

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	U 4 H 0 4 5
33/543	501	33/543	501 A
			501 J
// C 0 7 K 16/00		C 0 7 K 16/00	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12数)

(21)出願番号	特願2001 - 276415(P2001 - 276415)	(71)出願人	591258484 株式会社エイアンドティー 神奈川県藤沢市遠藤2023番地1
(22)出願日	平成13年9月12日(2001.9.12)	(72)発明者	三浦 圭介 東京都日野市日野320 - 11 株式会社エイ アンドティー内
		(72)発明者	川野 充康 東京都日野市日野320 - 11 株式会社エイ アンドティー内
		(74)代理人	100080609 弁理士 大島 正孝
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗原 / 抗体水溶液

(57)【要約】

【課題】 高感度で非特異反応を起こさない良好な特異性を保持した酵素免疫測定法(E I A 法)、または蛍光免疫測定法(F I A 法)、または放射性免疫測定法(R I A 法) による試薬を提供すること。

【解決手段】 (1) 抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、及びビオチン化抗原を含有する抗原水溶液、(2) 抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、及びビオチン化抗体を含有する抗体水溶液、(3) (2) に更にビオチン化抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清を含有する抗体水溶液、(4) 酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識された標識抗体、並びに該標識抗体と同一の動物種の血清を含有する抗体水溶液の 4 種から成る抗原 / 抗体水溶液を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、およびビオチン化抗原を含有することを特徴とするビオチン化抗原を含有する水溶液。

【請求項 2】 抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、およびビオチン化抗体とを含有することを特徴とするビオチン化抗体を含有する水溶液。

【請求項 3】 ビオチン化抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清をさらに含有する請求項 2 に記載の水溶液。

【請求項 4】 酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識された標識抗体、並びに該標識抗体と同一の動物種の血清を含有することを特徴とする標識抗体を含有する水溶液

【請求項 5】 (1) 特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、(2) 上記試料と上記被測定成分に対する抗体をビオチン化抗体として含有する請求項 2 の水溶液と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗体を反応せしめ、(3) 得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗体との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、(4) 工程 (3) の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする請求項 4 の水溶液を接触せしめ、次いで (5) 工程 (4) で得られた担体について標識抗体の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることを特徴とする被測定成分の定性または定量法。

【請求項 6】 (1) 特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、(2) 上記試料と上記被測定成分に対する抗原をビオチン化抗原として含有する請求項 1 の水溶液と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗原を反応せしめ、(3) 得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗原との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、(4) 工程 (3) の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗原を標識抗原として含有する水溶液を接触せしめ、次いで (5) 工程 (4) で得られた担体について標識抗原の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることを特徴とする被測定成分の定性または定量法。

【請求項 7】 (1) 特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、(2) 上記試料と上記被測定成分に対する抗原をビオチン化抗体として含有する請求項 1 の水溶液と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗原を反応せしめ、(3) 得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗原との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、(4) 工程 (3) の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする請求項 4 の水溶液を接触せしめ、次いで (5) 工程 (4) で得られた担体

について標識抗体の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることを特徴とする被測定成分の定性または定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は免疫学的測定において非特異反応を抑制しうる抗原水溶液、抗体水溶液、あるいはそれらの水溶液を用いての定性または定量方法に関する。

10 【0002】

【従来の技術】抗原抗体反応を利用した免疫測定法は、特異的で且つ高感度であるという利点から生体内成分のような微量成分を検出する為の手段として研究の分野のみならず臨床検査の分野でも幅広く利用されている。特に、検出に酵素反応を利用した酵素免疫測定法（以下、「EIA法」と表記することもある）や蛍光を利用した蛍光免疫測定法（以下、「FIA法」と表記することもある）、あるいはラジオアイソトープを利用した放射線同位元素標識物を利用した放射性免疫測定法（以下、「RIA法」と表記することもある）は、免疫測定法の中でもより高感度であることから幅広く用いられてきた（以下、EIA法、FIA法およびRIA法を総称して「XIA法」と表記することもある）。昨今では測定対象となる微量成分もより多種多様化しつつあり、故にXIA法にもより一層の高感度化と特異性の向上が求められている。一方で、高感度化と特異性向上（非特異反応の抑制）は対峙する性能でもあり、両者を両立するのは容易ではない。従って、感度と特異性の双方を両立する為にはより更なる工夫が必要となる。

30 【0003】XIA法の高感度化の技術としては、特表昭58-500300号公報および特開昭61-65162号公報に示されているようなモノクローナル抗体を利用したXIA法が知られている。当初XIA法では、ポリクローナル抗体を用いた方法が一般的であった。しかしながら、ポリクローナル抗体は測定対象に対する特異性と親和性の点で限界があるため、非特異反応を起こさずに高感度化を達成するには限界がある。一方で、モノクローナル抗体はポリクローナル抗体よりも特異性と親和性の点で優位であり、故に特異性を保持しつつ高感度化を達成し易いという利点がある。さらにモノクローナル抗体は、繰返して均質な抗体として得られるという利点とも相俟って、近年のXIA法ではモノクローナル抗体の採用が主流となってきている。さらに、XIA法をより高感度化する手法として、固相に抗ビオチン抗体を固定化して該抗体にビオチン化した抗原あるいは抗体を固定化する手法が知られている（以下、該手法を「B-XIA法」と表記することもある）。B-XIA法においては同一表面積の固相に固定化できる抗原あるいは抗体の量を2倍にすることができ、より一層の高感度化を達成することが可能となる。

【0004】 \times I A 法の特異性向上（非特異反応の抑制）の技術に関しては、特開昭 61 - 65162 号公報に開示されているように、 \times I A 法に使用する試薬にマウス血清を添加する方法が知られている。ヒト血液中には H A M A と呼ばれるマウス抗体に対する抗体が含まれることがあることは広く知られており、 \times I A 法にマウス由来のモノクローナル抗体を使用する場合には H A M A が該モノクローナル抗体を架橋して非特異反応を起こす原因となる。該技術ではマウス血清に H A M A を吸収させることにより非特異反応を抑制して特異性を向上させている。ところが、より一層の高感度化を目指した前述の B - \times I A 法においては、試薬にマウス血清を添加するだけでは非特異反応を抑制する上で効果が不十分であり、未だ特異性の点で問題が残っていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明の目的は、上記 B - \times I A 法に使用する試薬においても十分な非特異反応の抑制効果が得られる抗原水溶液、あるいは抗体水溶液を提供することにある。本発明の他の目的は、それらの水溶液を用い、非特異反応を十分抑制して、特定の被測定成分を定性または定量することにある。本発明のさらに他の目的および利点は以下の説明から明らかになる。

【0006】

【課題を解決する為の手段】本発明者らは上記問題を解決する為に鋭意研究を重ねた結果、抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、あるいはビオチン化抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、あるいは酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識された標識抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清を適宜組合せて含有した抗原水溶液、あるいは抗体水溶液を使用することで、B - \times I A 法においても十分な非特異反応の抑制効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の上記目的および利点は、第 1 に、抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、およびビオチン化抗原を含有することを特徴とするビオチン化抗原を含有する水溶液によって達成される。

【0007】本発明の上記目的および利点は、第 2 に、抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、およびビオチン化抗体とを含有することを特徴とするビオチン化抗体を含有する水溶液によって達成される。本発明の上記目的および利点は、第 3 に、酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識された標識抗体、並びに該標識抗体と同一の動物種の血清を含有することを特徴とする標識抗体を含有する水溶液によって達成される。

【0008】本発明の上記目的および利点は、第 4 に、（1）特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、（2）上記試料と上記被測定成分に対す

る抗体をビオチン化抗体として含有する本発明の上記水溶液と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗体を反応せしめ、（3）得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗体との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、（4）工程（3）の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする本発明の上記水溶液を接触せしめ、次いで（5）工程（4）で得られた担体について標識抗体の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることを特徴とする被測定成分の定性または定量法によって達成される。

【0009】また、本発明の上記目的および利点は、第 5 に、（1）特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、（2）上記試料と上記被測定成分に対する抗原をビオチン化抗原として含有する本発明の上記水溶液と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗原を反応せしめ、（3）得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗原との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、（4）工程（3）の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗原を標識抗原として含有する水溶液を接触せしめ、次いで（5）工程（4）で得られた担体について標識抗原の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることを特徴とする被測定成分の定性または定量法によって達成される。

【0010】さらに、本発明の上記目的および利点は、第 6 に、（1）特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、（2）上記試料と上記被測定成分に対する抗原をビオチン化抗体として含有する本発明の上記水溶液と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗原を反応せしめ、（3）得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗原との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、（4）工程（3）の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする本発明の上記水溶液を接触せしめ、次いで（5）工程（4）で得られた担体について標識抗体の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることを特徴とする被測定成分の定性または定量法によって達成される。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に述べるが、本発明で使用する物質、製法、操作法は以下に限定されるものではない。本発明における抗ビオチン抗体としては、ビオチン、あるいはビオチンと化学的に結合したタンパク質やペプチド等の物質におけるビオチン部分に対して特異的な抗体が何ら制限なく使用される。該抗体の作製方法は公知の方法が何ら制限なく使用可能であり、また該抗体を取得する為に使用する動物種についても何ら制限されることはない。また、該抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。さら

に、該抗体のサブクラスについても特に制限されるものではない。検出感度を考慮すると I g G、あるいは I g M がより好適に使用される。

【0012】本発明における血清としては、公知の手法により血液から分離された血清成分を含むものが何ら制限なく使用することが可能である。より具体的には、単純に血液を遠心分離して得られた上清をそのまま使用してもよいし、フィルター過、活性炭処理、脱脂処理、熱処理、生理食塩水や緩衝液等での希釈等の精製、あるいは加工処理を施して使用してもよい。また、該血清には必要に応じてアジ化ナトリウムやマイクロサイド I ~ III 等の防腐剤、あるいは塩化ナトリウムや塩化カリウム等の塩等を適宜選択して添加してもよい。例えば、本発明においては、抗ビオチン抗体をヤギから取得した場合、ヤギから採取し、場合により上記の如く処理した血清を含有すればよい。

【0013】本発明におけるビオチン化抗原としては、ビオチン化（ビオチンで標識）した抗原が特に制限されることなく用いることができる。該ビオチン化抗原に適用される抗原は抗原活性を有し、且つビオチン化が可能である物質であれば特に限定されるものではない。具体例を挙げると末端、あるいは側鎖にアミノ基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基等の官能基を有するタンパク質、ペプチド、多糖類等がある。また、該物質は天然に存在するもの、合成されたもの、あるいは遺伝子操作により発現されたものでもよく、さらに完全な分子でも断片でもよい。本発明においては目的とする測定対象に応じて適宜抗原の種類が選択される。抗原をビオチン化する方法としては、公知の方法を何ら制限なく用いることができる。一般的には、先ずビオチン化試薬と抗原溶液を接触させて反応させることにより抗原にビオチンを結合させ、次いでゲルろ過や透析等で未反応のビオチン化試薬を除去・精製する方法が知られている。該方法はビオチン化の反応が穏やかであるため抗原への攻撃性が低いことや操作が簡便であること、またビオチン化試薬は市販されており入手が容易であること等から特に好適に用いられる。以下、抗原のビオチン化について具体的に説明する。該反応に使用される好ましいビオチン化試薬を例示すると、ビオチンに N - ヒドロキシスクシンイミド基やマレイミド基等を導入したビオチン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルやビオチン - ペラジニルマレイミド等が挙げられる。また、該ビオチン化の反応はビオチン化試薬と抗原溶液を混合させることにより達成される。抗原溶液に使用される成分としては、ビオチン化試薬と反応性を示さないものであれば公知の緩衝液を何ら制限なく使用することができる。また該溶液の pH は、ビオチン化試薬にビオチン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを使用する場合には、反応効率や抗原への影響を考慮すると pH が 8 ~ 10 の弱塩基性で行なうのが好適である。また、反応温度は反応

効率や抗原への影響を考慮すると室温前後で行なうのが好適である。さらに反応時間は反応温度にもよるが、室温でビオチン化反応を行なう場合には通常 3 ~ 4 時間程度でよい。ビオチン化反応に次いで、ゲルろ過や透析等により未反応のビオチン化試薬の除去・精製を行なうことができる。未反応のビオチン化試薬はビオチン化抗原と競合する可能性があることから除去・精製を行なうことが望ましい。該未反応のビオチン化試薬を除去・精製する方法としては、ゲルろ過による方法や透析による方法等が挙げられる。簡便性やビオチン化抗原の収率を考慮するとゲルろ過による方法がより好適である。該方法で使用されるゲルろ過の担体としては S e p h a d e x G - 25 のような排除限界分子量が 10 KD 以下の脱塩用担体を利用するのが好適である。簡便性を考慮すると例えば S e p h a d e x G - 25 を予めパッキングした PD - 10（アマシャムファルマシア社製）のような少量用の市販脱塩用プレバックカラムがより好適に使用される。

【0014】本発明は、上記の如く、第 1 に、抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、およびビオチン化抗原を含有することを特徴とするビオチン化抗原を含有する水溶液（以下、該水溶液を「抗原水溶液 A」と表記することもある）である。B - x I A 法においては抗原水溶液 A を使用することにより非特異反応を抑制することが可能となる。抗原水溶液 A により非特異反応が抑制される機序については明らかでない部分もあるが、ビオチン化抗原を含有する水溶液に前述の抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清を共存させることにより、被検体中に含まれる抗ビオチン抗体に対する非特異的な吸着成分が該血清によって吸収され、非特異反応が抑制されると考えられる。抗原水溶液 A における血清の濃度は特に制限されるものではないが、非特異反応抑制効果および測定対象の検出感度を考慮すると 5 ~ 50 % 程度とするのが好適である。血清濃度が低すぎると非特異反応抑制効果が少なく、高すぎると測定対象の検出感度が低くなる傾向がある。また、抗原水溶液 A におけるビオチン化抗原の濃度についても特に限定されるものではないが、測定対象の検出感度および反応の特異性を考慮すると、抗原の分子量にも依存するが、概ね 0 . 1 ~ 500 μ g / mL 程度とするのが好適である。ビオチン化抗原の濃度は低すぎると検出感度が低くなり、高すぎると非特異反応が増大する。また、抗原水溶液 A は緩衝剤を用いて pH を調整するのが好適である。使用される緩衝剤としてはリン酸緩衝液やグッド緩衝液等の公知のものを何ら制限なく使用できる。また、pH も特に制限されるものではないが、抗原抗体反応の効率や該水溶液の保存性を考慮すると pH を 5 ~ 9 に調整するのが好適である。さらに、上記水溶液には非特異反応の抑制、あるいは再現性や保存性の向上を目的として、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マ

グネシウム、塩化カルシウム等の塩；アジ化ナトリウム、マイクロサイドⅠ～Ⅲ等の防腐剤；抗ビオチン抗体を取得した動物種以外の動物血清、牛血清アルブミンやカゼイン等のタンパク質を適宜選択して添加することができる。該添加物の濃度は特に限定されるものではない。塩化ナトリウムや塩化カリウム等の塩の場合は0.01～1M程度、アジ化ナトリウムやマイクロサイドⅠ～Ⅲ等の防腐剤の場合は0.01～0.1重量%、動物血清の場合は0.1～50重量%、牛血清アルブミンやカゼインのようなタンパク質は0.01～20重量%とするのが好適である。

【0015】本発明におけるビオチン化抗体としてはビオチン化（ビオチンで標識）した抗体が特に制限されることなく用いることができる。さらに、該ビオチン化抗体に適用される抗体は特定の抗原に対して特異的な抗原抗体反応が可能であれば特に限定されるものではない。該抗体の作製方法は公知の方法を何ら制限なく使用可能であり、また該抗体を取得する為に使用する動物種も何ら制限されることはない。また、該抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、測定対象に対する検出感度を考慮するとモノクローナル抗体がより好適である。さらに、該抗体のサブクラスについても特に制限されるものではないが、検出感度を考慮するとIgG、あるいはIgMがより好適に使用される。尚、該抗体のビオチン化方法については、公知の方法により前述したビオチン化抗原の場合と同様に行なえばよい。

【0016】本発明は、上記のとおり、第2に、抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清、およびビオチン化抗原を含有することを特徴とするビオチン化抗体を含有する水溶液（以下、該水溶液を「抗体水溶液A」と表記することもある）である。例えば、本発明において、抗ビオチン抗体をウサギより取得した場合には、ウサギから採取した血清を含有せしめればよい。さらに、抗体水溶液Aはビオチン化抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清をさらに含有することができる。この水溶液を以下、「抗体水溶液B」と表記することができる。例えば、本発明において、抗ビオチン抗体をウサギより、ビオチン化抗体をマウスより取得した場合には、ウサギ血清に加えてマウス血清をも含有せしめればよい。B-xIA法においては抗体水溶液A、あるいは抗体水溶液Bを使用することにより非特異反応を抑制することが可能となる。抗体水溶液A、あるいは抗体水溶液Bにより非特異反応が抑制される機序については明らかでない部分もあるが、抗体水溶液Aではビオチン化抗体を含有する水溶液に前述の抗ビオチン抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清を共存させることにより、被検体中に含まれる抗ビオチン抗体に対する非特異的な吸着成分が該血清によって吸収され、非特異反応が抑制されると考えられる。また、抗体水溶液Bではさらにビオチン化抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清を

共存させることにより、上記の抗体水溶液Aの機序に加えて抗ビオチン抗体に対する非特異的な吸着成分も第2の血清添加によって吸収され、より一層非特異反応が抑制されると考えられる。抗体水溶液Bはより好適な抗体水溶液として用いることができる。抗体水溶液A、あるいは抗体水溶液Bにおける血清の濃度は特に制限されるものではない。非特異反応抑制効果および測定対象の検出感度を考慮すると5～50%程度とするのが好適である。血清濃度が低すぎると非特異反応抑制効果が少なく、高すぎると測定対象の検出感度が低くなる傾向がある。また、上記水溶液におけるビオチン化抗体の濃度についても特に限定されるものではない。測定対象の検出感度および反応の特異性を考慮すると1～100μg/mL程度とするのが好適である。ビオチン化抗体の濃度は低すぎると検出感度が低くなり、高すぎると非特異反応が増大する。また、抗体水溶液A、あるいは抗体水溶液Bは緩衝剤を用いてpHを調整するのが好適である。使用される緩衝剤としてはリン酸緩衝液やグッド緩衝液等の公知のものを何ら制限なく使用できる。また、pHも特に制限されるものではない。抗原抗体反応の効率や該水溶液の保存性を考慮するとpHが5～9に調整するのが好適である。さらに、抗体水溶液A、あるいは抗体水溶液Bには非特異反応の抑制、あるいは再現性や保存性の向上を目的として、塩化ナトリウムや塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等の塩や、アジ化ナトリウムやマイクロサイドⅠ～Ⅲ等の防腐剤、抗ビオチン抗体あるいはビオチン化抗体を取得した動物種以外の動物血清、牛血清アルブミンやカゼイン等のタンパク質を適宜選択して添加することができる。該添加物の濃度は特に限定されるものではない。塩化ナトリウムや塩化カリウム等の塩の場合は0.01～1M程度、アジ化ナトリウムやマイクロサイドⅠ～Ⅲ等の防腐剤の場合は0.01～0.1重量%、動物血清の場合は0.1～50重量%、牛血清アルブミンやカゼインのようなタンパク質は0.01～20重量%とするのが好適である。

【0017】本発明における酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識された標識抗体としては、酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識した抗体が特に制限されることなく用いることができる。さらに、該標識抗体に適用される抗体は特定の抗原に対して特異的な抗原抗体反応が可能であれば特に限定されるものではない。該抗体の作製方法は公知の方法を何ら制限なく使用可能であり、また該抗体を取得する為に使用する動物種についても何ら制限されることはない。また、該抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、測定対象に対する検出感度を考慮するとモノクローナル抗体がより好適である。さらに、該抗体のサブクラスについても特に制限されるものではない。検出感度を考慮するとIgG、あるいはIgMがより好適に使用さ

れる。また、該標識抗体に使用される標識物は、酵素、蛍光、またはラジオアイソトープであれば公知のものを特に制限されことなく適宜選択して使用することができる。これら標識に好ましく使用される物質を具体的に例示すると、酵素ではペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ等が、蛍光ではイソチオシアネート (FITC)、ジクロロトリアジニルアミン (DTAF) 等が、ラジオアイソトープではヨウ素 125 (^{125}I) のような物質が挙げられる。本発明では該標識物質は、例えば Antibodies (Ed 10 Harlow 他著、1988、p321-358) に開示されているような公知の方法により、上記抗体に標識して使用される。

【0018】本発明は、上記の如く、第3に、酵素、蛍光、またはラジオアイソトープで標識された標識抗体、並びに該標識抗体と同一の動物種の血清を含有することを特徴とする標識抗体を含有する水溶液（以下、該水溶液を「抗体水溶液C」と表記することもある）である。例えば、本発明において、標識抗体をマウスより取得した場合には、マウス血清を含有せしめればよい。かかる抗体水溶液Cを使用することにより非特異反応を抑制することが可能となる。抗体水溶液Cにより非特異反応が抑制される機序については明らかでない部分もあるが、該標識抗体を含有する水溶液に標識抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清を共存させることにより、標識抗体が非特異的に吸着するのを該血清が競合的に阻害していると考えられる。抗体水溶液Cにおける血清の濃度は特に制限されるものではない。非特異反応抑制効果および測定対象の検出感度を考慮すると1~50%程度とするのが好適である。血清濃度が低すぎると非特異 30 反応抑制効果が少なく、高すぎると測定対象の検出感度が低くなる傾向がある。また、抗体水溶液Cにおける該標識抗体の濃度についても特に限定されるものではない。測定対象の検出感度および反応の特異性を考慮すると概ね0.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度とするのが好適である。該標識抗体の濃度は低すぎると検出感度が低くなり、高すぎると非特異反応が増大する。また、抗体水溶液Cは緩衝剤を用いてpHを調整するのが好適である。使用される緩衝剤としてはリン酸緩衝液やグッド緩衝液等の公知のものを何ら制限なく使用できる。また、pH 40 も特に制限されるものではない。抗原抗体反応の効率や該水溶液の保存性を考慮するとpHを5~9に調整するのが好適である。さらに、抗体水溶液Cには非特異反応の抑制、あるいは再現性や保存性の向上を目的として、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等の塩や、アジ化ナトリウムやマイクロサイドI~III等の防腐剤、該標識抗体を取得した動物種以外の動物血清、牛血清アルブミンやカゼイン等のタンパク質を適宜選択して添加することができる。該添加物の濃度は特に限定されるものではない。塩化ナトリウム 50

や塩化カリウム等の塩の場合は0.01~1M程度、アジ化ナトリウムやマイクロサイドI~III等の防腐剤の場合は0.01~0.1重量%、動物血清の場合は0.1~50重量%、牛血清アルブミンやカゼインのようなタンパク質は0.01~20重量%とするのが好適である。

【0019】本発明ではさらに被測定成分に対する抗原を酵素、蛍光、ラジオアイソトープ等で標識された抗原を含有する水溶液（以下、該水溶液を「抗原水溶液B」と表記することもある）を使用する。標識抗原としては、酵素、蛍光、またはラジオアイソトープ等で標識された抗原が特に制限されことなく用いることができる。該標識抗原に適用される抗原は抗原活性を有し、且つ酵素、蛍光、またはラジオアイソトープ等で標識することが可能である物質であれば特に限定されない。該物質について例示すると、タンパク質、ペプチド、多糖類等が挙げられる。また、該物質は天然に存在するもの、合成されたもの、あるいは遺伝子操作により発現されたものでもよく、さらに完全な分子でも断片でもよい。本発明においては目的とする測定対象に応じて適宜抗原の種類が選択される。抗原を酵素、蛍光、またはラジオアイソトープ等で標識する方法としては、前述の標識抗体と同様に、例えば Antibodies (Ed Harlow 他著、1988、p321-358) にあるように、公知の方法で行なうことが可能である。抗原水溶液Bにおける標識抗原の濃度は特に限定されない。測定対象の検出感度および反応の特異性を考慮すると、抗原の分子量にも依存するが、概ね0.1~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度とするのが好適である。標識抗原の濃度は低すぎると検出感度が低くなり、高すぎると非特異反応が増大する。また、抗原水溶液Bは緩衝剤を用いてpHを調整するのが好適である。使用される緩衝剤としてはリン酸緩衝液やグッド緩衝液等の公知のものが何ら制限なく使用できる。また、pHも特に制限されるものではない。抗原抗体反応の効率や該水溶液の保存性を考慮するとpHを5~9に調整するのが好適である。さらに、上記水溶液には非特異反応の抑制、あるいは再現性や保存性の向上を目的として、塩化ナトリウムや塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等の塩や、アジ化ナトリウムやマイクロサイドI~III等の防腐剤、抗ビオチン抗体を取得した動物種以外の動物血清、牛血清アルブミンやカゼイン等のタンパク質を適宜選択して添加することができる。該添加物の濃度は特に限定されるものではない。塩化ナトリウムや塩化カリウム等の塩の場合は0.01~1M程度、アジ化ナトリウムやマイクロサイドI~III等の防腐剤の場合は0.01~0.1重量%、動物血清の場合は0.1~50重量%、牛血清アルブミンやカゼインのようなタンパク質は0.01~20重量%とするのが好適である。

【0020】本発明では、上記の抗原水溶液A、抗体水

溶液 A、抗体水溶液 B、あるいは抗体水溶液 C から成る本発明の 4 種の水溶液と上記抗原水溶液 B とを適宜組合せて使用することにより、特定の被測定成分の定性または定量が達成される。即ち、特定の被測定成分が抗原である場合には、抗体水溶液 A および抗体水溶液 C を組合せた請求項 5 に記載の第 1 の方法を適用することにより、また特定の被測定成分が抗体である場合には抗原水溶液 A および抗原水溶液 B を組合せた請求項 6 に記載の第 2 の方法、若しくは抗原水溶液 A と抗体水溶液 C を組合せた請求項 7 に記載の第 3 の方法を適用することにより、特定の被測定成分の定性または定量が達成される。以下、上記第 1 ～ 3 の方法について具体的に説明する。

【0021】第 1 の方法では、(1) 特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、(2) 上記試料と上記被測定成分に対する抗体をビオチン化抗体として含有する抗体水溶液 A と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗体を反応せしめ、(3) 得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗体との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、(4) 工程 (3) の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする抗体水溶液 C を接触せしめ、次いで (5) 工程 (4) で得られた担体について標識抗体の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることにより被測定成分の定性または定量が達成される。

【0022】第 1 の方法の (1) において特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料としては、例えば血清や血漿、あるいは抗原を含む緩衝液やタンパク質溶液などが挙げられる。該特定の被測定成分とは、ビオチン化抗体と特異的に結合することが可能な物質であり、例えばウイルス抗原やホルモンやサイトカイン等の生理活性物質、腫瘍マーカー、アレルゲンといったタンパク質、ペプチド、多糖類等が挙げられる。尚、該物質は天然に存在するもの、合成されたもの、あるいは遺伝子操作により発現されたものでもよく、さらに完全な分子でも断片でもよい。

【0023】第 1 の方法の (2) において該試料と抗体水溶液 A を一緒にして被測定成分とビオチン化抗体を反応せしめる条件としては、反応温度は 15 ～ 50 、反応時間は 1 ～ 15 分程度が好適である。反応温度が 15

未満であれば反応に時間がかかりすぎ、50 以上ではタンパク質の変性が憂慮される為、また反応時間が 1 分未満だと感度が不足し、15 分を越えると測定に要する時間がかかりすぎる為あまり好ましくない。該試料と抗体水溶液 A を一緒にする比率は、被測定成分の検出感度、あるいは測定の再現性を考慮すると該試料と抗体水溶液 A とをこの順番の体積比で 1 対 0.1 ～ 1 程度とするのが好適である。抗体水溶液 A に対して該試料が少なくなると被測定成分の検出感度が低下し、多くなると抗体水溶液 A におけるビオチン化抗体の濃度を高く設定し

なければならないので、測定の時に分取する抗体水溶液 A の液量誤差が大きくなる為、再現性が低下し易くなる。また、工程 (2) においては抗体水溶液 A の代わりに、ビオチン化抗体を取得した動物種と同一の動物種の血清をさらに含有する抗体水溶液 B を使用してもよい。該工程で抗体水溶液 A の代わりに抗体水溶液 B を使用することで、さらにビオチン化抗体に依存する非特異反応も吸着除去でき、より好適である。

【0024】第 1 の方法の (3) において抗ビオチン抗体を固定した担体としては、抗ビオチン抗体を担持できるものであれば何ら制限なく使用可能である。抗ビオチン抗体を固定化する方法は公知の方法が使用できる。例示すると、抗ビオチン抗体と担体の疎水結合を利用した物理的吸着法、グルタルアルデヒド法やカルボジイミド法あるいは架橋剤等による化学結合法等が挙げられる。また、使用される担体についても特に制限されない。担体の材質や形状を例示すると、材質ではガラス繊維やシリカなどの無機物、あるいはポリスチレンやセルロース等の有機物が挙げられ、形状ではフィルター状、チューブ状、球状等が挙げられる。また、(3) における反応温度および反応時間は、(2) と同様の理由からそれぞれ 15 ～ 50 、および 1 ～ 15 分とするのが好適である。尚、(3) の反応後、余剰のビオチン化抗体や被測定成分といった未反応物を除去する為に該担体を洗滌してもよい。該洗滌操作で使用される洗滌液としては該未反応物を除去できるものであれば特に限定されない。好適には Tween 20 や Triton X-100 等の界面活性剤を含む緩衝液を用いるのがよい。ここで使用する界面活性剤の濃度は界面活性剤の種類にもよるが、洗滌効果を考慮すると 0.05 ～ 1% 程度で用いるのが好適である。また、該洗滌液には洗滌効果を高める為にカゼインやアルブミン等のタンパク質、あるいは動物血清などを添加してもよい。

【0025】第 1 の方法の (4) において上記被測定成分に対する抗体を標識した抗体を含む抗体水溶液 C を接触せしめる条件も、(2)、(3) と同様の理由からそれぞれ 15 ～ 50 、および 1 ～ 15 分とするのが好適である。尚、(4) の反応後についても、余剰の標識抗体といった未反応物を除去する為に該担体を洗滌してもよい。該洗滌操作で使用される洗滌液も該未反応物を除去できるものであれば特に限定されないが、通常上記 (3) で使用した洗滌液と同様のものを使用するのが好適である。

【0026】該第 1 の方法の (5) において、工程 (4) 迄の操作で得られた担体について標識抗体の有無、または量を測定する方法に関しては、抗体の標識物に応じて方法を選択する必要がある。工程 (5) において、標識抗体の標識物が酵素である場合は、酵素活性を測定することにより標識抗体の有無、または量を測定する。尚、酵素活性を測定するにあたっては、標識酵素の

特性に応じて比色、蛍光、あるいは発光基質を選択する必要がある。例えば標識酵素にペルオキシダーゼを選択する場合に使用する基質としては、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMBZ) や 1, 2 - フェニレンジアミン等の比色基質や 4 - ヒドロキシフェニル酢酸や 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸等の発光基質、あるいはルミノールのような発光基質等が挙げられる。これら適宜選択した酵素基質は適当な反応媒に溶解し使用する。尚、該酵素基質溶液には選択した酵素の性質に応じて、例えばペルオキシダーゼを選択した時には過酸化水素のような酵素基質の反応に必要な添加剤を加えて使用する。該酵素基質溶液は工程 (4) 迄の操作で得られた担体に接触して反応させ、次いで酵素基質の性質に応じて、例えば 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMBZ) を選択したときには波長 595 nm の吸光度を測定するといったように比色、蛍光、あるいは発光強度を測定する。次いで得られた比色、蛍光、あるいは発光強度を、予め測定した濃度既知の被測定成分を含む、あるいは被測定成分を含まない被検体溶液より得られた比色、蛍光、あるいは発光強度に参照することにより被検体中に含まれる被測定成分の定性または定量が達成される。工程 (5) において標識抗体の標識物が蛍光、あるいはラジオアイソトープである場合には、工程 (4) 迄に得られた担体をフルオロメーター、あるいはシンチレーションカウンターといった計測機器を使用して、蛍光強度、あるいは放射線量を測定することにより標識抗体の有無、または量を測定する。次いで、標識抗体の標識物が酵素のときと同様に、得られた蛍光強度、あるいは放射線量を、予め測定した濃度既知の被測定成分を含む、あるいは被測定成分を含まない被検体溶液より得られた蛍光強度、あるいは放射線量に参照することにより被検体中に含まれる被測定成分の定性または定量が達成される。

【0027】本発明では特定の被検体成分が抗体のようなビオチン化抗原に親和性を有する物質である場合は、前記の第2の方法、あるいは第3の方法により被測定成分の定性または定量が達成される。即ち第2の方法は、(1) 特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、(2) 上記試料と上記被測定成分に対する抗原をビオチン化抗原として含有する抗原水溶液 A と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗原を反応せしめ、(3) 得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗原との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、(4) 工程 (3) の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗原を標識抗原として含有する抗原水溶液 B を接触せしめ、次いで (5) 工程 (4) で得られた担体について標識抗原の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることにより被測定成分の定性または定量が達成され、また第3の方法は (1) 特定の被測

定成分を含有するかまたは含有しない試料を準備し、(2) 上記試料と上記被測定成分に対する抗原をビオチン化抗体として含有する抗原水溶液 A と一緒にして上記被測定成分とビオチン化抗原を反応せしめ、(3) 得られた反応液を抗ビオチン抗体を固定した担体と接触せしめて上記被測定成分とビオチン化抗原との反応生成物を抗ビオチン抗体と反応せしめ、(4) 工程 (3) の反応液の担体に上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする抗体水溶液 C を接触せしめ、次いで (5) 工程 (4) で得られた担体について標識抗体の標識の有無、または量を測定して被測定成分の有無、または量を求めることにより被測定成分の定性または定量が達成される。

【0028】特定の被検体成分が抗体である場合に、第2の方法、あるいは第3の方法の何れの方法を選択するかについては特に制限はなく、被検体成分の特性や試薬材料の特性、入手の容易性、経済性、あるいは標識の際の加工性等に応じて適宜選択すればよい。具体的に例を挙げると、被検体成分が特異抗体でサブクラスが跨るか、抗原の種類が少ないか、あるいは標識を施しても抗原性が保持されるか等の場合には第2の方法がより好適であるし、被検体成分が特異抗体で抗原の種類が多いか、あるいは標識を施すことにより抗原性の保持が困難であるか等の場合は第3の方法がより好適である。

【0029】上記第2の方法、および第2の方法の(1)において、特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない試料とはある特定の被測定成分を含有するかまたは含有しない水溶液であればよく、例えば血清や血漿、あるいは特異抗体を含む緩衝液やタンパク質溶液などが挙げられる。該特定の被測定成分としてはビオチン化抗原と特異的に結合することが可能な特定の物質であればよく、例えば該ビオチン化抗原に特異的な抗体が挙げられる。尚、該物質は天然に存在するもの、合成されたもの、あるいは遺伝子操作により発現されたものでもよく、さらに完全な分子でも、あるいは例えば抗体の場合 F(ab)₂ や Fab のような断片でもよい。上記第2の方法、および第3の方法の(2)において、該試料と抗原水溶液 A を一緒にして被測定成分とビオチン化抗体を反応せしめる条件としては、第1の方法と同様の理由から、反応温度は 15 ~ 50 °C、反応時間は 1 ~ 15 分程度が好適である。また、該試料と抗原水溶液 A を一緒にする比率も、第1の方法と同様の理由から、この順番の体積比で 1 対 0.1 ~ 1 程度とするのが好適である。

【0030】上記第2の方法、および第3の方法の(3)において抗ビオチン抗体を固定する担体には、第1の方法と同様に抗ビオチン抗体を保持できる担体であれば何ら制限なく使用可能である。抗ビオチン抗体を固定化する方法や担体についても、第1の方法と同様に何ら制限されることはない。即ち、第2の方法、あるいは第3の方法においても、第1の方法と同様に適宜適当な

材質、あるいは形状の担体を選択し、公知の方法で抗ピオチン抗体を固定化すればよい。該工程における反応温度および反応時間も、第１の方法と同様にそれぞれ１５～５０、および１～１５分とするのが好適である。また、第２の方法、あるいは第３の方法においても、（３）の反応後、余剰のピオチン化抗原や非特異成分といった未反応物を除去する為に該担体を洗滌してもよい。該洗滌操作で使用される洗滌液としても該未反応物を除去できるものであればよく、第１の方法と同様のものを使用することができる。

【0031】上記第2の方法の(4)において上記被測定成分に対する抗原を標識抗原として含有する抗原水溶液Bを、あるいは第3の方法の(4)において上記被測定成分に対する抗体を標識抗体とする抗体水溶液を接触せしめる条件も、第1の方法と同様の理由から、それぞれ15～50、および1～15分とするのが好適である。さらに第2の方法の(4)、あるいは第3の方法の(4)の反応後についても、第1の方法と同様に未反応の標識抗原、あるいは標識抗体といった未反応物を除去する為に該担体を洗滌してもよい。該洗滌操作で使用される洗滌液も該未反応物を除去できるものであれば特に限定されず、第1の方法と同様の洗滌液が好適に使用される。

【0032】上記第2の方法、および第3の方法の（5）において、工程（4）迄の操作で得られた担体について標識抗体の有無、または量を測定する方法に関しては、それぞれ標識抗原、あるいは標識抗体の標識物に依じて前述の第1の方法と同様に標識物の測定を行えばよい。次いで、第1の方法と同様に、かかる標識物の測定から得られた比色や発光強度等の酵素活性指標、蛍光強度、あるいは放射線量といったシグナルを、予め測定した濃度既知の被測定成分を含む、あるいは被測定成分を含まない被検体溶液より得られたシグナルに参照することにより被検体中に含まれる被測定成分の定性または定量が達成される。

【 0 0 3 3 】

【実施例】以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0034】実施例1 (HBs抗体測定試薬)

以下、被測定成分をHBs抗体とした例を挙げる。

(1) ビオチン化HBs抗原の調製、および精製

先ず、HBs抗原（明治乳業社製）を0.3mg/mLとなるように10mMのHEPES緩衝液（pH 8.5）を用いて希釈して総量500μLのHBs抗原溶液を調製した。次いで、該溶液にビオチン化試薬（20mM Biotinamidocaprato-NHS、ナカライテクス社製）を10μL添加して混合後、25℃にて3時間インキュベーションした。次いで、予め10mMのリン酸緩衝液（pH 7.4、以下、「PB

Ｓ」と表記することもある)で平衡化したPD-10カラム(アマシャムファルマシア製)を用いて、上記反応液中の未反応のビオチン化試薬を除去するため精製を行った。該精製は先ず該反応液500μLをPD-10カラムにアプライし、次いで2.0mLのPBSを該PD-10カラムに入れ、次いで3.5mLのPBSでビオチン化HBs抗原を回収した。

【0035】(2) ペルオキシダーゼ標識HBs抗原の調製

- 10 先ず 5 mg のペルオキシダーゼ（RZ > 3.0、東洋紡績社製）を 1.2 mL の水に溶解し、次いで該ペルオキシダーゼ溶液に 0.1 M の過ヨウ素酸ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）を 0.3 mL 添加して、25℃で20分静置した。次いで、該反応液を 1 mM の酢酸ナトリウム / 酢酸緩衝液（pH 4.0）に対して、4℃で一晩透析し該透析液を得、過ヨウ素酸活性化ペルオキシダーゼ溶液を得た。次いで、10 mg/mL の HB s 抗原を含む 20 mM の炭酸緩衝液（pH 9.5）を調製し、該溶液 0.5 mL と上記過ヨウ素
- 20 酸活性化ペルオキシダーゼ溶液を混合し、25℃で2時間攪拌した。次いで該反応液に 4 mg/mL の水素化ホウ素ナトリウム水溶液を 0.1 mL 加え、4℃で2時間静置した。次いで、該反応液を PBS に対して一晩透析してペルオキシダーゼ標識 HB s 抗原を得た。

【0036】(3)HBs抗体測定試薬の調製

(1) で調製したビオチン化HBs抗原濃度が40 μg/mLとなるように、またヤギ血清濃度が20%となるようにPBSに添加して第1試薬を調製した。次いで、(2) で調製したペルオキシダーゼ標識HBs抗原の濃度が30 μg/mLとなるように、また牛血清アルブミン(BSA)濃度、および牛胎児血清(FCS)濃度がそれぞれ1%、15%となるようにPBSに添加して第2試薬を調製した。

【0037】(4)HBs抗体の定量

H B s 抗体を含む、若しくは含まないヒト血清を試料として以下の測定に使用した。また、以下の測定は市販の分析装置 I D - 1 0 0 0 (東洋紡績製) を使用して行なった。まず試料 5 0 μ L と第 1 試薬 1 0 μ L を混合して 4 0 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベーション後、該反応液の 5 0 μ L をヤギより取得した抗ヒト H B s 抗体が固相化されているカップ (東洋紡績製) に滴下した。次いで、1 % B S A を含む P B S をカップに 5 0 μ L 滴下し、さらに第 2 試薬を 1 0 μ L 滴下した。4 0 $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベーション後 2 0 0 μ L の 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S で洗滌し、次いで 0 . 0 5 % の 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B Z) 、および 0 . 0 1 % の過酸化水素を含む T M B Z 溶液を 3 0 μ L 滴下し、さらに滴下後 5 . 5 ~ 7 . 5 秒間、および 4 0 . 5 ~ 4 2 . 5 秒間における波長 6 5 0 n m のレーザー光の反射強度の変化量を測定した。上記

測定結果を表 1 に示した。表 1 に示すように、上記 H B s 抗体測定試薬は、非特異反応も起こすことなく、またカットオフ値付近の低力価の H B s 抗体を含む試料でも明確に H B s 抗体を検出することが可能であった。

【 0 0 3 8 】 比較例 1 （ H B s 抗体測定試薬 ）

第 1 試薬にヤギ血清を添加しない以外は実施例 1 と同様

に行なった。該測定結果を表 1 に示した。表 1 に示すように、該 H B s 抗体測定試薬では H B s 抗体陰性血清で非特異反応が起こり、カットオフ値付近の低力価の H B s 抗体を含む試料も明確に判別できなかった。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

試料		実施例 1		比較例 1	
試料名	H B s 抗体基準力価 [mIU/mL]	シグナル ($\Delta K/S$)	測定値 [mIU/mL]	シグナル ($\Delta K/S$)	測定値 [mIU/mL]
陰性血清 A	0.0	0.00647	0.0	0.01285	0.0
陰性血清 B	0.0	0.00532	0.0	0.01474	1.1
陰性血清 C	0.0	0.00639	0.0	0.02565	6.8
陰性血清 D	0.0	0.00694	0.0	0.05289	21.4
陰性血清 E	0.0	0.00651	0.0	0.07392	35.7
陽性血清 A	5.3	0.01639	5.7	0.02941	8.4
陽性血清 B	649.2	0.92606	661.7	1.28727	730.8

【 0 0 4 0 】 実施例 2 （ H B s 抗原測定試薬 ）

以下、被測定成分を H B s 抗原とした例を挙げる。

(1) H B s 抗原の共通抗原決定基 a に対する第 1 ビオチン化モノクローナル抗体、および H B V の p r e - S 2 抗原に対する第 2 ビオチン化モノクローナル抗体の調製および精製

第 1 ビオチン化モノクローナル抗体、および第 2 ビオチン化モノクローナル抗体の調製は、両方とも以下の手順で行なった（以下、第 1 ビオチン化モノクローナル抗体のビオチン化に使用したモノクローナル抗体を「モノクローナル抗体 A」、第 2 ビオチン化モノクローナル抗体のビオチン化に使用したモノクローナル抗体を「モノクローナル抗体 B」と表記する）。ここではモノクローナル抗体 A を用いた第 1 ビオチン化モノクローナル抗体の調製法を示す。尚、モノクローナル抗体 A、およびモノクローナル抗体 B は特殊免疫研究所製のものを使用した。先ず、モノクローナル抗体 A 溶液を 2 m g / m L と 30 なるように 10 m M の H E P E S 緩衝液（p H 8 . 5）を用いて希釈して総量 250 μ L のモノクローナル抗体 A 溶液を調製した。次いで、該溶液にビオチン化試薬（50 m M B i o t i n - A C 5 - O s u、同仁化学社製）を 30 μ L 添加して混合後、25 にて 4 時間インキュベーションした。次いで、予め P B S で平衡化した P D - 10 カラムを用いて、上記反応液中の未反応のビオチン化試薬を除去するため精製を行なった。該精製は先ず該反応液 250 μ L を P D - 10 カラムにアプライし、次いで 2 . 25 m L の P B S を該 P D - 10 カラムに入れ、次いで 3 . 5 m L の P B S で第 1 ビオチン化モノクローナル抗体（以下、「1 - B 抗体」と表記することもある）を回収した。第 2 ビオチン化モノクローナル抗体（以下、「2 - B 抗体」と表記することもある）も上記と同様の方法にて作製した。

【 0 0 4 1 】 (2) H B s 抗原の共通抗原決定基 a に対する第 1 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体、および H B V の p r e - S 2 抗原に対する第 2 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製および精製

第 1 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体、および 50

第 2 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製は、両方とも以下の手順で行なった（以下、第 1 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の作製に使用したモノクローナル抗体を「モノクローナル抗体 C」、第 2 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の作製に使用したモノクローナル抗体を「モノクローナル抗体 D」と表記する）。ここでは、モノクローナル抗体 C を用いた第 1 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の作製法を示す。尚、モノクローナル抗体 C、およびモノクローナル抗体 D は特殊免疫研究所社製のものを使用した。10 m g / m L のモノクローナル抗体 C を含む 20 m M の炭酸緩衝液（p H 9 . 5）を調製し、該溶液 0 . 5 m L と実施例 1 と同様に調製した過ヨウ素酸活性化ペルオキシダーゼ溶液を混合し、25 で 2 時間攪拌した。次いで該反応液に 4 m g / m L の水素化ホウ素ナトリウム水溶液を 0 . 1 m L 加え、4 で 2 時間静置した。次いで、該反応液を P B S に対して一晩透析して第 1 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体（以下、「1 - P 抗体」と表記することもある）を得た。第 2 ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体（以下、「2 - P 抗体」と表記することもある）も上記と同様の方法にて作製した。

【 0 0 4 2 】 (3) H B s 抗原測定試薬の調製

(1) で調製した 1 - B 抗体濃度、および 2 - B 抗体濃度をそれぞれ 20 μ g / m L、即ち 1 - B 抗体と 2 - B 抗体の比がこの順番で 1 対 1、1 - B 抗体と 2 - B 抗体の合計の濃度が 40 μ g / m L となるように、またヤギ血清濃度が 20 % となるように P B S に添加して第 1 試薬を調製した。また、(2) で調製した 1 - P 抗体濃度、および 2 - P 抗体濃度をそれぞれ 5 μ g / m L となるように、即ち 1 - P 抗体と 2 - P 抗体の比がこの順番で 1 対 1、1 - P 抗体と 2 - P 抗体の合計の濃度が 10 μ g / m L となるように、またマウス血清濃度、および牛胎児血清（F C S）濃度がそれぞれ 10 %、3 % となるように P B S に添加して第 2 試薬を調製した。

【 0 0 4 3 】 (4) H B s 抗原の定量

H B s 抗原を含む、若しくは含まないヒト血清を試料として、実施例 1 と同様に分析装置 I D - 1000 を使用

してHBs抗原の定量を行なった。上記測定結果を表2に示した。表2に示すように、上記HBs抗原測定試薬は、非特異反応も起こすこともなく、カットオフ値付近の低濃度のHBs抗原でも明確に検出することが可能であった。

実施例3 (HBs抗原測定試薬)

第1試薬に、さらに10%となるようにマウス血清を添加した以外は、実施例2と同様に行なった。該測定結果を表2に示した。表2に示すように、該HBs抗原測定試薬は、非特異反応も起こすこともなく、カットオフ値10付近の低濃度のHBs抗原でも明確に検出することが可*

*能であった。さらに、実施例2では実施例1の場合よりもよりバックグラウンドが低下し特異性が向上した。

【0044】比較例2 (HBs抗原測定試薬)

第1試薬にヤギ血清を添加しない、および第2試薬にマウス血清を添加しない以外は実施例2と同様に行なった。該測定結果を表2に示した。表2に示すように、該HBs抗原測定試薬ではHBs抗原陰性血清で非特異反応が起こり、カットオフ値付近の低濃度のHBs抗原を含む試料も明確に判別できなかった。

【0045】

【表2】

試料		実施例2		実施例3		比較例2	
試料名	HBs抗原基準濃度 [ng/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [ng/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [ng/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [ng/mL]
陰性血清 A	0.0	0.00877	0.0	0.00583	0.0	0.01286	0.0
陰性血清 B	0.0	0.00926	0.0	0.00564	0.0	0.03359	0.9
陰性血清 C	0.0	0.00975	0.0	0.00619	0.0	0.06889	2.3
陰性血清 D	0.0	0.01031	0.0	0.00686	0.0	0.08472	3.1
陰性血清 E	0.0	0.01292	0.0	0.00727	0.0	0.08664	8.4
陽性血清 A	0.5	0.02998	0.6	0.02813	0.5	0.05273	1.6
陽性血清 B	324.8	7.41930	331.1	7.38220	325.9	8.28957	378.2

【0046】実施例4 (梅毒(TP)抗体測定試薬)
以下、被測定成分を梅毒(以下、梅毒を「TP」と表記することもある)抗体とした例を挙げる。

(1) ビオチン化TP抗原の調製、および精製

該実施例4においてはTP抗原として、分子量がそれぞれ15kD、17kD、47kDである3種のリコンビナントTP抗原(以下、該3種のリコンビナントTP抗原をそれぞれ、「15k-TPAg」、「17k-TPAg」、および「47k-TPAg」と表記する)を使用した。ここでは、15k-TPAgを用いた第1ビオチン化TP抗原の調製法を示す。尚、15k-TPAg、および17k-TPAgについてはBiosPacifical社製のものを、47k-TPAgについてはCapricorn社製のものを使用した。

【0047】まず、15k-TPAg溶液を1mg/mLとなるように10mMのHEPES緩衝液(pH 8.5)を用いて希釈して総量500μLの15k-TPAg溶液を調製した。次いで、該溶液にビオチン化試薬(50mM Biotinamidocaprato-NHS、ナカライテスク社製)を10μL添加して混合後、25℃にて3時間インキュベーションした。次いで、予めPBSで平衡化したPD-10カラムを用いて、上記反応液中の未反応のビオチン化試薬を除去するため精製を行なった。該精製は先ず該反応液500μLをPD-10カラムにアプライし、次いで2mLのPBSを該PD-10カラムに入れ、次いで3.5mLのPBSで第1ビオチン化TP抗原(以下、「B-15k-TPAg」と表記することもある)を回収した。第2ビオチン化TP抗原(以下、「B-17k-TPAg」と表記することもある)、および第3ビオチン化TP抗原

(以下、「B-47k-TPAg」と表記することもある)も上記と同様の方法にて作製した。

【0048】(2) ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGモノクローナル抗体の調製および精製

10mg/mLの抗ヒトIgGモノクローナル抗体(日本バイオテスト研究所製)を含む20mMの炭酸緩衝液(pH 9.5)を調製し、該溶液0.5mLと実施例1と同様に調製した過ヨウ素酸活性化ペルオキシダーゼ溶液を混合し、25℃で2時間攪拌した。次いで該反応液に4mg/mLの水素化ホウ素ナトリウム水溶液を0.1mL加え、4℃で2時間静置した。次いで、該反応液をPBSに対して一晚透析してペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGモノクローナル抗体を得た。

【0049】(3) TP抗体測定試薬の調製

(1)で調製したB-15k-TPAg濃度、B-17k-TPAg濃度、およびB-47k-TPAg濃度をそれぞれ1.0μg/mL、1.1μg/mL、および3.1μg/mLとなるように、またヤギ血清濃度が20%となるようにPBSに添加して第1試薬を調製した。また、(2)で調製したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGモノクローナル抗体の濃度が100ng/mLとなるように、またマウス血清濃度が10%となるようにPBSに添加して第2試薬を調製した。

【0050】(4) TP抗体の定量

TP抗体を含む、若しくは含まないヒト血清を被検体溶液として、実施例1と同様に分析装置ID-1000を使用してTP抗体の定量を行なった。該測定結果を表3に示した。表2に示すように、該TP抗体測定試薬は、非特異反応も起こすこともなく、カットオフ値付近の低力価のTP抗体でも明確に検出することが可能であっ

た。

【0051】比較例3 (HBs抗原測定試薬)

第1試薬にヤギ血清を添加しない、および第2試薬にマウス血清を添加しない以外は実施例4と同様に行な

た。該測定結果を表3に示した。表3に示すように、該*

*TP抗体測定試薬ではTP抗体陰性血清で非特異反応が起こり、カットオフ値付近の低力価のTP抗体を含む試料も明確に判別できなかった。

【0052】

【表3】

試料		実施例4		比較例3	
試料名	TP抗体基準力価 [U/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [U/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [U/mL]
陰性血清 A	0.0	0.00571	0.0	0.01076	0.0
陰性血清 B	0.0	0.00617	0.0	0.02663	8.8
陰性血清 C	0.0	0.00682	0.0	0.05639	16.3
陰性血清 D	0.0	0.00798	0.0	0.07483	18.9
陰性血清 E	0.0	0.00692	0.0	0.04455	14.1
陽性血清 A	10.3	0.03236	10.7	0.05284	15.7
陽性血清 B	698.8	1.87850	701.4	2.41279	752.1

【0053】以上の結果より、特定の被測定成分を測定するにあたり、抗原水溶液A、抗体水溶液A、抗体水溶液B、あるいは抗体水溶液Cの4種から成る本発明の水溶液を適宜組合せて使用することによって、非特異反応の抑制が可能になることが明らかとなった。さらに、本発明の上記水溶液を使用することにより、カットオフ付近の低値の試料においても明確に判別することができ、高感度の測定が可能になることが明らかとなった。

20

【0054】

【発明の効果】特定の被測定成分の定性または定量を行なうにあたり、本発明の抗原水溶液、あるいは抗体水溶液を使用することによって、非特異反応を起こさず、高感度な測定を行なうことが可能となる。即ち、本発明によって良好な特異性を示し、且つ高感度な測定試薬および方法を提供することが可能となった。

フロントページの続き

(72)発明者 岩本 久彦
東京都日野市日野320-11 株式会社エイ
アンドティー内

(72)発明者 吉村 佳典
東京都日野市日野320-11 株式会社エイ
アンドティー内

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA40 BA70 BA71
DA75 DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	抗原/抗体水溶液		
公开(公告)号	JP2003083966A	公开(公告)日	2003-03-19
申请号	JP2001276415	申请日	2001-09-12
申请(专利权)人(译)	株式会社エイアンドティー		
[标]发明人	三浦圭介 川野充康 岩本久彦 吉村佳典		
发明人	三浦 圭介 川野 充康 岩本 久彦 吉村 佳典		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/00 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.U G01N33/543.501.A G01N33/543.501.J C07K16/00		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	大岛正孝		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：通过酶免疫测定（EIA方法），荧光免疫测定（FIA方法）或放射免疫测定（RIA方法）提供试剂，这些试剂高度敏感并保留了良好的特异性而不会引起非特异性反应。提供。解决方案：（1）与获得抗生物素抗体的动物种类相同的动物的血清，以及含有生物素化抗原的抗原的水溶液，以及（2）与获得抗生物素抗体的动物种类相同的动物的血清。含有生物素化抗体的血清和抗体水溶液，（3）含有与（2），（4）中的酶，荧光或放射线获得生物素化抗体的动物相同的动物物种的血清。使用由四种类型的同位素标记的标记抗体组成的抗原/抗体水溶液和包含与标记抗体相同动物物种的血清。的抗体水溶液。

試料		実施例 1		比較例 1	
試料名	HBs 抗体基準力価 [mIU/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [mIU/mL]	シグナル (ΔK/S)	測定値 [mIU/mL]
陰性血清 A	0.0	0.00647	0.0	0.01286	0.0
陰性血清 B	0.0	0.00532	0.0	0.01474	1.1
陰性血清 C	0.0	0.00639	0.0	0.02665	6.8
陰性血清 D	0.0	0.00694	0.0	0.05299	21.4
陰性血清 E	0.0	0.00651	0.0	0.07302	35.7
陽性血清 A	5.3	0.01639	5.7	0.02941	8.4
陽性血清 B	649.2	0.92606	661.7	1.28727	730.8