

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6014091号
(P6014091)

(45) 発行日 平成28年10月25日 (2016. 10. 25)

(24) 登録日 平成28年9月30日 (2016. 9. 30)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/531 (2006. 01)	GO 1 N 33/531 B
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 J

請求項の数 10 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2014-185247 (P2014-185247)	(73) 特許権者	000162478
(22) 出願日	平成26年9月11日 (2014. 9. 11)		協和メデックス株式会社
(62) 分割の表示	特願2011-538449 (P2011-538449) の分割		東京都中央区晴海一丁目8番10号
原出願日	平成22年10月27日 (2010. 10. 27)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2015-7652 (P2015-7652A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成27年1月15日 (2015. 1. 15)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成26年9月11日 (2014. 9. 11)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	特願2009-250639 (P2009-250639)	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成21年10月30日 (2009. 10. 30)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100119507
前置審査			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体中の測定対象成分の測定方法及び測定用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを反応させた後、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を反応させて、該測定対象成分に結合した標識量を測定する免疫測定法において、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体をポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させることを特徴とする、免疫測定法における反応温度の影響抑制方法。

【請求項 2】

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ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、及び、エチレンジアミンポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物からなる群より選ばれるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤である請求項1記載の抑制方法。

【請求項 3】

胆汁酸誘導体を添加して検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを反応させる請求項1又は2記載の抑制方法。

【請求項 4】

胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項3記載の抑制方法。

【請求項 5】

両性界面活性作用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又は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4記載の抑制方法。

【請求項6】

胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項3記載の抑制方法。

【請求項7】

非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、N,N-ビス(3-グルコンアミドプロピル)コールアミド又は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記載の抑制方法。

【請求項8】

第1抗体が、不溶性担体に不動化されている請求項1~7のいずれかに記載の抑制方法。

【請求項9】

検体が、全血である請求項1~8のいずれかに記載の抑制方法。

【請求項10】

測定対象成分が、MxA蛋白質である請求項1~9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】

本発明は、検体中の測定対象成分の測定方法及び測定用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

検体中の成分を測定する方法として、免疫学的な測定法が利用されている。免疫学的測定方法としては、RIA法(放射免疫測定法)、EIA法(酵素免疫測定法)、CLIA法(化学発光免疫測定法)、CLEIA(化学発光酵素免疫測定法)、LA法(ラテックス凝集法)、TIA法(免疫比濁法)、イムノクロマトグラフィー法などの多くの方法がある。これらの測定法では、免疫学的手法により測定する場合、検体中の成分(または抗体)とそれに対する抗体(または抗原)との間における抗原抗体反応を利用している。また、これらの免疫学的測定法においては、予め、濃度のわかっている標準物質を測定して得られた数値(吸光度)とそれぞれに対する測定値(濃度)との関係をグラフにプロットした検量線(標準曲線)を作成し、目的とする検体中の成分の測定値を求める。これらの測定において用いる標準物質には、原料の入手が容易であり、多量に調製することが可能なりコンピナント抗原が多く用いられている。

【0003】

しかしながら、リコンビナント抗原は検体中の成分であるネイティブ抗原と必ずしも免疫反応性が一致しているとは限らず、測定する際の緩衝液や添加剤によっても反応性が異なることがある。特に、抗原抗体反応時の反応温度が変動した場合には両者の反応性の相違が顕著となり、温度による測定値の変動を生じるという問題がある(特許文献1~2参照)。

【0004】

MxA蛋白質は、I型インターフェロン(インターフェロン γ)により誘導される一連のタンパク質の一つで、分子量78kDa、Dynaminスーパーファミリーに属し、GTPase活性を有し、白血球、特に単核球の細胞質内に発現する。機能としては、ウイルスの増殖を阻害することによる抗ウイルス作用を有していることが知られており、ウイルス感染初期における生体の抗ウイルス状態の確立に関与していると言われている(非特許文献1~4参照)。

【0005】

いくつかの動物種でもみられるMxA蛋白質は、そのアミノ酸末端に特徴的なアミノ酸配列をもつ。N末GドメインはGTPaseとしての活性や抗ウイルス作用必須の部分であり、C末領域は、 α ヘリックス構造に富み、ロイシンジッパー構造を有する。この両部分は、分子内で相互に反応したり、分子間で相互に結合して自己凝集を引き起こすことが報告さ

10

20

30

40

50

れている（非特許文献5参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2008-101924号公報

【特許文献2】国際公開第2006/073073号パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】J. Interferon Res., vol.7, p.331-343 (1987).

【非特許文献2】Mol. Cell. Biol., vol.9, p.5062-5072 (1989).

【非特許文献3】J. Virol., vol.64, p.1171-1181 (1990).

【非特許文献4】Traffic, vol.3, p.710-717 (2002).

【非特許文献5】J. Biological Chem., vol.273, p.28365-28370 (1998).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、抗原等の検体中の測定対象成分を測定するに際して、反応温度等の影響を受けずに正確な測定を可能とする、検体中の測定対象成分の測定方法及び測定用キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、本課題を解決すべく鋭意検討し、検体中の測定対象成分の免疫測定法において、検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを、脂肪酸アルカノールアミド存在下に反応させることにより、また、検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを反応させた後、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させることにより、反応温度等の影響を受けずに、正確な測定が可能となることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の[1]～[28]に関する。

【0010】

[1] 検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを、脂肪酸アルカノールアミド存在下に反応させた後、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を反応させて、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定することを特徴とする、測定対象成分の測定方法。

[2] 標識化第2抗体を、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させる、[1]記載の方法。

[3] 検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを反応させた後、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させて、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定することを特徴とする、測定対象成分の測定方法。

[4] 脂肪酸アルカノールアミドが、脂肪酸ジエタノールアミドである[1]又は[2]記載の方法。

[5] 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ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、及び、エチレンジアミンポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物からなる群より選ばれるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤である[2]又は[3]記載の方法。

[6] 脂肪酸アルカノールアミドが、脂肪酸ジエタノールアミドであり、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ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、及び、エチレンジアミンポリ

10

20

30

40

50

オキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物からなる群より選ばれるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤である [2] 記載の方法。

【 0 0 1 1 】

[7] 胆汁酸誘導体を添加して検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第 1 抗体とを反応させる [1] ~ [6] のいずれかに記載の方法。

[8] 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である [7] 記載の方法。

[9] 両性界面活性作用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又は 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 [8] 記載の方法。

[1 0] 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である [7] 記載の方法。

[1 1] 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、N , N - ビス (3 - グルコンアミドプロピル) コールアミド又は 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 [1 0] 記載の方法。

[1 2] 第 1 抗体が、不溶性担体に不動化されている [1] ~ [1 1] のいずれかに記載の測定方法。

[1 3] 検体が、全血である [1] ~ [1 2] のいずれかに記載の方法。

[1 4] 測定対象成分が、M x A 蛋白質である [1] ~ [1 3] のいずれかに記載の方法。

【 0 0 1 2 】

[1 5] 測定対象成分に結合する第 1 抗体、及び、脂肪酸アルカノールアミドを含む第 1 試薬と、測定対象成分に結合する第 2 抗体に標識が結合した標識化第 2 抗体を含む第 2 試薬とを含むことを特徴とする、検体中の測定対象成分の測定用キット。

[1 6] 第 2 試薬が、更にポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含む [1 5] 記載のキット。

[1 7] 測定対象成分に結合する第 1 抗体を含む第 1 試薬と、測定対象成分に結合する第 2 抗体に標識が結合した標識化第 2 抗体、及び、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含む第 2 試薬とを含むことを特徴とする、検体中の測定対象成分の測定用キット。

[1 8] 脂肪酸アルカノールアミドが、脂肪酸ジエタノールアミドである [1 5] 又は [1 6] 記載のキット。

[1 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ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、及び、エチレンジアミンポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物からなる群より選ばれるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤である [1 6] 又は [1 7] 記載のキット。

[2 0] 脂肪酸アルカノールアミドが、脂肪酸ジエタノールアミドであり、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ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、及び、エチレンジアミンポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物からなる群より選ばれるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤である [1 6] 記載のキット。

【 0 0 1 3 】

[2 1] 第 1 試薬が更に、胆汁酸誘導体を含む [1 5] ~ [2 0] のいずれかに記載のキット。

[2 2] 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である [2 1] 記載のキット。

[2 3] 両性界面活性作用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又は 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 [2 2] 記載のキッ

10

20

30

40

50

ト。

[2 4] 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請 [2 1] 記載のキット。

[2 5] 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、N, N - ビス (3 - グルコンアミドプロピル) コールアミド又は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 [2 4] 記載のキット。

[2 6] 第1抗体が、不溶性担体に不動化されている [1 5] ~ [2 5] のいずれかに記載のキット。

[2 7] 検体が、全血である [1 5] ~ [2 6] のいずれかに記載のキット。

[2 8] 測定対象成分が、M x A蛋白質である [1 5] ~ [2 7] のいずれかに記載のキット。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明により、反応温度等の影響を受けずに、正確な測定を可能とする検体中の測定対象成分の測定方法及び測定用キットが提供される。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

(1) 検体

本発明において使用される検体としては、本発明による測定を可能とする検体であれば特に制限はなく、例えば全血 (血液)、血球、血清、血漿、髄液、尿、組織、培養細胞が挙げられる。尚、全血には、全血由来の血球分画に血漿が混合している検体も含まれる。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、溶血処理等が挙げられ、これらの処理を組み合わせてもよい。

【 0 0 1 6 】

成分 (測定対象物) 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挙げられる。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、超音波処理等が挙げられる。

【 0 0 1 7 】

(2) 測定対象成分

本発明における測定対象成分としては、本発明による測定を可能とする測定対象成分であれば特に制限はなく、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。

【 0 0 1 8 】

本発明において好適な測定対象成分としては、細胞内に含まれる物質、代謝産物等が挙げられ、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等が好ましい。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M x A蛋白質 (前述の非特許文献 2 ~ 3 参照) 等が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

(3) 脂肪酸アルカノールアミド

本発明における脂肪酸アルカノールアミドとしては、例えば脂肪酸ジエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸N - メチルエタノールアミド、脂肪酸モノイソプロパノールアミド、脂肪酸ジイソプロパノールアミド等が挙げられ、脂肪酸ジエタノールアミドが好ましい。脂肪酸ジエタノールアミドとしては、例えばラウリン酸ジエタノールアミド、カプリン酸ジエタノールアミド、カプリル酸ジエタノールアミド、デカン酸ジエタノールアミド、ミリスチン酸ジエタノールアミド、パルミチン酸ジエタノールアミド、ステアリン酸ジエタノールアミド、イソステアリン酸ジエタノールアミド、オレイン酸ジ

10

20

30

40

50

エタノールアミド、リノール酸ジエタノールアミド、オクチルデカン酸ジエタノールアミド、ココナッツ油脂肪酸ジエタノールアミド、ヤシ脂肪酸ジエタノールアミド、牛脂脂肪酸ジエタノールアミド、アルキルアルカノールアミド、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミドが挙げられる。これらの中で、オレイン酸ジエタノールアミド、ヤシ脂肪酸ジエタノールアミド、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミドが好ましい。オレイン酸ジエタノールアミドの具体例（市販品）としては、例えばスタホームD O、スタホームD O S（以上、日油社製）等、ヤシ脂肪酸ジエタノールアミドの具体例（市販品）としては、スタホームF、スタホームD F C、スタホームD F 4（以上、日油社製）等、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミドの具体例（市販品）としては、アミノーンP K - 0 2 S、アミノーンP K - 0 3 S（以上、花王社製）等が挙げられる。

10

【0020】

脂肪酸アルカノールアミドの抗原抗体反応における濃度としては、本発明の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はないが、例えば0.1～1.4%である。本発明においては、脂肪酸アルカノールアミドを単独（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。

【0021】

(4) ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤

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は、本発明の測定方法を可能とするものであれば特に制限はなく、例えばポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物（以下、P O E・P O P縮合物と記す）、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル（以下、P O E・P O Pアルキルエーテルと記す）、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルフェニルエーテル（以下、P O E・P O Pアルキルフェニルエーテルと記す）、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル（以下、P O E多環フェニルエーテルと記す）、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン多環フェニルエーテル（以下、P O E・P O P多環フェニルエーテルと記す）、または、エチレンジアミンポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物（以下、エチレンジアミンP O E・P O P縮合物と記す）等が挙げられ、P O E・P O P縮合物、P O E・P O Pアルキルエーテル、エチレンジアミンP O E・P O P縮合物が好ましく、P O E・P O P縮合物が特に好ましい。

20

【0022】

P O E・P O P縮合物は、ブロック共重合体、ランダム共重合体いずれでもよい。P O E・P O P縮合物の具体例（市販品）としては、例えばプロノン102、プロノン104、プロノン201、プロノン202B、プロノン204、プロノン208、プロノン403（以上、日油社製）、エマルゲンP P - 230、エマルゲンP P - 250、エマルゲンP P - 290（以上、花王社製）、プルロニックL - 101、プルロニックL - 103、プルロニックL - 121、プルロニックL - 122、プルロニックF - 108（以上、旭電化工業社製）等が挙げられる。

30

【0023】

P O E・P O Pアルキルエーテルの具体例（市販品）としては、例えばユニループ50MB - 168、ユニループ75DE - 25、ユニループ75DE - 3800、ユニループMT - 0620B（以上、日油社製）、ユニセーフP K A - 5015、ユニセーフP K A - 5016（以上、日油社製）、E M A L E X D A P E - 220、E M A L E X D A P E - 230（以上、日本エマルジョン社製）、ノイゲンX L - 400、ノイゲンX L - 1000F（以上、第一工業製薬社製）等が挙げられる。

40

【0024】

P O E・P O Pアルキルフェニルエーテルの具体例（市販品）としては、例えばエマルゲンL40（花王社製）、ディスパノールK P 189 - 40、ディスパノールK P 189R - 40（以上、日油社製）等が挙げられる。

【0025】

P O E多環フェニルエーテルの具体例（市販品）としては、例えばニューコール714

50

、ニューコール707、ニューコール2609、ニューコール2614（以上、日本乳化剤社製）、エマルゲンA-60、エマルゲンA-90、エマルゲンB-66（以上、花王社製）、BLAUNON DSP-9、BLAUNON DSP-12.5、BLAUNON TSP-5、BLAUNON TSP-16（以上、青木油脂社製）等が挙げられる。

【0026】

POE・POP多環フェニルエーテルの具体例（市販品）としては、例えばニューコール2616F、ニューコール710-F、ニューコール2608F、ニューコール707-F（以上、日本乳化剤社製）、ニューカルゲンCP-160、ニューカルゲンGP-120（以上、竹本油脂社製）等が挙げられる。

10

【0027】

エチレンジアミンPOE・POP縮合物の具体例（市販品）としては、例えばエチレンジアミンPO40EO40（日油社製）、プルロニックTR-704（旭電化工業社製）等が挙げられる。

【0028】

本発明の測定方法におけるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の濃度としては、本発明の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はなく、例えば0.01~1%であり、0.05~0.2%が好ましい。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種以上組み合わせることもできる。

20

【0029】

（5）胆汁酸誘導体

本発明における胆汁酸誘導体としては、本発明の測定を可能とするものであれば特に制限はないが、例えば両性界面活性剤作用を有する胆汁酸誘導体、非イオン性界面活性剤作用を有する胆汁酸誘導体等が挙げられる。両性界面活性剤作用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。

30

【0030】

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。

【0031】

本発明の測定方法における胆汁酸誘導体の濃度としては、臨界ミセル濃度(cmc)の1倍~50倍の範囲の濃度で用いるとよく、特にcmc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種以上組み合わせることもできる。

40

【0032】

（6）抗体および標識化抗体

本発明における抗体としては、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、本発明における抗体としては、抗体をバイン処理により得られるFab、ペプシン処理により得られるF(ab')₂、ペプシン処理-還元処理により得られるFab'等のFc部分を除去した抗体フラグメントも使用できる。抗体フラグメントとしては、F(ab')₂が好ましい。

【0033】

本発明における抗体は、測定対象成分またはそのエピトープに相当するペプチドを抗原

50

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。

【0034】

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等が挙げられる。

10

【0035】

本発明における標識化抗体は、本発明の測定方法において使用され得るものであり、上記の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することができる。

【0036】

(7) 測定方法

本発明の測定方法は、検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを、脂肪酸アルカノールアミド存在下に反応させた後、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を反応させて、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定することを特徴とする、測定対象成分の測定方法である。また、本発明の測定方法は、検体中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する第1抗体とを反応させた後、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させて、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定することを特徴とする、測定対象成分の測定方法である。本発明の測定方法の具体的態様を以下に示す。

20

【0037】

(1) 該測定対象成分と該測定対象成分に結合する第1抗体とを、脂肪酸アルカノールアミド存在下に反応させ(第1反応工程)、次いで、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を反応させて(第2反応工程)、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定する(検出工程)方法。

30

(2) 該測定対象成分と該測定対象成分に結合する第1抗体とを反応させ(第1反応工程)、次いで、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させて(第2反応工程)、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定する(検出工程)方法。

(3) 該測定対象成分と該測定対象成分に結合する第1抗体とを、脂肪酸アルカノールアミド存在下に反応させ(第1反応工程)、次いで、該測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤存在下に反応させて(第2反応工程)、第1抗体、該測定対象成分、及び、標識化第2抗体からなる免疫複合体を生成させ、生成した該免疫複合体中の標識量を測定する(検出工程)方法。

40

【0038】

上記(1)~(3)において、第1反応工程は、胆汁酸誘導体を添加して行うこともできる。

【0039】

上記(1)~(3)において、第1反応工程において、測定対象成分と第1抗体の免疫複合体が生成する。第2反応工程において、第1反応工程で生成した第1抗体と測定対象成分との免疫複合体と、標識化第2抗体とが反応し、第1抗体、測定対象成分及び標識化第2抗

50

体の免疫複合体が生成する。検出工程において、第2反応工程で生成した第1抗体、測定対象成分及び標識化第2抗体の免疫複合体中の標識量が測定される。用いた検体中の測定対象成分の濃度は、既知濃度の測定対象成分である標準物質を用いて同様の測定を行い、濃度と標識由来の情報量との関係を表す検量線を作成し、作成した検量線と検出工程での標識量とを関連付けることにより決定することができる。

【0040】

標準物質としては生体試料から調製することもできるが、遺伝子組み換え法により作製したリコンビナント抗原を用いて調製することもできる。標準物質は、溶液形態、凍結乾燥形態等のいずれの形態でもよく、形態に応じて、使用時に後述の水性媒体等に溶解させて用いることができる。また、標準物質の調製に際しては、後述の水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、界面活性剤、蛋白類、蛋白類安定化剤等を使用することもできる。

10

【0041】

上記(1)及び(3)の測定方法においては、予め、検体と脂肪酸アルカノールアミドとを混合、又は、検体と脂肪酸アルカノールアミド、胆汁酸誘導体とを混合して検体を前処理し、その後、前処理された検体を第1抗体との反応に供してもよい。上記(2)の測定方法においては、予め、検体と胆汁酸誘導体とを混合して検体を前処理し、その後、前処理された検体を第1抗体との反応に供してもよい。

【0042】

本発明の測定方法は、ドライケミストリーでも溶液中の反応でも適用可能である。第1反応工程及び第2反応工程における反応温度としては、本発明の測定方法を可能とする反応温度であれば特に制限はなく、例えば0~50℃が挙げられ、4℃~40℃が好ましい。反応時間としては、本発明の測定方法を可能とする反応時間であれば特に制限はなく、例えば1分間~72時間であり、5分間~20時間が好ましい。

20

【0043】

第1反応工程と第2反応工程との間には、洗浄工程を設けても、設けなくてもよいが、洗浄工程を設けることが好ましい。また、第2反応工程と検出工程の間には、洗浄工程を設けても、設けなくてもよいが、洗浄工程を設けることが好ましい。第1抗体は不溶性担体に不動化(固定化)されていなくても、不動化(固定化)されていてもよいが、不動化(固定化)されていることが好ましい。第1抗体が不溶性担体に不動化(固定化)されている場合、第1反応工程後の不溶性担体を洗浄することにより、第1反応工程で生成した第1抗体と測定対象成分の免疫複合体を、未反応成分(検体由来の成分、過剰の第1抗体等)から分離することができる。同様に、第2反応工程後の不溶性担体を洗浄することにより、第2反応工程で生成した第1抗体、測定対象成分及び標識化第2抗体の免疫複合体を、未反応成分(過剰の標識化第2抗体等)から分離することができる。洗浄液としては、リン酸緩衝化生理食塩水[0.15mol/L塩化ナトリウムを含有する10mmol/Lリン酸緩衝液、pH7.2(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は、例えばツイーン(Tween)20等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

30

【0044】

不溶性担体としては、第1抗体を不動化(固定化)し、抗原抗体反応、検出反応を可能とするものであれば特に制限はない。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挙げられる。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、スティック等が挙げられ、96ウェル/枚のポリスチレン製マイクロタイタープレート等が好ましい。

40

【0045】

第1抗体の不溶性担体への不動化(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

50

的結合としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学的結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。例えば、ポリスチレン製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第1抗体の溶液を添加して、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。

【0046】

第1抗体は、直接、不溶性担体に不動化（固定化）してもよいし、間接的に不溶性担体に不動化（固定化）してもよい。間接的な不動化（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、ビオチン化した第1抗体の溶液を添加し、ビオチンとアビジンとの特異的結合を介して、第1抗体を不溶性担体に固定化する方法が挙げられる。また、不溶性担体に、第1抗体に特異的に結合する抗体を固定化し、この抗体を介して第1抗体を不溶性担体に固定化してもよい。あるいは、第1抗体は、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。リンカーとしては、例えば、第1抗体の官能基と不溶性担体とその表面に保持している官能基の両者と共有結合できる分子等が挙げられ、第1抗体の官能基と反応することができる第1の反応活性基と、不溶性担体とその表面に保持している官能基と反応することができる第2の反応活性基とを同一分子内に持つ分子が好ましく、その中でも、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分子が特に好ましい。第1抗体の官能基および不溶性担体とその表面に保持している官能基としては、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、N-ヒドロキシサクニル基、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける活性な反応性基としては、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（PF₅）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挙げられる。

【0047】

第1抗体が不溶性担体に不動化（固定化）されていない場合には、第1反応工程後の反応液を、第1抗体と反応し得る物質が不動化（固定化）された不溶性担体に供し、その後、不溶性担体を洗浄することにより、第1抗体と測定対象成分の免疫複合体を未反応成分（検体由来の成分、過剰の第1抗体等）から分離することができる。第1抗体と反応し得る物質の不溶性担体への不動化（固定化）は、前述の第1抗体の不溶性担体への不動化（固定化）と同様の方法により行うことができる。

【0048】

第2抗体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挙げられる。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挙げられる。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）等が挙げられる。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挙げられる。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體、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。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、³H、¹⁴C、³⁵S、³²P、¹²⁵I、¹³¹I等が挙げられる。

【0049】

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 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）等が挙げられる。

【0050】

第2抗体の標識化は、第2抗体の官能基と標識物質の官能基との間で、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挙げられる。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。

【0051】

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挙げられる。この場合、NHSまたはその誘導體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。

10

【0052】

リンカーとしては、例えば、第2抗体の官能基に反応する官能基と、標識物質の官能基に反応する官能基の両方の官能基を分子内に有するものが挙げられ、第2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が好ましく、その中でも、第1の官能基と第2の官能基とが異なる基である分子が特に好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基が挙げられる。

【0053】

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 Immunocon j. Radiopharm., 3, 60, 1990) 記載の方法が挙げられる。

20

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) に従って、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複製し、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。

【0054】

30

検出工程において、第2反応工程で生成した第1抗体、測定対象成分及び標識化第2抗体の免疫複合体中の標識量を測定する。標識量の測定は、標識物質に応じて適切な方法を選択することができる。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には、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、 β -ウェルカウンター等により測定することができる。

【0055】

40

標識が酵素である場合、標識量の測定とは、酵素活性を測定することを意味する。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、発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挙げられる。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挙げられる。

【0056】

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、

50

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*-フェレンジアミン、10-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)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-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)等が挙げられる。

【0057】

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挙げられる。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挙げられる。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-ジ(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)等が挙げられる。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)等が挙げられる。

【0058】

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挙げられる。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、クマリン等が挙げられる。

【0059】

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挙げられる。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挙げられる。

【0060】

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挙げられる。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

10

20

30

40

50

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・ニナトリウム塩 (AMP PD)、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 . 13 , 7] デカン] - 4 - イル } フェニルホスフェート・ニナトリウム塩 (CDP - StarTM)、3 - { 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 . 13 , 7] デカン] - 4 - イル } フェニルホスフェート・ニナトリウム塩 (CSPDTM)、[10 - メチル - 9 (10H) - 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 (LumigenTM APS - 5) 等が挙げられる。

【 0061 】

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挙げられる。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挙げられる。 - 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挙げられる。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、反応液の発光度を蛍光光度計や蛍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挙げられる。 - 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挙げられる。

【 0062 】

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挙げられる。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挙げられる。

【 0063 】

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物質 (物質 A とする) である場合は、物質 A に特異的に結合する物質 (物質 B) 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化物質 B と、第 2 反応工程で生成した第 1 抗体、測定対象成分及び標識化第 2 抗体 (すなわち、物質 A で標識化された第 2 抗体) の免疫複合体とを反応させて、第 1 抗体、測定対象成分、標識化第 2 抗体 (すなわち、物質 A で標識化された第 2 抗体) 及び標識化物質 B の免疫複合体を生成させて、生成したこの免疫複合体中の標識量を前述の方法により測定することにより、検体中の測定対象成分を測定することができる。物質 B としては、例えば物質 A に対する抗体、アビジン (物質 A が、ビオチンの場合)、ストレプトアビジン (物質 A が、ビオチンの場合)、ビオチン (物質 A が、アビジン、ストレプトアビジンの場合) 等が挙げられる。物質 A に対する抗体としては、抗体フラグメントでもよく、抗体フラグメントとしては、例えば前述の Fab、F(ab')₂、Fab' 等が挙げられる。

【 0064 】

尚、本発明の測定方法 (1) 及び (2) の第 1 反応工程は、競合法にも適用することができる。競合法としては、具体的には以下の態様が挙げられる。

(4) 測定対象成分を、脂肪酸アルカノールアミドの存在下、競合物質に標識が結合した標識化競合物質、及び、該測定対象成分と標識化競合物質の両者に結合する抗体と反応させ (競合反応工程)、生成した該標識化競合物質と該抗体の免疫複合体中の標識量を測定する (検出工程) 方法。

(5) 測定対象成分を、脂肪酸アルカノールアミドの存在下、競合物質、及び、該測定対象成分と該競合物質の両者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 (競合反

10

20

30

40

50

応工程)、生成した該競合物質と該標識化抗体の免疫複合体中の標識量を測定する(検出工程)方法。

【0065】

競合反応工程は、胆汁酸誘導体を添加して行ってもよい。また、競合反応工程と検出工程との間に洗浄工程を設けても、設けなくてもよいが、洗浄工程を設けることが好ましい。洗浄工程としては、例えば前述の測定方法(1)~(3)での洗浄工程等が挙げられる。

【0066】

上記(4)の方法においては、測定対象成分と標識化競合物質の両者に結合する抗体は、不溶性担体に不動化(固定化)されていても、不動化(固定化)されていなくてもよいが、不動化(固定化)されていることが好ましい。また、上記(5)の方法においては、競合物質は、不溶性担体に不動化(固定化)されていなくても、不動化(固定化)されていてもよいが、不動化(固定化)されていることが好ましい。

10

【0067】

競合反応工程は、水性媒体存在下で行っても、水性媒体非存在下で行ってもよいが、水性媒体存在下で行うことが好ましい。水性媒体としては、例えば後述の水性媒体等が挙げられる。ここで、競合物質とは、「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、検体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。従って、競合法において用いる測定対象成分に結合する抗体は、測定対象成分および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。

20

【0068】

競合物質としては、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は競合物質として好ましい。標識化競合物質は、競合物質と前述の標識物質とを用いて、前述の標識化第2抗体と同様の方法により調製することができる。

【0069】

本発明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、緩衝液等が挙げられ、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、pH1~11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、グッド緩衝剤等が挙げられる。

30

【0070】

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)イミノニ酢酸(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)(POPSO)緩衝剤、N

40

50

- (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)エタンズルホン酸(CHESS)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)緩衝剤等が挙げられる。

【0071】

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、0.001~2.0mol/Lが好ましく、0.005~1.0mol/Lがより好ましく、0.01~0.1mol/Lが特に好ましい。

【0072】

本発明の測定方法においては、金属イオン、塩類、糖類、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。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、亜鉛イオン等が挙げられる。塩類としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム等が挙げられる。糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。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等が挙げられる。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)等が挙げられる。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]等が挙げられる。

【0073】

(8)測定用キット

本発明の測定用キットは、検体中の測定対象成分の免疫学的測定用キットであって、本発明の測定方法に使用することができる。

【0074】

本発明の測定用キットは、測定対象成分に結合する第1抗体、及び、脂肪酸アルカノールアミドを含む第1試薬と、測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を含む第2試薬とを含むことを特徴とする測定用キットである。また、本発明の測定用キットは、測定対象成分に結合する第1抗体を含む第1試薬と、測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体、及び、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含む第2試薬とを含むことを特徴とする測定用キットである。本発明の測定用キットの具体的な態様を以下に示す。

【0075】

(1)測定対象成分に結合する第1抗体、及び、脂肪酸アルカノールアミドを含む第1試薬と、測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を含む第2試薬とを含む、検体中の測定対象成分の測定用キット。

(2)測定対象成分に結合する第1抗体を含む第1試薬と、測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体、及び、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含む第2試薬とを含む、検体中の測定対象成分の測定用キット。

(3)測定対象成分に結合する第1抗体、及び、脂肪酸アルカノールアミドを含む第1試薬と、測定対象成分に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体、及び、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤を含む第2試薬とを含む、検体中の測定対象成分の測定用キット。

【0076】

第1試薬には、胆汁酸誘導体が含まれていてもよい。

【0077】

上記(1)及び(3)のキットにおいては、第1試薬は、脂肪酸アルカノールアミドを含む試

10

20

30

40

50

薬 [第 1 試薬 (A)] と、測定対象成分に対する第 1 抗体を含有する試薬 [第 1 試薬 (B)] とが別々に保存される試薬形態を取ることにもできる。上記 (1) 及び (3) のキットにおいて、胆汁酸誘導体が第 1 試薬に含まれる場合は、第 1 試薬は、脂肪酸アルカノールアミドと胆汁酸誘導体とを含む試薬 [第 1 試薬 (A)] と、測定対象成分に対する第 1 抗体を含有する試薬 [第 1 試薬 (B)] とが別々に保存される試薬形態を取ることにもできる。また、上記 (2) のキットにおいて、胆汁酸誘導体が第 1 試薬に含まれる場合は、第 1 試薬は、胆汁酸誘導体を含む試薬 [第 1 試薬 (A)] と、測定対象成分に対する第 1 抗体を含有する試薬 [第 1 試薬 (B)] とが別々に保存される試薬形態を取ることにもできる。ここで、第 1 試薬 (A) は、検体前処理液として使用することができる。

【 0 0 7 8 】

本発明のキットの形態は、溶液形態、凍結乾燥形態等、いかなる形態でもよい。本発明のキットにおける第 1 抗体、標識化第 2 抗体、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤、胆汁酸誘導体としては、それぞれ、例えば前述のものが挙げられる。また、本発明のキットは、必要に応じて、前述の水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、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。

【 0 0 7 9 】

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 】

【 0 0 8 0 】

[1] 抗 M x A 蛋白質モノクローナル抗体の調製

以下のようにして、エピトープの異なる 2 種類の抗ヒト M x A 蛋白質モノクローナル抗体 KM 1 1 2 4 (WO 9 6 / 0 5 2 3 0) および KM 1 1 3 5 (WO 9 6 / 0 5 2 3 0) を調製した。なお、KM 1 1 2 4 は、ヒト M x A 蛋白質のアミノ末端から 2 2 0 ~ 2 9 7 残基中に存在するエピトープ、KM 1 1 3 5 はヒト M x A 蛋白質のアミノ末端から 1 0 ~ 2 2 0 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。

【 0 0 8 1 】

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 KM 1 1 2 4 を生産するハイブリドーマ株 KM 1 1 2 4 (F E R M B P - 4 7 2 9) およびモノクローナル抗体 KM 1 1 3 5 を生産するハイブリドーマ株 KM 1 1 3 5 (F E R M B P - 4 7 3 1) 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。採取した腹水を 3,000rpm 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、カブリル酸沈殿法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 198 8) により精製したモノクローナル抗体を、M x A 蛋白質の免疫測定方法に用いた。

【 0 0 8 2 】

[2] リコンビナント M x A 蛋白質の調製

ヒト M x A 蛋白質をコードする cDNA を含む NdeI - BamHI 断片 (Genbank に BC032602 として登録されている塩基配列を基に調製) を、ベクター pET - 14b [ノバジェン (Novagen)、EMD バイオサイエンス (EMD Biosciences) 社製] の NdeI - BamHI 間に挿入して作製したヒト M x A 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 M x A 蛋白質を発現する。

【 0 0 8 3 】

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 °C 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 °C 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 °C で 2 時間振とう培養した。得られた培養液を 4 °C で 3,000rpm、10 分間遠心分離して菌体を回収

10

20

30

40

50

した。菌体はM x A蛋白質の調製まで-80 で保存した。

【 0 0 8 4 】

M x A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4,000rpm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10,000rpm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。

10

【 0 0 8 5 】

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M x A蛋白質を結合させた。4 で3,000rpm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3,000rpm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3,000rpmで2分間遠心分離し、レジンを回収した。

【 0 0 8 6 】

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M x A蛋白質を溶出させた。このレジンを含む混合液を4 、3,000rpmで2分間遠心分離し、上清のM x A蛋白質溶液を回収した。回収したM x A蛋白質溶液は、M x A蛋白質の測定に用いる標準液を調製するために使用した。

20

【 0 0 8 7 】

[3] ネイティブM x A蛋白質の調製

接着性のヒトグリア芽細胞種由来の細胞株T98G (D S ファーマバイオメディカル株式会社より購入、J. Cell. Physiol., 99, 43-54, 1979) を、10%ウシ胎児血清 (F B S)、1%非必須アミノ酸 (インビトロジェン社製)、1mmol/Lピルビン酸ナトリウム (インビトロジェン社製) を添加したE-MEM培地 (和光純薬工業社製) 10mLを添加した細胞培養用の10mLフラスコ内で、コンフルエントになるまで、炭酸ガス培養装置 (5%CO₂、37) を用いて2~3日間培養した。細胞がコンフルエントになったところで、細胞を150cm²フラスコに移して同様に培養を行った。150cm²フラスコ内で細胞がコンフルエントになったところで、培地を吸引除去し、P B S (-) (カルシウム、マグネシウムを含まないリン酸緩衝液) で洗浄し、0.02% E D T A を加え洗浄した。次に0.25%トリプシン溶液を添加して細胞をはがした後、等量の培養用培地を加えてトリプシンの作用を止め、細胞を回収し、25 3分間遠心分離 (1,400rpm) した。細胞数をカウントし、新しい培養用培地を添加した150cm²フラスコに1 x 10⁵細胞/mL程度に細胞を懸濁し、Interferon alpha A protein (フナコシ) を2,000U/mLになるよう添加した。24時間炭酸ガス培養装置を用いて培養し、培地を吸引除去し、P B S (-) で洗浄し、0.02% E D T A を加え洗浄した。次に0.25%トリプシン溶液を添加して細胞をはがした後、等量の培養用培地を加えてトリプシンの作用を止め、細胞を回収し、25 3分間遠心分離 (1,400rpm) した。上清を除去し、0.5mLの低張緩衝液 (10mmol/L H E P E S、1.5mmol/L MgCl₂、10mmol/L KCl) を添加して細胞を懸濁し溶液を回収し、使用するまで-80 で保存した。

30

40

【 0 0 8 8 】

[4] 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K M 1 1 3 5 を5 μg/mLになるように100mmol/L塩化ナトリウムを含む100mmol/Lリン酸緩衝液 (pH7.5) 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 μL/ウェルの量で分注した。3日間放置後、上清を吸引除去し、1%ブ

50

ロックエース（大日本製薬社製）、50mmol/L塩化ナトリウムを含むpH7.2リン酸緩衝液300 μLを各ウェルに分注し室温で一晩静置しプロッキングした。プ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×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。

【0089】

[5] ペルオキシダーゼ標識抗M×A蛋白質抗体の調製

[1]で調製した抗M×A蛋白質モノクローナル抗体KM1124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×A蛋白質抗体を作製した。

【0090】

まず、[1]で調製したKM1124(2mg)を含むリン酸緩衝液を0.1mol/Lホウ酸緩衝液(pH8.0)に置換し、アミコン（Amicon）攪拌式セル[ミリポア（Millipore）社製]を用いて1mLの容量に濃縮した。濃縮後の溶液に、2.15mg/mLの2-イミノチオラン塩酸塩[ピアース（Pierce）社製]を含む0.1mol/Lホウ酸緩衝液(pH8.0)40 μLを添加し、攪拌後、30で30分間反応させた。上記の反応において2-イミノチオラン塩酸塩は、KM1124に対しモル比で50倍量を用いた。5mmol/Lエチレンジアミン四酢酸2ナトリウム（EDTA・2Na）を加えた0.1mol/Lのリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックス（Sephadex）G25（アマシャム・バイオサイエンス社製）カラム（直径1.5cm×30cm）を用いて、反応後の溶液のゲルろ過を行い、未反応の2-イミノチオラン塩酸塩を除去し、スルフヒドリル化したKM1124を回収した。回収した溶液をアミコン攪拌式セルを用いて、5mLの容量に濃縮した。

【0091】

一方、KM1124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）2.5mgを0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)250 μLに溶解させた。この溶液を30で5分間加温した後、20mg/mL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）のN,N-ジメチルホルムアミド（ナカライテスク社製）溶液36 μLを加えて攪拌し、30で30分間反応させた。上記の反応においてEMCSは、PODに対しモル比で40倍量を用いた。0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG25カラム（直径1.5cm×30cm）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。回収した溶液をアミコン攪拌式セルを用いて濃縮した。

【0092】

上記で得られたスルフヒドリル化したKM1124の溶液とマレイミド化したPODの溶液を混合し、アミコン攪拌式セルを用いて、さらに容量を2mLに濃縮した後、30で1時間反応させた。得られた標識化抗体は、使用するまで-80で保存した。

【0093】

[6] 検体希釈液および標準液の調製

以下の組成からなる検体希釈液を調製した。

HEPES（同仁化学研究所社製）（pH8.0）	0.1mol/L	
CHAPS（同仁化学研究所社製）	4.9%	40
界面活性剤	（第1表に記載の種類と濃度）	
塩化ナトリウム	1.5mol/L	
BSA [インタージェン（InterGen）社製]	0.1%	
アジ化ナトリウム	0.1%	

前記[2]で調製したリコンビナントM×A蛋白質溶液を上記検体希釈液で希釈し、M×A蛋白質の0（検体希釈液のみ）、0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24ng/mLの各濃度の溶液を調製し、標準液とした。

【0094】

[7] 検量線の作製

前記[4]で作製した抗M×A蛋白質抗体（KM1135）固定化プレートに、[6]

10

20

30

40

50

で作製した標準液100 μ Lを添加し、1時間インキュベートし、抗体にM \times A蛋白質を結合させた。反応液を除去した後、洗浄液[0.05%ツイーン20(関東化学社製)を含むPBS]を400 μ L添加して除去する洗浄操作を5回行った。次いで、[5]で作製したPOD標識抗M \times A蛋白質抗体(KM1124)を、POD標識抗体希釈液(液状組成)緩衝液[50mmol/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)、0.01%4-アミノアンチピリン(4-AA; 埼京化成社製)、0.035%プロクリン300(シグマ社製)、0.1%ノニデットP40]にて800倍に希釈したものを調製し、これを100 μ L添加して30分間反応させた。反応液を除去し、前述の洗浄液を400 μ L添加してプレートを洗浄し、洗浄液を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 μ L添加し、室温で10分間反応させた。0.5mol/L硫酸を100 μ 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での吸光度をプレートリーダーで測定した。これらの一連の操作により、M \times A蛋白質濃度と吸光度との関係を表す検量線を作製した。

10

【0095】

次に、検体として、先の標準液の代わりに、培養細胞や全血検体を用いて同様の操作を行い、各検体における測定値を得、得られた測定値を予め作製した検量線と関連付け、各検体中のM \times A蛋白質濃度を決定した。

【0096】

[8] M \times A蛋白質測定における測定値変動の検討1 (一次反応)

20

前記[3]で使用した接着性のヒトグリア芽細胞種由来の細胞株T98Gをインターフェロンで刺激してM \times A蛋白質を誘導させ、ネイティブM \times A蛋白質を得た。得られたネイティブM \times A蛋白質の反応性をリコンビナントM \times A蛋白質と比較することにより、抗体のリコンビナントM \times A蛋白質に対する反応性と、抗体のネイティブM \times A蛋白質に対する反応性との相違について検討した。

【0097】

前記[3]で作製したネイティブM \times A蛋白質を[6]の検体希釈液で20倍希釈し、30分間静置することで細胞の可溶化を行ない、さらに検体希釈液で8倍に希釈して測定用試料とした。

【0098】

30

この試料と実施例の[6]で調製した各濃度の標準液を検体として用いて、[7]に記載された操作に従い測定を行った。但し、一次反応は25と37の両温度で行い、二次反応および発色反応については25で行った。ここで、25反応時と37反応時におけるネイティブM \times A蛋白質の測定値変動率は、以下の式(I)により算出した。結果を第1表に示す。

【0099】

【数1】

$$\text{変動率 (\%)} = [(37^\circ\text{C 反応時におけるネイティブM}\times\text{A蛋白質濃度)} / (25^\circ\text{C 反応時におけるネイティブM}\times\text{A蛋白質濃度)} - 1] * 100 \quad (\text{I})$$

40

【0100】

[比較例1]

実施例1の[6]の検体希釈液の組成中、界面活性剤を1.2%ノニデットP40(ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル)とすること以外は同じ組成の検体希釈液を用いて、実施例1と同様の方法により反応温度による測定値変動率を算出した。結果を第1表に示す。

【0101】

【表 1】

第1表

界面活性剤	濃度 (%)	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率 (%)
		25℃反応	37℃反応	
アミノーンPK-03S	1.2	315.0	357.6	13.5
スタホームF	1.2	320.2	372.4	16.3
スタホームDO	1.2	399.4	422.7	5.8
スターホームDOS	1.2	475.8	487.5	2.5
スターホームT	1.2	368.8	426.3	15.6
スターホームDFC	1.2	315.4	386.4	22.5
スタホームDF4	1.2	348.9	379.3	8.7
なし	0.0	242.5	363.6	49.9
ノニデットP40(比較例)	1.2	256.3	373.6	45.8

MxA蛋白質濃度* (ng/mL)

【0102】

第1表に示すとおり、測定値変動率について、界面活性剤を用いなかった場合(+49.9%)、MxA蛋白質の測定における使用が知られているノニデットP40(国際公開公報第2008/053973号パンフレット参照)を用いた場合(+45.8%)に比較して、脂肪酸アルカノールアミドを用いた場合、顕著に低下し、温度による測定値への影響が顕著に抑制されることが分かる。

【実施例2】

【0103】

MxA蛋白質測定における測定値変動の検討2 (一次反応)

ウイルス感染が認められMxA蛋白質陽性を示す患者5例からEDTA・2Na採血管を用いて採血した血液を検体として用いた。全血検体は試料希釈液で10倍希釈し、測定試料とした。

【0104】

検体希釈液として、1.2%スタホームDOを含む検体希釈液および1.2%ノニデットP40を含む検体希釈液を用いる以外は実施例1と同様にして1次反応を25と37で行い、反応温度による測定値変動を検討した。結果を第2表に示す。

【0105】

10

20

30

40

【表 2】

第2表

全血検体	スタホームDO			ノニデットP40		
	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)
	25℃反応	37℃反応		25℃反応	37℃反応	
1	29.1	29.2	0.4	25.1	27.9	11.2
2	17.8	18.0	1.3	12.9	14.7	13.9
3	26.5	27.5	3.7	26.1	28.2	8.0
4	8.7	9.7	12.2	8.3	10.0	20.6
5	15.0	16.3	8.4	8.4	10.3	22.6

MxA蛋白質濃度* (ng/mL)

【0106】

第2表に示すように、全血検体を用いた場合でも、測定値変動率は1.2%スタホームDOでは0~+12%以内であり、1.2%ノニデットP40の+8%~23%に比較して反応温度による測定値への影響が顕著に抑制されていることが分かる。

【実施例3】

【0107】

MxA蛋白質測定における測定値変動の検討3 (二次反応)

以下の組成からなるPOD標識抗体希釈緩衝液を調製した。

Bis-Tris (同仁化学研究所社製) (pH7.0)

50 mmol / L

BSA (インタージェン (InterGen) 社製) 0.1%

プロクリン300 (シグマ社製) 0.035%

界面活性剤 (第3表に記載の種類と濃度)

4-AA (埼京化成社製) 0.01%

実施例1の[3]で作製したネイティブMxA蛋白質を実施例1の[6]の検体希釈液[但し、「界面活性剤」としてノニデットP40を使用]で20倍希釈し、30分間静置することで細胞の可溶化を行ない、さらに8倍に希釈して測定用試料とした。

【0108】

検体として、この試料、及び、実施例1の[6]で調製した各濃度の標準液を用いて、POD標識抗体として、実施例1の[5]で調製したPOD標識抗MxA蛋白質抗体を上記POD標識抗体希釈緩衝液にて800倍希釈したものを用いて、実施例1の[7]に記載された操作に従い測定を行った。但し、一次反応は25 で、二次反応は25 と37 の両温度にて行った。25 反応時と37 反応時におけるネイティブMxA蛋白質の測定値変動率は、以下の式(I)により算出した。結果を第3表に示す。

【0109】

【数2】

$$\text{変動率 (\%)} = [(37^\circ\text{C反応時におけるネイティブMxA蛋白質濃度}) / (25^\circ\text{C反応時におけるネイティブMxA蛋白質濃度}) - 1] * 100 \quad (\text{I})$$

【0110】

【比較例2】

実施例3のPOD標識抗体希釈緩衝液中の界面活性剤を0.1%ノニデットP40とすること以外は実施例3と同様の方法により二次反応温度による測定値変動率を算出した。結果

10

20

30

40

50

を第3表に記す。

【0111】

【表3】

第3表

界面活性剤		濃度(%)	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)
構造	商品名		25℃反応	37℃反応	
POE・POP 縮合物	プロノン102	0.1	385.1	352.0	-8.6
	プロノン104	0.1	372.6	369.6	-0.8
	エマルゲンPP-230	0.1	479.7	458.5	-4.4
	エマルゲンPP-250	0.1	460.0	444.2	-3.4
	プロノン202B	0.1	470.8	520.3	10.5
	プロノン403	0.1	509.4	483.7	-5.0
POE・POA アルキルエーテル	ユニループ50MB-168	0.1	345.9	329.9	-4.6
	ユニループ75DE-25	0.1	313.6	258.4	-17.6
	ユニループ75DE-3800	0.1	288.3	276.7	-4.0
POE・POPアルキル フェニルエーテル	ディスパノールKP189R-40	0.1	552.5	517.7	-6.3
	ディスパノールKP189-40	0.1	560.0	493.5	-11.9
POE多環フェニル エーテル	ニューコール714	0.1	535.4	465.5	-13.1
	ニューコール2614	0.1	551.5	464.8	-15.7
POE・POP多環 フェニルエーテル	ニューコール2616F	0.1	505.8	467.7	-7.5
エチレンジアミン POE・POP縮合物	エチレンジアミンPO40EO40	0.1	534.7	520.4	-2.7
POEアルキル フェニルエーテル	ノニデットP40(比較例)	0.1	532.3	381.0	-28.4

MxAタンパク質濃度*(ng/mL)

【0112】

第3表に示すとおり、測定値変動率について、界面活性剤としてノニデットP40を用いた場合(-28.4%)に比較して、POE・POP縮合物、POE・POPアルキルエーテル、POE・POPアルキルフェニルエーテル、POE多環フェニルエーテル、POE・POP多環フェニルエーテル、エチレンジアミンPOE・POP縮合物を用いた場合、顕著に低下しており、反応温度の測定値への影響が顕著に抑制されることが分かる。

【実施例4】

【0113】

MxA蛋白質測定における測定値変動の検討4 (二次反応)

ウイルス感染が認められMxA蛋白質陽性を示す患者4例からEDTA・2Na採血管を用いて採血した血液を検体として用いた。全血検体は実施例1の[6]の検体希釈液[但し、「界面活性剤」としてノニデットP40(1.2%)を使用]で10倍希釈し、測定用試料とした。

【0114】

実施例3のPOD標識抗体希釈緩衝液中、界面活性剤として0.1%プロノン403、0.1%プロノン102、0.1%ノニデットP40をそれぞれ含むPOD標識抗体希釈緩衝液を用いて、実施例3と同様にして測定を行い(但し、一次反応は25で、二次反応は25と37の両温度にて行った)、反応温度による測定値変動を検討した。結果を第4表に記す。

【0115】

【表 4】

全血検体	POE・POP縮合物											
	プロノン403				プロノン102				POEアルキルフェニルエーテル(比較例) /ニテットP40			
	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)	MxA蛋白質濃度*	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)	MxA蛋白質濃度*	
	25°C反応	37°C反応			25°C反応	37°C反応		25°C反応	37°C反応		25°C反応	37°C反応
6	144.7	142.7	-1.4	108.6	110.8	2.0	131.7	88.9	-32.5	149.3	114.1	-23.6
7	84.0	84.5	0.6	62.8	60.9	-3.0	83.2	59.9	-28.0	54.3	32.5	-40.1
8	163.6	163.2	-0.2	124.5	126.7	1.8	149.3	114.1	-23.6	149.3	114.1	-23.6
9	52.7	50.3	-4.5	39.1	38.6	-1.1	54.3	32.5	-40.1	54.3	32.5	-40.1

MxA蛋白質濃度*(ng/mL)

第4表に示すように、全血検体を用いた場合でも、測定値変動率はプロノン403では-4.5%~+0.6%、プロノン102では-3.0%~+2.0%であり、ノニデットP40の-40.1%~-23.6%に比較して、反応温度の測定値への影響が顕著に抑制されることが分かる。

【実施例5】

【0117】

M×A蛋白質測定における測定値変動の検討5（二次反応）

ウイルス感染が認められM×A蛋白質陽性を示す患者5例からEDTA・2Na採血管を用いて採血した血液を検体として用いた。全血検体は実施例1の[6]の検体希釈液[但し、「界面活性剤」としてノニデットP40(1.2%)を使用]で10倍希釈し、測定用試料とした。

【0118】

実施例3のPOD標識抗体希釈緩衝液中、界面活性剤として0.1%エマルゲンPP-250、0.1%ユニループ50MB-168、0.1%ディスパノールKP189R-40、0.1%ニューコール2616F、0.1%エチレンジアミンPO40EO40をそれぞれ含むPOD標識抗体希釈緩衝液を用いて、実施例3と同様にして測定を行い(但し、一次反応は25で、二次反応は25と37の両温度にて行った)、反応温度による測定値変動を検討した。結果を第5表に記す。

【0119】

【 表 5 】

第5表

全血検体	POE・POP縮合物				POE・POPアルキルエーテル				POE・POPアルキルフェニルエーテル						
	エマルゲンPP-250				ユニルーブ50MB-168				ディスパノールKP189R-40						
	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)		MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)		MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)				
	25℃反応	37℃反応		25℃反応	37℃反応	25℃反応	37℃反応	25℃反応	37℃反応	25℃反応	37℃反応		25℃反応	37℃反応	
10	37.7	33.6	-11	26.2	25.5	-3	25.5	40.6	35.8	-12	35.8	10	39.8	27.6	-31
11	42.8	40.1	-6	31.7	29.8	-6	29.8	45.6	40.2	-12	40.2	11	43.9	29.6	-33
12	50.1	52.1	4	40.5	41.5	2	41.5	54.6	52.1	-5	52.1	12	52.1	40.0	-23
13	30.3	28.3	-7	24.5	22.6	-8	22.6	33.0	28.1	-15	28.1	13	30.8	22.1	-28
14	35.3	34.8	-1	29.2	29.1	0	29.1	37.1	34.6	-6	34.6	14	35.4	28.2	-20
全血検体	POE・POP多環フェニルエーテル				エチレンジアミンPOE・POP縮合物				POEアルキルフェニルエーテル(比較例)						
	ニューコール2616F				エチレンジアミンPO40EO40				ノニットP40						
	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)		MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)		MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)				
	25℃反応	37℃反応		25℃反応	37℃反応	25℃反応	37℃反応	25℃反応	37℃反応	25℃反応	37℃反応		25℃反応	37℃反応	
10	40.9	33.4	-18	36.1	33.5	-7	33.5	39.8	27.6	-31	27.6	10	39.8	27.6	-31
11	46.5	37.9	-19	40.7	38.3	-6	38.3	43.9	29.6	-33	29.6	11	43.9	29.6	-33
12	54.3	50.6	-7	49.4	49.0	-1	49.0	52.1	40.0	-23	40.0	12	52.1	40.0	-23
13	33.1	27.7	-16	29.7	26.2	-12	26.2	30.8	22.1	-28	22.1	13	30.8	22.1	-28
14	38.4	34.3	-11	33.9	32.5	-4	32.5	35.4	28.2	-20	28.2	14	35.4	28.2	-20

MxA蛋白質濃度* (ng/mL)

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

50

第5表に示すように、全血検体を用いた場合でも、測定値変動率はエマルゲンPP-250では-1%~-11%、ユニループ50MB-168では0~-8%、ディスパノールKP189R-40では-5~-15%、ニューコール2616Fでは-7~-15%、エチレンジアミンPO40EO40では-1~-12%であり、ノニデットP40の-33%~-20%に比較して、反応温度の測定値への影響が顕著に抑制されることが分かる。

【実施例6】

【0121】

以下の構成要素(a)~(g)からなるMxA蛋白質測定用キットを調製した。

(a) 抗MxA蛋白質抗体固定化プレート

実施例1[4]の方法に従い、抗MxA蛋白質抗体固定化プレートを次の方法で調製した。10
先ず、5µg/mLの抗MxA蛋白質モノクローナル抗体KM1135の、100mmol/L塩化ナトリウムを含む100mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.5)溶液を、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100µL/ウェルの量で分注し、3日間放置後、上清を吸引除去した。次いで、1%ブロッケー
ース(大日本製薬社製)の、100mmol/L塩化ナトリウムを含む100mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.5)溶液を各ウェルに300µL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、真空乾燥機で3日間乾燥し、抗MxA蛋白質モノクロー
ナル抗体固相化プレートを調製した。

【0122】

(b) 検体希釈液

以下の組成からなる検体希釈液を調製した。

Tris(同仁化学研究所社製)(pH8.5)	0.1mol/L
CHAPS(同仁化学研究所社製)	2.5%
スタホームDO	1.2%
塩化ナトリウム	0.1mol/L
BSA(生化学工業社製)	0.1%
アジ化ナトリウム	0.1%

【0123】

(c) POD標識抗MxA蛋白質抗体溶液

実施例1[5]の方法で調製されたPOD標識抗MxA蛋白質抗体KM1124を、以下の組成からなるPOD標識抗MxA蛋白質抗体希釈液で800倍希釈し、POD標識抗MxA
蛋白質抗体溶液を調製した。30

Bis-Tris(同仁化学研究所社製)(pH7.0)	0.05mol/L
プロノン202B	0.1%
塩化ナトリウム	50mmol/L
BSA(生化学工業社製)	0.1%
4-AA(埼京化成社製)	0.01%
プロクリン300	0.035%

【0124】

(d) 発色液

TMB1ue(セロロジカル社製)

(e) 反応停止液

0.5mol/L硫酸水溶液

(f) 洗浄液

以下の洗浄液を調製した。

リン酸緩衝液(pH7.2)	10mmol/L
ツイーン20	0.05%
塩化ナトリウム	0.15mol/L

【0125】

10

20

30

40

50

(g) 標準物質と標準液

実施例 1 [2] で調製したリコンビナント M x A 蛋白質を、リン酸緩衝液で希釈した後、凍結乾燥し、M x A 蛋白質の標準物質を調製した。

調製した凍結乾燥状態の標準物質を上記 (b) の検体希釈液で希釈し、0 (検体希釈液のみ)、0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24 ng/mL の各濃度の M x A 蛋白質溶液を調製し、これらを標準液とした。

【 0 1 2 6 】

〔 比較例 3 〕

以下の構成要素 (a) ~ (g) からなる M x A 蛋白質測定用キットを調製した。

(a) 抗 M x A 蛋白質抗体固定化プレート

実施例 6 の (a) と同じ抗 M x A 蛋白質抗体固定化プレート。

【 0 1 2 7 】

(b) 検体希釈液

以下の組成からなる検体希釈液を調製した。

H E P E S (同仁化学研究所社製) (p H 8 . 0)	0 . 1 m o l / L	
C H A P S (同仁化学研究所社製)	4 . 9 %	
ノニデット P 4 0	1 . 2 %	
塩化ナトリウム	0 . 1 m o l / L	
B S A (生化学工業社製)	0 . 1 %	
アジ化ナトリウム	0 . 1 %	20

【 0 1 2 8 】

(c) P O D 標識抗 M x A 蛋白質抗体溶液

実施例 1 [5] の方法で調製された P O D 標識抗 M x A 蛋白質抗体 K M 1 1 2 4 を、以下の組成からなる P O D 標識抗 M x A 蛋白質抗体希釈液で 800 倍希釈し、P O D 標識抗 M x A 蛋白質抗体溶液を調製した。

B i s - T r i s (同仁化学研究所社製) (p H 6 . 0)	5 0 m m o l / L	
ノニデット P 4 0	0 . 1 %	
塩化ナトリウム	5 0 m m o l / L	
B S A (生化学工業社製)	0 . 1 %	30
4 - A A (埼玉化成社製)	0 . 0 1 %	
プロクリン 3 0 0	0 . 0 3 5 %	

【 0 1 2 9 】

(d) 発色液

T M B l u e (セロロジカル社製)

(e) 反応停止液

0 . 5 m o l / L 硫酸水溶液

(f) 洗浄液

以下の洗浄液を調製した。

リン酸緩衝液 (p H 7 . 2)	1 0 m m o l / L	40
ツイーン 2 0	0 . 0 5 %	
塩化ナトリウム	0 . 1 5 m o l / L	

【 0 1 3 0 】

(g) 標準物質と標準液

実施例 1 [2] で調製したリコンビナント M x A 蛋白質を、リン酸緩衝液で希釈した後、凍結乾燥し、M x A 蛋白質の標準物質を調製した。

調製した凍結乾燥状態の標準物質を上記 (b) の検体希釈液で希釈し、0 (検体希釈液のみ)、0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24ng/mL の各濃度の M x A 蛋白質溶液を調製し、これらを標準液とした。

【 実施例 7 】

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

測定用試料として、実施例 1 [3] で調製した細胞を、実施例 6 の検体希釈液で 20 倍希釈し、30 分間静置した後、さらに検体希釈液で 8 倍希釈したものを、キットとして、実施例 6 のキットを用い、次の手順により、測定を行った。

【 0 1 3 2 】

実施例 6 (a) の抗 M x A 蛋白質抗体固定化プレートに、(g) で調製したそれぞれの標準液 100 μ L を添加し、所定の温度 (22 、 25 、 28 、 30 、 32 の各温度) で 1 時間反応させ、抗体に M x A 蛋白質を結合させた。反応液を除去した後、(f) の洗浄液 400 μ L でプレートを 5 回洗浄した。次いで、(c) で調製した P O D 標識抗 M x A 蛋白質抗体溶液 100 μ L を添加し、所定の温度 (22 、 25 、 28 、 30 、 32 の各温度) で 0.5 時間反応させた。反応後、反応液を除去し、(f) の洗浄液 400 μ L でプレートを 5 回洗浄した。次いで、暗所にて、0.05% テトラメチルベンジジン及び過酸化水素を含む (d) の発色液 100 μ L を添加し、室温で 10 分間反応させた後、(e) の反応停止液 100 μ L を添加し、室温で 10 分間インキュベーションし、反応を停止させた。反応液の 450nm での吸光度をプレートリーダーで測定し、M x A 蛋白質濃度と吸光度との関係を表す検量線を作製した。

10

【 0 1 3 3 】

[比較例 4]

実施例 6 のキットの代わりに比較例 3 のキットを用いる以外は実施例 7 と同様の方法により測定を行い、M x A 蛋白質濃度と吸光度との関係を表す検量線を作製した。

実施例 7 及び比較例 4 の測定の結果を第 6 表に示す。

20

【 0 1 3 4 】

【表 6】

第 6 表

キット	測定方法	反応温度 (°C)				
		22	25	28	30	32
実施例 6	実施例 7	445.5	443.2	443.5	449.2	435.3
		(100)	(100)	(100)	(101)	(98)
比較例 3	比較例 4	381.0	360.8	338.7	297.6	284.2
		(100)	(95)	(89)	(78)	(75)

30

【 0 1 3 5 】

第 6 表には、各反応温度での反応における測定値と、22 での反応における測定値を 100 とした場合の、各温度での測定値の相対値の両者を記載している。相対値が 100 に近い程、測定が反応温度の影響を受け難いことを意味する。第 6 表から明らかな様に、スタホーム D O (脂肪酸アルカノールアミド) とプロノン 2 0 2 B (P O E ・ P O P 縮合物) とを含む実施例 6 のキットを用いる実施例 7 の測定方法は、ノニデット P - 4 0 (P O E アルキルフェニルエーテル) を含む比較例 3 のキットを用いる比較例 4 の測定方法に比較して、顕著に測定値が安定していた。このことから、本発明の測定方法は、反応温度の影響を受け難い方法であることが分かる。

40

【産業上の利用可能性】

【 0 1 3 6 】

本発明により、感染症の診断等に有用な、検体中の測定対象成分の測定方法および測定用キットが提供される。

フロントページの続き

- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (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

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 国際公開第2008/053973(WO, A1)
特開平01-168624(JP, A)
特開平06-066798(JP, A)
特開2009-186359(JP, A)

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

专利名称(译)	测量样品中待测组分的方法和测量试剂盒		
公开(公告)号	JP6014091B2	公开(公告)日	2016-10-25
申请号	JP2014185247	申请日	2014-09-11
[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		
发明人	川村 みづほ		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/6866 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.D G01N33/543.501.J		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2009250639 2009-10-30 JP		
其他公开文献	JP2015007652A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于测量样本中要测量的部件的方法和套件，其能够进行准确的测量，这些测量不受反应温度等的影响，或者当测量诸如抗原的待测量的部件时。测定被测定成分的方法，其特征在于，在脂肪酸链烷醇酰胺的存在下，使试样中的测定对象成分与结合于被测定成分的第一抗体反应，然后使标记的第二抗体与结合待测量的组分的第二抗体结合以形成包含第一抗体，待测量的组分和标记的第二抗体的免疫复合物；并测量形成的免疫复合物中标记的量；以及用于测量在测量方法中使用的样本中待测量的部件的套件。

全血検体	スタホームDO			ノニットP40		
	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)	MxA蛋白質濃度*		測定値 変動率(%)
	25℃反応	37℃反応		25℃反応	37℃反応	
1	29.1	29.2	0.4	25.1	27.9	11.2
2	17.8	18.0	1.3	12.9	14.7	13.9
3	26.5	27.5	3.7	26.1	28.2	8.0
4	8.7	9.7	12.2	8.3	10.0	20.6
5	15.0	16.3	8.4	8.4	10.3	22.6