

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

**特許第3772267号**  
**(P3772267)**

(45) 発行日 平成18年5月10日(2006.5.10)

(24) 登録日 平成18年2月24日(2006.2.24)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 Q  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 1 5 D  
 GO 1 N 33/543 5 4 1 Z

請求項の数 3 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2001-367230 (P2001-367230)	(73) 特許権者	000138277
(22) 出願日	平成13年11月30日(2001.11.30)		株式会社三菱化学ヤトロン
(65) 公開番号	特開2003-166994 (P2003-166994A)		東京都新宿区西五軒町13番1号
(43) 公開日	平成15年6月13日(2003.6.13)	(74) 代理人	100090251
審査請求日	平成16年4月6日(2004.4.6)		弁理士 森田 憲一
		(74) 代理人	100139594
			弁理士 山口 健次郎
		(72) 発明者	黒田 隆
			東京都千代田区東神田1丁目11番4号
			株式会社ヤトロン内
		(72) 発明者	杉山 和之
			東京都千代田区東神田1丁目11番4号
			株式会社ヤトロン内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルゲン特異的 I g E の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 異なる色調を有する複数種の直径2～5mmの着色ビーズに、その色調毎に異なるアレルゲンを結合させる工程；

(2) 前記工程(1)で得られたアレルゲン結合着色ビーズと、前記の各アレルゲンとそれぞれ特異的に反応する各免疫グロブリンEを含む可能性のある被検試料とを、接触させる工程；

(3) 前記アレルゲン結合着色ビーズを、その色調毎に単離する工程；

(4) 前記工程(3)で単離した各アレルゲン結合着色ビーズと、標識物質で標識化した抗免疫グロブリンE抗体とを、それぞれ接触させる工程；及び

(5) 各アレルゲン結合着色ビーズと、そのアレルゲンに特異的に反応する免疫グロブリンEと、標識化抗免疫グロブリンE抗体とからなる各免疫複合体に含まれる標識物質に由来する各信号、あるいは、前記各免疫複合体に含まれない未反応の標識化抗免疫グロブリンE抗体に含まれる標識物質に由来する各信号を、それぞれ分析する工程を含むことを特徴とする、アレルゲン特異的免疫グロブリンEの分析方法。

【請求項2】

(1) 異なる色調を有する複数種の直径2～5mmの着色ビーズに、その色調毎に異なるアレルゲンを結合させる工程；

(2) 前記工程(1)で得られたアレルゲン結合着色ビーズと、前記の各アレルゲンとそれぞれ特異的に反応する各免疫グロブリンEを含む可能性のある被検試料とを、接触させ

る工程；

(3) 前記工程(2)で得られた混合物と、標識物質で標識化した抗免疫グロブリンE抗体とを、それぞれ接触させる工程；

(4) 前記アレルギー結合着色ビーズを、その色調毎に単離する工程；及び

(5) 前記工程(4)で単離した各アレルギー結合着色ビーズと、そのアレルギーに特異的に反応する免疫グロブリンEと、標識化抗免疫グロブリンE抗体とからなる各免疫複合体に含まれる標識物質に由来する各信号を、それぞれ分析する工程

を含むことを特徴とする、アレルギー特異的免疫グロブリンEの分析方法。

【請求項3】

(1) 異なる色調を有し、しかも、その色調毎に異なるアレルギーをその表面に担持する複数種の直径2～5mmの着色ビーズと； 10

(2) 標識物質で標識化した抗免疫グロブリンE抗体とを含むことを特徴とする、前記の各アレルギーのいずれか1種とのみ特異的に反応する免疫グロブリンEの分析用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アレルギー特異的免疫グロブリンE(IgE)の分析方法に関する。なお、本明細書における前記「分析」には、分析対象であるアレルギー特異的IgEの量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象であるアレルギー特異的IgEの存在の有無を判定する「検出」との両方が含まれる。 20

【0002】

【従来の技術】

免疫グロブリンE(IgE)は、1966年石坂らによって発見された分子量約19万の抗体分子でI型アレルギーに深く関わっていることが知られている。I型アレルギーの代表的疾患として、例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、又はじんましんを挙げることができ、これらの疾患において、血清中のIgE濃度(総IgE濃度)はある程度病状を反映していることが知られている。

【0003】

一方、その抗体分子の特質として、抗原に対して高い特異結合性を有しており、この反応性は疾患の原因抗原(アレルギー)特定に利用されている。古典的な方法として、皮膚テスト(例えば、スクラッチテスト、プリックテスト、皮内テスト、又はP r a u s n i t z - K u s t n e rテスト)がある。この方法は、アレルギー溶液を、針で掻いた傷や皮内注射を通して患者の皮膚に入れ、発赤又は膨疹のような生体反応の程度により、原因抗原を推定する方法である。また、アレルギーと思われる成分を少量吸入又は摂食することにより、病状の度合を観察する誘発試験なども従来より行なわれている。これらの試験は、いずれも患者自身の生体反応を観察するものであり、患者に苦痛を与えるばかりでなく、十分な管理の下に行なわれないと、しばしば危険を伴う。 30

【0004】

このような不都合を回避するために、近年、抗原抗体反応を応用したCAP-RAST(ファルマシア社)又はAlaSTAT(DPC社)をはじめとする、試験管内でアレルギー特異的なIgE量を測定する方法(インビトロ検査)が広く行なわれるようになってきている。 40

すなわち、生体内に発現したIgEを各種アレルギー(例えば、ダニ、スギ、ダスト、又はミルク等のアレルギー誘発物質)と反応させ、次いで、酵素又は放射性物質等で標識した抗IgE抗体と前記複合体とを反応させ、その標識物質由来の信号を検出することで、アレルギー特異的IgE量を測定するものである。

【0005】

また、同時に多項目のアレルギー検索を行なう測定系としては、いわゆる、MAST法(MAST社)がある。例えば、MAST法を利用した市販の製品(例えば、MAST26 50

； M A S T社）では、異なる26アレルゲンを、それぞれ別々に固相化したセルロール糸を張った担体が専用反応容器に納められており、患者血清中の対応する特異的I g Eを同時に測定することができる。

【0006】

ところで、特異的I g Eが関与するI型アレルギー疾患の代表的な疾患として、例えば、アトピー性皮膚炎又は気管支喘息を挙げることができる。これらの多くの症例は、生後数ヶ月から学童期を発症年齢としており、ハウスダスト、チリダニ、若しくはカビなどの吸入性抗原、又は卵白、牛乳、若しくは小麦などの食餌性抗原がアレルゲンとして報告されている。自覚症状の十分な伝達能力を持たない年齢層の患者において症状の重篤化及び/又は長期化を避けるためにも、アレルゲンを特定して早期に摂取制限することは治療上極めて重要なことであり、インビトロ検査による血清中のアレルゲン特異的I g E濃度の測定は、临床上重要な意義をもつと考えられる。ところが、従来インビトロ検査は、最低数十～数百 $\mu$ Lの血清を必要とするため、小児（特に乳幼児）からこのような大量のサンプルを回収することは困難で、しばしばインビボ検査に頼らざるを得ない状況であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の課題は、従来技術の前記の欠点を解消し、少量の被検試料（例えば、血清又は乾燥ろ紙血など）中のアレルゲン特異的I g E量を、複数のアレルゲンを対象に、同時且つ高感度に分析（特には測定）する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

前記課題は、本発明による、

（1）異なる色調を有する複数種の直径2～5mmの着色ビーズに、その色調毎に異なるアレルゲンを結合させる工程（以下、アレルゲン結合工程と称する）；

（2）前記工程（1）で得られたアレルゲン結合着色ビーズと、前記の各アレルゲンとそれぞれ特異的に反応する各免疫グロブリンEを含む可能性のある被検試料とを、接触させる工程（以下、被検試料接触工程と称する）；

（3）前記アレルゲン結合着色ビーズを、その色調毎に単離する工程（以下、単離工程と称する）；

（4）前記工程（3）で単離した各アレルゲン結合着色ビーズと、標識物質で標識化した抗免疫グロブリンE抗体とを、それぞれ接触させる工程（以下、標識化2次抗体接触工程と称する）；及び

（5）各アレルゲン結合着色ビーズと、そのアレルゲンに特異的に反応する免疫グロブリンEと、標識化抗免疫グロブリンE抗体とからなる各免疫複合体に含まれる標識物質に由来する各信号、あるいは、前記各免疫複合体に含まれない未反応の標識化抗免疫グロブリンE抗体に含まれる標識物質に由来する各信号を、それぞれ分析する工程（以下、分析工程と称する）

を含むことを特徴とする、アレルゲン特異的免疫グロブリンEの分析方法によって解決することができる。

また、本発明は、

（1）異なる色調を有する複数種の直径2～5mmの着色ビーズに、その色調毎に異なるアレルゲンを結合させる工程；

（2）前記工程（1）で得られたアレルゲン結合着色ビーズと、前記の各アレルゲンとそれぞれ特異的に反応する各免疫グロブリンEを含む可能性のある被検試料とを、接触させる工程；

（3）前記工程（2）で得られた混合物と、標識物質で標識化した抗免疫グロブリンE抗体とを、それぞれ接触させる工程；

（4）前記アレルゲン結合着色ビーズを、その色調毎に単離する工程；及び

（5）前記工程（4）で単離した各アレルゲン結合着色ビーズと、そのアレルゲンに特異的に反応する免疫グロブリンEと、標識化抗免疫グロブリンE抗体とからなる各免疫複合

10

20

30

40

50

体に含まれる標識物質に由来する各信号を、それぞれ分析する工程を含むことを特徴とする、アレルギー特異的免疫グロブリンEの分析方法に関する。

更に、本発明は、

(1)異なる色調を有し、しかも、その色調毎に異なるアレルギーをその表面に担持する複数種の直径2～5mmの着色ビーズと；

(2)標識物質で標識化した抗免疫グロブリンE抗体を含むことを特徴とする、前記の各アレルギーのいずれか1種とのみ特異的に反応する免疫グロブリンEの分析用キットに関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の分析方法は、(1)アレルギー結合工程、(2)被検試料接触工程、(3)単離工程、(4)標識化2次抗体接触工程、及び(5)分析工程を含む。本発明の分析方法は、前記工程(1)～(5)をこの順に実施することもできるし、あるいは、工程(3)及び(4)の順序を逆にし、アレルギー結合工程、被検試料接触工程、標識化2次抗体接触工程、単離工程、及び分析工程の順に実施することもできる。

本発明の分析方法では、アレルギーを固相化した複数の着色ビーズを1つの反応チューブ中で被検試料と反応させた後、着色ビーズの色によって個々の反応槽に分け、ビーズ表面で形成されたアレルギーと特異的IgEとの免疫複合体を、標識物質で標識された抗ヒトIgE抗体を使った検出系を利用して、それぞれのアレルギー特異的IgE抗体価を同時に測定することができる。これにより、被検試料の微量化が可能となり、従来乳幼児から充分量の採取が困難であった血清、血液、又は紙血などを測定対象とすることができる。

【0010】

ビーズの着色

本発明の分析方法では、異なる色調を有する複数種の着色したビーズを用いる。多様に着色されたビーズは市販されており、本発明の分析方法では、これらの市販ビーズを用いることができる。

ビーズのサイズは、直径2mm～5mmである。これより小粒径だと、分配操作が煩雑になることがある。また、これより大粒径だと、試料の量が多く必要になり、また、反応効率の面からも好ましくない。

材質としては、反応系に不利益を生じさせなければ、無機物質又は有機物質のいずれも使用することができ、特に限定されるものではないが、好ましくは、高分子物質、例えば、ポリスチレンビーズ又はポリプロピレン、あるいは、ガラスなどを挙げることができる。

【0011】

着色ビーズは、市販品を用いる代わりに、従来公知の方法により調製することもできる。例えば、ビーズとして、ポリスチレンビーズ[イムノビーズA26(直径=3.2mm);イムノケミカル社]を用いる場合には、例えば、適当な色素[例えば、メチルイエロー(Methyl Yellow;東京化成工業)、ソルベントブルー35(Solvent Blue 35;Aldrich Chemical Company)、オイルオレンジSS(Oil Orange SS;東京化成工業)、又はオイルレッドEGN(Oil Red EGN;Aldrich Chemical Company)等]を50%アセトン水溶液に溶解した着色液中で攪拌した後、精製水で洗浄することにより、調製することができる。前記色素としては、油溶性染料が使いやすいが、水溶性染料を用いることも可能である。

【0012】

ビーズへのアレルギー固相

各アレルギーを着色ビーズに結合させる方法も、特に限定されるものではなく、従来公知の手段、例えば、いわゆる物理的吸着又は化学結合法等により実施することができる。

10

20

30

40

50

例えば、物理的吸着の場合には、着色ビーズを、各アレルゲンの抽出液を適当な濃度に希釈した水溶液中で攪拌した後、緩衝液で洗浄し、乾燥することにより、アレルゲン結合着色ビーズを調製することができる。

また、化学結合法としては、例えば、ビーズの表面に予めビオチンを固相化しておき、同じくビオチンを結合させたアレルゲンを、アビジンを介して結合させる方法、あるいは、適当な官能基（例えば、カルボキシル基、アミノ基、又はスルフヒドリル基等）の官能基修飾を受けたビーズと、アレルゲンを、架橋剤（例えば、カルボジイミド又はN - ヒドロキシスクシンイミド等）を介して結合させる方法などを挙げるることができる。

【0013】

#### アレルゲン

本発明の分析方法で用いることのできるアレルゲンとしては、特に限定されるものではないが、例えば、ハウスダスト、チリダニ、食物、花粉、真菌、昆虫、寄生虫、化学物質、又は薬物等、従来公知のアレルゲンを対象とすることができる。各アレルゲンとして、市販品〔例えば、グリア（GREEN）社などから入手可能〕を用いることもできるし、あるいは、所望のアレルゲンを調製することもできる。例えば、原料となる抗原物質をそのまま、あるいは、粉碎処理した後、場合によっては有機溶剤（例えば、エーテル、アセトン、又はヘキサンなど）で脱脂処理を行なった後、緩衝液〔例えば、リン酸緩衝溶液（PBS）など〕中で攪拌抽出し、遠心上清を適当なタンパク濃度に希釈することにより、アレルゲンを調製することができる。

【0014】

#### 被検試料

本発明の分析方法で分析することのできる被検試料は、前記アレルゲンに特異的に反応するIgEを含む可能性のある試料である限り、特に限定されるものではなく、臨床診断に一般的に用いられる生体由来液、例えば、血清、血液、又はろ紙血などを挙げる事ができる。

【0015】

#### 抗IgE抗体及び標識物質

抗IgE抗体を標識化するのに用いる標識物質としては、公知の標識物質、例えば、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、パーオキシダーゼ、又はルシフェラーゼ）、蛍光物質（例えば、ユーロピウム）、発光物質（例えば、アクリジニウム誘導体、又はアダマンタン）、放射性物質（例えば、 $^{125}\text{I}$ ）等を挙げる事ができる。また、標識物質に合わせて、例えば、基質液又は発光誘発物質等を適宜選択することができる。また、抗IgE抗体としては、分析対象であるIgEと特異的に反応することができる限り、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれを用いることもできるし、あるいは、その断片、例えば、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、Fab、Fab'、又はFvを用いることもできる。

【0016】

#### 操作手順

以下、（1）アレルゲン結合工程、（2）被検試料接触工程、（3）単離工程、（4）標識化2次抗体接触工程、及び（5）分析工程をこの順に実施する態様を例にとって、本発明の分析方法を説明する。

本発明の分析方法におけるアレルゲン結合工程では、異なる色調を有する複数種の着色ビーズに、その色調毎に異なるアレルゲンを結合させる。

続く、本発明の分析方法における被検試料接触工程では、前記アレルゲン結合工程で得られたアレルゲン結合着色ビーズと、前記の各アレルゲンとそれぞれ特異的に反応するIgEを含む可能性のある被検試料とを、接触させる。被検試料中に、アレルゲン結合着色ビーズに結合させた或る特定のアレルゲンと特異的に反応するIgEが存在する場合には、前記着色ビーズ上で、前記アレルゲンと前記アレルゲン特異的IgEとの免疫複合体がそれぞれ形成される。

【0017】

10

20

30

40

50

続いて、本発明の分析方法における単離工程では、前記アレルゲン結合着色ビーズを、その色調毎に単離する。アレルゲン結合着色ビーズを色調毎に単離する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、目視により、単離手段（例えば、ピンセット又はアスピレータ）を用いて単離することができる。

各アレルゲン結合着色ビーズを単離した後、次の標識化2次抗体接触工程に移る前に、所望により、各アレルゲン結合着色ビーズの洗浄操作を実施することが好ましい。この洗浄操作により、アレルゲン結合着色ビーズ上に非特異的に残存する未反応物質を除去することができる。

#### 【0018】

本発明の分析方法における標識化2次抗体接触工程では、前記工程で単離した各アレルゲン結合着色ビーズと、標識物質で標識化した抗IgE抗体とを、それぞれ接触させる。次の分析工程に移る前に、所望により、各アレルゲン結合着色ビーズの洗浄操作を実施することが好ましい。この洗浄操作により、アレルゲン結合着色ビーズ上に非特異的に残存する未反応物質を除去することができる。

#### 【0019】

続く、本発明の分析方法における分析工程では、各アレルゲン結合着色ビーズと、そのアレルゲンに特異的に反応するIgEと、標識化抗IgE抗体とからなる各免疫複合体に含まれる標識物質に由来する各信号、あるいは、前記各免疫複合体に含まれない未反応の標識化抗IgE抗体に含まれる標識物質に由来する各信号を、それぞれ分析する。標識物質に由来する各信号の分析方法は、使用する標識物質の種類に応じて、適宜選択することができる。

例えば、複数種のアレルゲンの内、第1のアレルゲンを結合させた第1のアレルゲン結合着色ビーズ上に形成される免疫複合体に含まれる標識物質に由来する信号、あるいは、前記免疫複合体に含まれない未反応の標識化抗IgE抗体に含まれる標識物質に由来する信号を分析することにより、第1のアレルゲンに特異的に反応するIgE、すなわち、第1のアレルゲン特異的IgE量を決定することができる。同様にして、各アレルゲン結合着色ビーズ上に形成される各免疫複合体に含まれる標識物質に由来する各信号、あるいは、各免疫複合体に含まれない未反応の標識化抗IgE抗体に含まれる標識物質に由来する各信号を、それぞれ分析することにより、各アレルゲンに特異的に反応する各IgE量を決定することができる。

#### 【0020】

なお、標識化2次抗体接触工程及び単離工程の順序を逆にし、アレルゲン結合工程、被検試料接触工程、標識化2次抗体接触工程、単離工程、及び分析工程の順に実施する場合には、前記分析工程では、各アレルゲン結合着色ビーズと、そのアレルゲンに特異的に反応するIgEと、標識化抗IgE抗体とからなる各免疫複合体に含まれる標識物質に由来する各信号を分析することにより、アレルゲン特異的IgE量を決定することができる。

#### 【0021】

本発明の分析方法は、(1)アレルゲン結合工程、(2)被検試料接触工程、(3)単離工程、(4)標識化2次抗体接触工程、及び(5)分析工程を含む限り、特に限定されるものではないが、より具体的には、例えば、以下の手順に従って、実施することができる。

#### 【0022】

(アレルゲン結合着色ビーズの調製)

まず、複数種（例えば、7種）の異なるアレルゲンを、色調の異なる複数種（例えば、7種）のビーズにそれぞれ結合させる。

(第1反応)

得られた複数種のアレルゲン結合着色ビーズが各々適当個数（例えば、1個）ずつ入ったサンプルカップに、検体希釈液（兼抽出液）適当量（例えば、200 $\mu$ L）を分注し、被検試料（例えば、血清10 $\mu$ L又は乾燥る紙血1パンチ）を加えて、室温で数時間～一晚の間、攪拌しながらインキュベートする。

10

20

30

40

50

( ビーズトランスファー )

単離手段 ( 例えば、ピンセット等 ) を用い、サンプルカップからマイクロタイタープレート ( 例えば、96穴マイクロタイタープレート ) に、1ビーズ/ウェルとなるように、アレルギー結合着色ビーズを分配する。

( 第1洗浄 )

各ウェル中の未反応物質を除去する。例えば、自動洗浄機により、精製水又はPBS等 ( 例えば、300 $\mu$ Lで5回 ) で洗浄する。

( 標識化抗体の添加 )

標識物質を結合した抗IgE抗体 ( 例えば、アルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgE抗体 ) を適量 ( 例えば、100 $\mu$ L/ウェル ) 添加し、室温で所定時間 ( 例えば、1時間 ) 10  
 ) 攪拌しながらインキュベートする。

( 第2洗浄 )

再度、例えば、自動洗浄機により、精製水又はPBS等 ( 例えば、300 $\mu$ Lで5回 ) で洗浄する。

( 発光基質液添加 )

所望により、信号誘発物質を添加する。例えば、標識物質としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、信号誘発物質として、例えば、アダマンチルジオキセタン誘導体 ( AMP PD ; 例えば、100 $\mu$ L/ウェル ) を添加し、室温で所定時間 ( 例えば、30分間 ) 20  
 ) 攪拌しながらインキュベートする。

( 測光 )

自動測光機 ( 例えば、Luminous CT-9000D ; ダイアヤトロン ) で各ウェル中のビーズの発光量を測定する。

【 0 0 2 3 】

本発明の分析用キットは、( 1 ) 異なる色調を有し、しかも、その色調毎に異なるアレルギーをその表面に担持する複数種の着色ビーズと、( 2 ) 標識物質で標識化した抗IgE抗体とを含む。

本発明の分析用キットは、例えば、本発明の分析方法に用いることができる。

【 0 0 2 4 】

【 実施例 】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。 30

【 実施例 1 】

本実施例では、アレルギー疾患をもつ患者19例より血清を採取し、本発明の分析方法により、以下に示す手順に従って、ヤケヒョウヒダニ、卵白、牛乳、小麦、米、ピーナッツ、及び大豆に対する反応性を測定し、発光量 ( cps ) を観察した。また、対照として、AlaSTATマイクロプレート ( AlaSTAT Microplate ; Diagnostic Products Corporation ) の測定結果 ( IU/mL ) との比較を行なった。

【 0 0 2 5 】

直径3.2mmのポリスチレンビーズ7種 [ イムノビーズ ; A - 26、A - 26 GREEN、A - 26 ORANGE、A - 26 BLUE、A - 26 PINK、A - 26 RED、及びA - 26 YELLOW ; イムノケミカル ( 株 ) ] を、20個/mLとなるように、ヤケヒョウヒダニ、卵白、牛乳、小麦、米、ピーナッツ、及び大豆の各アレルギー固相液にそれぞれ添加し、18時間攪拌した後、PBSで洗浄し、吸湿紙上で室温乾燥させた。 40

前記アレルギー固相液としては、グリア社より購入したアレルギー抽出物 ( Allergen Extract )、すなわち、ヤケヒョウヒダニ ( Dermatophagoides pteronyssinus )、卵白 ( Egg, Chicken, White )、牛乳 ( Milk, Cow )、小麦 ( Wheat )、米 ( Rice )、ピーナッツ ( Peanut )、及び大豆 ( Soybean ) を使用した。 50

## 【0026】

得られた7種類のアレルゲン結合着色ビーズ各1個ずつ(計7ビーズ)を、反応チューブ(エッペンドルフテストチューブ, Safe-Lock, 2.0 mL)に、PBS [0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5)] 190 μL とともに入れ、患者19例より採取した各血清10 μL を添加した後、室温下18時間撹拌した。

ピンセットを用い、各ビーズを96穴マイクロタイタープレート(Round bottom plate, #3792; Coaster社)に、1ビーズ/ウェルとなるように分配し、自動洗浄機で洗浄(洗浄液: PBS)した後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgEモノクローナル抗体(Diagnostic Products Corporation)溶液(濃度=0.05 μg/mL)100 μL/ウェルを分注して、室温1時間撹拌した。自動洗浄機で洗浄後、発光基質(PPD試薬; Diagnostic Products Corporation)100 μL/ウェルを分注した。30分室温下撹拌した後、測定機(Luminous CT-9000D; ダイアヤトロン)で発光量を測定した。

10

## 【0027】

また、前記の本発明の分析方法に用いた19種類の血清について、従来法(AlaSTAT法)により特異的IgE濃度測定を実施した。

図1~図7に、各アレルゲンに対する特異的IgE量について、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を、回帰直線及び相関係数(R)と共に示す。図1~図7において、横軸(x軸)は、従来法により得られた特異的IgE濃度(単位: IU/mL)であり、縦軸(y軸)は、本発明の分析方法により得られた発光量(単位: cps)である。それぞれ、ヤケヒョウヒダニ、卵白、牛乳、小麦、米、ピーナッツ、及び大豆に関する結果である。いずれのアレルゲン及び総アレルゲンについても、本発明の分析方法で得られた結果は、従来法(AlaSTAT法)による特異的IgE濃度測定結果と良好な相関を示した。

20

## 【0028】

## 【実施例2】

本実施例では、乾燥ろ紙血サンプルにおける特異的IgE回収率について検討した。健常者及びアレルギー患者70例から血液を採取し、採血用ろ紙[採血用濾紙ディスク型; 東洋濾紙(株)製]に50 μL ずつ滴下した後、室温下1時間放置して乾燥させた。乾燥血部位の中心から直径7.5 mmの円形に切り出したサンプルを、PBS 200 μL とともにチューブに入れ、以下、実施例1に記載の方法と同様にして、7種のアレルゲン結合着色ビーズとの反応、ビーズの単離、標識化抗ヒトIgE抗体との反応、及び発光量の測定を実施した。

30

対照として、同時に採取分離した血清を、実施例1に記載の方法と同様にして測定し、発光量の比較を行なった。

## 【0029】

図8~図14に、各アレルゲン特異的IgE量について、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を回帰直線及び相関係数(R)と共に示す。図8~図14において、横軸(x軸)は、血清サンプルから得られた発光量(単位: cps)であり、縦軸(y軸)は、乾燥ろ紙血から得られた発光量(単位: cps)である。また、図8~図14は、それぞれ、ヤケヒョウヒダニ、卵白、牛乳、小麦、米、ピーナッツ、及び大豆に関する結果である。

40

いずれのアレルゲン及び総アレルゲンについても、乾燥ろ紙血サンプルより得られた発光量は、血清サンプルから得られたものと良好な相関を示した。

## 【0030】

## 【発明の効果】

本発明の分析方法によれば、通常の測定法では十分に測定することができない特異的IgE濃度を、複数の原因アレルゲンを対象として、同時に分析することができる。

50

**【図面の簡単な説明】**

【図1】ヤケヒョウヒダニアレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図2】卵白アレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図3】牛乳アレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図4】小麦アレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図5】米アレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

10

【図6】ピーナッツアレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図7】大豆アレルゲンについて、本発明の分析方法で得られた結果と従来法で得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図8】ヤケヒョウヒダニアレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図9】卵白アレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図10】牛乳アレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

20

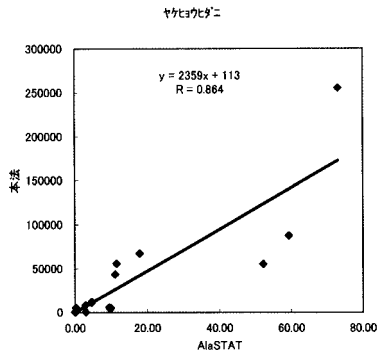
【図11】小麦アレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図12】米アレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

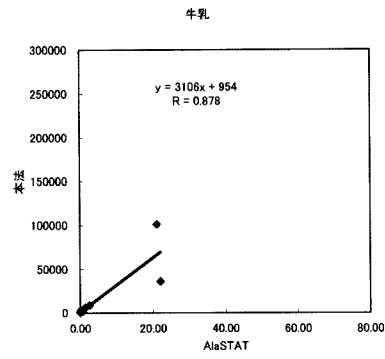
【図13】ピーナッツアレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

【図14】大豆アレルゲンについて、血清サンプルから得られた結果と乾燥ろ紙血サンプルから得られた結果との相関関係を示すグラフである。

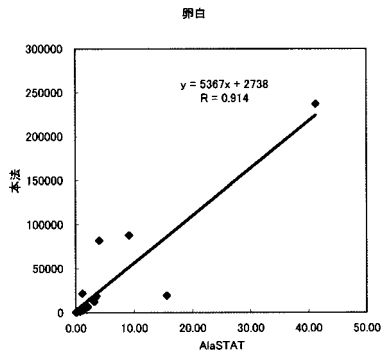
【 図 1 】



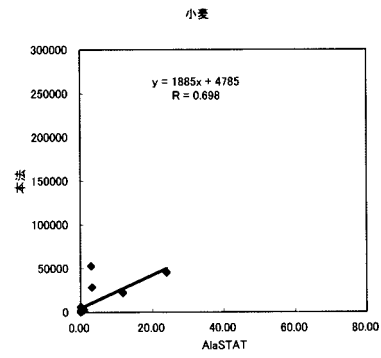
【 図 3 】



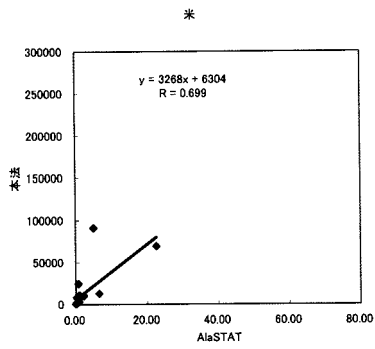
【 図 2 】



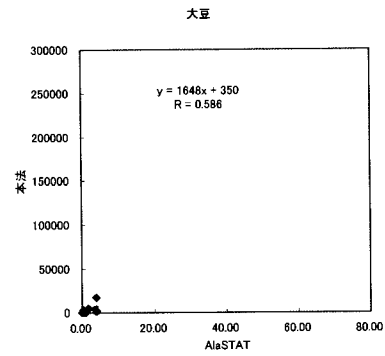
【 図 4 】



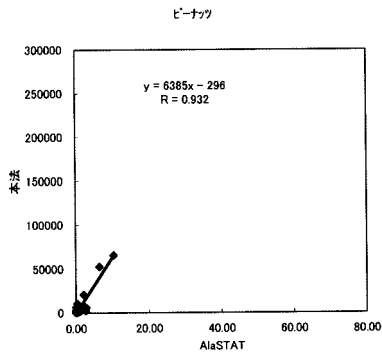
【 図 5 】



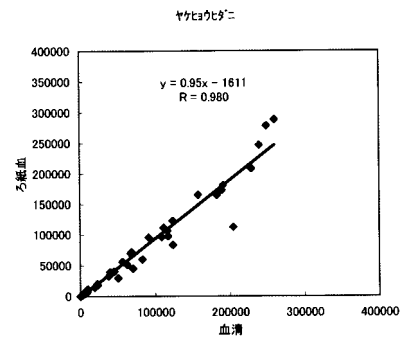
【 図 7 】



【 図 6 】

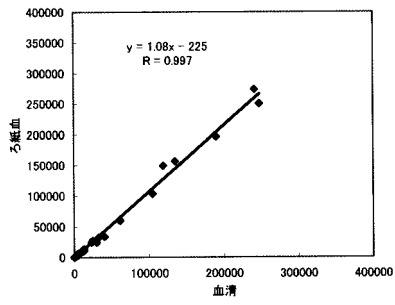


【 図 8 】



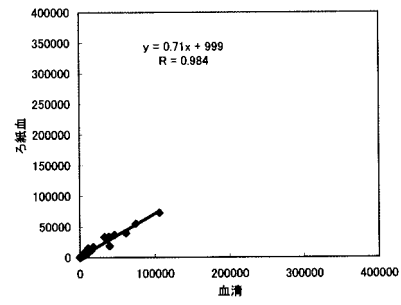
【 図 9 】

卵白



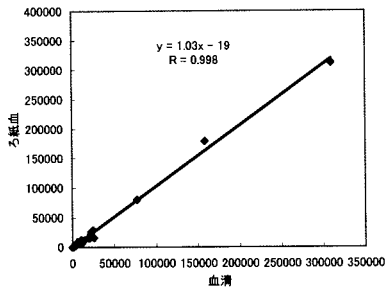
【 図 1 1 】

小麦



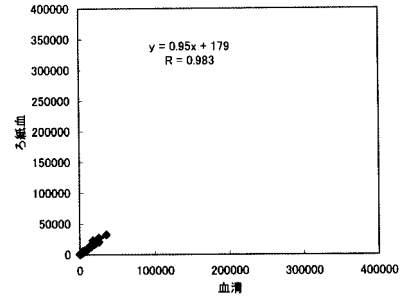
【 図 1 0 】

牛乳



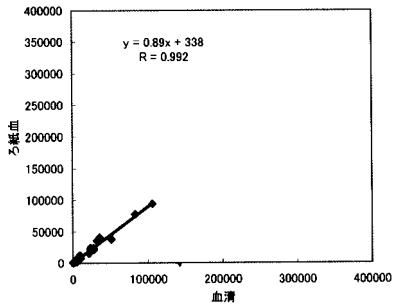
【 図 1 2 】

米



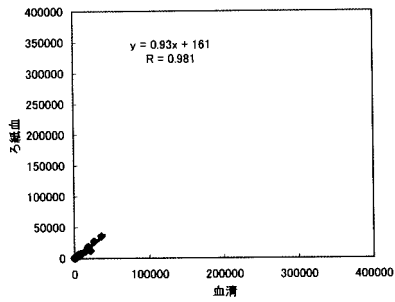
【 図 1 3 】

ピーナッツ



【 図 1 4 】

大豆



---

フロントページの続き

- (72)発明者 小野 哲也  
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内
- (72)発明者 川村 雅英  
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開平11-326326(JP,A)  
特開平08-005635(JP,A)  
特開2000-178309(JP,A)  
特表平08-511621(JP,A)  
特開平01-131460(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	分析过敏原特异性IgE的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3772267B2</a>	公开(公告)日	2006-05-10
申请号	JP2001367230	申请日	2001-11-30
申请(专利权)人(译)	株式会社ヤトロン		
当前申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron		
[标]发明人	黒田隆 杉山和之 小野哲也 川村雅英		
发明人	黒田 隆 杉山 和之 小野 哲也 川村 雅英		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/543.515.D G01N33/543.541.Z G01N33/543.515.A G01N33/564.Z		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
其他公开文献	JP2003166994A JP2003166994A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种同时和高度灵敏地分析少量过敏原的少量测试样品中的过敏原特异性IgE量的方法。该方法包括以下步骤：(1)将每种色调的不同过敏原与具有不同色调的多种类型的有色珠子结合；(2)组合过敏原结合的有色珠子和至少一种过敏原(3)分离针对每种色调的过敏原结合着色珠；(4)接触每种分离的过敏原结合着色分别使珠子与标记的抗IgE抗体接触；和(5)使珠子与每种免疫复合物中包含的标记物质接触，所述免疫复合物包含每种过敏原结合的着色珠子，过敏原特异性IgE和标记的抗IgE抗体。每个要分析的信号。

【 図 2 】

