

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6943789号
(P6943789)

(45) 発行日 令和3年10月6日 (2021. 10. 6)

(24) 登録日 令和3年9月13日 (2021. 9. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/42 (2006. 01)

C O 7 K 16/42

C 1 2 N 5/20 (2006. 01)

C 1 2 N 5/20

C 1 2 N 15/06 (2006. 01)

C 1 2 N 15/06 1 0 0

G O 1 N 33/531 (2006. 01)

G O 1 N 33/531 B

G O 1 N 33/543 (2006. 01)

G O 1 N 33/543 5 0 1 J

請求項の数 10 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-29071 (P2018-29071)
 (22) 出願日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)
 (65) 公開番号 特開2019-140987 (P2019-140987A)
 (43) 公開日 令和1年8月29日 (2019. 8. 29)
 審査請求日 令和2年10月2日 (2020. 10. 2)

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-02556

(73) 特許権者 509352945
 田中貴金属工業株式会社
 東京都千代田区丸の内2丁目7番3号
 (74) 代理人 110002000
 特許業務法人栄光特許事務所
 (72) 発明者 鈴木 啓太
 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金
 属工業株式会社 平塚テクニカルセンター
 内
 (72) 発明者 岩本 久彦
 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金
 属工業株式会社 平塚テクニカルセンター
 内
 審査官 山本 晋也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗体および非特異反応抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号 N I T E B P - 0 2 5 5 6 のハイブリドーマにより産生される、イヌ I g M
 に対するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

受託番号 N I T E B P - 0 2 5 5 6 のハイブリドーマ。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含有する、免疫測定法用の非特異反応抑制剤。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体の含有量が 0 . 5 μ g 以上 2 0 μ g 以下である、請求項 3 に記
 載の非特異反応抑制剤。

【請求項 5】

前記免疫測定法が、イムノクロマトグラフ法である請求項 3 または 4 に記載の非特異反
 応抑制剤。

【請求項 6】

請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の非特異反応抑制剤を含有する、イムノクロマトグ
 ラフ用テストストリップ。

【請求項 7】

請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の非特異反応抑制剤を含有する、イムノクロマトグ
 ラフ用テストキット。

【請求項 8】

検体中の被検出物質を特異的に検出するための免疫測定法において、請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載の非特異反応抑制剤の存在下に免疫反応を行わせる、免疫測定法。

【請求項 9】

前記免疫測定法が、酵素免疫測定法、凝集法又はイムノクロマトグラフ法である請求項 8 に記載の免疫測定法。

【請求項 10】

前記免疫測定法が、イムノクロマトグラフ法である請求項 8 に記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体、それを含有する免疫測定法用の非特異反応抑制剤、イムノクロマトグラフ用テストストリップ及びイムノクロマトグラフ用テストキット、並びに、非特異反応抑制剤の存在下に免疫反応を行わせる免疫測定法に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

抗原抗体反応を利用した免疫測定法は、微量成分を特異的かつ高感度に測定できることから、臨床検査に広く利用されている。そのような免疫測定法としては、例えば、酵素免疫測定法（例えば、ELISA 法）、凝集法、イムノクロマトグラフ法、放射免疫測定法、比濁法等が知られている。

20

【0003】

抗原抗体反応は、ある抗原決定基に対して誘導された抗体の抗原結合部位が、その抗原決定基と高い相補性をもつことにより生ずる、特異性の高い結合反応である。ところが、抗原抗体反応を利用した免疫測定においては、本来の目的とする特異的な抗原抗体反応以外の非特異反応が生じ、測定値の信頼性が損なわれてしまうことがしばしば認められている。

【0004】

このような現象が起こる原因の 1 つとして、被検出物質（抗原）以外の成分であるにもかかわらず、免疫測定に用いる抗体に結合する成分（以下、非特異因子という）が検体中に存在することが挙げられる。検体中に非特異因子が存在すると、被検出物質が存在しないにもかかわらず、被検出物質が存在することを示す測定結果が得られることとなる。

30

【0005】

このような非特異因子は、被検出物質と特異的に反応する抗体のみならず、被検出物質と反応しない抗体とも結合する物質である。非特異因子としては、異好性抗体やリウマトイド因子が知られている。

【0006】

異好性抗体は、ヒト血液等に存在するヒト以外の動物種由来の抗体に対する抗体であり、マウス抗体に対するヒト抗体（HAMA）をはじめ、ヤギ抗体に対するヒト抗体（HAGA）、ヒツジ抗体に対するヒト抗体（HASA）、及びウサギ抗体に対するヒト抗体（HARA）等がある。

40

【0007】

リウマトイド因子は、ヒト血液等に存在するヒトの抗体に対する抗体であり、関節リウマチ患者に多く見られる自己抗体である。

【0008】

さらに、上記異好性抗体やリウマトイド因子以外にも、いまだ成分が明らかになっていない非特異因子が多く存在するといわれている。

【0009】

検体中の非特異因子の存在は、微量成分を特異的かつ高感度に測定できるという免疫測定法の利点を損ない、臨床検査分野においては、患者などの疾病の診断を誤らせることにもつながる重大な問題であるため、従来、非特異因子による非特異反応を抑制し正しい測

50

定値を得るための様々な試みが行われてきた。

【 0 0 1 0 】

特許文献 1 には、試料中に存在する非特異因子である I g M 型または I g G 型の自然抗体に対して反応する抗ヒト I g M 抗体や抗ヒト I g G 抗体を免疫測定系に添加することにより、非特異因子による非特異反応を抑制し、抗原を正確に測定することができる、免疫学的測定法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 1 】

【特許文献 1】特開平 1 1 - 2 8 7 8 0 1 号公報

10

【 0 0 1 2 】

しかしながら、従来の方法では、免疫測定法における非特異反応の抑制にある程度の効果を示すものの、必ずしもその効果は十分とは言えず、いまだ改良の余地があった。また、検体によっては、従来用いられてきた非特異反応抑制剤による効果がほとんど得られず、非特異因子による非特異反応を抑制できないものも少なからず存在し、実用上必ずしも満足できるものではなかった。

【 0 0 1 3 】

したがって、本発明では、非特異因子による非特異反応を十分に抑制することができるモノクローナル抗体、およびそれを含有する免疫測定法用の非特異反応抑制剤等を提供することを目的とする。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、イヌ I g M に反応するモノクローナル抗体のうち、特定のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いて免疫測定法を実施した結果、非特異反応を十分に抑制することができることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 5 】

したがって、本発明は以下の通りである。

1. 受託番号 N I T E B P - 0 2 5 5 6 のハイブリドーマにより産生される、イヌ I g M に対するモノクローナル抗体。
2. 受託番号 N I T E B P - 0 2 5 5 6 のハイブリドーマ。
3. 前記 1 に記載のモノクローナル抗体を含有する、免疫測定法用の非特異反応抑制剤。
4. 前記モノクローナル抗体の含有量が 0 . 5 μ g 以上 2 0 μ g 以下である、前記 3 に記載の非特異反応抑制剤。
5. 前記免疫測定法が、イムノクロマトグラフ法である前記 3 または 4 に記載の非特異反応抑制剤。
6. 前記 3 ~ 5 のいずれか 1 に記載の非特異反応抑制剤を含有する、イムノクロマトグラフ用テストストリップ。
7. 前記 3 ~ 5 のいずれか 1 に記載の非特異反応抑制剤を含有する、イムノクロマトグラフ用テストキット。
8. 検体中の被検出物質を特異的に検出するための免疫測定法において、前記 3 ~ 5 のいずれか 1 に記載の非特異反応抑制剤の存在下に免疫反応を行わせる、免疫測定法。
9. 前記免疫測定法が、酵素免疫測定法、凝集法又はイムノクロマトグラフ法である前記 8 に記載の免疫測定法。
- 1 0 . 前記免疫測定法が、イムノクロマトグラフ法である前記 8 に記載の免疫測定法。

30

40

【発明の効果】

【 0 0 1 6 】

本発明のモノクローナル抗体、およびそれを含有する非特異反応抑制剤を用いることにより、免疫測定法における非特異反応を抑制することができる。

50

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、本発明の非特異反応抑制剤を含有するイムノクロマトグラフ用テストストリップの一実施形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本発明の目的の範囲内において、適宜変更を加えて実施することができる。

【0019】

本発明のモノクローナル抗体は、受託番号がNITE BP-02556であるハイブリドーマ(Anti-Dog IgM No. 12)により産生される、イヌIgMに対するモノクローナル抗体である。イヌIgMとはイヌに由来するIgM型の免疫グロブリンを意味する。

【0020】

本出願人は、後述する実施例に示す方法により得られた上記ハイブリドーマ(Anti-Dog IgM No. 12)を独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託した。以下に寄託を特定する内容を記載する。

【0021】

本出願人は、上記ハイブリドーマ(Anti-Dog IgM No. 12)を下記の条件で寄託した。

(1) 寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(2) 連絡先：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室 電話番号0438-20-5580

(3) 受託番号：NITE BP-02556

(4) 識別のための表示：Anti-Dog IgM No. 12

(5) 原寄託日：2017年10月10日

【0022】

上記モノクローナル抗体は、非特異反応抑制剤に含有させて用いることにより、免疫測定法における非特異反応を十分に抑制することができる。

【0023】

上記モノクローナル抗体を含有する非特異反応抑制剤は、上記モノクローナル抗体のみからなるものであってもよく、本発明の効果を妨げない範囲で上述のモノクローナル抗体以外の他の成分を含有するものであってもよい。他の成分としては、例えば、リン酸塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン等の緩衝剤、アジ化ナトリウム等の防腐剤、塩化ナトリウム、および塩化カリウム等の無機塩等が挙げられる。

【0024】

本発明の非特異反応抑制剤の形態は、特に限定されるものではなく、固体であってもよく、液体であってもよい。液体の場合は、溶媒中に非特異反応抑制剤が含有する成分を溶解又は懸濁させることで調製することができる。溶媒としては、例えば、水、グリセロール等の有機溶媒、これらの混合溶媒等が挙げられる。

【0025】

本発明の非特異反応抑制剤中の上述のモノクローナル抗体の含有量は、特に限定されるものではなく、検体の種類、検体の量、免疫測定法の測定条件等に基づいて適宜調整することができる。例えば、1検体あたりに使用する非特異反応抑制剤中の上述のモノクローナル抗体の含有量は、0.5 μ g以上20 μ g以下が好ましく、1 μ g以上15 μ g以下がより好ましく、2 μ g以上10 μ g以下がさらに好ましい。

【0026】

本発明の非特異反応抑制剤を適用できる免疫測定法としては、免疫反応を利用して、検体中の被検出物質を測定する方法であれば特に限定されず、その効果を発揮することができる。例えば、酵素免疫測定法(例えば、ELISA法)、凝集法、イムノクロマトグラ

10

20

30

40

50

フ法、放射免疫測定法、比濁法等が挙げられ、好ましくは、酵素免疫測定法、凝集法又はイムノクロマトグラフ法である。本発明の非特異反応抑制剤は、検体の採取の容易性から、取り扱いが容易とされているイムノクロマトグラフ法において特に有用である。

【0027】

次に、本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップについて説明する。本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップは、上述の非特異反応抑制剤を含有する。

【0028】

本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップは、イムノクロマトグラフ法を利用して、例えば、被検出物質の有無を判定したり、被検出物質の濃度を測定したりするために使用することができる。

10

【0029】

本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップは、上述の非特異反応抑制剤を含有すること以外は特に限定されるものではなく、公知のイムノクロマトグラフ用テストストリップと同様の構成とすることができる。本発明においては、非特異反応抑制剤は、イムノクロマトグラフ用テストストリップを構成する部材のうち、検体を含む液相が毛細管現象によって展開する部材の中に免疫反応に関与し得る態様で含まれていればよい。このようにすることで、非特異反応抑制剤の存在下で免疫反応を行うことができ、非特異反応を十分に抑制できる。

【0030】

以下、本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップの一実施形態を図面に基づいて説明するが、本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップは以下の実施形態に限定されるものではない。

20

【0031】

図1に示す本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップの一実施形態は、サンプルパッド1と、コンジュゲートパッド2と、メンブレンパッド3と、吸収パッド5と、バックシート6とを備える。

【0032】

サンプルパッド1は、検体を含む試料を添加し、毛細管現象によって試料を下流へ移動させるために設けられている部材である。サンプルパッド1の材料としては、公知の材料を用いることができ、例えば、シリカ、チタニア、ジルコニア、セリア、及びアルミナ等のセラミック微粒子、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維、綿等が挙げられる。また、サンプルパッド1の大きさ、形状は特に限定されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。サンプルパッド1には、後述のコンジュゲートパッドの機能を持たせることもできる。

30

【0033】

コンジュゲートパッド2は、検体中の被検出物質と特異的に反応する抗体又は抗原を標識物質で標識した標識試薬を含有する部材である。検体を含む試料がコンジュゲートパッド2を通過すると、被検出物質と標識試薬との複合体が形成される。コンジュゲートパッド2の材料としては、公知の材料を用いることができ、例えば、シリカ、チタニア、ジルコニア、セリア、及びアルミナ等のセラミック微粒子、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維、綿等が挙げられる。また、コンジュゲートパッド2の大きさ、形状は特に限定されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。

40

【0034】

標識物質としては、特に限定されるものではなく、例えば、金、銀、白金等の金属ナノ粒子、ラテックス粒子等の公知のものを使用することができる。金属ナノ粒子の平均粒径は、特に限定されるものではないが、好ましくは10nm以上150nm以下、より好ましくは20nm以上100nm以下である。また、ラテックス粒子の平均粒径は、特に限

50

定されるものではないが、好ましくは100nm以上500nm以下、より好ましくは100nm以上250nm以下である。検体中の被検出物質の有無を目視で判定できることから、標識物質は、金ナノ粒子であることが好ましい。

【0035】

標識試薬中の抗体又は抗原は、検体中の被検出物質と特異的に結合することができるものであれば市販されている抗体又は抗原を使用することができ、必要に応じて作製したものを使用することができる。被検出物質が抗原である場合には、それに特異的に結合することができる抗体が好ましい。抗体はモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。このような抗体は、例えば被検出物質である抗原で動物を感作することによる公知の方法で製造することができる。動物種の具体例としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ及びヒト等を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

【0036】

標識試薬中の抗体又は抗原の含有量は、特に限定されるものではないが、1テストストリップあたり、好ましくは0.01μg以上10μg以下、より好ましくは0.02μg以上5μg以下、さらに好ましくは0.02μg以上1μg以下である。

【0037】

メンブレンパッド3は、被検出物質を検出することにより、被検出物質の有無等を判定したり、被検出物質の濃度を測定したりするための検出部4を有する部材である。検出部4には、被検出物質を捕捉するための抗体又は抗原を含む捕捉試薬が固定されている。検出部4では、検体中に被検出物質が含まれると、標識試薬、被検出物質及び捕捉試薬からなる複合体が形成されて発色し、検体中に被検出物質が含まれないと、標識試薬、被検出物質及び捕捉試薬からなる複合体が形成されないため発色しない。メンブレンパッド3の材料としては、公知の材料を用いることができ、例えば、シリカ、チタニア、ジルコニア、セリア、及びアルミナ等のセラミック微粒子、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維、綿等が挙げられる。また、メンブレンパッド3の大きさ、形状は特に限定されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。

20

【0038】

捕捉試薬に用いられる抗体又は抗原は、上記標識試薬に含有される抗体又は抗原と同一の抗体又は抗原であってもよく、異なる抗体又は抗原であってもよい。

30

【0039】

捕捉試薬に用いられる抗体又は抗原は、検体中の被検出物質と特異的に結合することができるものであれば市販されている抗体又は抗原を使用することができ、必要に応じて作製したものを使用することができる。被検出物質が抗原である場合には、それに特異的に結合することができる抗体が好ましい。抗体はモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。このような抗体は、被検出物質である抗原で動物を感作することによる公知の方法で製造することができる。動物種の具体例としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ及びヒト等を挙げることができるが、これらに限定されない。

40

【0040】

捕捉試薬に用いられる抗体又は抗原の含有量は、特に限定されるものではないが、1テストストリップあたり、好ましくは0.1μg以上10μg以下、より好ましくは0.2μg以上5μg以下、さらに好ましくは0.2μg以上4μg以下である。

【0041】

検出部の形状としては、特に限定されるものではなく、例えば、線状、円状等が挙げられる。視認性、検出効率の観点から、線状が好ましい。

【0042】

メンブレンパッド3は、非特異的な吸着により分析の精度が低下することを防止するた

50

め、必要に応じて、公知の方法でブロッキング処理を行うことができる。一般にブロッキング処理はウシ血清アルブミン、スキムミルク、カゼイン、及びゼラチン等のタンパク質が好適に用いられる。かかるブロッキング処理後に、必要に応じて、T w e e n（登録商標）20、T r i t o n X - 100（登録商標）、及びS D S等の界面活性剤を1つ又は2つ以上組み合わせて洗浄してもよい。

【0043】

吸収パッド5は、メンブレンパッド3を通過した余剰の試料等を吸収する部材である。吸収パッドの材料としては、公知の材料を用いることができ、例えば、シリカ、チタニア、ジルコニア、セリア、及びアルミナ等のセラミック微粒子、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維、綿等が挙げられる。また、吸収パッド5の大きさ、形状は特に限定されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。

10

【0044】

バックグシート6は、サンプルパッド1、コンジュゲートパッド2、メンブレンパッド3、吸収パッド5等の各部材を固定する支持体として用いられる部材である。バックグシートの材料としては、特に限定されるものではなく、例えば、粘着剤によって試料に対して不透過性、非透湿性となるような、従来公知の種々の材料を用いることができる。また、バックグシート6の大きさ、形状は特に限定されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。

20

【0045】

本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップの一実施形態においては、非特異反応抑制剤は、サンプルパッド1、コンジュゲートパッド2及びメンブレンパッド3のうち少なくとも1つに含有されている。

【0046】

本発明のイムノクロマトグラフ用テストストリップに含まれる非特異反応抑制剤中の上述のモノクローナル抗体の含有量は、特に限定されるものではないが、1テストストリップあたり、好ましくは0.5 μ g以上20 μ g以下、より好ましくは1 μ g以上15 μ g以下、さらに好ましくは2 μ g以上10 μ g以下である。上記範囲であることによって、非特異反応を強く抑制できる。

30

【0047】

次に、本発明のイムノクロマトグラフ用テストキットについて説明する。

【0048】

本発明においてテストキットとは、免疫測定に必要な試薬等の2以上の物品を備えるキットをいう。本発明のイムノクロマトグラフ用テストキットは、上述の非特異反応抑制剤を含むこと以外は特に限定されるものではなく、公知のイムノクロマトグラフ用テストキットと同様の構成とすることができる。

【0049】

本発明においては、非特異反応抑制剤は、免疫反応に関与し得る態様でイムノクロマトグラフ用テストキットに含まれていればよい。例えば、非特異反応抑制剤は、試薬として独立して含有されていてもよく、免疫測定に用いる検体希釈液等の試薬、テストストリップ等に予め含有されていてもよい。

40

【0050】

本発明の一実施形態においては、イムノクロマトグラフ用テストキットは、テストストリップに加えて、免疫測定に必要な試薬を備える。テストストリップとしては、特に限定されるものではなく、例えば、上述のサンプルパッド、コンジュゲートパッド、メンブレンパッド、吸収パッド、バックグシート等から構成されるものを使用することができる。免疫測定に必要な試薬としては、特に限定されるものではないが、例えば、検体希釈液、展開液等が挙げられる。

【0051】

50

本発明の一実施形態においては、テストストリップ、試薬の少なくとも１つに非特異反応抑制剤が含有される。より具体的には、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、メンブレンパッド、試薬の少なくとも１つに非特異反応抑制剤が含有される。このようにすることで、非特異反応抑制剤の存在下で抗原抗体反応を行うことができ、非特異反応を抑制することができる。

【００５２】

本発明のイムノクロマトグラフ用テストキットに含まれる非特異反応抑制剤中の上述のモノクローナル抗体の含有量は、特に限定されるものではないが、１テストキットあたり、好ましくは $0.5 \mu\text{g}$ 以上 $20 \mu\text{g}$ 以下、より好ましくは $1 \mu\text{g}$ 以上 $15 \mu\text{g}$ 以下、さらに好ましくは $2 \mu\text{g}$ 以上 $10 \mu\text{g}$ 以下である。上記範囲であることによって、溶液の粘度を増加させることなく非特異反応を効率的に抑制することができる。

10

【００５３】

次に、本発明の免疫測定法について説明する。

【００５４】

本発明の免疫測定法は、上述の非特異反応抑制剤の存在下で免疫反応を行うものである。本発明の免疫測定法は、非特異反応抑制剤の存在下で免疫反応を行うことにより、本来の目的とする免疫反応以外の非特異反応を抑制することができる。

【００５５】

本発明の免疫測定法としては、免疫反応を利用して、検体中の被検出物質を定量的若しくは定性的に測定する方法であれば特に限定されるものではなく、例えば、酵素免疫測定法（例えば、ELISA法）、凝集法、イムノクロマトグラフ法、放射免疫測定法、比濁法等が挙げられ、好ましくは、酵素免疫測定法、凝集法又はイムノクロマトグラフ法である。本発明の免疫測定法は、検体の採取の容易性から、取り扱いが容易とされているイムノクロマトグラフ法において特に有用である。

20

【００５６】

本発明の免疫測定法に用いられる検体としては、特に限定されるものではなく、例えば、血清、血漿、全血、尿、唾液、鼻汁等が挙げられる。

【００５７】

本発明の免疫測定法において測定することができる被検出物質としては、例えば、検体中に含まれるウイルス、細菌、寄生虫、代謝物等が挙げられ、より具体的にはそれらが有するタンパク質、ペプチド、多糖類、及び複合糖質等を挙げることができる。特に、検体中に微量に含まれる抗原が好適である。なぜなら、検体中に含まれる抗原の濃度が微量である程、相対的に非特異的反応の影響が大きくなるので、本発明の非特異反応抑制剤が有用となるからである。

30

【００５８】

本発明における免疫反応は、非特異反応抑制剤の存在下で行うものであれば特に限定されるものではなく、常法にしたがって行うことができる。例えば、免疫反応を行う前に予め検体と非特異反応抑制剤とを接触させ、続いて検体中の被検出物質に結合し得る抗体又は抗原と接触させて免疫反応を行うことができる。また、免疫反応を行う前に予め検体中の被検出物質に結合し得る抗体又は抗原と非特異反応抑制剤とを接触させ、続いて検体と接触させて免疫反応を行うことができる。

40

【００５９】

本発明に用いられる非特異反応抑制剤中の上述のモノクローナル抗体の含有量は、特に限定されるものではなく、検体の種類、検体の量、免疫測定法の測定条件等に基づいて適宜調整することができる。例えば、１検体あたりに使用する非特異反応抑制剤中の上述のモノクローナル抗体の含有量は、 $0.5 \mu\text{g}$ 以上 $20 \mu\text{g}$ 以下が好ましく、 $1 \mu\text{g}$ 以上 $15 \mu\text{g}$ 以下がより好ましく、 $2 \mu\text{g}$ 以上 $10 \mu\text{g}$ 以下がさらに好ましい。

【００６０】

本発明の免疫測定法がイムノクロマトグラフ法である場合には、例えば、抗原を含む検体に予め非特異反応抑制剤を添加して得られた試料を固相に添加し、固相中で免疫複合体

50

を形成することで抗原を検出することができる。また、予め非特異反応抑制剤を添加したサンプルパッド、コンジュゲートパッド等の固相に抗原を含む検体を展開し、固相中で免疫複合体を形成することで抗原を検出することができる。

【0061】

本発明の免疫測定法が酵素免疫測定法（例えば、ELISA法）である場合には、例えば、抗原を含む検体に予め非特異反応抑制剤を添加し、その後、常法にしたがって抗原抗体反応を行うことで抗原の濃度を測定することができる。

【0062】

本発明の免疫測定法が凝集法である場合には、例えば、ラテックス凝集比濁法の場合、抗原を含む検体中に予め非特異反応抑制剤を添加しておいてもよいし、ラテックス混濁液中に添加しておいてもよい。ラテックス凝集比濁法は常法により行うことができる。

【実施例】

【0063】

以下、本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。

【0064】

[抗体の作製]

イヌIgM（Rockland社製、製品名DOG IgM Whole molecule）を免疫原として抗イヌIgM抗体のモノクローナル抗体を、次のように常法に従って作製した。100μgの上記イヌIgMと等量のAdjuvant Complete Freund（Difco）を混合して、マウス（BALB/c、5週齢、日本SLC）に3回免疫し、その脾臓細胞を細胞融合に用いた。細胞融合には、マウスの骨髓腫細胞であるSp2/0-Ag14細胞（Shulmanら、Nature, 276, 269-270, 1978）を用いた。細胞の培養には、Dulbecco's Modified Eagle Medium（Gibco）にL-グルタミン 0.3mg/ml、ペニシリンGカリウム 100単位/ml、硫酸ストレプトマイシン 100μg/ml、Gentacin 40μg/mlを添加し（DMEM）、これに牛胎児血清（JRH）を10%となるように加えた培養液を用いた。細胞融合は、免疫マウスの脾臓細胞とSp2/0-Ag14細胞を混合し、そこにPolyethylene glycol solution（Sigma）を添加することにより行った。融合細胞はHAT-DMEM

[0.1mM Sodium Hypoxanthine、0.4μM Aminopterinおよび0.016mM Thymidine（Gibco）を含む血清加DMEM]で培養し、酵素免疫測定法（ELISA法）により培養上清中の抗体産生を確認した。抗体産生陽性の細胞をHT-DMEM [0.1mM Sodium Hypoxanthineおよび0.16mM Thymidineを含む血清加DMEM]で培養し、さらに血清加DMEMで培養を続けた。

【0065】

クローニングした細胞は、2, 6, 10, 14-Tetramethylpentadecane（Sigma）を接種しておいたマウス（BALB/c、リタイア、日本SLC）に腹腔内接種し、腹水を採取した。この腹水をプロテインGカラムに供し、モノクローナル抗体を精製した。得られた抗体のうち、4種のモノクローナル抗体（No. 12、32、70、80）を後述する試験に用いた。これらのアイソタイプはIgG型であった。このうちNo. 12は、上述した受託番号NITE BP-02556のハイブリドーマにより産生される、イヌIgMに対するモノクローナル抗体である。

【0066】

[非特異反応抑制試験]

検体として、非特異反応を示すヒト血清を用い、上記作製したモノクローナル抗体、及び、従来公知の異好性阻止試薬HBRによる免疫測定法の非特異反応抑制効果を評価した。

10

20

30

40

50

具体的には、図1に示すように、バックグシート6上に、検出部4を有するメンブレンパッド3と、サンプルパッド1と、コンジュゲートパッド2と、吸収パッド5とを形成したテストストリップ、及び展開試料を以下のとおり作製し、イムノクロマトグラフ法により測定を行い、非特異反応抑制効果を評価した。

【0067】

(1) サンプルパッドの作製

サンプルパッドとして、グラスファイバーからなる不織布(ミリポア社製: 300mm×300mm)を用いた。

(2) コンジュゲートパッドの作製

金コロイド懸濁液(田中貴金属工業社製: LC40nm)0.5mlに、リン酸緩衝液(pH7.4)で0.05mg/mlの濃度になるように希釈した抗ジカウイルスNS1抗体(Aaltobioreagents社製、製品名Anti-Zikavirus NS1 Antibody)を0.1ml加え、室温で10分間静置した。

次いで、1質量%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝液(pH7.4)を0.1ml加え、更に室温で10分間静置した。その後、十分攪拌した後、8000×gで15分間遠心分離を行い、上清を除去した後、1質量%のBSAを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を0.1ml加えた。以上の手順で標識試薬を作製した。

上記作製した標識試薬300μLに300μLの10質量%トレハロース水溶液と1.8mLの蒸留水を加えたものを12mm×300mmのグラスファイバーパッド(ミリポア社製)に均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲートパッドを作製した。

【0068】

(3) 検出部の作製

メンブレンとしてニトロセルロースからなるシート(ミリポア社製、商品名: HF120、300mm×25mm)を用いた。

次に、5質量%のイソプロピルアルコールを含むリン酸緩衝液(pH7.4)で1.0mg/mlの濃度になるように、抗ジカウイルスNS1抗体(Aaltobioreagents社製、製品名Anti-Zikavirus NS1 Antibody)を希釈した溶液150μLを、乾燥されたメンブレン上の検出部に1mmの幅でイムノクロマト用ディスペンサー「XYZ3050」(BIODOT社製)を用いて1μL/mmの量(1シートあたり25μL)でライン状に塗布した。

また、金ナノ粒子標識試薬の展開の有無や展開速度を確認するために検出部の下流に、金ナノ粒子標識物質と広く親和性を有するヤギ由来抗血清をリン酸緩衝液(pH7.4)で希釈した液をコントロール部位(コントロールライン)に塗布した。その後、50で30分間乾燥させ、室温で一晩乾燥させた。

(4) テストストリップの作製

検出部を有するメンブレンパッドに、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、及びグラスファイバー製の不織布からなる吸収パッドを順次貼り合わせた。そして、裁断機で幅が5mmとなるように裁断し、バックグシート(倉本産業社製、製品名イムノクロマト用バックグシート)上に貼り付け、テストストリップとした。なお、コンジュゲートパッドの試料展開方向の長さを12mmとした。

(5) 展開試料の調製

非特異反応を示すヒト血清(SCIPAC社製、製品名Normal Female Serum)を検体とし、検体30μL、0.5%Triton X-100を含むPBS溶液60μL、及び上記作製した実施例または比較例のモノクローナル抗体各4μg、あるいはHBR(Scantibody社製)4μgを混合し、展開試料を調製した。また、上記抗体の代わりにPBS10μLを使用したものをコントロールとした。

(6) 測定

上記作製したテストストリップ及び展開試料を用いて、以下の方法で非特異反応抑制効果を試験した。

10

20

30

40

50

展開試料 150 μ L をテストストリップのサンプルパッドに添加し展開させ、15 分後にイムノクロマトリーダーを用いて、検出部の発色強度 (450 nm の吸光度) を測定した。その結果を表 1 に示す。

また、判定方法を以下に示す。

○：検出部の発色が目視で認識されない

×：検出部の発色が目視で認識される

【0069】

【表 1】

表1

	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3	HBR	コントロール
抗体	No.12 (NITE BP -02556)	No.70	No.80	No.32	—	—
発色強度 (mAbs)	10.1	39.7	46.8	65.2	58.4	85.4
判定	○	×	×	×	×	×

10

【0070】

コントロールの結果からもわかるように、検体として使用したヒト血清 (S C I P A C 社製、製品名 Normal Female Serum) は、非特異反応が生じる検体であることがわかる。そして、本発明における抗体を用いた実施例では、比較例の抗体や異好性阻止試薬 H B R と比較しても顕著に非特異反応を抑制できた。

20

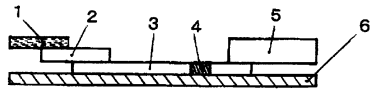
【符号の説明】

【0071】

- 1 サンプルパッド
- 2 コンジュゲートパッド
- 3 メンブレンパッド
- 4 検出部
- 5 吸収パッド
- 6 バッキングシート

30

【図 1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 0 1 M
G 0 1 N 33/543 5 2 1
C 1 2 P 21/08

(56)参考文献 特開 2 0 1 6 - 6 5 7 9 5 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 2 6 7 5 8 (W O , A 1)
特開 2 0 1 7 - 1 5 5 3 3 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 6
C 0 7 K 1 6 / 4 2
G 0 1 N 3 3 / 5 3 1
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3
C 1 2 P 2 1 / 0 8
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)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d