

請求項9に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、第1抗体を固相調製した後、固相に酵素標識抗原、内分泌攪乱化学物質、および第2抗体を添加して免疫反応を行わせ、免疫反応終了後、前記固相を洗浄してから発光試薬を添加して、酵素反応による発光量から前記内分泌攪乱化学物質を測定することを特徴とする。

10

【0023】

請求項10に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項9において、前記内分泌攪乱化学物質が 17β -エストラジオールであることを特徴とする。

【0024】

請求項11に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項10において、前記第1抗体が抗ウサギIgGヤギ抗体であり、前記第2抗体が抗 17β -エストラジオールウサギ抗体であることを特徴とする。

20

【0025】

請求項12に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項11において、前記抗ウサギIgGヤギ抗体の濃度が $1.0 \mu\text{g/mL}$ であり、前記抗 17β -エストラジオールウサギ抗体の濃度が $0.75 \mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする。

【0026】

請求項13に記載の内分泌攪乱化学物質の酵素免疫測定方法は、請求項11または12において、免疫反応を 200 rpm の回転数で振とうしながら行うことを特徴とする。

【0027】

酵素免疫測定法とは、酵素で標識した抗原または抗体を用いて抗原抗体反応を行い、酵素活性を測定することにより抗原抗体反応を検出して抗原または抗体の量を決定する方法である。

30

【0028】

請求項1乃至8に記載の発明は、試料中の内分泌攪乱化学物質と、酵素標識抗原とを固相調製した抗体に競合させて免疫反応させ、発光試薬を加えることにより起こる固相抗体に固定された酵素標識抗原の発光反応の発光量を求め、検量線を用いて間接的に試料中の内分泌攪乱化学物質の測定を行うことができる。

【0029】

また、請求項9乃至13に記載の発明は、試料中の内分泌攪乱化学物質と、酵素標識抗原と、を固相調製した第1抗体に反応されうる第2抗体に競合させて免疫反応させ、第2抗体と、第1抗体と、により固相に固定された酵素標識抗原を発光試薬を加えることにより起こる発光反応の発光量から測定することにより、試料中の内分泌攪乱化学物質の測定を行うことができる。

40

【0030】

なお、酵素標識 17β -エストラジオールの標識酵素は生物又は化学発光反応を触媒しうる限り、特に限定されないが、ベルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシターゼ、グルコースオキシターゼ、ウレアーゼ等がある。

【0031】

また、抗体についてはポリクロナール抗体、モノクロナール抗体のどちらを用いてもよい。

【発明の効果】

50

【0032】

以上の説明から明らかなように、本発明は以下の効果を奏する。

【0033】

高価なGC-MSやLC-MS/MS等による機器分析装置を使用せず、 17β -エストラジオールを酵素免疫測定法により、安価な装置で、簡単、迅速に測定することが可能である。

【0034】

17β -エストラジオールの測定に用いる抗体の濃度、酵素標識抗原の濃度、振とう効果、および反応時間について最適値を検討しているの、正確な測定が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0035】

以下、本発明の実施形態を図面に基づいて説明する。

【0036】

(第1実施の形態)

図1は本発明の第1実施の形態に係る、酵素免疫測定法の測定プロセスを示す測定操作の模式図である。図1において、まずポリスチレン製の試験管に 17β -エストラジオール抗体を希釈緩衝液により希釈し、1mLずつ分注し、冷蔵庫で1晩保存し固相抗体の調製を固相11にて行う。

【0037】

17β -エストラジオール抗体(固相抗体)は、 17β -エストラジオールに牛血清アルブミン(BSA)を結合し、ウサギに免疫して調製する。また、固相抗体の希釈緩衝液は0.9%塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウムを含む0.05mol/Lのホウ酸緩衝液(pH=8.0)を用いる。

20

【0038】

次に、 17β -エストラジオールにペルオキシダーゼ(酵素)を標識した酵素標識抗原(酵素標識 17β -エストラジオール)と所望の濃度に調製した 17β -エストラジオールとを試験管に添加し、200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行う。

【0039】

酵素標識抗原はSIGMA社製のESTRADIOL-PEROXIDAZEを購入して、0.1mol/Lのリン酸緩衝液(pH=6.0)で100μg/mLに調製する。ESTRADIOL-PEROXIDAZEを希釈して所望の濃度に調製するときは、2%ポリエチレングリコール、0.05%Tween 20、0.9%塩化ナトリウムを含む0.05mol/Lのトリス塩酸緩衝液(pH=8.0)を調製して使用する。

30

【0040】

前記のようにして得られた抗原抗体液12について、蒸留水を用いて試験管を5回洗浄する。洗浄後、発光試薬を添加して発光反応液13を得、この発光反応液13を発光測定装置で0~30秒間の発光量を測定して、その測定データをデータ処理14にて処理する。

【0041】

なお、発光試薬は6mmol/Lルミノール、10mol/L過酸化水素、18.2mmol/Lパラヨードフェノールを含むトリス塩酸緩衝液(pH=8.5)からなる試薬である。

40

【0042】

以下の実施例により、第1実施の形態を具体的に説明する。

【0043】

(実施例1) 固相抗体濃度の検討

固相抗体濃度を緩衝液で、0.375、0.75、1.5、3.0、および6.0μg/mLの各濃度に調製し、ポリスチレン製の試験管に1mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0044】

50

前記固相チューブに $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した酵素標識抗原を $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、 200rpm の回転数で振とうしながら 1 時間免疫反応を行った。

【0045】

免疫反応終了後、蒸留水で 5 回洗浄した。

【0046】

洗浄後、 6mM のルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータ UPD-4000)で $0 \sim 30$ 秒間の発光量を測定した。

【0047】

その測定結果を図 2 に示す。図 2 は、 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素標識抗原濃度に対して前記固相抗体濃度範囲であれば、固相抗体濃度は充分であることを示している。

10

【0048】

固相抗体は動物に免疫して作製するので、作製した抗体を多くの測定回数に供するようになるのが好ましい。そのためには、固相抗体濃度はできる限り低濃度であることが好ましいので、固相抗体濃度は、 $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ が最もよいと判断した。

【0049】

(実施例 2) 酵素標識抗原濃度の検討

固相抗体濃度を緩衝液で $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、ポリスチレン製の試験管に 1mL ずつ分注して、冷蔵庫で 1 晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

【0050】

酵素標識抗原を $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製し、これを複数のサンプルに分割した。また、 17β -エストラジオールについて $8 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-4} \text{g}/\text{L}$ の濃度範囲で少なくとも 7 以上のサンプルを調製した。前記酵素標識抗原のサンプルと 17β -エストラジオールのサンプルとを 1 対 1 の割合(体積比)で混合し、各混合液から $100 \mu\text{L}$ を分取して前記固相チューブに添加した。

20

【0051】

添加後、 200rpm の回転数で振とうしながら 1 時間免疫反応を行った。

【0052】

免疫反応終了後、蒸留水で 5 回洗浄した。

【0053】

洗浄後、 6mM のルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータ UPD-4000)で $0 \sim 30$ 秒間の発光量を測定した。

30

【0054】

また、酵素標識抗原濃度が 0.1 、 0.25 、 0.5 、 0.75 、および $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ のものについても前記と同様の測定を行った。

【0055】

その測定結果を図 3 ~ 図 8 に示す。図 3 ~ 図 8 の結果から、図 5 および図 6 が 17β -エストラジオール濃度と発光量との相関関係がよいことを確認し、酵素標識抗原の濃度範囲は $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ がよいと判断した。

【0056】

(実施例 3) 酵素標識抗原濃度の検討 2

40

前記実施例 2 では、酵素標識抗原と 17β -エストラジオールとを 1 対 1 の割合で混合し、その混合液から $100 \mu\text{L}$ を分取して固相チューブに添加しているので、最終的な酵素標識抗原の濃度は、始めに調製した濃度の $1/2$ になっている。実施例 3 では前記 1 対 1 の混合割合を変えたとき、前記実施例 2 と同様の結果が得られるかを検証した。

【0057】

固相抗体濃度を緩衝液で $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、ポリスチレン製の試験管に 1mL ずつ分注して、冷蔵庫で 1 晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

【0058】

酵素標識抗原を $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製し、これを複数のサンプルに分割した。また、 17β -エストラジオールについて、 $8 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-4} \text{g}/\text{L}$ の濃度範囲で

50

少なくとも6以上のサンプルを調製した。

【0059】

0.5 µg/mLの濃度に調製した酵素標識抗原のサンプル500 µLと17β-エストラジオールのサンプル500 µLとを混合し、各混合液から100 µLを分取して前記固相チューブに添加した。

【0060】

添加後、200 rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

【0061】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0062】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0~30秒間の発光量を測定した。

【0063】

また、酵素標識抗原を1.0、および2.0 µg/mLの各濃度に調製し、これらを少なくとも6以上のサンプルに分割した。1.0 µg/mLの濃度に調製した酵素標識抗原のサンプル0.5 mLと17β-エストラジオールのサンプル1.5 mLとを混合した各混合溶液、および、2.0 µg/mLの濃度に調製した酵素標識抗原のサンプル0.25 mLと17β-エストラジオールのサンプル1.75 mLとを混合した各混合溶液についても前記と同様の測定を行った。

【0064】

その測定結果を図9~図11に示す。実施例3では最終的な酵素標識抗原の濃度はすべて0.25 µg/mLであり、前記結果からこの酵素標識抗原の濃度であれば、混合比が1対1ではなくてもよいことを確認した。さらに、前記実施例2の結果と実施例3の結果とから、最終的な酵素標識抗原の濃度が0.125~0.25 µg/mLであればよいと判断した。

【0065】

(実施例4) 液量の検討

固相抗体濃度を緩衝液で0.75 µg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

【0066】

酵素標識抗原を0.5 µg/mLの濃度に調製し、これを複数のサンプルに分割した。また、17β-エストラジオールを 8×10^{-7} 、および 4×10^{-6} g/Lの各濃度に調製し、酵素標識抗原のサンプルと17β-エストラジオールのサンプルとを1対1の割合で混合した。各混合溶液から100、300、および500 µLを分取して固相チューブに添加した。

【0067】

添加後、200 rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

【0068】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0069】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0~30秒間の発光量を測定した。

【0070】

その測定結果を図12に示す。図12から、固相チューブに添加する酵素標識抗原と17β-エストラジオールとの混合溶液量は100 µLがよいということを確認した。また、100 µL以下の液量では、分注精度が悪くなるので、100 µLが適量であると判断した。

【0071】

(実施例5) 免疫反応順序の検討

実施例5では、免疫反応を行う際に、酵素標識抗原と17β-エストラジオールとの混

10

20

30

40

50

合溶液を固相チューブに100 μ L添加して1時間免疫反応を行う第1方法と、17 β -エストラジオールを100 μ L固相チューブに添加して30分間免疫反応を行った後に酵素標識抗原を100 μ L添加して30分間免疫反応を行う第2方法と、酵素標識抗原を固相チューブに100 μ L添加して30分間免疫反応を行った後に17 β -エストラジオールを100 μ L添加して30分間免疫反応を行う第3方法とを行い、どの方法が適しているかを検討した。なお、酵素標識抗原と17 β -エストラジオールとの混合比および添加比はすべて1対1とした。

【0072】

固相抗体濃度を緩衝液で0.75 μ g/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

10

【0073】

17 β -エストラジオールを $8 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-4}$ g/Lの濃度範囲で5倍ずつ希釈して少なくとも6以上のサンプルを調製した。また、酵素標識抗原を0.5 μ g/mLの濃度に調製し、複数のサンプルに分割した。

【0074】

これらのサンプルについて前記第1～3方法により免疫反応を行った。

【0075】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0076】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0～30秒間の発光量を測定した。

20

【0077】

その測定結果を図13に示す。第1方法と第2方法とはほぼ同等の結果を示しているが、第3方法は感度が悪いことを確認した。

【0078】

(実施例6) 反応時間の検討1

固相抗体濃度を緩衝液で0.75 μ g/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

【0079】

17 β -エストラジオールを 2×10^{-5} g/Lの濃度に調製し、また、酵素標識抗原を0.25 μ g/mLの濃度に調製し、17 β -エストラジオールのサンプルと酵素標識抗原のサンプルとを1対1の割合で混合し、混合液を100 μ Lずつ分取して、固相チューブに添加した。

30

【0080】

添加後、200 rpmの回転数で振とうしながら、それぞれ、0分間、15分間、30分間、60分間、90分間、および120分間免疫反応を行った。

【0081】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0082】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0～30秒間の発光量を測定した。

40

【0083】

その測定結果を図14に示す。図14から、60分間反応させた後は発光量の増加はほとんど無いことが確認でき、60分間以上免疫反応を行えば充分であると判断した。

【0084】

(実施例7) 反応時間の検討2

前記実施例6では 2×10^{-5} g/Lの濃度の17 β -エストラジオールについて反応時間を検討したが、濃度によって反応性が異なってくることが考えられる。そこで実施例7では、17 β -エストラジオールの濃度を変えて、免疫反応時間の検討を行った。

【0085】

50

固相抗体濃度を緩衝液で $0.75 \mu\text{g/mL}$ に調製し、ポリスチレン製の試験管に 1 mL ずつ分注して、冷蔵庫で 1 晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

【0086】

17β -エストラジオールを $8 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ の濃度範囲で 5 倍ずつ希釈して少なくとも 6 以上のサンプルを調製した。また、酵素標識抗原を $0.25 \mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し、複数のサンプルに分割した。 17β -エストラジオールのサンプルと酵素標識抗原のサンプルとを 1 対 1 の割合で混合し、混合液を $100 \mu\text{L}$ ずつ分取して、固相チューブに添加した。

【0087】

添加後、 200 rpm の回転数で振とうしながら、それぞれ、30 分間、45 分間、および 60 分間免疫反応を行った。 10

【0088】

免疫反応終了後、蒸留水で 5 回洗浄した。

【0089】

洗浄後、 6 mM のルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータ UPD-4000)で 0 ~ 30 秒間の発光量を測定した。

【0090】

その測定結果を図 15 ~ 図 17 に示す。図 15 ~ 図 17 の結果から、反応時間が 60 分間のものが濃度と発光量との相関関係がよいということを確認し、免疫反応時間 30 分間 ~ 60 分間の範囲では、60 分間が最もよいと判断した。 20

【0091】

(実施例 8) 振とうの効果についての検討

免疫反応を静置して行う場合と、 200 rpm で振とうしながら行う場合との相違について検討した。

【0092】

固相抗体濃度を緩衝液で $0.75 \mu\text{g/mL}$ に調製し、ポリスチレン製の試験管に 1 mL ずつ分注して、冷蔵庫で 1 晩保存することにより複数の固相チューブを調製した。

【0093】

17β -エストラジオールを $8 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ の濃度範囲で 5 倍ずつ希釈して少なくとも 6 以上のサンプルを調製し、また、酵素標識抗原を $0.25 \mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し複数のサンプルに分割した。 17β -エストラジオールのサンプルと酵素標識抗原のサンプルとを 1 対 1 の割合で混合し、混合液を $100 \mu\text{L}$ ずつ分取して、固相チューブに添加した。 30

【0094】

添加後、それぞれ、静置して 1 時間、および 200 rpm の回転数で振とうしながら 1 時間、免疫反応を行った。

【0095】

その測定結果を図 18、図 19 に示す。図 18 および図 19 の結果から免疫反応時間が 1 時間の場合には、 200 rpm の回転数で振とうするのがよいことを確認した。

【0096】

(第 2 実施の形態)

図 20 は本発明の第 2 実施の形態に係る、酵素免疫測定法の測定プロセスを示す測定操作の模式図である。図 20 において、まずポリスチレン製の試験管に第 1 抗体である抗ウサギ IgG ヤギ抗体(固相抗体)を希釈緩衝液により希釈し、 1 mL ずつ分注し、冷蔵庫で 1 晩保存し固相抗体の調製を固相 21 にて行う。抗ウサギ IgG ヤギ抗体は日本バイオテック研究所の市販品を購入して使用し、固相抗体の希釈緩衝液は 0.9% 塩化ナトリウム、 0.1% アジ化ナトリウムを含む、 0.05 mol/L のホウ酸緩衝液($\text{pH} = 8.0$)を調製して使用する。

【0097】

次に、 17β -エストラジオールにペルオキシダーゼ(酵素)を標識した酵素標識抗原(50

酵素標識 17 β -エストラジオール)、所望の濃度に調製した 17 β -エストラジオール、第2抗体である抗 17 β -エストラジオールウサギ抗体の順に固相抗体の調製を行った試験管に添加し、200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行う。抗 17 β -エストラジオールウサギ抗体は、17 β -エストラジオールに牛血清アルブミン(BSA)を結合し、ウサギに免疫して調製する。酵素標識抗原はSIGMA社製のESTRADIOL-PEROXIDAZEを購入して使用する。

【0098】

抗 17 β -エストラジオールウサギ抗体、及びESTRADIOL-PEROXIDAZEを希釈して所望の濃度に調製するときは、2%ポリエチレングリコール、0.05% Tween 20、0.9%塩化ナトリウムを含む0.05mol/Lのトリス塩酸緩衝液(pH=8.0)を調製して使用する。 10

【0099】

上記のようにして得られた抗原抗体液22と固相抗体との免疫反応終了後、蒸留水を用いて試験管を5回洗浄する。洗浄後、発光試薬を添加して発光反応液23を得、この発光反応液23を発光測定装置で0~30秒間の発光量を測定して、その測定データをデータ処理24にて処理する。

【0100】

なお、発光試薬は6mmol/Lの濃度に調製し、10mmol/L過酸化水素、18.2mmol/Lパラヨードフェノールを含むトリス塩酸緩衝液(pH=8.5)を調製して使用する。 20

【0101】

以下の実施例により、第2実施の形態を具体的に説明する。

【0102】

(実施例9) 固相抗体濃度の検討

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で、1.0、2.0、および3.0 μ g/mLの各濃度に調製し、ポリスチレン製の試験管に1mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0103】

前記固相チューブに0.75 μ g/mLに調製した酵素標識抗原を100 μ Lずつ添加した。その後、抗 17 β -エストラジオールウサギ抗体を0.75、1.5、3.0、および6.0 μ g/mLの各濃度に調製し、これらを前記固相チューブに100 μ Lずつ添加し、200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。 30

【0104】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0105】

洗浄後、6mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0~30秒間の発光量を測定した。その測定結果を図21に示す。

【0106】

図21に示すとおり、固相抗体濃度は1 μ g/mLが良いことが判明した。 40

【0107】

(実施例10) 抗 17 β -エストラジオールウサギ抗体濃度の検討

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μ g/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0108】

前記固相チューブに0.5 μ g/mLに調製した酵素標識抗原を100 μ Lずつ添加した。その後、0.75、1.5、3.0、および6.0 μ g/mLに調製した抗 17 β -エストラジオールウサギ抗体を前記固相チューブに100 μ Lずつ添加し、200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

【0109】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0110】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0～30秒間の発光量を測定した。その測定結果を図22に示す。

【0111】

図22に示すとおり、抗17β-エストラジオールウサギ抗体濃度は0.75 μg/mLが良いことが判明した。

【0112】

(実施例11) 免疫反応時間の検討1

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0113】

前記固相チューブに0.75 μg/mLに調製した酵素標識抗原を200 μLずつ添加し、さらに17β-エストラジオールの希釈緩衝液を100 μL添加した。その後、0.75 μg/mLに調製した抗17β-エストラジオールウサギ抗体を前記固相チューブに100 μLずつ添加した。

【0114】

添加後、200 rpmの回転数で振とうしながら0分間、15分間、30分間、45分間、60分間、90分間、120分間、150分間、180分間、210分間、および240分間免疫反応を行った。

【0115】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0116】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0～30秒間の発光量を測定した。その測定結果を図23に示す。

【0117】

図23から、免疫反応は反応開始直後から徐々に進行し、90分過ぎからはそれほど大きな免疫反応の進行はないことが判明した。

【0118】

(実施例12) 免疫反応時間の検討2

実施例11では、17β-エストラジオールの希釈緩衝液で最適反応時間について検討したが、濃度によって17β-エストラジオールの反応性が異なることも考えられるので、17β-エストラジオールの濃度を6.40×10⁻⁹～1.0×10⁻⁴ g/Lの濃度範囲に5倍ずつ希釈調製して最適反応時間について検討した。

【0119】

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0120】

前記固相チューブに0.75 μg/mLに調製した酵素標識抗原を200 μLずつ添加し、これに、6.40×10⁻⁹～1.0×10⁻⁴ g/Lの濃度範囲に5倍ずつ希釈調製した17β-エストラジオールを100 μLずつ添加した。その後、0.75 μg/mLに調製した抗17β-エストラジオールウサギ抗体を200 μLずつ添加した。

【0121】

添加後、200 rpmの回転数で振とうしながら、30分間、60分間、および90分間免疫反応を行った。

【0122】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0123】

10

20

30

40

50

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0～30秒間の発光量を測定した。その測定結果を図24に示す。

【0124】

図24に示す結果から、免疫反応時間が30分間～90分間の範囲でそれほど大きな差異は観測されなかったが、低濃度領域の測定では60分間以上免疫反応を行ったほうが良いことが判明した。

【0125】

(実施例13) 攪拌効果の検討

免疫反応を静置で行う場合と、200rpmで行う場合の相違について検討した。

10

【0126】

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0127】

前記固相チューブに0.75 μg/mLに調製した酵素標識抗原を200 μLずつ添加し、これに、6.40×10⁻⁹～1.0×10⁻⁴ g/Lの濃度範囲に5倍ずつ希釈調製した17β-エストラジオールを100 μLずつ添加した。その後、0.75 μg/mLに調製した抗17β-エストラジオールウサギ抗体を200 μLずつ添加した。

【0128】

添加後、静置で1時間、および200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

20

【0129】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0130】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0～30秒間の発光量を測定した。測定結果を図25に示す。

【0131】

図25の測定結果から、免疫時間が1時間の場合には200rpmの回転数で行った方が良いことが判明した。

30

【0132】

(実施例14) 実試料(下水処理水)の測定1

いろいろな夾雑物が混入する下水処理水や河川水中に含まれる環境ホルモン(17β-エストラジオール)の測定に適應できるかを検討するために、都内下水処理場の流入下水および放流水に17β-エストラジオールを添加して、添加回収試験を行った。

【0133】

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0134】

前記固相チューブに0.75 μg/mLに調製した酵素標識抗原を200 μLずつ添加し、これに、5.0×10⁻⁸～5.0×10⁻⁴ g/Lの濃度範囲に希釈調製した17β-エストラジオールと下水処理水(S浄水場の曝気槽入口水と放流水)に17β-エストラジオール濃度が5.0×10⁻⁷ g/L、5.0×10⁻⁵ g/Lになるように調製した処理水を添加した。その後、0.75 μg/mLに調製した抗17β-エストラジオールウサギ抗体を200 μLずつ添加した。

40

【0135】

添加後200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

【0136】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0137】

50

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0~30秒間の発光量を測定した。測定結果を図26に示す。

【0138】

図26の測定結果から、本発明の酵素免疫測定法は非常に特異的な反応であるために、いろいろな夾雑物が混入する下水処理水であっても、交差反応性の影響をあまり受けずに測定できることが判明した。

【0139】

(実施例15) 実試料(下水処理水)の測定2

下水処理場の処理水は、下水処理場によって処理水質が異なる。例えば、汚泥処理設備を有する処理上では、汚泥処理からの返流水があり、その返流水中には比較的多くの硫化物が含まれている。その意味で、実施例14とは異なる都内下水処理場の流入下水および放流水に17β-エストラジオールを添加して、添加回収試験を行った。

【0140】

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0141】

前記固相チューブに0.75 μg/mLに調製した酵素標識抗原を200 μLずつ添加し、これに、5.0×10⁻⁸~5.0×10⁻⁴ g/Lの濃度範囲に希釈調製した17β-エストラジオールと下水処理水(C処理場の一沈流出水と放流水)に17β-エストラジオール濃度が5.0×10⁻⁷ g/L、5.0×10⁻⁵ g/Lになるように調製した処理水を添加した。その後、0.75 μg/mLに調製した抗17β-エストラジオールウサギ抗体を200 μLずつ添加した。

【0142】

添加後200 rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

【0143】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0144】

洗浄後、6 mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0~30秒間の発光量を測定した。測定結果を図27に示す。

【0145】

図27の測定結果から、本発明の酵素免疫測定法は非常に特異的な反応であるために、いろいろな夾雑物が混入する下水処理水であっても、交差反応性の影響をあまり受けずに測定できることが判明した。

【0146】

(実施例16) 実試料(河川水)の測定3

いろいろな夾雑物が混入する下水処理水や河川水中に含まれる17β-エストラジオールの測定に適応できるかを検討するために、都内の河川水に17β-エストラジオールを添加して、添加回収試験を行った。

【0147】

固相は、固相抗体濃度を緩衝液で1.0 μg/mLに調製し、ポリスチレン製の試験管に1 mLずつ分注して、冷蔵庫で1晩保存することにより固相チューブを調製した。

【0148】

前記固相チューブに0.75 μg/mLに調製した酵素標識抗原を200 μLずつ添加し、これに、5.0×10⁻⁸~5.0×10⁻⁴ g/Lの濃度範囲に希釈調製した17β-エストラジオールと河川水(M川)に17β-エストラジオール濃度が5.0×10⁻⁷ g/L、5.0×10⁻⁵ g/Lになるように調製した処理水を添加した。その後、0.75 μg/mLに調製した抗17β-エストラジオールウサギ抗体を200 μLずつ添加した。

10

20

30

40

50

【0149】

添加後200rpmの回転数で振とうしながら1時間免疫反応を行った。

【0150】

免疫反応終了後、蒸留水で5回洗浄した。

【0151】

洗浄後、6mMのルミノールを主成分とする発光試薬を添加して、発光測定装置(明電舎製のルミノメータUPD-4000)で0~30秒間の発光量を測定した。測定結果を図28に示す。

【0152】

図28の測定結果から、本発明の酵素免疫測定法は非常に特異的な反応であるために、
10
いろいろな夾雑物が混入する河川水であっても、交差反応性の影響をあまり受けずに測定
できることが判明した。

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1】本発明の第1実施の形態の測定操作の模式図である。

【図2】本発明の実施例1の結果を示す特性図である。

【図3】本発明の実施例2の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が0.01μg/ml)
である。

【図4】本発明の実施例2の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が0.1μg/ml)で
ある。
20

【図5】本発明の実施例2の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が0.25μg/ml)
である。

【図6】本発明の実施例2の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が0.5μg/ml)で
ある。

【図7】本発明の実施例2の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が0.75μg/ml)
である。

【図8】本発明の実施例2の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が1.0μg/ml)で
ある。

【図9】本発明の実施例3の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が0.5μg/mL)で
ある。
30

【図10】本発明の実施例3の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が1.0μg/mL)
である。

【図11】本発明の実施例3の結果を示す特性図(酵素標識抗原濃度が2.0μg/mL)
である。

【図12】本発明の実施例4の結果を示す特性図である。

【図13】本発明の実施例5の結果を示す特性図である。

【図14】本発明の実施例6の結果を示す特性図である。

【図15】本発明の実施例7の結果を示す特性図(免疫反応時間が30分間)である。

【図16】本発明の実施例7の結果を示す特性図(免疫反応時間が45分間)である。

【図17】本発明の実施例7の結果を示す特性図(免疫反応時間が60分間)である。
40

【図18】本発明の実施例8の結果を示す特性図(静置して1時間反応)である。

【図19】本発明の実施例8の結果を示す特性図(200rpmの振とうで1時間反応)で
ある。

【図20】本発明の第2実施の形態の測定操作の模式図である。

【図21】本発明の実施例9の結果を示す特性図である。

【図22】本発明の実施例10の結果を示す特性図である。

【図23】本発明の実施例11の結果を示す特性図である。

【図24】本発明の実施例12の結果を示す特性図である。

【図25】本発明の実施例13の結果を示す特性図である。

【図26】本発明の実施例14の結果を示す特性図である。
50

【図 2 7】本発明の実施例 1 5 の結果を示す特性図である。

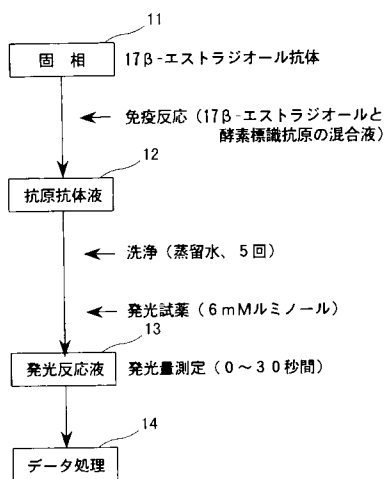
【図 2 8】本発明の実施例 1 6 の結果を示す特性図である。

【符号の説明】

【 0 1 5 4 】

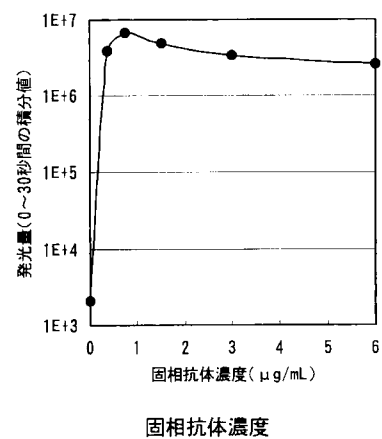
- 1 1、2 1 ... 固 相
- 1 2、2 2 ... 抗原抗体液
- 1 3、2 3 ... 発光反応液
- 1 4、2 4 ... データ処理

【 図 1 】

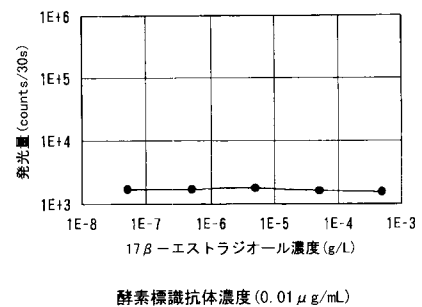


測定プロセス（第 1 抗体固相法）

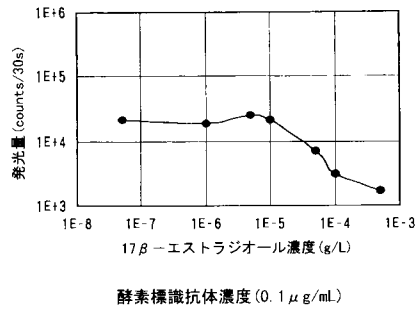
【 図 2 】



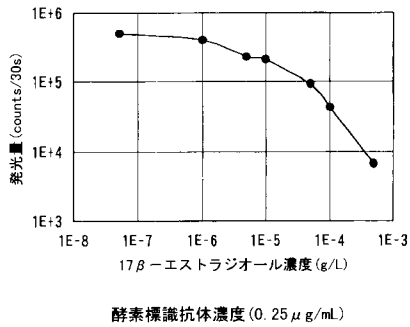
【 図 3 】



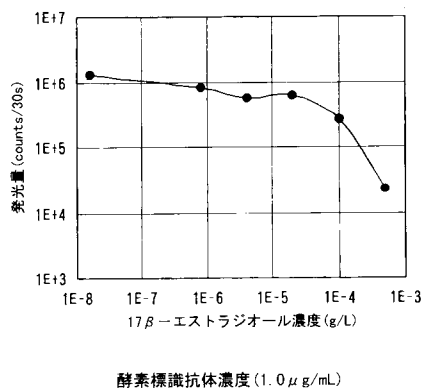
【図 4】



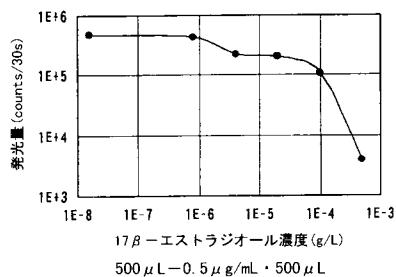
【図 5】



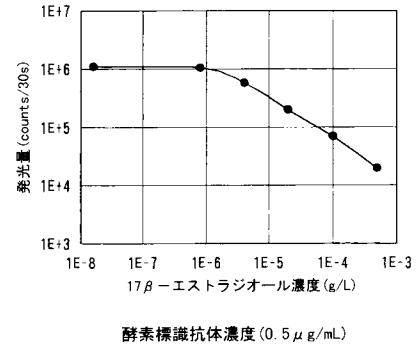
【図 8】



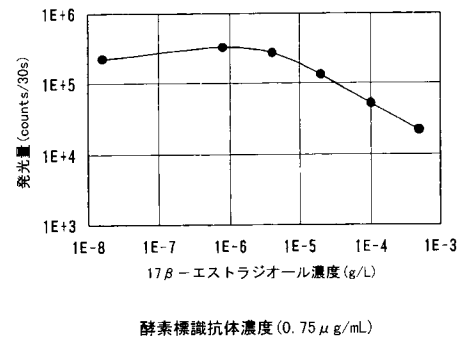
【図 9】



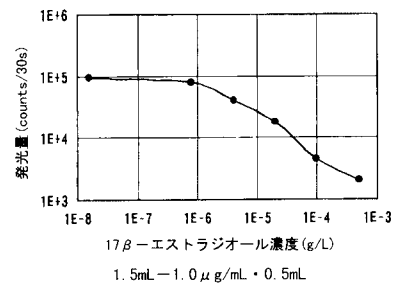
【図 6】



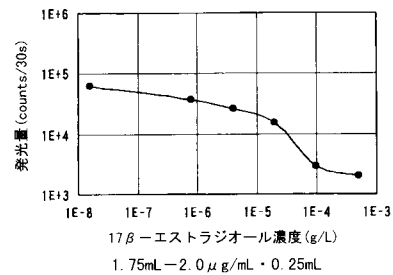
【図 7】



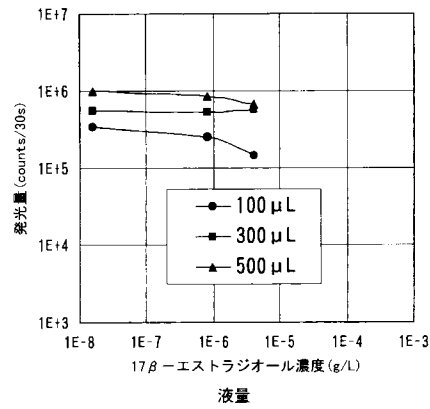
【図 10】



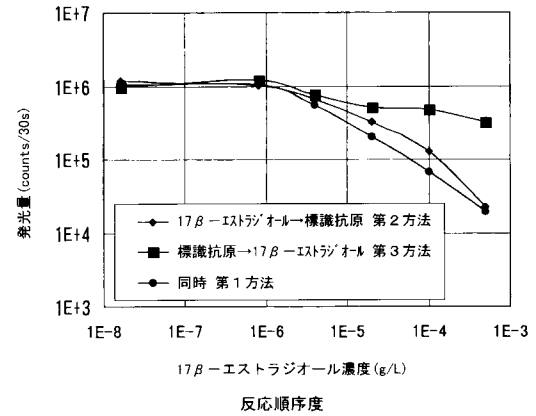
【図 11】



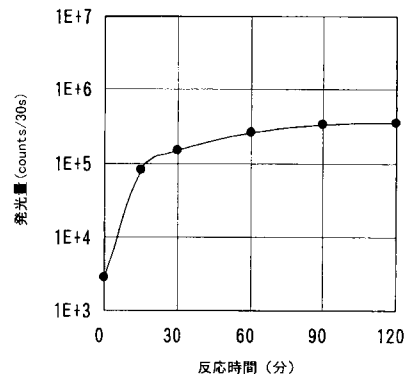
【図 1 2】



【図 1 3】

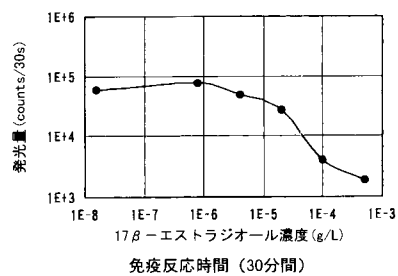


【図 1 4】



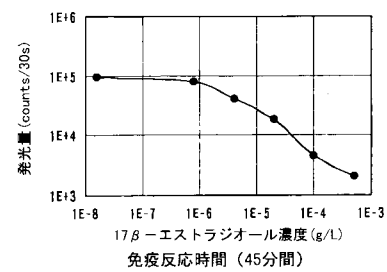
反応時間の影響

【図 1 5】



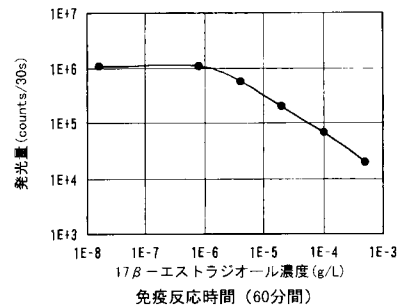
免疫反応時間 (30分間)

【図 1 6】



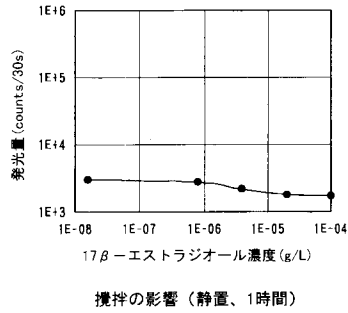
免疫反応時間 (45分間)

【図 1 7】

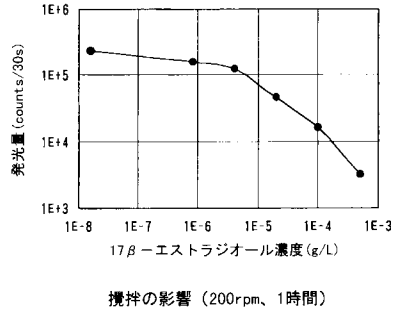


免疫反応時間 (60分間)

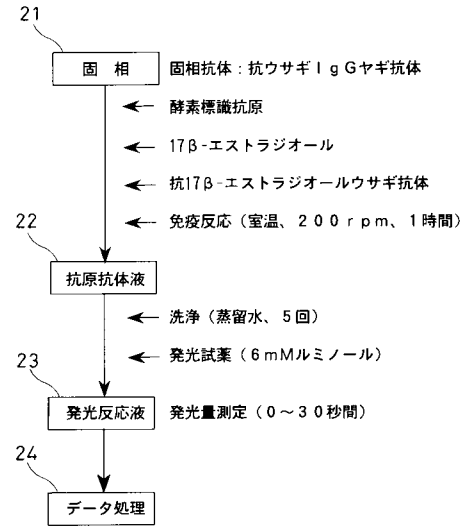
【図 18】



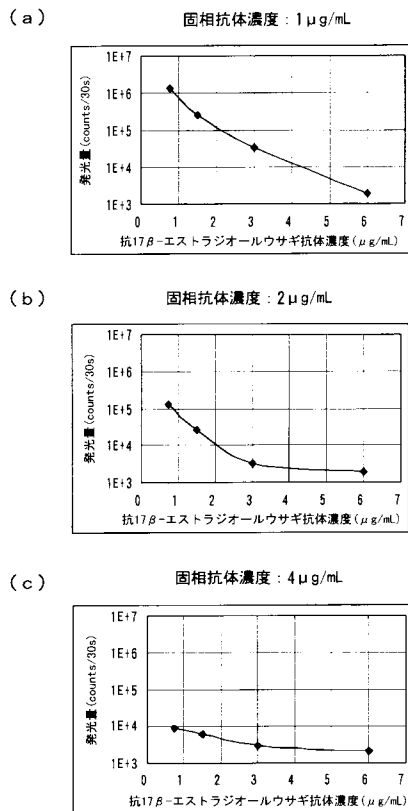
【図 19】



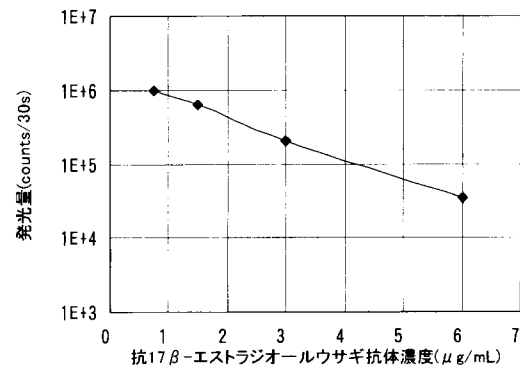
【図 20】



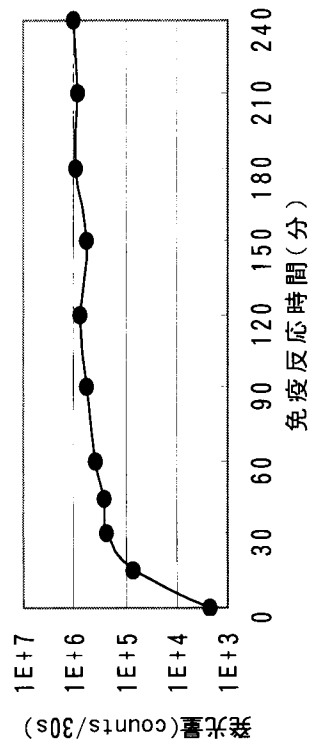
【図 21】



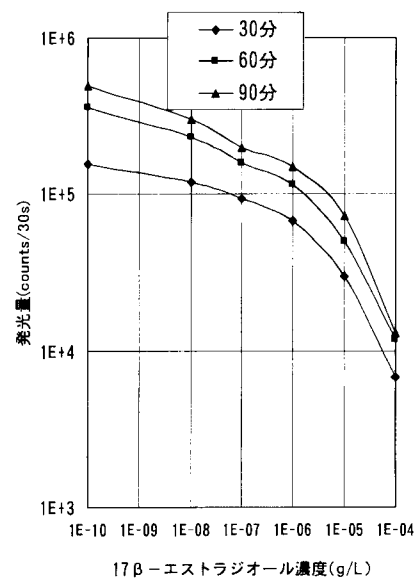
【図 22】



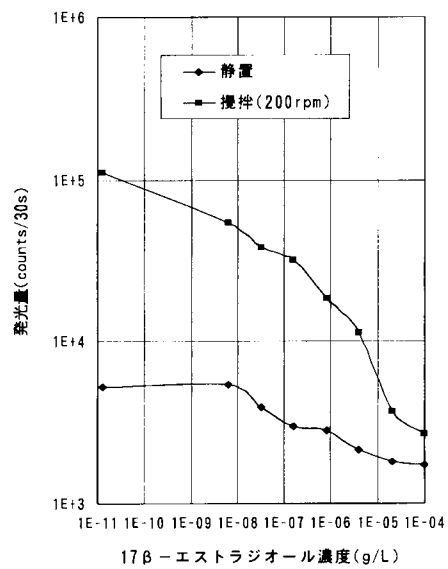
【図 2 3】



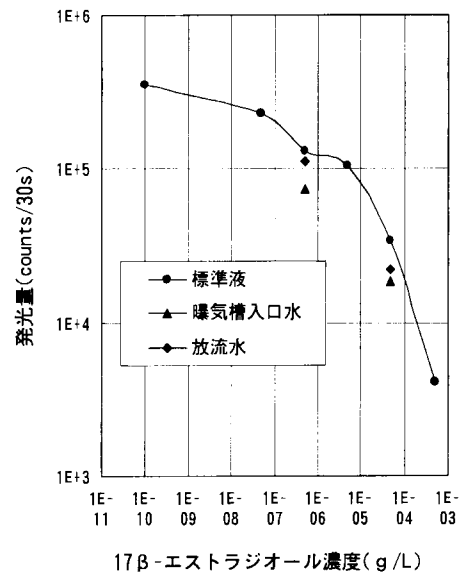
【図 2 4】



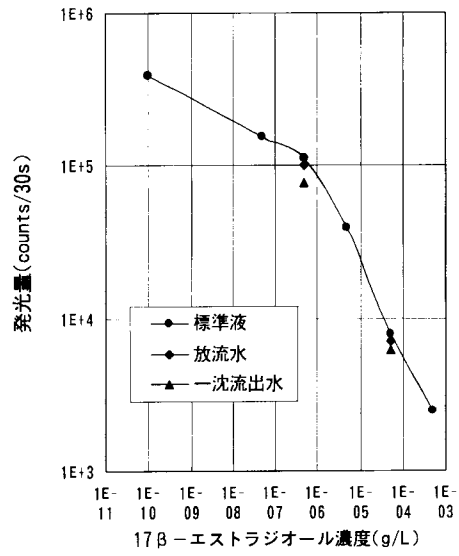
【図 2 5】



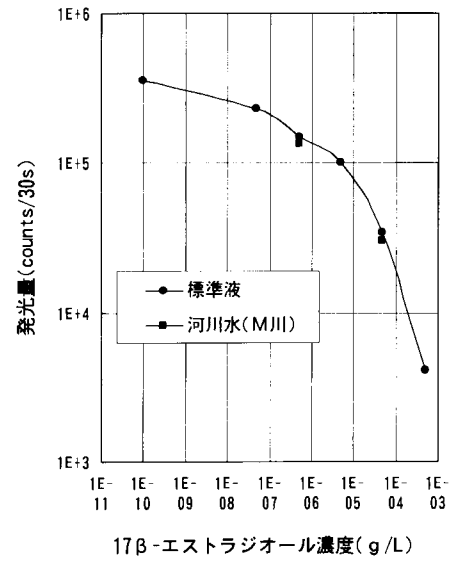
【図 2 6】



【図 27】



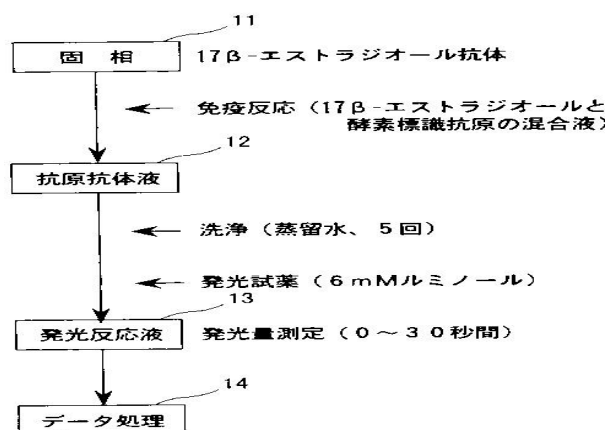
【図 28】



专利名称(译)	内分泌干扰化学物质的酶免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2004205504A	公开(公告)日	2004-07-22
申请号	JP2003415890	申请日	2003-12-15
申请(专利权)人(译)	株式会社明电舎		
[标]发明人	福岡正芳 野瀬勝利 高瀬長武		
发明人	福岡 正芳 野瀬 勝利 高瀬 長武		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/543.555.D G01N33/543.575		
代理人(译)	橋本 剛		
优先权	2002361608 2002-12-13 JP		
其他公开文献	JP2004205504A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：轻松，快速，准确且经济地测量破坏内分泌的化学物质。 解决方案：样品中的内分泌干扰化学物质和酶标记的抗原与固相制备的固相抗体竞争，从而引起免疫反应，并添加发光试剂将固相抗体固定在固相上。 确定酶标记的抗原的发光量，并使用校准曲线间接确定样品中内分泌干扰物的浓度。 [选型图]图1



測定プロセス(第1抗体固相法)