

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0101421 (43) 공개일자 2012년09월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)		(71) 출원인 교와 메텍스 가부시키키가이샤 일본 도쿄도 주오구 하루미 1쵸메 8-10
(21) 출원번호 10-2012-7013819		(72) 발명자 가와무라 미즈호 일본 시즈오카현 순토군 나가이즈미쵸 미나미이시 키 아자가미야마지 600방1 교와 메텍스 가부시키키 가이샤 교와 메텍스 캄큐쇼 나이
(22) 출원일자(국제) 2010년10월27일 심사청구일자 없음		(74) 대리인 특허법인코리아나
(85) 번역문제출일자 2012년05월29일		
(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/069027		
(87) 국제공개번호 WO 2011/052620 국제공개일자 2011년05월05일		
(30) 우선권주장 JP-P-2009-250639 2009년10월30일 일본(JP)		

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **검체 중의 측정 대상 성분의 측정 방법 및 측정용 키트**

(57) 요약

항원 등의 검체 중의 측정 대상 성분을 측정할 때에, 반응 온도 등의 영향을 받지 않고 정확한 측정을 가능하게 하는, 검체 중의 측정 대상 성분의 측정 방법 및 측정용 키트를 제공한다.

검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법, 및 당해 측정 방법에 사용하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.

특허청구의 범위

청구항 1

검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

표지화 제 2 항체를 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키는 방법.

청구항 3

검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드인 방법.

청구항 5

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,

폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 방법.

청구항 6

제 2 항에 있어서,

지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드이고, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

담즙산 유도체를 첨가하여 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시키는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

담즙산 유도체가 양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]프로판술포네이트 또는

3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시프로판술포네이트인 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

담즙산 유도체가 비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 N,N-비스(3-글루콘아미드프로필)콜아미드 또는 N,N-비스(3-D-글루콘아미드프로필)데옥시콜아미드인 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

제 1 항체가 불용성 담체에 부동화되어 있는 측정 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

검체가 전혈인 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

측정 대상 성분이 MxA 단백질인 방법.

청구항 15

측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체, 및 지방산 알칸올아미드를 함유하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 포함하는 제 2 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

제 2 시약이 추가로 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 키트.

청구항 17

측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 포함하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체, 및 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 제 2 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.

청구항 18

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서,

지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드인 키트.

청구항 19

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서,

폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 키트.

청구항 20

제 16 항에 있어서,

지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드이고, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 키트.

청구항 21

제 15 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

제 1 시약이 추가로 담즙산 유도체를 포함하는 키트.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

담즙산 유도체가 양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 키트.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]프로판술포네이트 또는 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시프로판술포네이트인 키트.

청구항 24

제 21 항에 있어서,

담즙산 유도체가 비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 키트.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 N,N-비스(3-글루콘아미드프로필)콜아미드 또는 N,N-비스(3-D-글루콘아미드프로필)테옥시콜아미드인 키트.

청구항 26

제 15 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,

제 1 항체가 불용성 담체에 부동화되어 있는 키트.

청구항 27

제 15 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서,

검체가 전혈인 키트.

청구항 28

제 15 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,

측정 대상 성분이 MxA 단백질인 키트.

명세서

기술분야

본 발명은 검체 중의 측정 대상 성분의 측정 방법 및 측정용 키트에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 검체 중의 성분을 측정하는 방법으로서, 면역학적 측정법이 이용되고 있다. 면역학적 측정 방법으로는, RIA 법 (방사 면역 측정법), EIA 법 (효소 면역 측정법), CLIA 법 (화학 발광 면역 측정법), CLEIA (화학 발광 효소 면역 측정법), LA 법 (라텍스 응집법), TIA 법 (면역 비탁법), 임류노크로마토그래피법 등의 많은 방법이 있다. 이들 측정법에서는, 면역학적 수법에 의해 측정하는 경우, 검체 중의 성분 (또는 항체) 과 그것에 대한 항체 (또는 항원) 사이에 있어서의 항원 항체 반응을 이용하고 있다. 또, 이들 면역학적 측정법에 있어서는, 미리, 농도를 알고 있는 표준 물질을 측정하여 얻어진 수치 (흡광도) 와 각각에 대한 측정값 (농도) 의 관계를 그래프에 플롯한 검량선 (표준 곡선) 을 작성하여, 목적으로 하는 검체 중의 성분의 측정값을 구한다. 이들 측정에 있어서 사용하는 표준 물질에는, 원료의 입수가 용이하고, 다량으로 조제하는 것이 가능한 리코비넨트 항원이 많이 사용되고 있다.
- [0003] 그러나, 리코비넨트 항원은 검체 중의 성분인 네이티브 항원과 반드시 면역 반응성이 일치한다고 할 수 없고, 측정할 때의 완충액이나 첨가제에 따라서도 반응성이 상이한 경우가 있다. 특히, 항원 항체 반응시의 반응 온도가 변동된 경우에는 양자의 반응성의 상위가 현저해져, 온도에 의한 측정의 변동을 일으킨다는 문제가 있다 (특허문헌 1 ? 2 참조).
- [0004] MxA 단백질은 I 형 인터페론 (인터페론 α / β) 에 의해 유도되는 일련의 단백질의 하나로, 분자량 78 kDa, Dynamine 슈퍼 패밀리에 속하고, GTPase 활성을 갖고, 백혈구, 특히 단핵구의 세포질 내에 발현된다. 기능으로는, 바이러스의 증식을 저해함으로써 항바이러스 작용을 갖고 있는 것이 알려져 있고, 바이러스 감염 초기에 있어서의 생체의 항바이러스 상태의 확립에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (비특허문헌 1 ? 4 참조).
- [0005] 몇 가지 동물종에서도 보여지는 MxA 단백질은 그 아미노산 말단에 특징적인 아미노산 배열을 갖는다. N 말 (末) G 도메인은 GTPase 로서의 활성이나 항바이러스 작용 필수 부분이고, C 말 영역은 α 헬릭스 구조가 풍부하고, 류신 지퍼 구조를 갖는다. 이 양 부분은 분자 내에서 서로 반응하거나 분자 사이에서 서로 결합하여 자기 응집을 일으키는 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 5 참조).

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 2008-101924호
(특허문헌 0002) 국제 공개 제2006/073073호 팜플렛

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) J.Interferon Res., vol.7, p.331-343 (1987).
(비특허문헌 0002) Mol.Cell.Biol., vol.9, p.5062-5072 (1989).
(비특허문헌 0003) J.Virol., vol.64, p.1171-1181 (1990).
(비특허문헌 0004) Traffic, vol.3, p.710-717 (2002).
(비특허문헌 0005) J.Biological Chem., vol.273, p.28365-28370 (1998).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은, 항원 등의 검체 중의 측정 대상 성분을 측정할 때에, 반응 온도 등의 영향을 받지 않고 정확한 측정을 가능하게 하는, 검체 중의 측정 대상 성분의 측정 방법 및 측정용 키트를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명자들은 본 과제를 해결하기 위하여 예의 검토하여, 검체 중의 측정 대상 성분의 면역 측정법에 있어서, 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시킴으로써, 또, 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시킴으로써, 반응 온도 등의 영향을 받지 않고, 정확한 측정이 가능해지는 것을 알아내어, 본 발명을 완성시켰다. 즉, 본 발명은 이하의 [1] ? [28] 에 관한 것이다.
- [0010] [1] 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법.
- [0011] [2] 표지화 제 2 항체를 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키는 [1] 에 기재된 방법.
- [0012] [3] 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법.
- [0013] [4] 지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드인 [1] 또는 [2] 에 기재된 방법.
- [0014] [5] 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 [2] 또는 [3] 에 기재된 방법.
- [0015] [6] 지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드이고, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 [2] 에 기재된 방법.
- [0016] [7] 담즙산 유도체를 첨가하여 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시키는 [1] ? [6] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0017] [8] 담즙산 유도체가 양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 [7] 에 기재된 방법.
- [0018] [9] 양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]프로판술포네이트 또는 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시프로판술포네이트인 [8] 에 기재된 방법.
- [0019] [10] 담즙산 유도체가 비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 [7] 에 기재된 방법.
- [0020] [11] 비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 N,N-비스(3-글루콘아미드프로필)콜아미드 또는 N,N-비스(3-D-글루콘아미드프로필)테옥시콜아미드인 [10] 에 기재된 방법.
- [0021] [12] 제 1 항체가 불용성 담체에 부동화되어 있는 [1] ? [11] 중 어느 하나에 기재된 측정 방법.
- [0022] [13] 검체가 전혈인 [1] ? [12] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0023] [14] 측정 대상 성분이 MxA 단백질인 [1] ? [13] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0024] [15] 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체, 및 지방산 알칸올아미드를 함유하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 포함하는 제 2 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.
- [0025] [16] 제 2 시약이 추가로 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 [15] 에 기재된 키트.
- [0026] [17] 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 포함하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체, 및 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 제 2 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.
- [0027] [18] 지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드인 [15] 또는 [16] 에 기재된 키트.
- [0028] [19] 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥

시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 [16] 또는 [17] 에 기재된 키트.

[0029] [20] 지방산 알칸올아미드가 지방산 디에탄올아미드이고, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제가 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르, 및 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제인 [16] 에 기재된 키트.

[0030] [21] 제 1 시약이 추가로 담즙산 유도체를 포함하는 [15] ? [20] 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0031] [22] 담즙산 유도체가 양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 [21] 에 기재된 키트.

[0032] [23] 양쪽성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]프로판술포네이트 또는 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시프로판술포네이트인 [22] 에 기재된 키트.

[0033] [24] 담즙산 유도체가 비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체인 [21] 에 기재된 키트.

[0034] [25] 비이온성 계면 활성 작용을 갖는 담즙산 유도체가 N,N-비스(3-글루콘아미드프로필)콜아미드 또는 N,N-비스(3-D-글루콘아미드프로필)테옥시콜아미드인 [24] 에 기재된 키트.

[0035] [26] 제 1 항체가 불용성 담체에 부동화되어 있는 [15] ? [25] 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0036] [27] 검체가 전혈인 [15] ? [26] 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0037] [28] 측정 대상 성분이 MxA 단백질인 [15] ? [27] 중 어느 하나에 기재된 키트.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 의해, 반응 온도 등의 영향을 받지 않고, 정확한 측정을 가능하게 하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정 방법 및 측정용 키트가 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] (1) 검체

[0040] 본 발명에 있어서 사용되는 검체로는, 본 발명에 의한 측정을 가능하게 하는 검체이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 전혈 (혈액), 혈구, 혈청, 혈장, 골수액, 뇨, 조직, 배양 세포를 들 수 있다. 또한, 전혈에는, 전혈 유래의 혈구 분획에 혈장이 혼합되어 있는 검체도 포함된다. 전혈로는, 피검자로부터 채취한 혈액 그 자체이어도 되는데, 채취한 혈액을 처리한 것이어도 되고, 처리한 혈액이 바람직하다. 당해 처리로는, 예를 들어 항응고 처리, 용혈 처리 등을 들 수 있고, 이들 처리를 조합해도 된다.

[0041] 성분 (측정 대상물) 이 혈구의 세포 내 성분인 경우에는, 전혈로서, 용혈 처리한 혈액이 바람직하고, 항응고 처리와 용혈 처리의 양 처리를 실시한 혈액이 특히 바람직하다. 항응고 처리로는, 예를 들어 채취한 혈액에 EDTA, 헤파린 등을 첨가하는 처리 등을 들 수 있다. 용혈 처리로는, 예를 들어 계면 활성제 또는 사포닌류 용액의 첨가, 저장액 (低張液) 과의 혼합, 동결 용해, 초음파 처리 등을 들 수 있다.

[0042] (2) 측정 대상 성분

[0043] 본 발명에 있어서의 측정 대상 성분으로는, 본 발명에 의한 측정을 가능하게 하는 측정 대상 성분이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 핵산, 단백질, 지질, 비타민, 다당류 등을 들 수 있다. 핵산으로는 DNA, RNA, ATP, ADP, AMP, 사이클릭 AMP 등을 들 수 있다. 또, 단백질로는 효소, 호르몬, 각종 펩티드 등을 들 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서 바람직한 측정 대상 성분으로는, 세포 내에 포함되는 물질, 대사 산물 등을 들 수 있고, 인터페론 등의 각종 사이토카인에 의해 세포 내에 유발되는 단백질 등이 바람직하다. 구체적인 측정 대상 성분으로는, I 형 인터페론에 의해 세포질 내로 유도되는 MxA 단백질 (전술한 비특허문헌 2 ? 3 참조) 등을 들 수 있다.

[0045] (3) 지방산 알칸올아미드

[0046] 본 발명에 있어서의 지방산 알칸올아미드로는, 예를 들어 지방산 디에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 N-메틸에탄올아미드, 지방산 모노이소프로판올아미드, 지방산 디이소프로판올아미드 등을 들 수 있고, 지방산 디에탄올아미드가 바람직하다. 지방산 디에탄올아미드로는, 예를 들어 라우르산디에탄올아미드, 카프

르산디에탄올아미드, 카프릴산디에탄올아미드, 데칸산디에탄올아미드, 미리스트산디에탄올아미드, 팔미트산디에탄올아미드, 스테아르산디에탄올아미드, 이소스테아르산디에탄올아미드, 올레산디에탄올아미드, 리놀산디에탄올아미드, 옥틸데칸산디에탄올아미드, 코코넛유 지방산 디에탄올아미드, 야자 지방산 디에탄올아미드, 우지 지방산 디에탄올아미드, 알킬알칸올아미드, 팜핵유 지방산 디에탄올아미드를 들 수 있다. 이들 중에서, 올레산디에탄올아미드, 야자 지방산 디에탄올아미드, 팜핵유 지방산 디에탄올아미드가 바람직하다. 올레산디에탄올아미드의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 스타폼 DO, 스타폼 DOS (이상, 니치유사 제조) 등, 야자 지방산디에탄올아미드의 구체예 (시판품)로는, 스타폼 F, 스타폼 DFC, 스타폼 DF4 (이상, 니치유사 제조) 등, 팜핵유 지방산 디에탄올아미드의 구체예 (시판품)로는, 아미논 PK-02S, 아미논 PK-03S (이상, 카오사 제조) 등을 들 수 있다.

[0047] 지방산 알칸올아미드의 항원 항체 반응에 있어서의 농도로는, 본 발명의 측정 방법을 가능하게 하는 농도이면 특별히 제한은 없지만, 예를 들어 0.1 ? 1.4 % 이다. 본 발명에 있어서는, 지방산 알칸올아미드를 단독 (1종류)으로 사용할 수도 있는데, 2종 이상 조합하여 사용할 수도 있다.

[0048] (4) 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제

[0049] 본 발명에 있어서의 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제는 본 발명의 측정 방법을 가능하게 하는 것이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물 (이하, POE?POP 축합물이라고 기재한다), 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬에테르 (이하, POE?POP 알킬에테르라고 기재한다), 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌알킬페닐에테르 (이하, POE?POP 알킬페닐에테르라고 기재한다), 폴리옥시에틸렌 다고리 페닐에테르 (이하, POE 다고리 페닐에테르라고 기재한다), 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 다고리 페닐에테르 (이하, POE?POP 다고리 페닐에테르라고 기재한다), 또는 에틸렌디아민폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 축합물 (이하, 에틸렌디아민 POE?POP 축합물이라고 기재한다) 등을 들 수 있고, POE?POP 축합물, POE?POP 알킬에테르, 에틸렌디아민 POE?POP 축합물이 바람직하고, POE?POP 축합물이 특히 바람직하다.

[0050] POE?POP 축합물은 블록 공중합체, 랜덤 공중합체 중 어느 것이어도 된다. POE?POP 축합물의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 프로논 102, 프로논 104, 프로논 201, 프로논 202B, 프로논 204, 프로논 208, 프로논 403 (이상, 니치유사 제조), 에마르겐 PP-230, 에마르겐 PP-250, 에마르겐 PP-290 (이상, 카오사 제조), 플루로닉 L-101, 플루로닉 L-103, 플루로닉 L-121, 플루로닉 L-122, 플루로닉 F-108 (이상, 아사히 전화 공업사 제조) 등을 들 수 있다.

[0051] POE?POP 알킬에테르의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 유니루브 50MB-168, 유니루브 75DE-25, 유니루브 75DE-3800, 유니루브 MT-0620B (이상, 니치유사 제조), 유니세이프 PKA-5015, 유니세이프 PKA-5016 (이상, 니치유사 제조), EMALLEX DAPE-220, EMALLEX DAPE-230 (이상, 닛폰 에멀션사 제조), 노이겐 XL-400, 노이겐 XL-1000F (이상, 다이이치 공업 제약사 제조) 등을 들 수 있다.

[0052] POE?POP 알킬페닐에테르의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 에마르겐 L40 (카오사 제조), 디스파놀 KP189-40, 디스파놀 KP189R-40 (이상, 니치유사 제조) 등을 들 수 있다.

[0053] POE 다고리 페닐에테르의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 뉴콜 714, 뉴콜 707, 뉴콜 2609, 뉴콜 2614 (이상, 닛폰 유화제사 제조), 에마르겐 A-60, 에마르겐 A-90, 에마르겐 B-66 (이상, 카오사 제조), BLAUNON DSP-9, BLAUNON DSP-12.5, BLAUNON TSP-5, BLAUNON TSP-16 (이상, 아오키 유지사 제조) 등을 들 수 있다.

[0054] POE?POP 다고리 페닐에테르의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 뉴콜 2616 F, 뉴콜 710-F, 뉴콜 2608F, 뉴콜 707-F (이상, 닛폰 유화제사 제조), 뉴카르겐 CP-160, 뉴카르겐 GP-120 (이상, 타케모토 유지사 제조) 등을 들 수 있다.

[0055] 에틸렌디아민 POE?POP 축합물의 구체예 (시판품)로는, 예를 들어 에틸렌디아민 P040E040 (니치유사 제조), 플루로닉 TR-704 (아사히 전화 공업사 제조) 등을 들 수 있다.

[0056] 본 발명의 측정 방법에 있어서의 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제의 농도로는, 본 발명의 측정 방법을 가능하게 하는 농도이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 0.01 ? 1 % 이고, 0.05 ? 0.2 % 가 바람직하다. 본 발명에 있어서는, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 단독 (1종류)으로 사용할 수도 있지만, 2종 이상 조합하여 사용할 수도 있다.

[0057] (5) 담즙산 유도체

[0058] 본 발명에 있어서의 담즙산 유도체로는, 본 발명의 측정을 가능하게 하는 것이면 특별히 제한은 없지만, 예를

들어 양쪽성 계면 활성제 작용을 갖는 담즙산 유도체, 비이온성 계면 활성제 작용을 갖는 담즙산 유도체 등을 들 수 있다. 양쪽성 계면 활성제 작용을 갖는 담즙산 유도체로는, 예를 들어 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]프로판술포네이트 {3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid} (이하, CHAPS 로 약기한다), 3-[(3-콜아미드프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시프로판술포네이트 {3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonic acid} (이하, CHAPSO 로 약기한다) 등을 들 수 있다.

[0059] 비이온성 계면 활성제 기능을 갖는 담즙산 유도체로는, 예를 들어 N,N-비스(3-D-글루콘아미드프로필)콜아미드 [N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)cholamide] (이하, BIGCHAP 로 약기한다), N,N-비스(3-D-글루콘아미드프로필)데옥시콜아미드 [N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholamide] (이하, deoxy-BIGCHAP 로 약기한다) 등을 들 수 있다.

[0060] 본 발명의 측정 방법에 있어서의 담즙산 유도체의 농도로는, 임계 미셀 농도 (cmc) 의 1 배 ? 50 배의 범위의 농도로 사용하면 되고, 특히 cmc 농도의 1 배 ? 10 배가 바람직하다. 본 발명에 있어서, 담즙산 유도체를 단독 (1 종류) 으로 사용할 수도 있는데, 2 종 이상 조합하여 사용할 수도 있다.

[0061] (6) 항체 및 표지화 항체

[0062] 본 발명에 있어서의 항체로는, 측정 대상 성분에 특이적으로 결합하는 항체이면 특별히 제한은 없고, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 모두 사용할 수 있는데, 모노클로날 항체가 바람직하다. 또, 본 발명에 있어서의 항체로는, 항체를 파파인 처리에 의해 얻어지는 Fab, 펩신 처리에 의해 얻어지는 F(ab')₂, 펩신 처리-환원 처리에 의해 얻어지는 Fab' 등의 Fc 부분을 제거한 항체 프래그먼트도 사용할 수 있다. 항체 프래그먼트로는, F(ab')₂ 가 바람직하다.

[0063] 본 발명에 있어서의 항체는 측정 대상 성분 또는 그 에피토프에 상당하는 펩티드를 항원으로서 사용하여 통상적인 방법에 의해 취득할 수 있는데, 시판품으로서도 입수 가능하다.

[0064] 측정 대상 성분이 MxA 단백질인 경우, MxA 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로는, 예를 들어, 국제 공개 공보 WO96/05230 에 기재된, 하이브리도마 세포주 KM1122, KM1123, KM1124 (FERM BP-4729), KM1125, KM1126, KM1127, KM1128, KM1129, KM1130, KM1131, KM1132 (FERM BP-4730), KM1133, KM1134, KM1135 (FERM BP-4731) 가 각각 생성하는 항인간 MxA 단백질 모노클로날 항체 KM1122, KM1123, KM1124, KM1125, KM1126, KM1127, KM1128, KM1129, KM1130, KM1131, KM1132, KM1133, KM1134, KM1135 등을 들 수 있다.

[0065] 본 발명에 있어서의 표지화 항체는 본 발명의 측정 방법에 있어서 사용될 수 있는 것이고, 상기의 항체와 후술하는 표지 물질을 사용하여, 후술하는 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0066] (7) 측정 방법

[0067] 본 발명의 측정 방법은 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법이다. 또, 본 발명의 측정 방법은 검체 중의 측정 대상 성분과, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시킨 후, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키고, 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 것을 특징으로 하는 측정 대상 성분의 측정 방법이다. 본 발명의 측정 방법의 구체적 양태를 이하에 나타낸다.

[0068] (1) 그 측정 대상 성분과 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시키고 (제 1 반응 공정), 이어서, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 반응시키고 (제 2 반응 공정), 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 (검출 공정) 방법.

[0069] (2) 그 측정 대상 성분과 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 반응시키고 (제 1 반응 공정), 이어서, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키고 (제 2 반응 공정), 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어

지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 (검출 공정) 방법.

- [0070] (3) 그 측정 대상 성분과 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를, 지방산 알칸올아미드 존재하에 반응시키고 (제 1 반응 공정), 이어서, 그 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제 존재하에 반응시키고 (제 2 반응 공정), 제 1 항체, 그 측정 대상 성분, 및 표지화 제 2 항체로 이루어지는 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 그 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 (검출 공정) 방법.
- [0071] 상기 (1) ? (3) 에 있어서, 제 1 반응 공정은 담즙산 유도체를 첨가하여 실시할 수도 있다.
- [0072] 상기 (1) ? (3) 에 있어서, 제 1 반응 공정에 있어서, 측정 대상 성분과 제 1 항체의 면역 복합체가 생성된다. 제 2 반응 공정에 있어서, 제 1 반응 공정에서 생성된 제 1 항체와 측정 대상 성분의 면역 복합체와, 표지화 제 2 항체가 반응하여, 제 1 항체, 측정 대상 성분 및 표지화 제 2 항체의 면역 복합체가 생성된다. 검출 공정에 있어서, 제 2 반응 공정에서 생성된 제 1 항체, 측정 대상 성분 및 표지화 제 2 항체의 면역 복합체 중의 표지량이 측정된다. 사용한 검체 중의 측정 대상 성분의 농도는 이미 알려진 농도의 측정 대상 성분인 표준 물질을 사용하여 동일한 측정을 실시하고, 농도와 표지 유래의 정보량의 관계를 나타내는 검량선을 작성하여, 작성한 검량선과 검출 공정에서의 표지량을 관련지음으로써 결정할 수 있다.
- [0073] 표준 물질로는 생체 시료로부터 조제할 수도 있지만, 유전자 재조합법에 의해 제조한 리코비닌트 항원을 사용하여 조제할 수도 있다. 표준 물질은 용액 형태, 동결 건조 형태 등의 어느 형태이더라도 되고, 형태에 따라, 사용시에 후술하는 수성 매체 등에 용해시켜 사용할 수 있다. 또, 표준 물질의 조제시에는, 후술하는 수성 매체, 금속 이온, 염류, 당류, 계면 활성제, 단백류, 단백류 안정화제 등을 사용할 수도 있다.
- [0074] 상기 (1) 및 (3) 의 측정 방법에 있어서는, 미리, 검체와 지방산 알칸올아미드를 혼합, 또는 검체와 지방산 알칸올아미드, 담즙산 유도체를 혼합하여 검체를 전처리하고, 그 후, 전처리된 검체를 제 1 항체와의 반응에 제공해도 된다. 상기 (2) 의 측정 방법에 있어서는, 미리, 검체와 담즙산 유도체를 혼합하여 검체를 전처리하고, 그 후, 전처리된 검체를 제 1 항체와의 반응에 제공해도 된다.
- [0075] 본 발명의 측정 방법은 드라이 케미스트리에서도 용액 중의 반응에서도 적용 가능하다. 제 1 반응 공정 및 제 2 반응 공정에 있어서의 반응 온도로는, 본 발명의 측정 방법을 가능하게 하는 반응 온도이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 0 ℃ ? 50 ℃ 를 들 수 있고, 4 ℃ ? 40 ℃ 가 바람직하다. 반응 시간으로는, 본 발명의 측정 방법을 가능하게 하는 반응 시간이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 1 분간 ? 72 시간이고, 5 분간 ? 20 시간이 바람직하다.
- [0076] 제 1 반응 공정과 제 2 반응 공정 사이에는, 세정 공정을 형성해도 되고, 형성하지 않아도 되는데, 세정 공정을 형성하는 것이 바람직하다. 또, 제 2 반응 공정과 검출 공정 사이에는, 세정 공정을 형성해도 되고, 형성하지 않아도 되는데, 세정 공정을 형성하는 것이 바람직하다. 제 1 항체는 불용성 담체에 부동화 (고정화) 되어 있지 않아도 되고, 부동화 (고정화) 되어 있어도 되는데, 부동화 (고정화) 되어 있는 것이 바람직하다. 제 1 항체가 불용성 담체에 부동화 (고정화) 되어 있는 경우, 제 1 반응 공정 후의 불용성 담체를 세정함으로써, 제 1 반응 공정에서 생성된 제 1 항체와 측정 대상 성분의 면역 복합체를, 미반응 성분 (검체 유래의 성분, 과잉의 제 1 항체 등) 으로부터 분리할 수 있다. 동일하게, 제 2 반응 공정 후의 불용성 담체를 세정함으로써, 제 2 반응 공정에서 생성된 제 1 항체, 측정 대상 성분 및 표지화 제 2 항체의 면역 복합체를, 미반응 성분 (과잉의 표지화 제 2 항체 등) 으로부터 분리할 수 있다. 세정액으로는, 인산 완충화 생리 식염수 [0.15 mol/ℓ 염화나트륨을 함유하는 10 mmol/ℓ 인산 완충액, pH 7.2 (이하, PBS 라고 기재한다)], 계면 활성제를 함유하는 PBS, 후술하는 수성 매체 등을 들 수 있다. 당해 계면 활성제로는, 예를 들어 트윈 (Tween) 20 등의 비이온성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0077] 불용성 담체로는, 제 1 항체를 부동화 (고정화) 시켜, 항원 항체 반응, 검출 반응을 가능하게 하는 것이면 특별히 제한은 없다. 불용성 담체의 바람직한 소재로는 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 폴리비닐톨루엔, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리염화비닐, 나일론, 폴리메타크릴레이트, 젤라틴, 아가로오스, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스아세테이트, 아세트산셀룰로오스, 폴리에틸렌테레프탈레이트 등의 고분자 소재, 유리, 세라믹스, 자성 입자나 금속 등을 들 수 있다. 불용성 담체의 바람직한 형상으로는 튜브, 비즈, 플레이트, 라텍스 등의 미립자, 스틱 등을 들 수 있고, 96 웰/장의 폴리스티렌제 마이크로타이터 플레이트 등이 바람직하다.
- [0078] 제 1 항체의 불용성 담체에 대한 부동화 (고정화) 방법으로는, 물리학적 결합을 이용한 방법과 화학적 결합을 이용한 방법 또는 이들의 병용 등, 공지된 방법이 이용된다. 물리학적 결합으로는, 예를 들어 정전적 결합,

수소 결합, 소수 결합 등을 들 수 있다. 화학적 결합으로는, 예를 들어 공유 결합, 배위 결합 등을 들 수 있다. 예를 들어, 폴리스티렌제 마이크로타이터 플레이트를 불용성 담체로서 사용하는 경우에는, 플레이트 내의 웰에 제 1 항체의 용액을 첨가하고, 1 시간 내지 1 일간, 4 °C ~ 30 °C 에서 인큐베이트함으로써, 물리 흡착시켜 고정화시키는 방법을 들 수 있다.

[0079] 제 1 항체는, 직접, 불용성 담체에 부동화 (고정화) 시켜도 되고, 간접적으로 불용성 담체에 부동화 (고정화) 시켜도 된다. 간접적인 부동화 (고정화) 방법으로는, 예를 들어 아비딘을 고정화시킨 불용성 담체에, 비오틴화한 제 1 항체의 용액을 첨가하고, 비오틴과 아비딘의 특이적 결합을 통하여, 제 1 항체를 불용성 담체에 고정화시키는 방법을 들 수 있다. 또, 불용성 담체에, 제 1 항체에 특이적으로 결합하는 항체를 고정화시키고, 이 항체를 개재하여 제 1 항체를 불용성 담체에 고정화시켜도 된다. 혹은, 제 1 항체는 링커를 통한 공유 결합에 의해 불용성 담체에 고정화시켜도 된다. 링커로는, 예를 들어, 제 1 항체의 관능기와, 불용성 담체가 그 표면에 유지하고 있는 관능기 양자와 공유 결합할 수 있는 분자 등을 들 수 있고, 제 1 항체의 관능기와 반응할 수 있는 제 1 반응 활성기와, 불용성 담체가 그 표면에 유지하고 있는 관능기와 반응할 수 있는 제 2 반응 활성기를 동일 분자 내에 갖는 분자가 바람직하고, 그 중에서도, 제 1 반응 활성기와 제 2 반응 활성기가 상이한 기인 분자가 특히 바람직하다. 제 1 항체의 관능기 및 불용성 담체가 그 표면에 유지하고 있는 관능기로는, 카르복실기나 아미노기, 글리시딜기, 술포히드릴기, 수산기, 아미드기, 이미노기, N-하이드록시숙시닐기, 말레이미드기 등을 들 수 있다. 링커에 있어서의 활성 반응성기로는, 알릴아지드, 카르보디이미드, 히드라지드, 알데히드, 하이드록시메틸포스포닉, 이미드에스테르, 이소시아네이트, 말레이미드, N-하이드록시숙시닐이미드 (NHS) 에스테르, 펜타플루오로페닐 (PFP) 에스테르, 소랄렌, 피리딜술파이드, 비닐술포 등의 기를 들 수 있다.

[0080] 제 1 항체가 불용성 담체에 부동화 (고정화) 되어 있지 않은 경우에는, 제 1 반응 공정 후의 반응액을, 제 1 항체와 반응시킬 수 있는 물질이 부동화 (고정화) 된 불용성 담체에 제공하고, 그 후, 불용성 담체를 세정함으로써, 제 1 항체와 측정 대상 성분의 면역 복합체를 미반응 성분 (검체 유래의 성분, 과잉의 제 1 항체 등) 으로부터 분리할 수 있다. 제 1 항체와 반응할 수 있는 물질의 불용성 담체에 대한 부동화 (고정화) 는 전술한 제 1 항체의 불용성 담체에 대한 부동화 (고정화) 와 동일한 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0081] 제 2 항체를 표지하는 표지 물질로는 효소, 형광 물질, 발광 물질, 방사성 동위 원소, 비오틴, 디고옥시게닌, 태그 배열을 포함하는 폴리펩티드, 금속 콜로이드 입자, 착색 라텍스 입자 등을 들 수 있다. 효소로는, 예를 들어, 알칼리포스파타아제, 퍼옥시다아제, 갈락토시다아제, 클루루로니다아제, 루시페라아제 등을 들 수 있다. 형광 물질로는, 예를 들어, FITC (플루오레세인 이소티오시아네이트), RITC (로다민 B 이소티오시아네이트) 등을 들 수 있다. 그 밖의 형광 물질로서, 예를 들어 quantum dot (Science, 281, 2016-2018, 1998), 피코에리트린 등의 피코빌리 단백질, GFP (Green fluorescent Protein), RFP (Red fluorescent Protein), YFP (Yellow fluorescent Protein), BFP (Blue fluorescent Protein) 등의 형광을 발하는 단백질을 들 수 있다. 발광 물질로는, 예를 들어, 아크리디늄 및 그 유도체, 루테늄 착물 화합물, 로핀 등을 들 수 있다. 또 루테늄 착물 화합물로는, 전자 공여체와 함께 전기 화학적으로 발광하는, Clin. Chem. 37, 9, 1534-1539, 1991 에 나타낸 것이 바람직하다. 방사성 동위 원소로는, 예를 들어, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I 등을 들 수 있다.

[0082] 태그 배열을 포함하는 폴리펩티드로는, FLAG 펩티드 (FLAG 태그, Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys), 폴리히스티딘 (His 태그, His His His His His His), myc 에피토프펩티드 (myc 태그, Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu), 헤마글루티닌에피토프펩티드 (HA 태그, Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala) 등을 들 수 있다.

[0083] 제 2 항체의 표지화는, 제 2 항체의 관능기와 표지 물질의 관능기 사이에서, 링커를 통하거나 또는 통하지 않고 공유 결합을 일으키는 반응에 의해 실시할 수 있다. 관능기로는, 카르복실기나 아미노기, 글리시딜기, 술포히드릴기, 수산기, 아미드기, 이미노기, 하이드록시숙시닐에스테르기, 말레이미드기, 이소티오시아네이트기 등을 들 수 있다. 이 관능기끼리의 사이에서 축합 반응을 실시하게 하는 것이 가능하다.

[0084] 링커를 통하지 않는 결합 방법으로는 예를 들어, EDC 등의 카르보디이미드 화합물을 사용하는 방법 등을 들 수 있다. 이 경우, NHS 또는 그 유도체 등의 활성 에스테르를 사용할 수도 있다. 이소티오시아네이트기와 아미노기 사이의 축합 반응은 다른 시약을 필요로 하지 않고, 중성 ? 약 알칼리성의 조건에서 혼합하는 것만으로 진행하기 때문에 바람직하다.

[0085] 링커로는, 예를 들어, 제 2 항체의 관능기에 반응하는 관능기와, 표지 물질의 관능기에 반응하는 관능기의 양방

의 관능기를 분자 내에 갖는 것을 들 수 있고, 제 2 항체의 아미노산 잔기와 반응할 수 있는 제 1 관능기와, 표지 물질의 관능기와 반응할 수 있는 제 2 관능기를 동일 분자 내에 갖는 분자가 바람직하고, 그 중에서도, 제 1 관능기와 제 2 관능기가 상이한 기인 분자가 특히 바람직하다. 링커의 관능기로는, 예를 들어 전술한 관능기를 들 수 있다.

[0086] 방사성 동위 원소를 화학적으로 결합시키는 방법으로는, 예를 들어 문헌 (Antibody Immunoconj.Radiopharm., 3, 60, 1990) 에 기재된 방법을 들 수 있다.

[0087] 표지 물질이 효소, 아비딘, 형광을 발하는 단백질, 피코빌리 단백질, 태그 배열을 포함하는 폴리펩티드 등의 폴리펩티드인 경우에는, 공지된 유전자 재조합 기술 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 에 따라, 표지 물질과 항체의 융합 단백질을 코딩하는 DNA 를 함유하는 발현 벡터를 제조하고, 발현 벡터를 적당한 숙주에 도입하여, 숙주를 배양함으로써 제조할 수 있다. 융합 단백질을 코딩하는 DNA 는 항체 및 표지 물질을 각각 코딩하는 DNA 를 PCR 등으로 클로닝하고, 각각의 DNA 를 리가아제 반응으로 연결함으로써 얻을 수 있다.

[0088] 검출 공정에 있어서, 제 2 반응 공정에서 생성된 제 1 항체, 측정 대상 성분 및 표지화 제 2 항체의 면역 복합체 중의 표지량을 측정한다. 표지량의 측정은, 표지 물질에 따라 적절한 방법을 선택할 수 있다. 표지 물질이 발색 물질, 즉, 어떠한 파장의 광을 흡수하는 물질인 경우에는, 분광 광도계나 멀티 웰 플레이트 리더 등을 사용할 수 있다. 표지 물질이 형광 물질인 경우에는, 형광 광도계나 형광 멀티 웰 플레이트 리더 등을 사용할 수 있다. 표지 물질이 발광 물질인 경우에는, 발광 광도계나 발광 멀티 웰 플레이트 리더 등을 사용할 수 있다. 표지 물질이 방사성 동위 원소인 경우, 방사성 동위 원소의 양은 방사 활성을 신틸레이션 카운터, γ -웰 카운터 등에 의해 측정할 수 있다.

[0089] 표지가 효소인 경우, 표지량의 측정이란, 효소 활성을 측정하는 것을 의미한다. 효소의 기질을 당해 효소와 반응시키고, 생성된 물질을 측정함으로써, 표지량을 측정할 수 있다. 효소가 퍼옥시다아제인 경우에는, 예를 들어 흡광도법, 형광법, 발광법 등에 의해 퍼옥시다아제 활성을 측정할 수 있다. 흡광도법에 의해 퍼옥시다아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 퍼옥시다아제와 그 기질인 과산화수소 및 산화 발색형 색원체의 조합을 반응시켜, 반응액의 흡광도를 분광 광도계나 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 측정하는 방법 등을 들 수 있다. 산화 발색형 색원체로는, 예를 들어 로이코형 색원체, 산화 커플링 발색형 색원체 등을 들 수 있다.

[0090] 로이코형 색원체는, 과산화수소 및 퍼옥시다아제 등의 과산화 활성 물질의 존재하, 단독으로 색으로 변환되는 물질이다. 구체적으로는, 테트라메틸벤지딘, o-페닐렌디아민, 10-N-카복시메틸카르바모일-3,7-비스(디메틸아미노)-10H-페노티아진 (CCAP), 10-N-메틸카르바모일-3,7-비스(디메틸아미노)-10H-페노티아진 (MCDP), N-(카복시메틸아미노카르보닐)-4,4'-비스(디메틸아미노)디페닐아민나트륨염 (DA-64), 4,4'-비스(디메틸아미노)디페닐아민, 비스[3-비스(4-클로로페닐)메틸-4-디메틸아미노페닐]아민 (BCMA) 등을 들 수 있다.

[0091] 산화 커플링 발색형 색원체는, 과산화수소 및 퍼옥시다아제 등의 과산화 활성 물질의 존재하, 2 개의 화합물이 산화적 커플링하여 색소를 생성하는 물질이다. 2 개의 화합물의 조합으로는, 커플러와 아닐린류 (트린더 시약)의 조합, 커플러와 페놀류의 조합 등을 들 수 있다. 커플러로는, 예를 들어 4-아미노안티피린 (4-AA), 3-메틸-2-벤조티아졸리논히드라진 등을 들 수 있다. 아닐린류로는, N-(3-술포프로필)아닐린, N-에틸-N-(2-하이드록시-3-술포프로필)-3-메틸아닐린 (TOOS), N-에틸-N-(2-하이드록시-3-술포프로필)-3,5-디메틸아닐린 (MAOS), N-에틸-N-(2-하이드록시-3-술포프로필)-3,5-디메톡시아닐린 (DAOS), N-에틸-N-(3-술포프로필)-3-메틸아닐린 (TOPS), N-(2-하이드록시-3-술포프로필)-3,5-디메톡시아닐린 (HDAOS), N,N-디메틸-3-메틸아닐린, N,N-디(3-술포프로필)-3,5-디메톡시아닐린, N-에틸-N-(3-술포프로필)-3-메톡시아닐린, N-에틸-N-(3-술포프로필)아닐린, N-에틸-N-(3-술포프로필)-3,5-디메톡시아닐린, N-(3-술포프로필)-3,5-디메톡시아닐린, N-에틸-N-(3-술포프로필)-3,5-디메틸아닐린, N-에틸-N-(2-하이드록시-3-술포프로필)-3-메톡시아닐린, N-에틸-N-(2-하이드록시-3-술포프로필)아닐린, N-에틸-N-(3-메틸페닐)-N'-숙시닐에틸렌디아민 (EMSE), N-에틸-N-(3-메틸페닐)-N'-아세틸에틸렌디아민, N-에틸-N-(2-하이드록시-3-술포프로필)-4-플루오로-3,5-디메톡시아닐린 (F-DAOS) 등을 들 수 있다. 페놀류로는, 페놀, 4-클로로페놀, 3-메틸페놀, 3-하이드록시-2,4,6-트리요드벤조산 (HTIB) 등을 들 수 있다.

[0092] 형광법에 의해 퍼옥시다아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 퍼옥시다아제와 그 기질인 과산화수소 및 형광 물질의 조합을 반응시켜, 형광 광도계나 형광 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 생성한 형광의 강도를 측정하는 방법 등을 들 수 있다. 당해 형광 물질로는, 예를 들어 4-하이드록시페닐아세트산, 3-(4-하이드록시페닐)프로피온산, 쿠마린 등을 들 수 있다.

- [0093] 발광법에 의한 퍼옥시다아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 퍼옥시다아제와 그 기질인 과산화수소 및 발광 물질의 조합을 반응시켜, 발광 강도계나 발광 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 생성한 발광의 강도를 측정하는 방법 등을 들 수 있다. 당해 발광 물질로는, 예를 들어 루미놀 화합물, 루시게닌 화합물 등을 들 수 있다.
- [0094] 효소가 알칼리포스파타아제인 경우에는, 예를 들어 발광법 등에 의해 알칼리포스파타아제 활성을 측정할 수 있다. 발광법에 의해 알칼리포스파타아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 알칼리포스파타아제와 그 기질을 반응시켜, 생성된 발광의 발광 강도를 발광 강도계나 발광 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 측정하는 방법 등을 들 수 있다. 알칼리포스파타아제의 기질로는, 예를 들어 3-(2'-스피로아다만탄)-4-메톡시-4-(3'-포스포릴옥시)페닐-1,2-디옥세탄?2나트륨염 (AMPPD), 2-클로로-5-{4-메톡시-스피로[1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)트리시클로[3.3.1.1.3,7]데칸]-4-일}페닐포스페이트?2나트륨염 (CDP-StarTM), 3-{4-메톡시-스피로[1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)트리시클로[3.3.1.1.3,7]데칸]-4-일}페닐포스페이트?2 나트륨염 (CSPDTM), [10-메틸-9(10H)-아크리디닐리덴]페녹시메틸인산?2 나트륨염 (LumigenTM APS-5) 등을 들 수 있다.
- [0095] 효소가 β-D-갈락토시다아제인 경우에는, 예를 들어 흡광도법 (비색법), 발광법 또는 형광법 등에 의해 β-D-갈락토시다아제 활성을 측정할 수 있다. 흡광도법 (비색법)에 의해 β-D-갈락토시다아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 o-니트로페닐-β-D-갈락토피라노시드 등을 들 수 있다. 발광법에 의해 β-D-갈락토시다아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 β-D-갈락토시다아제와 그 기질을 반응시켜, 반응액의 발광도를 발광 강도계나 발광 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 측정하는 방법 등을 들 수 있다. β-D-갈락토시다아제의 기질로는, 예를 들어 갈락톤-플러스 [Galacton-Plus, 어플라이드 바이오 시스템즈 (Applied Biosystems) 사 제조] 또는 그 유사 화합물 등을 들 수 있다. 형광법에 의해 β-D-갈락토시다아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 β-D-갈락토시다아제와 그 기질을 반응시켜, 반응액의 형광도를 형광 광도계나 형광 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 측정하는 방법 등을 들 수 있다. β-D-갈락토시다아제의 기질로는, 예를 들어 4-메틸운베리페릴-β-D-갈락토피라노시드 등을 들 수 있다.
- [0096] 효소가 루시페라아제인 경우에는, 예를 들어 발광법 등에 의해 루시페라아제 활성을 측정할 수 있다. 발광법에 의해 루시페라아제 활성을 측정하는 방법으로는, 예를 들어 루시페라아제와 그 기질을 반응시켜, 반응액의 발광도를 발광 강도계나 발광 멀티 웰 플레이트 리더 등으로 측정하는 방법 등을 들 수 있다. 루시페라아제의 기질로는, 예를 들어 루시페린, 세렌테라진 등을 들 수 있다.
- [0097] 표지 물질이 형광 물질, 발광 물질, 방사성 동위 원소 및 효소 이외의 물질(물질 A 라고 한다) 인 경우에는, 물질 A 에 특이적으로 결합하는 물질 (물질 B) 을 형광 물질, 발광 물질, 방사성 동위 원소, 효소 등으로 표지한 표지화 물질 B 와, 제 2 반응 공정에서 생성된 제 1 항체, 측정 대상 성분 및 표지화 제 2 항체 (즉, 물질 A 로 표지화된 제 2 항체) 의 면역 복합체를 반응시키고, 제 1 항체, 측정 대상 성분, 표지화 제 2 항체 (즉, 물질 A 로 표지화된 제 2 항체) 및 표지화 물질 B 의 면역 복합체를 생성시켜, 생성된 이 면역 복합체 중의 표지량을 전술한 방법에 의해 측정함으로써, 검체 중의 측정 대상 성분을 측정할 수 있다. 물질 B 로는, 예를 들어 물질 A 에 대한 항체, 아비딘 (물질 A 가 비오틴인 경우), 스트렙타비딘 (물질 A 가 비오틴인 경우), 비오틴 (물질 A 가 아비딘, 스트렙타비딘인 경우) 등을 들 수 있다. 물질 A 에 대한 항체로는, 항체 프래그먼트이어도 되고, 항체 프래그먼트로는, 예를 들어 전술한 Fab, F(ab')₂, Fab' 등을 들 수 있다.
- [0098] 또한, 본 발명의 측정 방법 (1) 및 (2) 의 제 1 반응 공정은 경합법에도 적용할 수 있다. 경합법으로는, 구체적으로는 이하의 양태를 들 수 있다.
- [0099] (4) 측정 대상 성분을, 지방산 알칸올아미드의 존재하, 경합 물질에 표지가 결합된 표지화 경합 물질, 및 그 측정 대상 성분과 표지화 경합 물질의 양자에 결합하는 항체와 반응시키고 (경합 반응 공정), 생성된 그 표지화 경합 물질과 그 항체의 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 (검출 공정) 방법.
- [0100] (5) 측정 대상 성분을, 지방산 알칸올아미드의 존재하, 경합 물질, 및 그 측정 대상 성분과 그 경합 물질의 양자에 결합하는 항체에 표지가 결합된 표지화 항체와 반응시키고 (경합 반응 공정), 생성된 그 경합 물질과 그 표지화 항체의 면역 복합체 중의 표지량을 측정하는 (검출 공정) 방법.
- [0101] 경합 반응 공정은 담즙산 유도체를 첨가하여 실시해도 된다. 또, 경합 반응 공정과 검출 공정 사이에 세정 공정을 형성해도 되고, 형성하지 않아도 되는데, 세정 공정을 형성하는 것이 바람직하다. 세정 공정으로는, 예를 들어 전술한 측정 방법 (1) ? (3) 에서의 세정 공정 등을 들 수 있다.

- [0102] 상기 (4) 방법에 있어서는, 측정 대상 성분과 표지화 경합 물질의 양자에 결합하는 항체는 불용성 담체에 부동화 (고정화) 되어 있어도 되고, 부동화 (고정화) 되어 있지 않아도 되는데, 부동화 (고정화) 되어 있는 것이 바람직하다. 또, 상기 (5) 방법에 있어서는, 경합 물질은 불용성 담체에 부동화 (고정화) 되어 있지 않아도 되고, 부동화 (고정화) 되어 있어도 되는데, 부동화 (고정화) 되어 있는 것이 바람직하다.
- [0103] 경합 반응 공정은 수성 매체 존재하에서 실시해도 되고, 수성 매체 비존재하에서 실시해도 되는데, 수성 매체 존재하에서 실시하는 것이 바람직하다. 수성 매체로는, 예를 들어 후술하는 수성 매체 등을 들 수 있다. 여기서, 경합 물질이란, 「측정 대상 성분에 결합하는 항체」에 결합할 수 있는 물질로서, 또한 그 결합이 그 측정 대상 성분과 경합적인 물질을 의미하고, 측정 대상 성분 그 자체도 포함된다. 경합 물질은 검체 중의 측정 대상 성분을 경합법에 의해 측정할 때에 사용되는 것이다. 따라서, 경합법에 있어서 사용하는 측정 대상 성분에 결합하는 항체는 측정 대상 성분 및 경합 물질에 결합하는 항체이고, 그 측정 대상 성분과 결합하여 면역 복합체를 생성함과 함께, 경합 물질과도 결합하여 면역 복합체를 생성한다.
- [0104] 경합 물질로는, 성분에 결합하는 항체가 인식하는 에피토프의 구조와 동일한 구조를 가지고 있는 물질이 바람직하고, 또한 측정 대상 성분에 결합하는 항체에 대한 결합의 강도가 그 항체에 대한 그 성분의 결합의 강도와 동일한 정도인 것이 바람직하다. 측정 대상 성분 그 자체는 경합 물질로서 바람직하다. 표지화 경합 물질은 경합 물질과 전술한 표지 물질을 사용하여, 전술한 표지화 제 2 항체와 동일한 방법에 의해 조제할 수 있다.
- [0105] 본 발명에 있어서 사용되는 수성 매체로는, 예를 들어 탈이온수, 증류수, 완충액 등을 들 수 있고, 완충액이 바람직하다. 완충액의 조제에 사용되는 완충제로는, 완충능을 갖는 것이라면 특별히 한정되지 않지만, pH 1 ? 11 의 예를 들어 락트산 완충제, 시트르산 완충제, 아세트산 완충제, 숙신산 완충제, 프탈산 완충제, 인산 완충제, 트리에탄올아민 완충제, 디에탄올아민 완충제, 리신 완충제, 바르비투르 완충제, 이미다졸 완충제, 말산 완충제, 옥살산 완충제, 글리신 완충제, 붕산 완충제, 탄산 완충제, 글리신 완충제, 굿 완충제 등을 들 수 있다.
- [0106] 굿 완충제로는, 예를 들어 2-모르폴리노에탄술폰산 (MES) 완충제, 비스(2-하이드록시에틸)이미노트리스(하이드록시메틸)메탄(Bis-Tris) 완충제, 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 (Tris) 완충제, N-(2-아세트아미드)이미노 2 아세트산 (ADA) 완충제, 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) (PIPES) 완충제, 2-[N-(2-아세트아미드)아미노]에탄술폰산 (ACES) 완충제, 3-모르폴리노-2-하이드록시프로판술폰산 (MOPSO) 완충제, 2-[N,N-비스(2-하이드록시에틸)아미노]에탄술폰산 (BES) 완충제, 3-모르폴리노프로판술폰산 (MOPS) 완충제, 2-{N-[트리스(하이드록시메틸)메틸]아미노}에탄술폰산 (TES) 완충제, N-(2-하이드록시에틸)-N'-(2-술포에틸)피페라진 (HEPES) 완충제, 3-[N,N-비스(2-하이드록시에틸)아미노]-2-하이드록시프로판술폰 산 (DIPSO) 완충제, 2-하이드록시-3-{N-트리스(하이드록시메틸)메틸]아미노}프로판술폰산 (TAPSO) 완충제, 피페라진-N,N'-비스(2-하이드록시프로판-3-술폰산) (POPSO) 완충제, N-(2-하이드록시에틸)-N'-(2-하이드록시-3-술포프로필)피페라진 (HEPPSO) 완충제, N-(2-하이드록시에틸)-N'-(3-술포프로필)피페라진 (EPPS) 완충제, 트리신[N-트리스(하이드록시메틸)메틸글리신] 완충제, 비신[N,N-비스(2-하이드록시에틸)글리신] 완충제, 3-[N-트리스(하이드록시메틸)메틸]아미노프로판술폰산 (TAPS) 완충제, 2-(N-시클로헥실아미노)에탄술폰산 (CHES) 완충제, 3-(N-시클로헥실아미노)-2-하이드록시프로판술폰산 (CAPSO) 완충제, 3-(N-시클로헥실아미노)프로판술폰산 (CAPS) 완충제 등을 들 수 있다.
- [0107] 완충액의 농도는 측정에 적절한 농도이면 특별히 제한은 되지 않지만, 0.001 ? 2.0 mol/ℓ 가 바람직하고, 0.005 ? 1.0 mol/ℓ 가 보다 바람직하며, 0.01 ? 0.1 mol/ℓ 가 특히 바람직하다.
- [0108] 본 발명의 측정 방법에 있어서는, 금속 이온, 염류, 당류, 방부제, 단백질, 단백질 안정화제 등을 공존시킬 수 있다. 금속 이온으로는, 예를 들어 마그네슘 이온, 망간 이온, 아연 이온 등을 들 수 있다. 염류로는, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼륨 등을 들 수 있다. 당류로는, 예를 들어 만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있다. 방부제로는, 예를 들어 아지화나트륨, 항생 물질 (스트렙토마이신, 페니실린, 겐타마이신 등), 바이오에이스, 프로클린 300, 프록셀 (Proxel) GXL 등을 들 수 있다. 단백질로는, 예를 들어 소 혈청 알부민 (BSA), 소 태아 혈청 (FBS), 카세인, 블록에이스 (다이네프론 제약사 제조) 등을 들 수 있다. 단백질 안정화제로는, 예를 들어 퍼옥시다아제 안정화 완충액 [Peroxidase Stabilizing Buffer, 다코사이토메이션 (DakoCytomation) 사 제조] 등을 들 수 있다.
- [0109] (8) 측정용 키트
- [0110] 본 발명의 측정용 키트는 검체 중의 측정 대상 성분의 면역학적 측정용 키트로서, 본 발명의 측정 방법에 사용할 수 있다.
- [0111] 본 발명의 측정용 키트는 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체, 및 지방산 알칸올아미드를 함유하는 제 1 시약

과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 포함하는 제 2 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 측정용 키트이다. 또, 본 발명의 측정용 키트는 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 포함하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체, 및 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 제 2 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 측정용 키트이다. 본 발명의 측정용 키트의 구체적 양태를 이하에 나타낸다.

[0112] (1) 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체, 및 지방산 알칸올아미드를 함유하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체를 포함하는 제 2 시약을 포함하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.

[0113] (2) 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체를 포함하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체, 및 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 제 2 시약을 포함하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.

[0114] (3) 측정 대상 성분에 결합하는 제 1 항체, 및 지방산 알칸올아미드를 함유하는 제 1 시약과, 측정 대상 성분에 결합하는 제 2 항체에 표지가 결합된 표지화 제 2 항체, 및 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제를 함유하는 제 2 시약을 포함하는 검체 중의 측정 대상 성분의 측정용 키트.

[0115] 제 1 시약에는, 담즙산 유도체가 포함되어 있어도 된다.

[0116] 상기 (1) 및 (3)의 키트에 있어서는, 제 1 시약은 지방산 알칸올아미드를 함유하는 시약 [제 1 시약 (A)] 과, 측정 대상 성분에 대한 제 1 항체를 포함하는 시약 [제 1 시약 (B)] 이 따로따로 보존되는 시약 형태를 취할 수도 있다. 상기 (1) 및 (3)의 키트에 있어서, 담즙산 유도체가 제 1 시약에 포함되는 경우에는, 제 1 시약은 지방산 알칸올아미드와 담즙산 유도체를 포함하는 시약 [제 1 시약 (A)] 과, 측정 대상 성분에 대한 제 1 항체를 포함하는 시약 [제 1 시약 (B)] 이 따로따로 보존되는 시약 형태를 취할 수도 있다. 또, 상기 (2)의 키트에 있어서, 담즙산 유도체가 제 1 시약에 포함되는 경우에는, 제 1 시약은 담즙산 유도체를 포함하는 시약 [제 1 시약 (A)] 과, 측정 대상 성분에 대한 제 1 항체를 포함하는 시약 [제 1 시약 (B)] 이 따로따로 보존되는 시약 형태를 취할 수도 있다. 여기서, 제 1 시약 (A)은 검체 전처리액으로서 사용할 수 있다.

[0117] 본 발명의 키트의 형태는 용액 형태, 동결 건조 형태 등, 어떠한 형태이어도 된다. 본 발명의 키트에 있어서의 제 1 항체, 표지화 제 2 항체, 지방산 알칸올아미드, 폴리옥시에틸렌계 비이온성 계면 활성제, 담즙산 유도체로는, 각각, 예를 들어 전술한 것을 들 수 있다. 또, 본 발명의 키트는, 필요에 따라, 전술한 수성 매체, 금속 이온, 염류, 당류, 방부제, 단백질, 단백질 안정화제 등을 함유할 수 있다.

[0118] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하는데, 이들은 본 발명의 범위를 전혀 한정하는 것은 아니다.

[0119] 실시예 1

[0120] [1] 항 MxA 단백질 모노클로날 항체의 조제

[0121] 이하와 같이 하여, 에피토프가 상이한 2 종류의 항인간 MxA 단백질 모노클로날 항체 KM1124 (W096/05230) 및 KM1135 (W096/05230)를 조제하였다. 또한, KM1124는 인간 MxA 단백질의 아미노 말단으로부터 220 ? 297 잔기 중에 존재하는 에피토프, KM1135는 인간 MxA 단백질의 아미노 말단으로부터 10 ? 220 잔기 중에 존재하는 에피토프와 각각 결합하는 마우스 모노클로날 항체이다.

[0122] 프리스탄 처리한 8 주령 누드 암컷 마우스 (Balb/c)에, 모노클로날 항체 KM1124를 생산하는 하이브리도마 주 KM1124 (FERM BP-4729) 및 모노클로날 항체 KM1135를 생산하는 하이브리도마 주 KM1135 (FERM BP-4731)를 각각 5×10^6 세포/마리씩 복강 내 주사하였다. 10 ? 21 일 후에, 하이브리도마 주가 복수암화되어, 복수가 고인 마우스로부터 복수를 채취하였다. 채취한 복수를 3,000 rpm으로 5 분간, 원심 분리하여 고형분을 제거하고, 상청을 회수하였다. 이 상청으로부터, 카프틸산 침전법 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)에 의해 정제한 모노클로날 항체를, MxA 단백질의 면역 측정 방법에 이용하였다.

[0123] [2] 리콤비넌트 MxA 단백질의 조제

[0124] 인간 MxA 단백질을 코드하는 cDNA를 함유하는 NdeI-BamHI 단편 (Genbank에 BC032602로서 등록되어 있는 염기 배열을 기초로 조제)을, 벡터 pET-14b [노바젠 (Novagen), EMD 바이오사이언시즈 (EMD Biosciences)사 제

조] 의 NdeI-BamHI 사이에 삽입하여 제조한 인간 MxA 단백질 발현 벡터 pET14b-MxA (Nucleic Acids Res, 32, 643-652, 2004) 에서 Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS 주를 형질 전환하였다. 이 형질 전환체는 N 말단에 His 태그가 부가된 MxA 단백질을 발현한다.

[0125] 얻어진 형질 전환체를, 암피실린을 포함하는 LB 배지 5 ml 에 식균하고, 600 nm 의 흡광도 (OD600) 가 0.5 가 될 때까지 37 °C 에서 진탕 배양하였다. 이 배양액을 암피실린을 포함하는 LB 배지 250 ml 에 식균하고, 600 nm 에서의 흡광도가 0.3 ~ 0.5 가 될 때까지 37 °C 에서 진탕 배양하였다. 여기에, 이소프로필티오갈락토시드 (IPTG) 를 최종농도 0.4 mmol/l 가 되도록 첨가하고, 추가로 37 °C 에서 2 시간 진탕 배양하였다. 얻어진 배양액을 4 °C 에서 3,000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 균체는 MxA 단백질의 조제까지 80 °C 에서 보존하였다.

[0126] MxA 단백질은 균체 내에 불용체 (inclusion body) 상태로 존재하고 있었으므로, 균체를 빙상에서 용해시켜, 빙랭한 결합 완충액 (5 mmol/l 이미다졸, 0.5 mol/l 염화나트륨, 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.9) 20 ml 를 첨가하여 현탁시켰다. 균체 현탁액에 30 초씩 5 회의 초음파 처리를 하여 균체를 파쇄한 후, 4 °C 에서 4,000 rpm 으로 10 분간 원심 분리를 실시하였다. 상청을 제거하고, 침전에 빙랭한 결합 완충액 20 ml 를 첨가하여 현탁시키고, 다시 동일하게 초음파 처리와 원심 분리를 실시하였다. 상청을 제거하고, 침전에 6 mol/l 우레아를 함유하는 결합 완충액 20 ml 를 첨가하여 현탁시켰다. 동일하게 초음파 처리를 실시한 후, 빙상에서 30 분간 가만히 정지시켜 불용체를 용해시키고, 4 °C 에서 10,000 rpm 으로 30 분간 원심 분리를 실시하였다. 상청을 회수하여 0.45 nm 밀리포어 필터로 여과하였다.

[0127] 얻어진 용액에 Ni-NTA His⁶Bind 레진 (노바젠, EMD 바이오사이언시즈사 제조) 0.5 ml 를 첨가하고, 4 °C 에서 2 시간 회전시키면서 혼화시켜, His 태그를 통하여 레진에 MxA 단백질을 결합시켰다. 4 °C 에서 3,000 rpm 으로 2 분간 원심 분리하여, 레진을 회수하였다. 레진에 빙랭한 6 mol/l 우레아를 함유하는 결합 완충액 10 ml 를 첨가한 후, 4 °C 에서 3,000 rpm 으로 2 분간 원심 분리하여, 레진을 회수하였다. 이 세정 조작을 다시 반복한 후, 추가로 레진에 빙랭한 세정 완충액 (6 mol/l 우레아, 60 mmol/l 이미다졸, 0.5 mol/l 염화나트륨, 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.9) 10 ml 를 첨가하고, 4 °C 에서 3,000 rpm 으로 2 분간 원심 분리하여, 레진을 회수하였다.

[0128] 레진에, 빙랭한 용출 완충액 (6 mol/l 우레아, 1 mol/l 이미다졸, 0.5 mol/l 염화나트륨, 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.9) 10 ml 를 첨가하고, 4 °C 에서 2시간 회전시키면서 혼화시켜, 레진으로부터 MxA 단백질을 용출시켰다. 이 레진을 포함하는 혼합액을 4 °C, 3,000 rpm 으로 2 분간 원심 분리하여, 상청의 MxA 단백질을 용액을 회수하였다. 회수한 MxA 단백질 용액은 MxA 단백질의 측정에 사용하는 표준액을 조제하기 위해서 사용하였다.

[0129] [3] 네이티브 MxA 단백질의 조제

[0130] 접착성의 인간 글리어 아세포종 유래의 세포주 T98G (DS 파머 바이오메디칼 주식회사에서 구입, J.Cell.Physiol., 99, 43-54, 1979) 를, 10 % 소 태아 혈청 (FBS), 1 % 비필수 아미노산 (인비트로젠사 제조), 1 mmol/l 피루브산나트륨 (인비트로젠사 제조) 을 첨가한 E-MEM 배지 (와코 준야쿠 공업사 제조) 10 ml 를 첨가한 세포 배양용의 10 ml 플라스크 내에서, 콘플루언트가 될 때까지, 탄산 가스 배양 장치 (5 % CO₂, 37 °C) 를 사용하여 2 ~ 3 일간 배양하였다. 세포가 콘플루언트가 된 상태에서, 세포를 150 cm² 플라스크로 옮겨 동일하게 배양을 실시하였다. 150 cm² 플라스크 내에서 세포가 콘플루언트가 된 배지를 흡인 제거하여, PBS (-) (칼슘, 마그네슘을 함유하지 않는 인산 완충액) 로 세정하고, 0.02 % EDTA 를 첨가하여 세정하였다. 다음으로 0.25 % 트립신 용액을 첨가하여 세포를 박리한 후, 등량의 배양용 배지를 첨가하여 트립신의 작용을 멈추고, 세포를 회수하여, 25 °C 3 분간 원심 분리 (1,400 rpm) 하였다. 세포 수를 카운트하여, 새로운 배양용 배지를 첨가한 150 cm² 플라스크에 1×10⁵ 세포/ml 정도로 세포를 현탁하고, Interferon alpha A protein (후나코시) 를 2,000 U/ml 가 되도록 첨가하였다. 24 시간 탄산 가스 배양 장치를 사용하여 배양하고, 배지를 흡인 제거하여, PBS (-) 세정하고, 0.02 % EDTA 를 첨가하여 세정하였다. 다음으로 0.25 % 트립신 용액을 첨가하여 세포를 박리한 후, 등량의 배양용 배지를 첨가하여 트립신의 작용을 멈추고, 세포를 회수하여, 25 °C 3 분간 원심 분리 (1,400 rpm) 하였다. 상청을 제거하고, 0.5 ml 의 저장 완충액 (10 mmol/l HEPES, 1.5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l KCl) 을 첨가하여 세포를 현탁하여 용액을 회수하고, 사용할 때까지 -80 °C 에서 보존하였다.

[0131] [4] 항 MxA 단백질 항체 고상화 플레이트의 조제

- [0132] [1] 에서 조제한 항 MxA 단백질 모노클로날 항체 KM1135 를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 100 mmol/ℓ 염화나트륨을 함유하는 100 mmol/ℓ 인산 완충액 (pH 7.5) 으로 희석시키고, 96 웰 마이크로타이터 플레이트 [나르젠 눈크 인터내셔널 (Nalge Nunc International) 사 제조] 에 100 $\mu\ell$ /웰의 양으로 분주 (分注) 하였다. 3 일간 방치 후, 상청을 흡인 제거하여, 1 % 블록 에이스 (다이넛폰 제약사 제조), 50 mmol/ℓ 염화나트륨을 함유하는 pH 7.2 인산 완충액 300 $\mu\ell$ 를 각 웰에 분주하여 실온에서 하룻밤 가만히 정지시켜 블로킹하였다. 블로킹액을 제거한 후, PBS 로 세정하였다. 진공 건조기로 3 일간 건조시킨 것을, 항 MxA 단백질 모노클로날 항체 고정화 플레이트로서 사용하였다.
- [0133] [5] 퍼옥시다아제 표지 항 MxA 단백질 항체의 조제
- [0134] [1] 에서 조제한 항 MxA 단백질 모노클로날 항체 KM1124 를 이하와 같이 하여 말레이미드법으로 퍼옥시다아제 (이하, POD 로 약기) 와 결합시켜, POD 표지 항 MxA 단백질 항체를 제조하였다.
- [0135] 먼저, [1] 에서 조제한 KM1124 (2 mg) 를 함유하는 인산 완충액을 0.1 mol/ℓ 붕산 완충액 (pH 8.0) 으로 치환하고, 아미콘 (Amicon) 교반식 셀 [밀리포어 (Millipore) 사 제조] 을 사용하여 1 ml 의 용량에 농축시켰다. 농축 후의 용액에, 2.15 mg/ml 의 2-이미노티오란염산염 [피어스 (Pierce) 사 제조] 를 함유하는 0.1 mol/ℓ 붕산 완충액 (pH 8.0) 40 $\mu\ell$ 를 첨가하고, 교반 후, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분간 반응시켰다. 상기 반응에 있어서 2-이미노티오란염산염은 KM1124 에 대해 몰비로 50 배량을 사용하였다. 5 mmol/ℓ 에틸렌디아민 4 아세트산 2 나트륨 ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$) 을 첨가한 0.1 mol/ℓ 의 인산 완충액 (pH 6.0) 으로 평형화한 세파덱스 (Sephadex) G25 (아마샴?바이오사이언스사 제조) 칼럼 (직경 1.5 $\text{cm} \times 30 \text{ cm}$) 을 사용하여, 반응 후의 용액의 겔 여과를 실시하고, 미반응의 2-이미노티오란염산염을 제거하여, 술포히드릴화한 KM1124 를 회수하였다. 회수한 용액을 아미콘 교반식 셀을 사용하여, 5 ml 의 용량에 농축시켰다.
- [0136] 한편, KM1124 에 대해 몰비로 5 배량에 해당하는 POD (토요 방직사 제조, 퍼옥시다아제 I-C) 2.5 mg 을 0.1 mol/ℓ 인산 완충액 (pH 7.0) 250 $\mu\ell$ 에 용해시켰다. 이 용액을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 가온한 후, 20 mg/ml 의 N-(6-말레이미드카프로일옥시) 숙신이미드 (EMCS, 도넨 화학 연구소사 제조) 의 N,N-디메틸포름아미드 (나카라이 테스크사 제조) 용액 36 $\mu\ell$ 를 첨가하여 교반하고, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분간 반응시켰다. 상기 반응에 있어서 EMCS 는 POD 에 대해 몰비로 40 배량을 사용하였다. 0.1 mol/ℓ 인산 완충액 (pH 6.0) 으로 평형화한 세파덱스 G25 칼럼 (직경 1.5 $\text{cm} \times 30 \text{ cm}$) 을 사용하여, 반응 후의 용액의 겔 여과를 실시하고, 미반응의 EMCS 를 제거하여, 말레이미드화된 POD 를 회수하였다. 회수한 용액을 아미콘 교반식 셀을 사용하여 농축시켰다.
- [0137] 상기에서 얻어진 술포히드릴화된 KM1124 의 용액과 말레이미드화된 POD 의 용액을 혼합하여, 아미콘 교반식 셀을 사용하여, 추가로 용량을 2 ml 로 농축시킨 후, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 반응시켰다. 얻어진 표지화 항체는 사용할 때까지 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보존하였다.
- [0138] [6] 검체 희석액 및 표준액의 조제
- [0139] 이하의 조성으로 이루어지는 검체 희석액을 조제하였다.
- [0140] HEPES (도넨 화학 연구소사 제조) (pH 8.0) 0.1 mol/ℓ
- [0141] CHAPS (도넨 화학 연구소사 제조) 4.9 %
- [0142] 계면 활성제 (제 1 표에 기재된 종류와 농도)
- [0143] 염화나트륨 1.5 mol/ℓ
- [0144] BSA [인타젠 (InterGen) 사 제조] 0.1 %
- [0145] 아지화나트륨 0.1 %
- [0146] 상기 [2] 에서 조제한 리コンビ넌트 MxA 단백질 용액을 상기 검체 희석액으로 희석시키고, MxA 단백질의 0 (검체 희석액만), 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24 ng/ml 의 각 농도의 용액을 조제하여, 표준액으로 하였다.
- [0147] [7] 검량선의 제조
- [0148] 상기 [4] 에서 제조한 항 MxA 단백질 항체 (KM1135) 고정화 플레이트에, [6] 에서 제조한 표준액 100 $\mu\ell$ 를 첨가하고, 1 시간 인큐베이트하여, 항체에 MxA 단백질을 결합시켰다. 반응액을 제거한 후, 세정액 [0.05 % 트윈 20 (칸토 화학사 제조) 을 함유하는 PBS] 를 400 $\mu\ell$ 첨가하여 제거하는 세정 조작을 5 회 실시하였다. 이어서, [5] 에서 제조한 POD 표지 항 MxA 단백질 항체 (KM1124) 를, POD 표지 항체 희석액 (액상 조성) 완충

액 [50 mmol/ℓ Bis-Tris (도닌 화학 연구소사 제조), 0.1 % BSA (인터젠 (InterGen) 사 제조), 0.01 % 4-아미노안티피린 (4-AA; 사이교 화성사 제조), 0.035 % 프로클린 300 (시그마사 제조), 0.1 % 노니데트 P40] 으로 800 배로 희석시킨 것을 조제하고, 이것을 100 μℓ 첨가하여 30 분간 반응시켰다. 반응액을 제거하고, 전술한 세정액을 400 μℓ 첨가하여 플레이트를 세정하고, 세정액을 제거하는 세정 조작을 5 회 실시하였다. 어두운 곳에서, 0.05 % 테트라메틸벤지딘 및 과산화수소를 함유하는 POD 의 발색 기질 TMB_{blue} [세룰로지컬 (Serological) 사 제조] 를 100 μℓ 첨가하고, 실온에서 10 분간 반응시켰다. 0.5 mol/ℓ 황산을 100 μℓ 첨가하여 실온에서 10 분간 인큐베이션하여 반응을 정지시켰다. 파장 450 nm 에서의 흡광도를 플레이트 리더로 측정하였다. 이들 일련의 조작에 의해, MxA 단백질 농도와 흡광도의 관계를 나타내는 검량선을 제작하였다.

[0149] 다음으로, 검체로서, 앞의 표준액 대신에, 배양 세포나 전혈 검체를 사용하여 동일한 조작을 실시하고, 각 검체에 있어서의 측정값을 얻고, 얻어진 측정값을 미리 제작한 검량선과 관련지어 각 검체 중의 MxA 단백질 농도를 결정하였다.

[0150] [8] MxA 단백질 측정에 있어서의 측정값 변동의 검토 1 (1 차 반응)

[0151] 상기 [3] 에서 사용한 접착성의 인간 글리어 아세포종 유래의 세포주 T98G 를 인터페론으로 자극하여 MxA 단백질을 유도시켜, 네이티브 MxA 단백질을 얻었다. 얻어진 네이티브 MxA 단백질의 반응성을 리콤비넨트 MxA 단백질과 비교함으로써, 항체의 리콤비넨트 MxA 단백질에 대한 반응성과, 항체의 네이티브 MxA 단백질에 대한 반응성의 상이에 대해 검토하였다.

[0152] 상기 [3] 에서 제작한 네이티브 MxA 단백질을 [6] 의 검체 희석액으로 20 배 희석시키고, 30 분간 가만히 정지 시킴으로써 세포의 가용화를 실시하고, 추가로 검체 희석액으로 8 배로 희석시켜 측정용 시료로 하였다.

[0153] 이 시료와 실시예의 [6] 에서 조제한 각 농도의 표준액을 검체로서 사용하여, [7] 에 기재된 조작에 따라 측정을 실시하였다. 단, 1 차 반응은 25 ℃ 와 37 ℃ 의 양 온도에서 실시하고, 2 차 반응 및 발색 반응에 대해서는 25 ℃ 에서 실시하였다. 여기서, 25 ℃ 반응시와 37 ℃ 반응시에 있어서의 네이티브 MxA 단백질의 측정값 변동률은 이하의 식 (I) 에 의해 산출하였다. 결과를 제 1 표에 나타낸다.

[0154] [수학식 1]

[0155] 변동률 (%) = [37 ℃ 반응시에 있어서의 네이티브 MxA 단백질 농도] / (25 ℃ 반응시에 있어서의 네이티브 MxA 단백질 농도) - 1] * 100 (I)

[0156] [비교예 1]

[0157] 실시예 1 의 [6] 의 검체 희석액의 조성 중, 계면 활성제를 1.2% 노니데트 P40 (폴리옥시에틸렌알킬페닐에테르) 으로 하는 것 이외에는 동일한 조성의 검체 희석액을 사용하여, 실시예 1 과 동일한 방법에 의해 반응 온도에 의한 측정값 변동률을 산출하였다. 결과를 제 1 표에 나타낸다.

표 1

계면활성제	농도 (%)	MxA단백질농도*		측정값 변동률 (%)
		25℃반응	37℃반응	
아미논PK -03S	1.2	315.0	357.6	13.5
스타폼 F	1.2	320.2	372.4	16.3
스타폼 DO	1.2	399.4	422.7	5.8
스타폼 DOS	1.2	475.8	487.5	2.5
스타폼 T	1.2	368.8	426.3	15.6
스타폼 DFC	1.2	315.4	386.4	22.5
스타폼 DF4	1.2	348.9	379.3	8.7
없음	0.0	242.5	363.6	49.9
노니데트 P40(비교예)	1.2	256.3	373.6	45.8

MxA단백질농도* (ng/mL)

[0158]

[0159] 제 1 표에 나타내는 바와 같이, 측정값 변동률에 대해, 계면 활성제를 사용하지 않은 경우 (+49.9 %), MxA 단

백질의 측정에 있어서의 사용이 알려져 있는 노니데트 P40 (국제 공개 공보 제2008/053973호 팜플렛 참조) 을 사용한 경우 (+45.8 %)와 비교하여, 지방산 알칸올아미드를 사용한 경우, 현저하게 저하되고, 온도에 의한 측정값에 대한 영향이 현저하게 억제되는 것을 알 수 있다.

실시에 2

MxA 단백질 측정에 있어서의 측정값 변동의 검토 2 (1 차 반응)

바이러스 감염이 확인되어, MxA 단백질 양성을 나타내는 환자 5 예로부터 EDTA?2Na 채혈관을 사용하여 채혈한 혈액을 검체로서 사용하였다. 전혈 검체는 시료 희석액으로 10 배 희석시켜, 측정 시료로 하였다.

검체 희석액으로서, 1.2 % 스타폼 DO 를 함유하는 검체 희석액 및 1.2 % 노니데트 P40 을 함유하는 검체 희석액을 사용하는 것 이외에는 실시예 1 과 동일하게 하여 1 차 반응을 25 ℃ 와 37 ℃ 에서 실시하고, 반응 온도에 의한 측정값 변동을 검토하였다. 결과를 제 2 표에 나타낸다.

표 2

전혈검체	스타폼 DO			노니데트 P40		
	MxA단백질농도*		측정값 변동률(%)	MxA단백질농도*		측정값 변동률(%)
	25℃반응	37℃반응		25℃반응	37℃반응	
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

MxA단백질농도* (ng/mL)

제 2 표에 나타내는 바와 같이, 전혈 검체를 사용한 경우에도, 측정값 변동률은 1.2 % 스타폼 DO 에서는 0 ? +12 % 이내로, 1.2 % 노니데트 P40 의 +8 % ? 23 % 와 비교하여 반응 온도에 의한 측정값에 대한 영향이 현저하게 억제되어 있는 것을 알 수 있다.

실시에 3

MxA 단백질 측정에 있어서의 측정값 변동의 검토 3 (2 차 반응)

이하의 조성으로 이루어지는 POD 표지 항체 희석 완충액을 조제하였다.

Bis-Tris (도닌 화학 연구소사 제조) (pH 7.0) 50 mmol/ℓ

BSA (인타젠 (InterGen) 사 제조) 0.1 %

프로클린 300 (시그마사 제조) 0.035 %

계면 활성제 (제 3 표에 기재된 종류와 농도)

4-AA (사이코 화성사 제조) 0.01 %

실시에 1 의 [3] 에서 제작한 네이티브 MxA 단백질을 실시예 1 의 [6] 의 검체 희석액 [단, 「계면 활성제」로서 노니데트 P40 을 사용] 으로 20 배 희석시키고, 30 분간 가만히 정지시킴으로써 세포의 가용화를 실시하고, 추가로 8 배로 희석시켜 측정용 시료로 하였다.

검체로서, 이 시료, 및 실시예 1 의 [6] 에서 조제한 각 농도의 표준액을 사용하여, POD 표지 항체로서 실시예 1 의 [5] 에서 조제한 POD 표지 항 MxA 단백질 항체를 상기 POD 표지 항체 희석 완충액으로 800 배로 희석시킨 것을 사용하여, 실시예 1 의 [7] 에 기재된 조작에 따라 측정을 실시하였다. 단, 1 차 반응은 25 ℃ 에서, 2 차 반응은 25 ℃ 와 37 ℃ 의 양 온도에서 실시하였다. 25 ℃ 반응시와 37 ℃ 반응시에 있어서의 네이티브 MxA 단백질의 측정값 변동률은 이하의 식 (I) 에 의해 산출하였다. 결과를 제 3 표에 나타낸다.

[수학식 2]

변동률 (%) = [37 ℃ 반응시에 있어서의 네이티브 MxA 단백질 농도]/ (25 ℃ 반응시에 있어서의 네이티브 MxA

단백질 농도] - 1] * 100 (I)

[비교예 2]

실시에 3 의 POD 표지 항체 희석 완충액 중의 계면 활성제를 0.1 % 노니테트 P40 으로 하는 것 이외에는 실시예 3 과 동일한 방법에 의해 2 차 반응 온도에 의한 측정값 변동률을 산출하였다. 결과를 제 3 표에 기재한다.

표 3

계면활성제		농도 (%)	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)
구조	상품명		25℃ 반응	37℃ 반응	
축합물 POE·POP	프로논 102	0.1	385.1	352.0	-8.6
	프로논 104	0.1	372.6	369.6	-0.8
	에마르겐 PP-230	0.1	479.7	458.5	-4.4
	에마르겐 PP-250	0.1	460.0	444.2	-3.4
	프로논 202B	0.1	470.8	520.3	10.5
	프로논 403	0.1	509.4	483.7	-5.0
POE·POA 알킬에테르	유니루브 50MB-168	0.1	345.9	329.9	-4.6
	유니루브 75DE-25	0.1	313.6	258.4	-17.6
	유니루브 75DE-3800	0.1	288.3	276.7	-4.0
POE·POP 알킬 페닐에테르	디스파놀 KP189R-40	0.1	552.5	517.7	-6.3
	디스파놀 KP189-40	0.1	560.0	493.5	-11.9
POE 다고리 페닐에테르	뉴콜 714	0.1	535.4	465.5	-13.1
	뉴콜 2614	0.1	551.5	464.8	-15.7
POE·POP 다고리 페닐에테르	뉴콜 2616F	0.1	505.8	467.7	-7.5
에틸렌디아민 POE·POP 축합물	에틸렌디아민 PO40EO40	0.1	534.7	520.4	-2.7
POE 알킬 페닐에테르	노니테트 P40 (비교예)	0.1	532.3	381.0	-28.4

MxA 단백질농도 * (ng/mL)

제 3 표에 나타내는 바와 같이, 측정값 변동률에 대해, 계면 활성제로서 노니테트 P40 을 사용한 경우 (-28.4 %) 와 비교하여, POE?POP 축합물, POE?POP 알킬에테르, POE?POP 알킬페닐에테르, POE 다고리 페닐에테르, POE?POP 다고리 페닐에테르, 에틸렌디아민 POE?POP 축합물을 사용한 경우, 현저하게 저하되어 있어, 반응 온도의 측정값에 대한 영향이 현저하게 억제되는 것을 알 수 있다.

실시에 4

MxA 단백질 측정에 있어서의 측정값 변동의 검토 4 (2 차 반응)

바이러스 감염이 확인되어, MxA 단백질 양성을 나타내는 환자 4 예로부터 EDTA?2Na 채혈관을 사용하여 채혈한 혈액을 검체로서 사용하였다. 전혈 검체는 실시예 1 의 [6] 의 검체 희석액 [단, 「계면 활성제」로서 노니테트 P40 (1.2 %) 를 사용] 으로 10 배 희석시켜, 측정용 시료로 하였다.

실시에 3 의 POD 표지 항체 희석 완충액 중, 계면 활성제로서 0.1 % 프로논 403, 0.1 % 프로논 102, 0.1 % 노니테트 P40 을 각각 함유하는 POD 표지 항체 희석 완충액을 사용하여, 실시예 3 과 동일하게 하여 측정을 실시하고 (단, 1 차 반응은 25 ℃ 에서, 2 차 반응은 25 ℃ 와 37 ℃ 의 양 온도에서 실시하였다), 반응 온도에 의한 측정값 변동을 검토하였다. 결과를 제 4 표에 기재한다.

표 4

전혈검체	POE·POP 촉합물						POE 알킬페닐에테르(비교예)		
	프로논 403						노니데트 P40		
	MxA 단백질농도 *			MxA 단백질농도 *			MxA 단백질농도 *		
	25℃ 반응	37℃ 반응	측정값 변동률 (%)	25℃ 반응	37℃ 반응	측정값 변동률 (%)	25℃ 반응	37℃ 반응	측정값 변동률 (%)
6	144.7	142.7	-1.4	108.6	110.8	2.0	131.7	88.9	-32.5
7	84.0	84.5	0.6	62.8	60.9	-3.0	83.2	59.9	-28.0
8	163.6	163.2	-0.2	124.5	126.7	1.8	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
MxA 단백질농도 * (ng/mL)									

[0186]

[0187] 제 4 표에 나타내는 바와 같이, 전혈 검체를 사용한 경우에도, 측정값 변동률은 프로논 403 에서는 -4.5 % ? +0.6 % , 프로논 102 에서는 -3.0 % ? +2.0 % 로, 노니데트 P40 의 -40.1 % ? -23.6 % 와 비교하여, 반응 온도의 측정값에 대한 영향이 현저하게 억제되는 것을 알 수 있다.

[0188]

실시예 5

[0189]

MxA 단백질 측정에 있어서의 측정값 변동의 검토 5 (2 차 반응)

[0190]

바이러스 감염이 확인되고, MxA 단백질 양성을 나타내는 환자 5 예로부터 EDTA?2Na 채혈관을 사용하여 채혈한 혈액을 검체로서 사용하였다. 전혈 검체는 실시예 1 의 [6] 의 검체 희석액 [단, 「계면 활성제」로서 노니 데트 P40 (1.2 %) 를 사용] 으로 10 배 희석시켜, 측정용 시료로 하였다.

[0191]

실시예 3 의 POD 표지 항체 희석 완충액 중, 계면 활성제로서 0.1 % 에마르겐 PP-250, 0.1 % 유니루브 50MB-168, 0.1 % 디스파놀 KP189R-40, 0.1 % 뉴콜 2616F, 0.1 % 에틸렌디아민 PO40EO40 을 각각 포함하는 POD 표지 항체 희석 완충액을 사용하여, 실시예 3 과 동일하게 하여 측정을 실시하고 (단, 1 차 반응은 25 ℃ 에서, 2 차 반응은 25 ℃ 와 37 ℃ 의 양 온도에서 실시하였다), 반응 온도에 의한 측정값 변동을 검토하였다. 결과를 제 5 표에 기재한다.

표 5

전혈검체	POE·POP 속혈물					POE·POP 알킬페닐에테르					POE·POP 알킬페닐에테르				
	에마르겐 PP-250					유니루브 50MB-168					디스파놀 KP189R-40				
	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)		측정값 변동률 (%)	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)		측정값 변동률 (%)	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)		측정값 변동률 (%)
	25℃ 반응	37℃ 반응	25℃ 반응	37℃ 반응		25℃ 반응	37℃ 반응	25℃ 반응	37℃ 반응		25℃ 반응	37℃ 반응	25℃ 반응	37℃ 반응	
10	37.7	33.6	-11			26.2	25.5	-3			40.6	35.8	-12		
11	42.8	40.1	-6			31.7	29.8	-6			45.6	40.2	-12		
12	50.1	52.1	4			40.5	41.5	2			54.6	52.1	-5		
13	30.3	28.3	-7			24.5	22.6	-8			33.0	28.1	-15		
14	35.3	34.8	-1			29.2	29.1	0			37.1	34.6	-6		
전혈검체	POE·POP 다고리페닐에테르					에틸렌디아민 PO40E040					노니테트 P40				
	뉴콜 2616F					에틸렌디아민 PO40E040					노니테트 P40				
	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)		측정값 변동률 (%)	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)		측정값 변동률 (%)	MxA 단백질농도 *		측정값 변동률 (%)		측정값 변동률 (%)
	25℃ 반응	37℃ 반응	25℃ 반응	37℃ 반응		25℃ 반응	37℃ 반응	25℃ 반응	37℃ 반응		25℃ 반응	37℃ 반응	25℃ 반응	37℃ 반응	
10	40.9	33.4	-18			36.1	33.5	-7			39.8	27.6	-31		
11	46.5	37.9	-19			40.7	38.3	-6			43.9	29.6	-33		
12	54.3	50.6	-7			49.4	49.0	-1			52.1	40.0	-23		
13	33.1	27.7	-16			29.7	26.2	-12			30.8	22.1	-28		
14	38.4	34.3	-11			33.9	32.5	-4			35.4	28.2	-20		

MxA 단백질농도 * (ng/mL)

[0192]

[0193]

제 5 표에 나타내는 바와 같이, 전혈 검체를 사용한 경우에도, 측정값 변동률은 에마르겐 PP-250 에서는 -1 % ? -11 %, 유니루브 50MB-168 에서는 0 ? -8%, 디스파놀 KP189R-40 에서는 -5 ? -15 %, 뉴콜 2616F 에서는 -7 ? -15 %, 에틸렌디아민 PO40E040 에서는 -1 ? -12 % 로, 노니테트 P40 의 -33 % ? -20 % 와 비교하여, 반응 온도의 측정값에 대한 영향이 현저하게 억제되는 것을 알 수 있다.

[0194]

실시예 6

[0195]

이하의 구성 요소 (a) ? (g) 로 이루어지는 MxA 단백질 측정용 키트를 조제하였다.

[0196]

(a) 항 MxA 단백질 항체 고정화 플레이트

[0197]

실시예 1 [4] 의 방법에 따라, 항 MxA 단백질 항체 고정화 플레이트를 다음의 방법으로 조제하였다. 먼저, 5 µg/mL 의 항 MxA 단백질 모노클로날 항체 KM1135 의, 100 mmol/L 염화나트륨을 함유하는 100 mmol/L 인산 완충액 (pH 7.5) 용액을, 96 웰 마이크로타이터 플레이트 [나르젠 눈크 인터내셔널 (Nalge Nunc International) 사 제조] 에 100 µL/웰의 양으로 분주하여, 3 일간 방치 후, 상청을 흡인 제거하였다. 이어서, 1 % 블록에 이스 (다이넛폰 제약사 제조) 의, 100 mmol/L 염화나트륨을 함유하는 100 mmol/L 인산 완충액 (pH 7.5) 용액을 각 웰에 300 µL 분주하고, 실온에서 하룻밤 가만히 정지시켜 블로킹하였다. 블로킹액을 제거한 후, PBS 로 세정하여, 진공 건조기로 3 일간 건조시켜, 항 MxA 단백질 모노클로날 항체 고정화 플레이트를 조제하였다.

[0198]

(b) 검체 희석액

- [0199] 이하의 조성으로 이루어지는 검체 희석액을 조제하였다.
- [0200] Tris (도닌 화학 연구소사 제조) (pH 8.5) 0.1 mol/ℓ
- [0201] CHAPS (도닌 화학 연구소사 제조) 2.5 %
- [0202] 스타폼 DO 1.2 %
- [0203] 염화나트륨 0.1 mol/ℓ
- [0204] BSA (생화학 공업사 제조) 0.1 %
- [0205] 아지화나트륨 0.1 %
- [0206] (c) POD 표지 항 MxA 단백 항체 용액
- [0207] 실시예 1 [5] 의 방법으로 조제된 POD 표지 항 MxA 단백 항체 KM1124 를, 이하의 조성으로 이루어지는 POD 표지 항 MxA 단백 항체 희석액으로 800 배 희석시켜, POD 표지 항 MxA 단백 항체 용액을 조제하였다.
- [0208] Bis-Tris (도닌 화학 연구소사 제조) (pH 7.0) 0.05 mol/ℓ
- [0209] 프로논 202B 0.1 %
- [0210] 염화나트륨 50 mmol/ℓ
- [0211] BSA (생화학 공업사 제조) 0.1 %
- [0212] 4-AA (사이코 화성사 제조) 0.01 %
- [0213] 프로클린 300 0.035 %
- [0214] (d) 발색액
- [0215] TMBblue (세룰로지컬사 제조)
- [0216] (e) 반응 정지액
- [0217] 0.5 mol/ℓ 황산 수용액
- [0218] (f) 세정액
- [0219] 이하의 세정액을 조제하였다.
- [0220] 인산 완충액 (pH 7.2) 10 mmol/ℓ
- [0221] 트윈 20 0.05 %
- [0222] 염화나트륨 0.15 mol/ℓ
- [0223] (g) 표준 물질과 표준액
- [0224] 실시예 1 [2] 에서 조제한 리콥비넌트 MxA 단백질을, 인산 완충액으로 희석시킨 후, 동결 건조시켜, MxA 단백질의 표준 물질을 조제하였다.
- [0225] 조제한 동결 건조 상태의 표준 물질을 상기 (b) 의 검체 희석액으로 희석시키고, 0 (검체 희석액만), 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24 ng/ml 의 각 농도의 MxA 단백질 용액을 조제하고, 이들을 표준액으로 하였다.
- [0226] [비교예 3]
- [0227] 이하의 구성 요소 (a) ? (g) 로 이루어지는 MxA 단백질 측정용 키트를 조제하였다.
- [0228] (a) 항 MxA 단백질 항체 고정화 플레이트
- [0229] 실시예 6 의 (a) 와 동일한 항 MxA 단백질 항체 고정화 플레이트.
- [0230] (b) 검체 희석액
- [0231] 이하의 조성으로 이루어지는 검체 희석액을 조제하였다.

[0232]	HEPES (도닌 화학 연구소사 제조) (pH 8.0)	0.1 mol/ℓ
[0233]	CHAPS (도닌 화학 연구소사 제조)	4.9 %
[0234]	노니테트 P40	1.2 %
[0235]	염화나트륨	0.1 mol/ℓ
[0236]	BSA (생화학 공업사 제조)	0.1 %
[0237]	아지화나트륨	0.1 %
[0238]	(c) POD 표지 항 MxA 단백 항체 용액	
[0239]	실시예 1 [5] 의 방법으로 조제된 POD 표지 항 MxA 단백 항체 KM1124 를, 이하의 조성으로 이루어지는 POD 표지 항 MxA 단백 항체 희석액으로 800 배 희석시키고, POD 표지 항 MxA 단백 항체 용액을 조제하였다.	
[0240]	Bis-Tris (도닌 화학 연구소사 제조) (pH 6.0)	50 mmol/ℓ
[0241]	노니테트 P40	0.1 %
[0242]	염화나트륨	50 mmol/ℓ
[0243]	BSA (생화학 공업사 제조)	0.1 %
[0244]	4-AA (사이코 화성사 제조)	0.01 %
[0245]	프로클린 300	0.035 %
[0246]	(d) 발색액	
[0247]	TMBblue (세룰로지컬사 제조)	
[0248]	(e) 반응 정지액	
[0249]	0.5 mol/ℓ 황산 수용액	
[0250]	(f) 세정액	
[0251]	이하의 세정액을 조제하였다.	
[0252]	인산 완충액 (pH 7.2)	10 mmol/ℓ
[0253]	트윈 20	0.05 %
[0254]	염화나트륨	0.15 mol/ℓ
[0255]	(g) 표준 물질과 표준액	
[0256]	실시예 1 [2] 에서 조제한 리코비넨트 MxA 단백질을, 인산 완충액으로 희석시킨 후, 동결 건조시키고, MxA 단백질의 표준 물질을 조제하였다.	
[0257]	조제한 동결 건조 상태의 표준 물질을 상기 (b) 의 검체 희석액으로 희석시키고, 0 (검체 희석액만), 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24 ng/ml 의 각 농도의 MxA 단백질 용액을 조제하고, 이들을 표준액으로 하였다.	
[0258]	실시예 7	
[0259]	측정용 시료로서, 실시예 1 [3] 에서 조제한 세포를, 실시예 6 의 검체 희석액으로 20 배 희석시키고, 30 분간 가만히 정지시킨 후, 추가로 검체 희석액으로 8배 희석시킨 것을 사용하고 키트로서 실시예 6 의 키트를 사용하여 다음의 순서에 따라, 측정을 실시하였다.	
[0260]	실시예 6(a) 의 항 MxA 단백질 항체 고정화 플레이트에, (g) 에서 조제한 각각의 표준액 100 μℓ 를 첨가하고, 소정 온도 (22 ℃, 25 ℃, 28 ℃, 30 ℃, 32 ℃ 의 각 온도) 에서 1 시간 반응시켜, 항체에 MxA 단백질을 결합시켰다. 반응액을 제거한 후, (f) 의 세정액 400 μℓ 로 플레이트를 5 회 세정하였다. 이어서, (c) 에서 조제한 POD 표지 항 MxA 단백 항체 용액 100 μℓ 첨가하고, 소정 온도 (22 ℃, 25 ℃, 28 ℃, 30 ℃, 32 ℃ 의 각 온도) 에서 0.5 시간 반응시켰다. 반응 후, 반응액을 제거하여, (f) 의 세정액 400 μℓ 로 플레이트를 5 회 세정하였다. 이어서, 어두운 곳에서, 0.05 % 테트라메틸벤지딘 및 과산화수소를 함유하는 (d) 의 발색액	

100 μ l 를 첨가하고, 실온에서 10 분간 반응시킨 후, (e) 의 반응 정지액 100 μ l 를 첨가하고, 실온에서 10 분간 인큐베이션하여, 반응을 정지시켰다. 반응액의 450 nm 에서의 흡광도를 플레이트 리더로 측정하고, MxA 단백질 농도와 흡광도의 관계를 나타내는 검량선을 제작하였다.

[비교예 4]

실시예 6 의 키트 대신에 비교예 3 의 키트를 사용하는 것 이외에는 실시예 7 과 동일한 방법에 의해 측정을 실시하여, MxA 단백질 농도와 흡광도의 관계를 나타내는 검량선을 제작하였다.

실시예 7 및 비교예 4 의 측정의 결과를 제 6 표에 나타낸다.

표 6

키트	측정방법	반응온도 (°C)				
		22	25	28	30	32
실시예 6	실시예 7	445.5	443.2	443.5	449.2	435.3
		(100)	(100)	(100)	(101)	(98)
비교예 3	비교예 4	381.0	360.8	338.7	297.6	284.2
		(100)	(95)	(89)	(78)	(75)

제 6 표에는, 각 반응 온도에서의 반응에 있어서의 측정값과, 22 °C 에서의 반응에 있어서의 측정값을 100 으로 했을 경우의, 각 온도에서의 측정값의 상대값의 양자를 기재하고 있다. 상대값이 100 에 가까울수록, 측정이 반응 온도의 영향을 잘 받지 않는 것을 의미한다. 제 6 표로부터 분명한 바와 같이, 스타폼 D0 (지방산 알칸올아미드) 와 프로논 202B (POE?POP 축합물) 를 함유하는 실시예 6 의 키트를 사용하는 실시예 7 의 측정 방법은, 노니데트 P-40 (POE 알킬페닐에테르) 을 포함하는 비교예 3 의 키트를 사용하는 비교예 4 의 측정 방법과 비교하여, 현저하게 측정이 안정되어 있었다. 이것으로부터, 본 발명의 측정 방법은 반응 온도의 영향을 잘 받지 않는 방법인 것을 알 수 있다.

산업상 이용가능성

본 발명에 의해, 감염증의 진단 등에 유용한, 검체 중의 측정 대상 성분의 측정 방법 및 측정용 키트가 제공된다.