

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5557450号  
(P5557450)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月13日(2014.6.13)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 J
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 M
	GO 1 N 33/543 5 1 1 J
	GO 1 N 33/543 5 1 1 M
請求項の数 31 (全 24 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2008-542184 (P2008-542184)	(73) 特許権者	000162478
(86) (22) 出願日	平成19年11月1日(2007.11.1)		協和メデックス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/071344		東京都中央区晴海一丁目8番10号
(87) 国際公開番号	W02008/053973	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成20年5月8日(2008.5.8)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成22年9月24日(2010.9.24)	(74) 代理人	100119507
(31) 優先権主張番号	特願2006-299498 (P2006-299498)		弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成18年11月2日(2006.11.2)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
		(74) 代理人	100130845
			弁理士 渡邊 伸一
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 測定対象成分の免疫測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分であって、細胞内に含まれる物質およびサイトカインによって細胞内に誘発される蛋白質から選択される測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下に反応させることを特徴とするヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法。

【請求項2】

ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、更に、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に反応させる請求項1記載の方法。

【請求項3】

免疫測定法が、サンドイッチ法または競合法である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体との反応が、(1) 該測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1の抗体および該測定対象成分に結合する第2の抗体に標識が結合した標識化抗体との反応、(2) 該測定対象成分と、競合物質に標識が結合した標識化競合物質ならびに該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体との反応、または、(3) 該測定対象成分と、競合物質ならびに該測定対象成分および該競合物質に結合し、かつ標識が結合した標識化抗体との反応である請求項1または2に記載の方法。

## 【請求項 5】

試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 6】

試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、3 - [(3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホネートまたは3 - [(3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネートである請求項 5 記載の方法。

10

## 【請求項 8】

非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、N, N - ビス(3 - D - グルコンアミドプロピル)コールアミドまたはN, N - ビス(3 - D - グルコンアミドプロピル)デオキシコールアミドである請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 9】

ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルである請求項 2 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 10】

試料が、全血である請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

測定対象成分が、M x A 蛋白質である請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 12】

胆汁酸誘導体および、以下の(1)~(3)からなる群より選ばれる要素を含有することを特徴とするヘモグロビン含有する試料中の測定対象成分であって、細胞内に含まれる物質およびサイトカインによって細胞内に誘発される蛋白質から選択される測定対象成分の免疫測定用試薬。

(1) 該測定対象成分に結合する第1の抗体、および、該測定対象成分に結合する第2の抗体に標識が結合した標識化抗体；

(2) 競合物質に標識が結合した標識化競合物質、ならびに、該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体；または、

(3) 競合物質、ならびに、該測定対象成分および該競合物質に結合し、かつ、標識が結合した標識化抗体。

30

## 【請求項 13】

更に、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含有する請求項 12 記載の試薬。

## 【請求項 14】

胆汁酸誘導体が、両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 12 または 13 に記載の試薬。

## 【請求項 15】

胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 12 または 13 に記載の試薬。

40

## 【請求項 16】

両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、3 - [(3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホネートまたは3 - [(3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネートである請求項 14 記載の試薬。

## 【請求項 17】

非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、N, N - ビス(3 - D - グルコンアミドプロピル)コールアミドまたはN, N - ビス(3 - D - グルコンアミドプロピル)デオキシコールアミドである請求項 15 記載の試薬。

## 【請求項 18】

50

ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルである請求項 13 ~ 17 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 19】

試料が、全血である請求項 12 ~ 18 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 20】

測定対象成分が、M x A 蛋白質である請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 21】

ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分であって、細胞内に含まれる物質およびサイトカインによって細胞内に誘発される蛋白質から選択される測定対象成分の免疫測定法におけるヘモグロビンの影響抑制方法であって、ヘモグロビンを含む試料中の該測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下に反応させることを特徴とする、方法。

10

【請求項 22】

免疫測定法が、サンドイッチ法または競合法である請求項 21 記載の抑制方法。

【請求項 23】

測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体との反応が、(1) 該測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第 1 の抗体および該測定対象成分に結合する第 2 の抗体に標識が結合した標識化抗体との反応、(2) 該測定対象成分と、競合物質に標識が結合した標識化競合物質ならびに該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体との反応、または、(3) 該測定対象成分と、競合物質ならびに該測定対象成分および該競合物質に結合し、かつ標識が結合した標識化抗体との反応である請求項 21 記載の抑制方法。

20

【請求項 24】

試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載の抑制方法。

【請求項 25】

試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載の抑制方法。

【請求項 26】

両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、3 - [(3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホネートまたは 3 - [(3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネートである請求項 24 記載の抑制方法。

30

【請求項 27】

非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、N, N - ビス(3 - D - グルコンアミドプロピル)コールアミドまたは N, N - ビス(3 - D - グルコンアミドプロピル)デオキシコールアミドである請求項 25 記載の抑制方法。

【請求項 28】

ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、更に、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に反応させる請求項 21 ~ 27 のいずれかに記載の抑制方法。

40

【請求項 29】

ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルである請求項 28 記載の抑制方法。

【請求項 30】

試料が、全血である請求項 21 ~ 29 のいずれかに記載の抑制方法。

【請求項 31】

測定対象成分が、M x A 蛋白質である請求項 21 ~ 30 のいずれかに記載の抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法、免疫測定用試薬、および、免疫測定法におけるヘモグロビンの影響抑制方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液中の測定対象成分を免疫測定法により測定する場合、赤血球や白血球等の血球細胞の外に存在する測定対象成分については、全血から血球を除去した血清または血漿が試料として用いられる。しかし、血球を除去するためには遠心分離機等の専用の装置が必要であり、手間もかかるため、直接全血試料を測定する方法が提案されている（特許文献1参照）。全血を試料とする場合、溶血により試料に混入するヘモグロビン等の血球成分や血球の膜成分が、光学的な検出系に影響したり、免疫反応を阻害したり、測定対象物質を吸着することにより、測定に影響がでる問題がある。このような問題を回避するため、溶血をさせずに測定する全血を試料とする免疫測定方法が報告されている（特許文献2、3、4および5参照）。

10

【0003】

細胞内蛋白質等の血球成分を測定する場合には、血球を溶解する必要があるため、上記の溶血をさせずに測定する方法を用いることができない。この場合には、フローサイトメトリーにより、対象の血球を分離してから、分離した細胞を溶解させて目的の血球成分を測定する方法がとられてきたが、フローサイトメトリーのための専用の装置が必要であり、手間がかかる。

20

【0004】

一方、細胞内蛋白質の簡便な測定法の例として、界面活性剤で全血中の血球を溶解させたものを測定試料としたM×A蛋白質の免疫測定法が報告されている（非特許文献1、2）。

【特許文献1】特開平10-48214号公報

【特許文献2】特開平6-265554号公報

【特許文献3】国際公開第96/04558号パンフレット

【特許文献4】国際公開第02/73203号パンフレット

【特許文献5】特開2004-45395号公報

【非特許文献1】ジャーナル・オブ・インターフェロン・リサーチ（Journal of Interferon Research），（米国），1992年，第12巻，第2号，p. 67 - 74

30

【非特許文献2】ペディアトリック・リサーチ（Pediatric Research），（米国），1997年，第41巻，第5号，p. 647 - 650

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、ヘモグロビンの影響が抑制されたヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法および免疫測定用試薬、ならびに、ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法におけるヘモグロビンの影響抑制方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

40

【0006】

本発明者らは、試料中の測定対象成分の免疫測定法において、該測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体との反応を、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下に行うことにより、正確に該測定対象成分を測定できることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の[1]～[24]に関する。

[1] ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下に反応させることを特徴とするヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法。

[2] ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、更に、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に存在させる[1]記

50

載の方法。

[ 3 ] 免疫測定法が、サンドイッチ法または競合法である [ 1 ] または [ 2 ] に記載の方法。

[ 4 ] 測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体との反応が、( 1 ) 該測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第 1 の抗体および該測定対象成分に結合する第 2 の抗体に標識が結合した標識化抗体との反応、( 2 ) 該測定対象成分と、競合物質に標識が結合した標識化競合物質ならびに該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体との反応、または、( 3 ) 該測定対象成分と、競合物質ならびに該測定対象成分および該競合物質に結合し、かつ標識が結合した標識化抗体との反応である [ 1 ] または [ 2 ] に記載の方法。

10

[ 5 ] 試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の方法。

[ 6 ] 試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である請求項 [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の方法。

[ 7 ] 両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、3 - [ ( 3 - コールアミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] プロパンスルホネート ( 以下、C H A P S と略記する ) または 3 - [ ( 3 - コールアミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネート ( 以下、C H A P S O と略記する ) である [ 5 ] 記載の方法。

[ 8 ] 非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、N , N - ビス ( 3 - D - グルコンアミドプロピル ) コールアミド ( 以下、B I G C H A P と略記する ) または N , N - ビス ( 3 - D - グルコンアミドプロピル ) デオキシコールアミド ( 以下、d e o x y - B I G C H A P と略記する ) である [ 6 ] 記載の方法。

20

[ 9 ] ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルである [ 2 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載の方法。

[ 1 0 ] 試料が、全血である [ 1 ] ~ [ 9 ] のいずれかに記載の方法。

[ 1 1 ] 測定対象成分が、M x A 蛋白質である [ 1 ] ~ [ 1 0 ] のいずれかに記載の方法。

[ 1 2 ] 胆汁酸誘導体および、以下の ( 1 ) ~ ( 3 ) からなる群より選ばれる要素を含有することを特徴とするヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定用試薬。

30

( 1 ) 該測定対象成分に結合する第 1 の抗体、および、該測定対象成分に結合する第 2 の抗体に標識が結合した標識化抗体；

( 2 ) 競合物質に標識が結合した標識化競合物質、ならびに、該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体；または、

( 3 ) 競合物質、ならびに、該測定対象成分および該競合物質に結合し、かつ、標識が結合した標識化抗体。

[ 1 3 ] 更に、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含有する [ 1 2 ] 記載の試薬。

[ 1 4 ] 胆汁酸誘導体が、両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である [ 1 2 ] または [ 1 3 ] に記載の試薬。

40

[ 1 5 ] 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である [ 1 2 ] または [ 1 3 ] に記載の試薬。

[ 1 6 ] 両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、C H A P S または C H A P S O である [ 1 4 ] 記載の試薬。

[ 1 7 ] 非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、B I G C H A P または d e o x y - B I G C H A P である [ 1 5 ] 記載の試薬。

[ 1 8 ] ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルである [ 1 3 ] ~ [ 1 7 ] のいずれかに記載の試薬。

[ 1 9 ] ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下に反応させることを特

50

徴とする、ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法におけるヘモグロビンの影響抑制方法。

〔20〕 試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である〔19〕記載の抑制方法。

〔21〕 試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体である〔19〕記載の抑制方法。

〔22〕 両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、CHAPSまたはCHAPSOである〔20〕記載の抑制方法。

〔23〕 非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が、BIGCHAPまたはdeoxy-BIGCHAPである〔21〕記載の抑制方法。

〔24〕 ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、更に、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に反応させる〔19〕～〔23〕のいずれかに記載の抑制方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明により、ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の正確な測定を可能とする免疫測定法および免疫測定用試薬、ならびに、ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法におけるヘモグロビンの影響抑制方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

(1) ヘモグロビンを含有する試料

本発明の免疫測定方法において使用されるヘモグロビンを含有する試料としては、例えば、全血、全血から調製した赤血球を含む血球画分、溶血が疑われる血漿または血清、赤血球、任意の試料にヘモグロビンを添加した試料等、ヘモグロビンを含有する試料またはヘモグロビンの含有が疑われる試料があげられる。全血としては、被検者より採取した血液そのものでもよいが、採取した血液を処理したのもでもよく、処理した血液が好ましい。当該処理としては、例えば抗凝固処理、溶血処理等があげられ、これらの処理を組み合わせてもよい。

【0009】

測定対象成分が血球の細胞内成分である場合は、全血として、溶血処理した血液が好ましく、抗凝固処理と溶血処理の両処理を行った血液が特に好ましい。抗凝固処理としては、例えば採取した血液にEDTA、ヘパリン等を添加する処理等があげられる。溶血処理としては、例えば界面活性剤またはサポニン類溶液の添加、低張液との混合、凍結融解、超音波処理等があげられる。

(2) 測定対象成分

本発明における測定対象成分は、ヘモグロビンを含有する可能性の有る試料中の成分で有れば特に制限は無いが、例えば、核酸、蛋白質、脂質、ビタミン、多糖類等が挙げられる。核酸としてはDNA、RNA、ATP、ADP、AMP、サイクリックAMP等が挙げられる。また、蛋白質としては酵素、ホルモン、各種ペプチド等が挙げられる。

【0010】

本発明において好適な測定対象成分は、細胞内に含まれる物質、インターフェロン等の各種サイトカインによって細胞内に誘発される蛋白質が挙げられる。

具体的な測定対象成分としては、I型インターフェロンによって細胞質内に誘導されるMxA蛋白質(Mol. Cell. Biol., 9, 5062-5072, 1989; J. Virol. 64, 1171-1181, 1990)等があげられる。

(3) 胆汁酸誘導体

本発明における胆汁酸誘導体は、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体である。試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体としては、本発明の免疫測定法およびヘモグロビンの影響抑制方法を可能とする胆汁酸誘導体であれば特に制限はないが、両性界面活性剤機能または非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体が好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0011】

両性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体としては、例えば3 - [ ( 3 - コールアミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] プロパンスルホネート { 3 - [ ( 3 - Cholamidopropyl ) dimethylammonio ] propanesulfonic acid、以下、CHAPSと略記する }、3 - [ ( 3 - コールアミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネート { 3 - [ ( 3 - Cholamidopropyl ) dimethylammonio ] - 2 - hydroxypropanesulfonic acid、以下、CHAPSOと略記する } 等が挙げられる。

## 【0012】

非イオン性界面活性剤機能を有する胆汁酸誘導体としては、例えばN, N - ビス ( 3 - D - グルコンアミドプロピル ) コールアミド [ N, N - Bis ( 3 - D - gluconamidopropyl ) cholamide、以下BIGCHAPと略記する ]、N, N - ビス ( 3 - D - グルコンアミドプロピル ) デオキシコールアミド [ N, N - Bis ( 3 - D - gluconamidopropyl ) deoxycholamide、以下、deoxy-BIGCHAPと略記する ] 等が挙げられる。

10

## 【0013】

胆汁酸誘導体は、測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体との反応におけるヘモグロビンの影響を抑制する作用を示し、特にCHAPS、CHAPSO、BIGCHAPおよびdeoxy-BIGCHAPが好適に使用される。

胆汁酸誘導体の濃度としては、臨界ミセル濃度 ( c m c ) の 1 倍 ~ 5 0 倍の範囲の濃度で用いるとよく、特にc m c濃度の1倍 ~ 10倍が好ましい。本発明においては、胆汁酸誘導体を単独 ( 1 種類 ) で用いることもできるが、2種以上組み合わせて用いることもできる。

20

## (4) ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤

ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤は、本発明の免疫測定法において、測定感度を向上させる作用があり、免疫反応に共存させるのが好ましい。

## 【0014】

本発明におけるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤としては、例えばポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等があげられ、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルが好ましい。ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルにおけるアルキルとしては、例えばオクチル、ノニル等があげられる。ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルの具体例 ( 市販品 ) としては、例えばノニドットP - 40 ( ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル ) 等があげられる。

30

## 【0015】

本発明においては、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を単独 ( 1 種類 ) で用いることもできるが、2種以上組み合わせて用いることもできる。本発明の免疫測定法においては、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の濃度は0.01 ~ 2.0%が好ましく、0.05 ~ 1.8%がより好ましく、0.1 ~ 1.4%が特に好ましい。

## (5) 抗体および標識化抗体

40

本発明の測定方法において使用される抗体としては、測定対象成分に特異的に結合する抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用できるが、モノクローナル抗体が好ましい。また、本発明に用いる抗体としては、抗体断片を包含する。具体的には、抗体をパパイン処理により得られるF a b、ペプシン処理により得られるF ( a b ' )<sub>2</sub>、ペプシン処理 - 還元処理により得られるF a b ' 等のF c部分を除去した抗体断片が挙げられる。抗体断片としては、F ( a b ' )<sub>2</sub>が特に好ましい。

## 【0016】

本発明において使用する抗体は、測定対象成分またはその一部分を抗原として用いて通常の方法により取得することができるが、市販品としても入手可能である。

50

測定対象成分がM×A蛋白質である場合、M×A蛋白質に特異的に結合する抗体としては、例えば、国際公開公報WO96/05230に記載された、ハイブリドーマ細胞株KM1122、KM1123、KM1124(FERM BP-4729)、KM1125、KM1126、KM1127、KM1128、KM1129、KM1130、KM1131、KM1132(FERM BP-4730)、KM1133、KM1134、KM1135(FERM BP-4731)がそれぞれ産生する抗ヒトM×A蛋白質モノクローナル抗体KM1122、KM1123、KM1124、KM1125、KM1126、KM1127、KM1128、KM1129、KM1130、KM1131、KM1132、KM1133、KM1134、KM1135等があげられる。

【0017】

本発明における標識化抗体は、本発明の測定対象成分の免疫測定に使用され得るものであり、本発明に用いられる抗体と後述の標識物質とを用いて、後述の方法により作製されるものである。

(6) 競合物質および標識化競合物質

本発明において「競合物質」とは、本発明の免疫測定法において用いる「測定対象成分に結合する抗体」に結合できる物質であって、かつその結合が、該測定対象成分と競合的であるような物質を意味し、測定対象成分そのものも含まれる。「競合物質」は、試料中の測定対象成分を競合法により測定する際に使用されるものである。したがって、競合法において用いる測定対象成分に結合する抗体は、測定対象成分、競合物質および標識化競合物質に結合する抗体であり、該測定対象成分と結合して免疫複合体を生成するとともに、競合物質とも結合して免疫複合体を生成する。

【0018】

競合物質としては、測定対象成分に結合する抗体が認識するエピトープの構造と同じ構造を有している物質が好ましく、さらに測定対象成分に結合する抗体に対する結合の強さが、該抗体に対する該測定対象成分の結合の強さと同程度であるものが好ましい。測定対象成分そのものが競合物質として好ましい。

本発明における標識化競合物質は、本発明の測定対象成分の免疫測定に使用され得るものであり、上記の競合物質と後述の標識物質とを用いて、後述の方法により作製されるものである。

(7) 免疫測定法

本発明の免疫測定法は、ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体との反応を、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下に行うことを特徴とするヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分の免疫測定法である。

【0019】

ヘモグロビンを含む試料と、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体との混合比は1:1~1:1000が好ましく、ヘモグロビンを含む試料が全血である場合には、1:2~1:49の混合比が良く、1:4~1:9が特に好ましい。試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体を、ヘモグロビンを含む試料に添加する場合、添加の際の温度としては、約2~40が好ましく、添加後24時間以内に測定することが好ましい。

【0020】

免疫測定法としては、抗原抗体反応に基づく方法であれば特に制限がなく、操作方法、標識物質の有無、標識物質の種類、担体、B/F分離の有無は限定されない。

抗原抗体反応の反応としては、競合反応法および非競合反応法のいずれでもよい。

検出方法としては、抗原抗体反応の結果を凝集等により直接検出する非標識法、標識物質を使用して検出する標識法のいずれでもよいが、測定感度の点で特に標識法が好ましい。

【0021】

本発明の免疫測定法としては、B/F分離を行う必要のあるヘテロジニアス法、および

10

20

30

40

50

B / F 分離を行う必要のないホモジニアス法のいずれも使用できる。

反応相としては、全反応が液相で行われる液相法と免疫反応の相手を固相化して反応を行う固相法のいずれの方法を用いてもよい。

具体的な測定方法としては、「バイオ検査薬開発マニュアル」シーエムシー、石川栄治ら共編「酵素免疫測定法」第3版 医学書院、文献 日本臨床 vol. 53 No. 9 等に記載されている方法が挙げられる。

#### 【0022】

本発明の測定法の具体例として、以下の測定方法1～4の方法が挙げられるが、本発明は、これらの方法に限定されるものではない。測定方法1は非競合反応法であるサンドイッチ法、測定方法2および3は試料中の測定対象成分と競合物質を競合させる競合法、測定方法4は、免疫複合体と免疫複合体に含まれない標識化抗体または標識化競合物質との分離（B / F 分離）を行わないホモジニアス法である。

10

#### 測定方法1

以下の（a）～（e）の工程を順次行う測定方法。

（a）ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分と、該測定対象成分に特異的に結合する第1の抗体とを、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下、または、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体とポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に反応させて、第1の抗体と該測定対象成分とからなる免疫複合体を生成させる工程；

（b）試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下、または、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体とポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に、（a）工程で生成した免疫複合体と、該測定対象成分に結合する第2の抗体に標識が結合した標識化抗体とを反応させ、第1の抗体、該測定対象成分および標識化抗体からなる免疫複合体を生成させる工程；

20

（c）（b）工程で生成した免疫複合体と該免疫複合体に含まれない標識化抗体とを分離する工程；

（d）（b）工程で生成した免疫複合体中の標識の量を測定する工程；および、

（e）（d）工程で測定した該免疫複合体中の標識の量から、該試料中の該測定対象成分の濃度を決定する工程。

#### 【0023】

第1の抗体は、不溶性担体に固定化されていることが好ましい。工程（a）と工程（b）は順次行っても、同時に行ってもよい。第1の抗体と結合した該測定対象成分に第2の抗体が結合することができれば、第1の抗体が認識する該測定対象成分の部位と、第2の抗体が認識する該測定対象成分の部位とは同じであっても異なってもよいが、異なっていることが好ましい。また、後述のように、（e）工程において、既知濃度の測定対象成分を用いて予め作成した該測定対象成分濃度と測定値（標識由来の情報量）との関係を表す検量線を用いることにより、該試料中の測定対象成分の濃度を決定することができる。

30

#### 測定方法2

以下の（a）～（d）の工程を順次行う測定方法。

40

（a）ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分、標識化競合物質を、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下、または、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体とポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に、該測定対象成分および該標識化競合物質に結合する抗体と反応させて、該抗体と該標識化競合物質とからなる免疫複合体、および、該抗体と該測定対象成分とからなる免疫複合体を生成させる工程；

（b）該抗体と該標識化競合物質とからなる免疫複合体を、未反応の標識化競合物質から分離する工程；

（c）（a）工程で生成した該抗体と該標識化競合物質とからなる免疫複合体中の標識の量を測定する工程；および、

50

(d)(c)工程で測定した該免疫複合体中の標識の量から、該試料中の該測定対象成分の濃度を決定する工程。

【0024】

該抗体は、不溶性担体に固定化されていることが好ましい。また、後述のように、(d)工程において、既知濃度の測定対象成分を用いて予め作成した該測定対象成分濃度と測定値(標識由来の情報量)との関係を表す検量線を用いることにより、該試料中の測定対象成分の濃度を決定することができる。

測定方法3

以下の(a)~(d)の工程を順次行う測定方法。

(a)ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分、競合物質を、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下、または、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体とポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に、該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体に標識が結合した標識化抗体と反応させて、該標識化抗体と該競合物質とからなる免疫複合体、および、該標識化抗体と該測定対象成分とからなる免疫複合体を生成させる工程；

(b)該標識化抗体と該競合物質とからなる免疫複合体を、未反応の標識化抗体、および、該標識化抗体と該測定対象成分とからなる免疫複合体から分離する工程；

(c)該標識化抗体と該競合物質とからなる免疫複合体中の標識の量を測定する工程；および、

(d)(c)工程で測定した該免疫複合体中の標識の量から、該試料中の該測定対象成分の濃度を決定する工程。

【0025】

該競合物質は、不溶性担体に固定化されていることが好ましい。なお、該競合物質が該測定対象成分と同じ構造である場合には、(a)の工程において不溶性担体に固定化された競合物質を用いる。また、後述のように、(d)工程において、既知濃度の測定対象成分を用いて予め作成した該測定対象成分濃度と測定値(標識由来の情報量)との関係を表す検量線を用いることにより、該試料中の測定対象成分の濃度を決定することができる。

【0026】

測定方法4

以下の(a)~(c)の工程を有する測定方法。

(a)ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分を、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体の存在下、または、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体とポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の存在下に、該測定対象成分に特異的に結合する第1の抗体を標識物質1で標識した標識化抗体1、および、該測定対象成分に特異的に結合する第2の抗体を標識物質1とは異なる標識物質2で標識した標識化抗体2と反応させ、標識化抗体1、測定対象成分および標識化抗体2からなる免疫複合体を生成させる工程；

(b)(a)工程で生成した該免疫複合体における標識物質1と標識物質2の相互作用の変化量を測定する工程；および

(c)(b)工程で測定した相互作用の変化量から試料中の該測定対象成分の量を決定する工程。

【0027】

第2の抗体は、第1の抗体と結合した測定対象成分に結合することができれば、第1の抗体が認識する該測定対象成分の部位と、第2の抗体が認識する該測定対象成分の部位は同じであっても異なってもよいが、異なっていることが好ましい。また、後述のように、(c)工程において、既知濃度の測定対象成分を用いて予め作成した該測定対象成分濃度と測定値(標識由来の情報量)との関係を表す検量線を用いることにより、該試料中の測定対象成分の濃度を決定することができる。

【0028】

上記の通り、測定方法1~3は、B/F分離を伴うヘテロジニアス法である。測定方法

10

20

30

40

50

1の工程(c)、測定方法2および3の工程(b)がB/F分離の工程である。このB/F分離は、抗体または競合物質が不溶性担体に固定化されている場合には、反応溶液を除去した後、不溶性担体を洗浄することにより容易に行うことができる。すなわち、抗原抗体反応後に反応溶液を除去し、不溶性担体を洗浄液により洗浄することにより、不溶性担体上に生成した免疫複合体と未反応の標識体(標識化抗体、標識化競合物質)とを分離することができる。

【0029】

洗浄液としては、リン酸緩衝化生理食塩水(0.15 mol/L 塩化ナトリウムを含有する10 mmol/L リン酸緩衝液、pH 7.2、以下、PBSと記す)、界面活性剤を含有するPBS、後述の水性媒体等をあげることができる。当該界面活性剤として、例えばツイーン(Tween)20等の非イオン性界面活性剤等があげられる。

また、測定方法1において、第1の抗体が不溶性担体に固定化されている場合には、工程(a)と工程(b)との間に、未反応の反応物を除去するため、不溶性担体を洗浄する工程を挿入することもできる。この場合、工程(b)は、(a)工程で生成した免疫複合体と、該測定対象成分に結合する第2の抗体に標識が結合した標識化抗体とを反応させ、第1の抗体、該測定対象成分および標識化抗体からなる免疫複合体を生成させる工程となる。

【0030】

測定方法2において、測定対象成分に結合する抗体が不溶性担体に固定化されていない場合は、(c)工程で標識化競合物質に結合せず、該抗体に結合する結合性物質を固定化した不溶性担体を該免疫複合体に作用し、該免疫複合体を不溶性担体に結合させた後、反応溶液を除去し、さらに不溶性担体を洗浄することにより、該免疫複合体と、該免疫複合体に含まれない標識化競合物質とを分離することができる。また、標識化競合物質に結合せず、該抗体に結合する結合性物質を固定化した不溶性担体の存在下で、(a)工程の免疫複合体を生成させる反応を行い、免疫複合体の生成と免疫複合体の不溶性担体への固定化を同時に行った後、反応溶液を除去し、さらに不溶性担体を洗浄することにより、免疫複合体と、免疫複合体に含まれない標識化競合物質を分離することができる。標識化競合物質に結合せず、該抗体に結合する結合性物質としては、例えば、該抗体の定常領域と結合する抗体等があげられる。また測定対象成分が蛋白質でない場合は、(c)工程で、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール等の蛋白質沈殿剤を添加して、免疫複合体のみを沈殿させた後、遠心分離することにより、免疫複合体と、免疫複合体に含まれない標識化競合物質を分離することができる。

【0031】

測定方法1の方法において、第1の抗体が不溶性担体に固定化されていない場合は、B/F分離の工程において、標識化抗体に結合せず、第1の抗体に結合する結合性物質を固定化した不溶性担体を添加するか、あるいは免疫複合体を生成させる工程を、標識化抗体に結合せず、第1の抗体に結合する結合性物質を固定化した不溶性担体の存在下で行い、それぞれ反応溶液を除去した後、不溶性担体を洗浄することにより、免疫複合体中の標識化抗体と免疫複合体に含まれない標識化抗体とを分離することができる。標識化抗体に結合せず、第1の抗体に結合する結合性物質としては、例えば、第1の抗体の作製に用いた動物種と標識化抗体に用いられる抗体(第2の抗体)の作製に用いた動物種とが異なる場合には、第1の抗体の作製に用いた動物種の免疫グロブリンに対する抗体等があげられ、第1の抗体が定常領域を有する抗体で、標識化抗体がFabやF(ab')<sub>2</sub>、Fab'等の定常領域を有しない抗体断片である場合であれば、第1の抗体の定常領域に特異的に結合する抗体等があげられる。

(8) 不溶性担体

抗体または競合物質を固定化するための不溶性担体としては、抗体または競合物質を安定に保持できるものであればいかなるものも包含される。不溶性担体の好ましい素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロ

10

20

30

40

50

ース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックス、磁性粒子や金属等があげられる。不溶性担体の好ましい形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックス等の微粒子、スティック等があげられる。例えば、1枚に96ウェルを有するポリスチレン製のマイクロタイタープレート等が好ましい。

#### (9) 抗体または競合物質の不溶性担体への固定化

抗体または競合物質の不溶性担体への固定化方法としては、物理学的結合を利用した方法と化学的結合を利用した方法またはこれらの併用等、公知の方法が用いられる。物理学的結合としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等があげられる。化学的結合としては、例えば共有結合、配位結合等があげられる。例えば、ポリスチレン製免疫測定用マイクロタイタープレートを不溶性担体として使用する場合には、プレート内のウェルに抗体または競合物質の溶液を添加して、1時間から1日間、4 ~ 30 でインキュベートすることにより、物理吸着させ固定化する方法をあげることができる。

10

#### 【0032】

抗体または競合物質は、直接、不溶性担体に固定化してもよいし、間接的に不溶性担体に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばアビジンを固定化した不溶性担体に、ビオチン化した抗体または競合物質を添加し、ビオチンとアビジンとの特異的結合を介して、抗体または競合物質を不溶性担体に固定化する方法があげられる。また、不溶性担体に、抗体に特異的に結合する抗体または競合物質に特異的に結合する抗体を固定化し、この抗体を介して抗体または競合物質を不溶性担体に固定化してもよい。あるいは、抗体または競合物質は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体に固定化してもよい。

20

#### 【0033】

リンカーとしては、例えば、抗体または測定対象成分の官能基と不溶性担体の側鎖の官能基の両者と共有結合できる分子であればどのようなものでもよい。好ましい態様は、例えば、抗体または測定対象成分が有する官能基と反応することができる第1の反応活性基と、不溶性担体の側鎖の官能基と反応することができる第2の反応活性基を同時に持つ分子であり、第1の反応活性基と第2の反応活性基が異なる基であることが好ましい。抗体または競合物質の官能基および不溶性担体はその表面に保持している官能基としては例えば、カルボキシ基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、N-ヒドロキシサクシニル基、マレイミド基等があげられる。リンカーにおける活性な反応性基としては、例えば、アリルアジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル、ペンタフルオロフェニル(PFP)エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基があげられる。

30

#### (10) 抗体または測定対象成分の標識

抗体または測定対象成分を標識する標識物質としては酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、タグ配列を含むポリペプチド、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子等があげられる。

#### 【0034】

酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ等があげられる。

蛍光物質としては、例えば、FITC(フルオレッセイン イソチオシアナート)、RITC(ローダミンB-イソチオシアナート)等があげられる。その他の蛍光物質として、例えばquantum dot(Science, 281, 2016-2018, 1998)、フィコエリスリン等のフィコビリ蛋白質、GFP(Green fluorescent Protein)、RFP(Red fluorescent Protein)、YFP(Yellow fluorescent Protein)、BFP(Blue fluorescent Protein)等の蛍光を発する蛋白質があげられる。

40

#### 【0035】

発光物質としては、例えば、アクリジニウムおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物

50

、ロフィン等があげられる。またルテニウム錯体化合物としては、電子供与体と共に電気化学的に発光する、Clin. Chem. 37, 9, 1534-1539, 1991に示されたものが好ましい。

放射性同位元素としては、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 等があげられる。

【0036】

タグ配列を含むポリペプチドとしては、FLAGペプチド（FLAGタグ、Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys）、ポリヒスチジン（Hisタグ、His His His His His His）、mycエピトープペプチド（mycタグ、Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu）、ヘマグルチニンエピトープペプチド（HAタグ、Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala）等があげられる。

10

【0037】

抗体または測定対象成分の標識化は、抗体または測定対象成分と標識物質それぞれが有する官能基の間で、リンカーを介してまたは介さず共有結合を生じる反応によって行うことができる。官能基としては、カルボキシル基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、ヒドロキシサクシニルエステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基等があげられる。この官能基同士の間で縮合反応を行わせることが可能である。

【0038】

リンカーを介さない結合方法としては例えば、EDC等のカルボジイミド化合物を用いる方法等があげられる。この場合、NHSまたはその誘導体等の活性エステルを使用することも可能である。イソチオシアナート基とアミノ基の間の縮合反応は、他の試薬を必要とせず、中性～弱アルカリ性の条件で混合するだけで進行するため、好ましい。

20

リンカーとしては、例えば、標識物質と抗体とをそれぞれの官能基を介して結合させうる分子であればどのようなものでもよい。好ましい態様は、例えば、抗体のアミノ酸残基と反応することができる第1の官能基と、標識物質の側鎖の官能基と反応することができる第2の官能基とを同一分子内に有する分子であり、第1の官能基と第2の官能基とが異なる基であることが好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基があげられる。

【0039】

放射性同位元素を化学的に結合させる方法としては、例えば文献（Antibody Immunocloning: Radiopharm., 3, 60, 1990）記載の方法があげられる。

30

標識物質が酵素、アビジン、蛍光を発する蛋白質、フィコビリ蛋白質、タグ配列を含むポリペプチド等のポリペプチドである場合には、公知の遺伝子組換え技術（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）にしたがって、標識物質と抗体の融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、発現ベクターを適当な宿主に導入して、宿主を培養することにより製造することができる。融合蛋白質をコードするDNAは、抗体および標識物質をそれぞれコードするDNAをPCR等でクローニングし、それぞれのDNAをリガーゼ反応で連結することにより得ることができる。

【0040】

40

前述の(6)の測定方法4に記載のホモジニアス法に用いられる標識物質1と2としては、1つの測定対象成分に結合して近接することにより相互作用を起こす標識物質があげられる。このような標識物質として、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET: fluorescence resonance energy transfer）を起こす蛍光物質があげられる。FRETとは、第1の蛍光物質が励起光を受光することによって生じた蛍光エネルギーが、近接する第2の蛍光物質の蛍光エネルギーとして利用される現象であり、2種類の蛍光物質が1～10nmまで近接することにより起こる。FRETを起こす蛍光物質の組み合わせとしては、一方の蛍光波長のスペクトルと、他方の励起波長のスペクトルとに重なりがある組合せがあげられる。蛍光物質としては、蛍光蛋白質、低分子有機蛍光色素、無機化合物等があげられる。FRETを起こす蛍光蛋白質の組み合わせとしては、例えばYFP[緑色蛍光蛋白質（G

50

F P ) の黄色変異体 ] と C F P [ 緑色蛍光蛋白質 ( G F P ) のシアン色変異体 ] との組み合わせ等があげられる。低分子有機蛍光色素の組み合わせとしては、例えば C y 3 と C y 5 の組み合わせがあげられる。無機化合物としては例えば q u a n t u m d o t ( Science, 281, 2016-2018, 1998 ) があげられる。

#### 【 0 0 4 1 】

また、ホモジニアス法での該標識物質の組み合わせとして、バイオルミネッセンス共鳴エネルギー移動 ( B R E T : bioluminescence resonance energy transfer ) を起こす、化学発光を生じる酵素と蛍光物質との組み合わせもあげることができる。B R E T を起こす酵素と蛍光物質との組み合わせとしては、酵素が基質を分解して生じる発光波長のスペクトルと、蛍光物質の励起波長のスペクトルとに重なりがある組合せがあげられる。例えば酵素としてウミシイタケルシフェラーゼ ( R l u c ) 、基質として例えばディープブルー C [ Deep Blue C、パッカーードバイオサイエンス ( Packard BioScience ) 社製 ]、蛍光物質として G F P を用いる組合せ等があげられる。この場合、R l u c による基質の分解によって 3 9 5 n m の波長の光が生じ、R l u c に G F P が近接することにより、G F P がこの光のエネルギーを受けて発する 5 1 0 n m の波長の蛍光を検出することができる。

#### 【 0 0 4 2 】

また、ホモジニアス法での該標識物質の組み合わせとして、標識物質 1 と標識物質 2 が近接して、ある配向性をもって結合したときに酵素活性を生じる物質の組み合わせがあげられる。例えば、標識物質の組み合わせとしては、標識物質 1 として - ガラクトシダーゼの サブユニット、標識物質 2 として - ガラクトシダーゼの サブユニットを用いる組合せ、標識物質 1 として R l u c の N 末端側ドメイン、標識物質 2 として R l u c の C 末端側ドメインを用いる組合せ等があげられる。

#### ( 1 1 ) 抗原抗体反応

抗原抗体反応は水性媒体中で行われることが好ましい。反応温度としては、例えば 0 ~ 5 0 があげられ、4 ~ 4 0 が好ましい。反応時間としては、5 分間 ~ 2 0 時間が好ましい。

#### ( 1 2 ) 標識量の測定

免疫複合体の標識の量の測定方法は、標識物質に応じて適切なものを選ぶことができる。すなわち、標識物質が発色物質すなわちある波長の光を吸収する物質の場合、或いは凝集等により生じる濁度 ( 吸光度 ) 変化量の場合、分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が蛍光物質の場合には、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が発光物質の場合には、発光光度計や発光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が放射性同位元素である場合、放射性同位元素の量は、放射活性をシンチレーションカウンター、  
- ウェルカウンター等により測定することができる。

#### 【 0 0 4 3 】

標識が酵素である場合、標識量は、酵素活性を測定することにより定量することができる。例えば酵素の基質を当該酵素と反応させ、生成した物質を測定することにより、標識量を測定することができる。

酵素がペルオキシダーゼである場合には、例えば吸光度法、蛍光法等によりペルオキシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および酸化発色型色原体の組み合わせとを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等があげられる。

#### 【 0 0 4 4 】

ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジジン、o - フェニレンジアミン、1 0 - N - カルボキシメチルカルバモイル - 3 , 7 - ビス ( ジメチルアミノ ) - 1 0 H - フェノチアジン ( C C A P )、1 0 - N - メチルカルバモイル - 3 , 7 -

10

20

30

40

50

ビス(ジメチルアミノ) - 10H - フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル) - 4, 4' - ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン ナトリウム塩(DA-64)、4, 4' - ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス〔3 - ビス(4 - クロロフェニル)メチル - 4 - ジメチルアミノフェニル〕アミン(BCMA)等があげられる。

#### 【0045】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カブラーとアニリン類(トリンダー試薬)との組み合わせ、カブラーとフェノール類との組み合わせ等があげられる。カブラーとしては、例えば 4 - アミノアンチピリン(4-AA)、3 - メチル - 2 - ベンゾチアゾリノンヒドラジン等があげられる。アニリン類としては、N-(3 - スルホプロピル)アニリン、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3 - メチルアニリン(TOOS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメチルアニリン(MAOS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン(DAOS)、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) - 3 - メチルアニリン(TOPS)、N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン(HDAOS)、N, N - ジメチル - 3 - メチルアニリン、N, N - ビス(3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) - 3 - メトキシアニリン、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル)アニリン、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン、N - (3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメチルアニリン、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3 - メトキシアニリン、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル)アニリン、N - エチル - N - (3 - メチルフェニル) - N' - サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N - エチル - N - (3 - メチルフェニル) - N' - アセチルエチレンジアミン、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 4 - フルオロ - 3, 5 - ジメトキシアニリン(F-DAOS)等があげられる。フェノール類としては、フェノール、4 - クロロフェノール、3 - メチルフェノール、3 - ヒドロキシ - 2, 4, 6 - トリヨード安息香酸(HTIB)等があげられる。

#### 【0046】

蛍光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および蛍光物質の組み合わせとを反応させ、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で生成した蛍光の強度を測定する方法等があげられる。当該蛍光物質としては、例えば4 - ヒドロキシフェニル酢酸、3 - (4 - ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、クマリン等があげられる。

#### 【0047】

発光法によるペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および発光物質の組み合わせとを反応させ、発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で生成した発光の強度を測定する方法等があげられる。当該発光物質としては、例えばルミノール化合物、ルシゲニン化合物等があげられる。

酵素がアルカリホスファターゼである場合には、例えば発光法等によりアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。発光法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する方法としては、例えばアルカリホスファターゼとその基質とを反応させ、生成した発光の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。アルカリホスファターゼの基質としては、例えば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・二ナトリウム塩(AMPPD)、2 - クロロ - 5 - {4 - メトキシスピロ[1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ)トリシクロ[3.3.1.1.3, 7]デカン] - 4 - イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CDP-Star<sup>TM</sup>)、3 - {

10

20

30

40

50

4 - メトキシスピロ [ 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2' - ( 5' - クロロ ) トリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1 3 , 7 ] デカン ] - 4 - イル } フェニルホスフェート・ニナトリウム塩 ( C S P D <sup>T M</sup> )、 [ 1 0 - メチル - 9 ( 1 0 H ) - アクリジニルイデン ] フェノキシメチルリン酸・ニナトリウム塩 ( L u m i g e n <sup>T M</sup> A P S - 5 ) 等があげられる。

【 0 0 4 8 】

酵素が - D - ガラクトシダーゼである場合には、例えば吸光度法 ( 比色法 )、発光法または蛍光法等により - D - ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法 ( 比色法 ) により - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば o - ニトロフェニル - - D - ガラクトピラノシド等があげられる。発光法により - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。 - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン・プラス [ Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ ( Applied Biosystems ) 社製 ] またはその類似化合物等があげられる。蛍光法により - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。 - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えば 4 - メチルウンベリフェリル - - D - ガラクトピラノシド等があげられる。

10

【 0 0 4 9 】

酵素がルシフェラーゼである場合には、例えば発光法等によりルシフェラーゼ活性を測定することができる。発光法によりルシフェラーゼ活性を測定する方法としては、例えばルシフェラーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。ルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等があげられる。

20

【 0 0 5 0 】

標識物質が蛍光物質、発光物質、放射性同位元素および酵素以外の場合には、当該標識物質に特異的に結合する物質を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、酵素等で標識した標識体と、免疫複合体中の標識化抗体または標識化競合物質を構成している当該標識物質とを結合させ、当該標識物質に特異的に結合する物質を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素を用いて、上記の記載と同様にして検出を行うことができる。標識物質に特異的に結合する物質としては、標識物質を特異的に結合する抗体、また標識物質がビオチンの場合は、アビジンやストレプトアビジン等があげられる。また、標識物質に特異的に結合する物質 ( 標識物質に特異的に結合する抗体、アビジンまたはストレプトアビジン等 ) を用いて、免疫複合体中の標識物質と結合させた後、標識物質に特異的に結合する物質に結合する抗体、例えば、抗体の定常領域に特異的に結合する抗体またはアビジンまたはストレプトアビジンに特異的に結合する抗体を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素で標識したものを結合させ、これらの抗体を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素を用いて、上記の記載と同様にして検出を行うこともできる。

30

【 0 0 5 1 】

これらの検出に用いる抗体、アビジンまたはストレプトアビジンや標識物質に特異的に結合する抗体、抗体の定常領域に特異的に結合する抗体、アビジンまたはストレプトアビジンに特異的に結合する抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、あるいは F a b、ペプシン処理により得られる F ( a b ' )<sub>2</sub>、ペプシン処理 - 還元処理により得られる F a b ' 等の F c 部分を除去した抗体フラグメントでもよい。

40

( 1 3 ) 測定対象成分の定量

測定対象成分の定量においては、標準物質、すなわち既知の濃度の該測定対象成分の溶液を用いて該測定対象成分の濃度と測定値 ( 標識由来の情報量 ) との関係を表す検量線を作成する必要がある。検量線を作成した後、試料を用いて測定を行い、得られた測定値と予め作成された検量線とから、該試料中の該測定対象成分の濃度を決定することができる

50

。(14) 水性媒体およびその他の共存物

本発明の免疫測定法において使用される水性媒体としては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられ、緩衝液が好ましい。緩衝液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH 1 ~ 11 の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、グッド緩衝剤等があげられる。

【0052】

グッド緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝剤、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝剤、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝剤、2-[N-(2-アセトアミド)アミノ]エタンスルホン酸(ACES)緩衝剤、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)緩衝剤、2-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エタンスルホン酸(BES)緩衝剤、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝剤、2-  
{N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}エタンスルホン酸(TES)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-スルホエチル)ピペラジン(HEPES)緩衝剤、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)緩衝剤、2-ヒドロキシ-3-  
{[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}プロパンスルホン酸(TAPSO)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸)(POP SO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)ピペラジン(HEPPSO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(3-スルホプロピル)ピペラジン(EPPS)緩衝剤、トリシン[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン]緩衝剤、ピシン[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン]緩衝剤、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノプロパンスルホン酸(TAPS)緩衝剤、2-(N-シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸(ChES)緩衝剤、3-  
(N-シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(CAPSO)緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)プロパンスルホン酸(CAPS)緩衝剤等があげられる。

【0053】

緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001 ~ 2.0 mol/L が好ましく、0.005 ~ 1.0 mol/L がより好ましく、0.01 ~ 0.1 mol/L が特に好ましい。

本発明の免疫測定法においては、金属イオン、塩類、糖類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等を共存させることができる。

【0054】

金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等があげられる。

塩類としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム等があげられる。

糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等があげられる。

防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質(ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、バイオエース、プロクリン300、プロキセル(Proxel)GXL等があげられる。

【0055】

蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ胎児血清(FBS)、カゼイン、ブロックエース(大日本製薬社製)等があげられる。

蛋白質安定化剤としては、例えばペルオキシダーゼ安定化緩衝液 [ Peroxidase Stabilizing Buffer、ダコサイトメーション (DakoCytomation) 社製 ] 等があげられる。

#### (15) 免疫測定用試薬

本発明の免疫測定用試薬は、本発明の免疫測定法に使用され得るものであり、上記(3)に記載した胆汁酸誘導体、要すれば、さらにポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含有する。具体的には、本発明の免疫測定用試薬としては、例えば(3)に記載した胆汁酸誘導体、要すれば、さらにポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含有すると共に、以下の(i)~(iii)からなる群より選ばれる要素を含有することを特徴とする試薬が挙げられる。

- (i) 該測定対象成分に結合する第1の抗体、および、該測定対象成分に結合する第2の抗体に標識が結合した標識化抗体；
- (ii) 競合物質に標識が結合した標識化競合物質、ならびに、該測定対象成分および該競合物質に結合する抗体；または、
- (iii) 競合物質、ならびに、該測定対象成分および該競合物質に結合し、かつ、標識が結合した標識化抗体。

#### 【0056】

本発明の免疫測定用試薬の形状は、本発明の免疫測定法を可能とする形状であれば特に制限はない。試薬の形状としては、例えば液状や凍結乾燥状態等の形状が挙げられる。凍結乾燥状態の試薬を使用する場合には、測定前に前述の水性媒体等で溶解して測定に供する。

本発明の免疫測定用試薬において使用される胆汁酸誘導体、測定対象成分に結合する抗体、競合物質、測定対象成分に結合する抗体に標識が結合した標識化抗体、標識化競合物質としては、例えば、それぞれ、前述の胆汁酸誘導体、測定対象成分に結合する抗体、競合物質、測定対象成分に結合する抗体に標識が結合した標識化抗体、標識化競合物質をあげることができる。また、本発明の免疫測定用試薬は、必要に応じて、前述の水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等を含有することができる。

#### 【0057】

また、本発明の免疫測定用試薬は、キットの形態で保存、流通されてもよい。キットとしては、2試薬系、3試薬系等の形態が挙げられるが、キットを構成する各試薬中の構成要素は、当業者が適宜選択することができる。例えば、胆汁酸誘導体を水性媒体に溶解して調製した溶液を試料希釈液としてキット中の1つの構成試薬とすることができる。

#### (16) 試料中のヘモグロビンの影響抑制方法

本発明は、ヘモグロビン含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法における、ヘモグロビンの影響を抑制する方法を提供する。ヘモグロビンの影響は、試料中の測定対象成分を免疫測定法により測定する際、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体を存在させることにより抑制される。試料中の測定対象成分の測定において、試料由来の胆汁酸誘導体とは別異の胆汁酸誘導体を存在させることにより、試料に含まれるヘモグロビンの影響が抑制されるため、測定対象成分の正確な測定が可能となる。

#### 【0058】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0059】

#### [1] 抗Mx A蛋白質モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス (Balb/c) に、モノクローナル抗体KM1124を生産するハイブリドーマ株KM1124 (FERM BP-4729) およびモノクローナル抗体KM1135を生産するハイブリドーマ株KM1135 (FERM BP-4731) をそれぞれ  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹ずつ腹腔内注射した。10~21日後に、ハイブリドーマ株が腹水癌化し、腹水のたまったマウスから腹水を採取した。採取

10

20

30

40

50

した腹水を3000rpmで5分間、遠心分離して固形分を除去し、上清を回収した。この上清から、カプリル酸沈殿法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) によりモノクローナル抗体を精製し、それぞれモノクローナル抗体 KM1124 およびモノクローナル抗体 KM1135 を取得した。

#### 【0060】

なお、KM1124は、ヒトMxA蛋白質のアミノ末端から220~297残基中に存在するエピトープ、KM1135はヒトMxA蛋白質のアミノ末端から10~220残基中に存在するエピトープとそれぞれ結合するマウスモノクローナル抗体である。

#### 【2】リコンビナントMxA蛋白質の調製

ヒトMxA蛋白質をコードするcDNAを含むNdeI-BamHI断片を、ベクター pET-14b [ノバジェン (Novagen)、EMDバイオサイエンシズ (EMD Biosciences) 社製] のNdeI-BamHI間に挿入して作製したヒトMxA蛋白質発現ベクター pET14b-MxA (Nucleic Acids Res, 32, 643-652, 2004) で *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS株を形質転換した。この形質転換体は、N末端にHisタグが付加したMxA蛋白質を発現する。

#### 【0061】

得られた形質転換体を、アンピシリンを含むLB培地5mLに植菌し、600nmの吸光度(OD600)が0.5になるまで37℃で振とう培養した。この培養液をアンピシリンを含むLB培地250mLに植菌し、600nmでの吸光度が0.3~0.5になるまで37℃で振とう培養した。ここに、イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を終濃度0.4mmol/Lになるように添加し、さらに37℃で2時間振とう培養して培養を終了した。培養液を4℃で3000rpm、10分間遠心分離して菌体を回収した。菌体はMxA蛋白質の調製まで-80℃で保存した。

#### 【0062】

MxA蛋白質は菌体内に不溶体 (inclusion body) の状態で存在していたので、菌体を氷上で融解させ、氷冷した結合緩衝液 (5mmol/Lイミダゾール、0.5mol/L塩化ナトリウム、20mmol/L Tris-HCl、pH7.9) 20mLを添加し、懸濁させた。菌体懸濁液に30秒ずつ5回の超音波処理をして菌体を破碎した後、4℃で4000rpmで10分間遠心分離を行った。上清を除き、沈殿に氷冷した結合緩衝液20mLを添加して懸濁させ、再び同様に超音波処理と遠心分離を行った。上清を除き、沈殿に6mol/L尿素を含む結合緩衝液20mLを添加し、懸濁させた。同様に超音波処理を行った後、氷上で30分間静置して不溶体を溶解させ、4℃で10000rpmで30分間遠心分離を行った。上清を回収して0.45nmミリポアフィルターでろ過した。

#### 【0063】

得られた溶液にNi-NTA His-Bindレジン (ノバジェン、EMDバイオサイエンシズ社製) 0.5mLを添加し、4℃で2時間回転させながら混和させ、Hisタグを介してレジンにMxA蛋白質を結合させた。4℃で3000rpmで2分間遠心分離し、レジンを回収した。レジンに氷冷した6mol/L尿素を含む結合緩衝液10mLを添加した後、4℃で3000rpmで2分間遠心分離し、レジンを回収した。この洗浄操作を再度繰り返した後、さらにレジンに氷冷した洗浄緩衝液 (6mol/L尿素、60mmol/Lイミダゾール、0.5mol/L塩化ナトリウム、20mmol/L Tris-HCl、pH7.9) 10mLを添加し、4℃で3000rpmで2分間遠心分離し、レジンを回収した。

#### 【0064】

レジンに氷冷した溶出緩衝液 (6mol/L尿素、1mol/Lイミダゾール、0.5mol/L塩化ナトリウム、20mmol/L Tris-HCl、pH7.9) 10mLを添加し、4℃で2時間回転させながら混和させ、レジンからMxA蛋白質を溶出させ、次いで4℃で3000rpmで2分間遠心分離し、上清をMxA蛋白質溶液として回収した。

10

20

30

40

50

### [ 3 ] 抗 M x A 蛋白質抗体固相化プレートの調製

[ 1 ] で調製した抗 M x A 蛋白質モノクローナル抗体 KM 1 1 3 5 を  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  になるように PBS で希釈し、96 ウェルマイクロタイタープレート [ ナルジェンヌンクインターナショナル (Nalge Nunc International) 社製 ] に  $100 \mu\text{L}$  / ウェルの量で分注した。3 日間放置後、上清を吸引除去し、25% ブロックエース (大日本製薬社製)、PBS  $300 \mu\text{L}$  を分注し室温で一晩静置しブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、PBS で洗浄した。真空乾燥機で 3 日間乾燥したものを、抗 M x A 蛋白質モノクローナル抗体固相化プレートとして使用した。

### [ 4 ] ペルオキシダーゼ標識抗 M x A 蛋白質抗体の調製

[ 1 ] で調製した抗 M x A 蛋白質モノクローナル抗体 KM 1 1 2 4 を以下のようにしてマレイミド法でペルオキシダーゼ (以下、POD と略す) と結合させ、POD 標識抗 M x A 蛋白質抗体を作製した。

#### 【 0 0 6 5 】

まず、抗 M x A 蛋白質抗体 KM 1 1 2 4  $2 \text{mg}$  を含む溶液の溶媒を  $0.1 \text{mol}/\text{L}$  ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) に置換し、 $0.086 \text{mg}$  の 2 - イミノチオラン塩酸塩 [ ピアース (Pierce) 社製 ] を添加し、攪拌後、30 で 30 分間反応させた。 $0.1 \text{mol}/\text{L}$  のリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックス (Sephadex) G 25 (アマシャム・バイオサイエンス社製) カラム (直径  $1.5 \text{cm} \times 30 \text{cm}$ ) を用いて、反応溶液中の未反応の 2 - イミノチオランを除去し、スルフヒドリル化した KM 1 1 2 4 を回収した。

#### 【 0 0 6 6 】

一方、抗 M x A 蛋白質抗体 KM 1 1 2 4 に対しモル比で 5 倍量にあたる POD (東洋紡績社製、ペルオキシダーゼ I - C)  $2.5 \text{mg}$  を  $0.1 \text{mol}/\text{L}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0)  $250 \mu\text{L}$  に溶解させた。この溶液を 30 で 5 分間加温した後、N, N - ジメチルホルムアミド (ナカライテスク社製) に溶解させた  $0.72 \text{mg}$  の N - (6 - マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド (EMCS、同仁化学研究所社製) を加えて攪拌し、30 で 30 分間反応させた。 $0.1 \text{mol}/\text{L}$  リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックス G 25 カラム (直径  $1.5 \text{cm} \times 30 \text{cm}$ ) を用いて、反応後の溶液のゲルろ過を行い、未反応の EMCS を除去し、マレイミド化した POD を回収した。

#### 【 0 0 6 7 】

上記で得られたスルフヒドリル化した抗 M x A 蛋白質抗体 KM 1 1 2 4 の溶液とマレイミド化した POD の溶液を混合し、30 で 1 時間反応させた。得られた標識化抗体は、POD 標識希釈液 (液状組成) 緩衝液 {  $50 \text{mmol}/\text{L}$  Bis - Tris (同仁化学研究所社製)、0.1% BSA [ インタージェン (InterGen) 社製 ] } にて 800 倍に希釈し使用した。

### [ 5 ] 試料希釈液の調製

以下の組成からなる試料希釈液をそれぞれ調製した。

#### 【 0 0 6 8 】

HEPES (pH 8.0)	$0.1 \text{mol}/\text{L}$	
界面活性剤	(第 1 表に記載の種類と濃度)	
NaCl	$1.5 \text{mol}/\text{L}$	
BSA	0.1%	
アジ化ナトリウム	0.1%	

### [ 6 ] サンドイッチ ELISA による M x A 蛋白質測定系の構築

前記 [ 2 ] で調製した M x A 蛋白質溶液を前記 [ 5 ] で調製した試料希釈液で希釈し、M x A 蛋白質の 0 (緩衝液のみ)、3.2、6.3、12.5、25、50、100、200 ng / mL の各濃度の溶液を調製し、測定試料とした。

#### 【 0 0 6 9 】

前記 [ 3 ] で作製した抗 M x A 蛋白質抗体固定化プレートに  $100 \mu\text{L}$  の測定試料を添加し、室温で 1 時間インキュベートし、抗体に測定試料中の M x A 蛋白質を結合させた。

測定試料を除去した後、洗浄液〔0.05%ツイーン20（関東化学社製）を含むPBS〕を400 $\mu$ L添加して除去する洗浄操作を5回行った。次いで、〔4〕で作製したPOD標識抗M $\times$ A蛋白質抗体溶液を100 $\mu$ L添加して室温で30分間反応させた。標識化抗体を除去し、洗浄液を400 $\mu$ L添加して除去する洗浄操作を5回行った。暗所で、0.05%テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を含むPODの発色基質TMB1ue〔セロロジカル（Serological）社製〕を100 $\mu$ L添加し、室温で10分間反応させた。0.5mol/L硫酸を100 $\mu$ L添加して室温で10分間インキュベーションして反応を停止させた。波長450nmの吸光度をプレートリーダーで測定した。その結果、測定試料中のM $\times$ A蛋白質の濃度の上昇にしたがって、吸光度の上昇が見られ、M $\times$ A蛋白質の測定ができることが示された。

10

## 【0070】

なお、実際に血液中のM $\times$ A蛋白質を測定する場合には、このようにして得られた標準曲線を用いて血液中のM $\times$ A蛋白質を換算することによって行う。

〔7〕血液を用いたM $\times$ A蛋白質の添加回収試験

ウィルス感染が認められM $\times$ A陽性を示す患者2例と、健常者3例からEDTA・2Na採血管を用いて採取した血液を用いた。

## 【0071】

この血液を〔5〕の試料希釈液で10倍希釈した試料を、〔6〕記載の方法で各試料中のM $\times$ A蛋白質濃度を測定し、M $\times$ A蛋白質無添加試料中のM $\times$ A蛋白質濃度（以下、Aと略記する）とした。

20

次にこの試料溶液9容に対し、前記〔2〕で調製した500ng/mLのM $\times$ A蛋白質溶液を1容添加した試料を、〔6〕記載の方法で各試料中のM $\times$ A蛋白質濃度を測定し、M $\times$ A蛋白質添加試料中のM $\times$ A蛋白質濃度（以下、Bと略記する）として、次式によりM $\times$ A蛋白質回収率（%）を計算した。

## 【0072】

## 【数1】

$$M \times A \text{蛋白質回収率} (\%) = (B - A) / 50 * 100 \quad (\text{式1})$$

## 【0073】

M $\times$ A蛋白質回収率（%）は、ヘモグロビンによる影響が完全に抑制されたときに理論的に100%となり、ヘモグロビンの影響が出るに従い、低い値となる。

30

## 比較例1

実施例1の〔5〕の組成より界面活性剤を除いたものを試料希釈液として用いる以外は実施例1と同様の方法により、添加回収試験を行った。

## 比較例2

実施例1の〔5〕の組成中、界面活性剤を0.2%ノニデットP40とすること以外は実施例1と同様の方法により、添加回収試験を行った。

## 【0074】

## 【表1】

40

第1表

界面活性剤	濃度 (%)	M $\times$ A蛋白質回収率 (%)					
		陽性1	陽性2	陰性1	陰性2	陰性3	平均
CHAPS	4.9	88.9	96.6	97.5	93.8	88.2	93.0
CHAPSO	5.0	76.3	92.1	100.0	91.4	86.9	89.3
BIGCHAP	2.5	76.7	91.8	103.3	86.6	88.2	89.3
deoxy-BIGCHAP	1.2	70.6	82.9	82.8	81.4	72.5	78.0
無添加 (比較例1)	0	70.2	67.0	66.9	75.7	72.8	70.5
ノニデットP-40 (比較例2)	0.2	67.9	75.7	82.6	68.2	67.9	72.5

50

## 【 0 0 7 5 】

第 1 表に示すように、胆汁酸誘導体を添加して測定することにより M x A 蛋白質回収率の値は上昇し、ヘモグロビンの影響を抑制していることが判る。

## 【 実施例 2 】

## 【 0 0 7 6 】

4 . 9 % C H A P S を含む前記 [ 5 ] に記載の試料希釈液組成にノニデット P - 4 0 を添加することによる感度の検討を行った。前記 [ 5 ] 記載の試料希釈液にノニデット P - 4 0 を 0、0 . 2 %、1 %、1 . 4 % 添加し、前記 [ 2 ] で調製した M x A 蛋白質 0 ( 緩衝液のみ )、3 . 2、6 . 3、1 2 . 5、2 5、5 0、1 0 0、2 0 0 n g / m L の各濃度の溶液を調製し、実施例 1 の [ 6 ] 記載の方法で吸光度 ( A b s ) を測定した。結果を第 2 表に示す。

## 【 0 0 7 7 】

## 【 表 2 】

第 2 表

M x A 蛋白質 ( n g / m L )	ノニデット P - 4 0 添加濃度 (%)			
	0 . 0	0 . 2	1 . 0	1 . 4
0	0.022	0.022	0.022	0.022
3	0.038	0.041	0.055	0.060
6	0.055	0.061	0.087	0.096
1 2	0.082	0.093	0.140	0.157
2 4	0.139	0.158	0.244	0.273
4 8	0.243	0.274	0.424	0.477
9 6	0.433	0.496	0.761	0.853
1 9 2	0.810	0.915	1.387	1.528

## 【 0 0 7 8 】

第 2 表に示すとおり、ノニデット P - 4 0 の添加量に依存した吸光度の上昇が認められ測定感度が上昇することがわかる。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 7 9 】

ウィルス感染が認められ M x A 蛋白質陽性を示す患者 2 例と、健常者 3 例から E D T A · 2 N a 採血管を用いて採血した血液を試料として用いた。

試料希釈液として、4 . 9 % C H A P S を含む試料希釈液および 4 . 9 % C H A P S および 1 . 4 % ノニデット P - 4 0 を含む試料希釈液を用いる以外実施例 1 と同様にして M x A 蛋白質回収率を求めた。結果を第 3 表に示す。

## 【 0 0 8 0 】

## 【 表 3 】

第 3 表

界面活性剤	M x A 蛋白質回収率 (%)					
	陽性 3	陽性 4	陰性 4	陰性 5	陰性 6	平均
CHAPS	93.9	89.3	96.1	97.5	98.3	95.0
CHAPS + ノニデット P - 4 0	90.1	83.8	96.1	100.5	104.2	94.9

## 【 0 0 8 1 】

第 3 表に示すように、添加回収率はノニデット P - 4 0 を添加しても低下しないことが

わかる。

【産業上の利用可能性】

【0082】

本発明により、臨床診断に有用な、ヘモグロビンの影響が抑制された、ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分の免疫測定法等が提供される。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/53 D

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 川村 みづほ

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所  
内

(72)発明者 富田 聡仁

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所  
内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 国際公開第02/073202(WO,A1)  
国際公開第2004/106930(WO,A1)  
特開2001-164125(JP,A)  
米国特許出願公開第2001/0008972(US,A1)  
特許第3539567(JP,B2)  
米国特許第05952009(US,A)  
特開2002-202302(JP,A)  
国際公開第02/090930(WO,A1)  
特開2006-234831(JP,A)  
特開平04-194664(JP,A)  
J. Interferon Res., 1992,Vol.12, p.67-74

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3 1

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	待测组分的免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP5557450B2</a>	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	JP2008542184	申请日	2007-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
[标]发明人	川村みづほ 富田聡仁		
发明人	川村 みづほ 富田 聡仁		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/68 G01N33/721 C07K16/18 Y10T436/25125		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.501.J G01N33/543.501.M G01N33/543.511.J G01N33/543.511.M G01N33/53.D		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一 正人大关		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2006299498 2006-11-02 JP		
其他公开文献	JPWO2008053973A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种在含有血红蛋白的样品中免疫测定待测组分的方法，该方法包括使含有血红蛋白的样品中待测组分与能够在不同于胆汁酸的胆汁酸衍生物存在下与该组分结合的抗体反应样本中固有的衍生物；一种抑制血红蛋白干扰的方法，用于在含有血红蛋白的样品中免疫测定待测组分，该方法包括使含有血红蛋白的样品中待测组分与能够在胆汁酸存在下与该组分结合的抗体反应衍生物不同于样品中固有的胆汁酸衍生物；描述了含有血红蛋白的样品中待测组分的免疫测定试剂，所述血红蛋白包含胆汁酸衍生物。

第1表

界面活性剂	濃度 (%)	M x A蛋白質回収率 (%)					
		陽性1	陽性2	陰性1	陰性2	陰性3	平均
CHAPS	4.9	88.9	96.6	97.5	93.8	88.2	93.0
CHAPSO	5.0	76.3	92.1	100.0	91.4	86.9	89.3
BIGCHAP	2.5	76.7	91.8	103.3	86.6	88.2	89.3
deoxy-BIGCHAP	1.2	70.6	82.9	82.8	81.4	72.5	78.0
無添加 (比較例1)	0	70.2	67.0	66.9	75.7	72.8	70.5
ノニデットP-40 (比較例2)	0.2	67.9	75.7	82.6	68.2	67.9	72.5