

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4545869号  
(P4545869)

(45) 発行日 平成22年9月15日(2010.9.15)

(24) 登録日 平成22年7月9日(2010.7.9)

|                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| (51) Int.Cl.            | F I                     |
| GO 1 N 33/537 (2006.01) | GO 1 N 33/537           |
| GO 1 N 33/53 (2006.01)  | GO 1 N 33/53 U          |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 1 5 F   |
|                         | GO 1 N 33/543 5 2 1     |
|                         | GO 1 N 33/543 5 2 5 E   |
|                         | 請求項の数 3 (全 17 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願2000-45380 (P2000-45380)  
 (22) 出願日 平成12年2月23日(2000.2.23)  
 (65) 公開番号 特開2001-235471 (P2001-235471A)  
 (43) 公開日 平成13年8月31日(2001.8.31)  
 審査請求日 平成19年2月14日(2007.2.14)

前置審査

(73) 特許権者 000228590  
 日本ケミファ株式会社  
 東京都千代田区岩本町2丁目2番3号  
 (73) 特許権者 000003160  
 東洋紡績株式会社  
 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号  
 (74) 代理人 100074675  
 弁理士 柳川 泰男  
 (72) 発明者 丹生 淳郷  
 埼玉県北葛飾郡庄和町新宿新田2-2-2番地  
 81号  
 (72) 発明者 鈴木 義徳  
 千葉県柏市豊四季台2丁目1番地41号1  
 04

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多孔性フィルタを用いる生理活性試料物質の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生理活性を有する測定試料物質を含む試料溶液と、該測定試料物質に特異的に結合する第一の生理活性物質に**ビオチンであるリガンドが結合された結合体を含む溶液**とを、それらの溶液の容量比が1：1乃至20：1となるように接触させて、リガンドに結合した生理活性物質と測定試料物質との複合体を溶液中にて形成する工程；該複合体を含む溶液を、上記リガンドの補捉剤である**抗ビオチン抗体もしくは抗ストレプトアビジンが、それぞれに対応して抗ビオチン抗体に対する抗体もしくは抗ストレプトアビジン抗体であるスペースを介して結合された、透過した溶液を吸収することができる吸収体を下部に備えた多孔性のグラスフィルタの表面に滴下し、透過させて、該複合体のリガンド部分を、該リガンド補捉剤に結合させる工程；該多孔性フィルタの表面に、上記測定試料物質に特異的に結合する、酵素で標識された第二の生理活性物質の溶液を滴下し、透過させて、この酵素標識を持つ第二の生理活性物質を、リガンド補捉剤とリガンド部分とを介して多孔性フィルタに結合している第一の生理活性物質と測定試料物質との複合体に結合させる工程；多孔性フィルタを洗浄することにより未結合の酵素標識第二生理活性物質を除去する工程；そして多孔性フィルタに結合した酵素の活性を測定する工程からなることを特徴とする、多孔性フィルタを用いる生理活性を有する試料物質の測定方法。**

【請求項2】

生理活性を有する測定試料物質が**アレルギー特異的 I g E 抗体であって、第一の生理活性物質にリガンドが結合された結合体がビオチン化アレルギーである請求項1に記載の試**

料物質の測定方法。

## 【請求項3】

試料溶液と、測定試料物質に特異的に結合する第一の生理活性物質にリガンドが結合された結合体を含む溶液とを、それらの溶液の容量比が2：1乃至10：1となる量にて接触させることを特徴とする請求項1もしくは2に記載の試料物質の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、固相担体として多孔性フィルタを用い、免疫学的測定法に基づく生理活性を有する試料物質の量の測定方法に関するものである。

10

## 【0002】

## 【従来の技術】

固相免疫測定法においては、測定対象とする抗原あるいは抗体に応じて、あらかじめ該当する抗原に対応する固定化抗体固相あるいは該当する抗体に対する固定化抗原固相を調製し、測定の都度、対象とする物質に対応した当該固相を選択する方法が従来では一般的であった。このような方法では、測定対象物質ごとに必要とされる固相の種類は無数となるため、固相の調製が煩雑を極め、かつ、測定操作も機械的あるいは用手法に関わらず、測定対象物質に応じて適当な固相ごとに選択しなければならないという煩雑さが重なっていた。

## 【0003】

20

上記の問題を解決しようとする試みはすでになされている。例えば、一種類のリガンド捕捉剤固定化固相を用い、測定対象物質に応じたリガンド標識生理活性物質を選択して、リガンド捕捉剤固定化固相上で測定時に必要とするリガンド標識生理活性物質、即ち、リガンド標識抗原あるいは抗体を固相に捕捉することに基づく方法が知られている。また、必要な固相を調製するか、あるいは、試料中の測定対象の抗原あるいは測定対象抗体とリガンド標識抗体もしくはリガンド標識抗原をリガンド捕捉剤固定化固相上に添加し、捕捉することにより、免疫的に測定される任意の測定対象物質の測定を可能にする方法も知られている。これらの方法は、たとえば、特公平4-49657号公報及び特開平2-145967号公報に記載されている。

## 【0004】

30

しかしながら、公知の方法では、極めて短い時間で、1mL当たりナノグラム量のレベルでの測定感度を得ることはできなかった。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、汎用性の高い測定具を用いて、従来の免疫学的測定法に要する時間よりも極めて短い時間にて、1mL当たりナノグラム量のレベルでの測定感度を得ることのできる免疫学的測定法に基づく生理活性を持つ試料物質の測定方法を提供することにある。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

40

本発明は、生理活性を有する測定試料物質を含む試料溶液と、該測定試料物質に特異的に結合する第一の生理活性物質にビオチンであるリガンドが結合された結合体を含む溶液とを、それらの溶液の容量比が1：1乃至20：1（好ましくは、2：1以上であり、また10：1以下である）となるように接触させて、リガンドに結合した生理活性物質と測定試料物質との複合体を溶液中にて形成する工程；該複合体を含む溶液を、上記リガンドの補捉剤である抗ビオチン抗体もしくはストレプトアビジンが、それぞれに対応して抗ビオチン抗体に対する抗体もしくは抗ストレプトアビジン抗体であるスぺーサを介して結合された、透過した溶液を吸収することができる吸収体を下部に備えた多孔性のグラスフィルタの表面に滴下し、透過させて、該複合体のリガンド部分を、該リガンド補捉剤に結合させる工程；該多孔性フィルタの表面に、上記測定試料物質に特異的に結合する、酵素で

50

標識された第二の生理活性物質の溶液を滴下し、透過させて、この酵素標識を持つ第二の生理活性物質を、リガンド捕捉剤とリガンド部分とを介して多孔性フィルタに結合している第一の生理活性物質と測定試料物質との複合体に結合させる工程；多孔性フィルタを洗浄することにより未結合の酵素標識第二生理活性物質を除去する工程；そして多孔性フィルタに結合した酵素の活性を測定する工程からなることを特徴とする、多孔性フィルタを用いる生理活性を有する試料物質の測定方法にある。

【0008】

本発明の試料物質の測定方法の好ましい態様を次に記す。

(1) リガンドとしてビオチンを用いること。

(2) リガンド捕捉剤として抗ビオチン抗体を用いること。

(3) リガンド捕捉剤が抗ビオチン抗体で、スペーサが抗ビオチン抗体に対する抗体であること。

(4) 第一の生理活性物質にリガンドが結合された複合体としてビオチン化アレルゲンを用いること。

【0009】

(5) リガンド捕捉剤がスペーサを介して結合している繊維質多孔性フィルタを用いること。

(6) リガンド捕捉剤がストレプトアビジンであること。

(7) リガンド捕捉剤がストレプトアビジンで、スペーサが抗ストレプトアビジン抗体であること。

(8) リガンド捕捉剤がストレプトアビジンで、スペーサが抗ストレプトアビジン抗体に対する抗体に抗ストレプトアビジン抗体を重層したものであること。

(9) 繊維質多孔性フィルタの下部に吸収体が備えられていること。

【0010】

(10) 繊維質多孔性フィルタを固相担体とし、リガンドを捕捉するリガンド捕捉剤をこの固相担体上に担持し、測定試料物質に特異的に結合する第一の生理活性物質にリガンドが結合された物質と、測定試料物質を含む試料とを液中で混合攪拌し反応させたのち、その反応液の一定量を、リガンド捕捉剤が結合している固相担体上に直接滴下し、その後、該滴下部分に、測定試料物質に特異的に結合する、酵素で標識された第二の生理活性物質を含む溶液を滴下して反応させ、その反応液がフィルタの縦方向に浸透後、洗浄液を滴下して、次いで、繊維質多孔性フィルタ上の酵素活性の量を測定することによって、測定試料物質の量を測定する繊維質多孔性フィルタ免疫測定方法において、測定試料物質を含む試料と測定試料物質に特異的に結合する生理活性物質にリガンドが結合された物質との液中での比率が20:1~1:1までの範囲、好ましくは10:1~2:1、さらに好ましくは10:1~4:1の範囲で測定すること。

【0011】

(11) 測定試料物質に特異的に結合する第一の生理活性物質にリガンドが結合された物質と測定試料物質を含む試料との溶液中での結合反応の後、該反応液を適当な希釈液で希釈した後、その一定量を取り、固相担体上に滴下すること。

(12) 酵素反応後の信号量の測定方法として、積分球を使用して反射率を測定すること。

【0012】

(13) 上記信号量の測定に際して、信号強度の初速度を測定すること。

(14) 固相担体上に結合した酵素活性の信号強度の初速度を測定し終わるまでの時間が、リガンド捕捉剤が結合している繊維質多孔性フィルタ上に直接、溶液を滴下後、15分以内、好ましくは8分以内に反応を終了させること。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の多孔性フィルタを用いる生理活性試料物質の量や生理活性の測定法において、多孔性フィルタとしてはグラスファイバーフィルタを用いることが好ましい。リガンドとし

10

20

30

40

50

ては、ビオチンを用いることが好ましく、また多孔性フィルタに結合させるリガンド捕捉剤としては、抗ビオチン抗体もしくはストレプトアビジンを用いることが好ましい。

【0014】

リガンド捕捉剤は、多孔性フィルタにスペーサを介して結合されている。たとえば、リガンドとしてビオチンを用いるときは、スペーサとしてリガンド捕捉剤に対する抗体、すなわち抗ビオチン抗体に対する抗体に抗ビオチン抗体を重層することが好ましい。また、スペーサとして抗ストレプトアビジン抗体を用いるか、あるいは抗ストレプトアビジンに対する抗体に抗ストレプトアビジンを重層するかして用いることもできる。

【0015】

次に、本発明の多孔性フィルタを用いる生理活性試料物質の測定方法を、抗体（アレルギー特異的IgE抗体）を測定対象の生理活性物質とし、第一の生理活性物質として抗原（アレルギー）を用い、酵素標識された第二の生理活性物質として、酵素標識された第二抗体（抗ヒトIgE抗体）を用いる場合において、そして上記の好ましい多孔性フィルタ、リガンド、リガンド捕捉剤を利用する系を例にとり、さらに詳しく説明する。

【0016】

本発明の測定方法では、多孔性フィルタを固相担体として用いて、測定物質に特異的に結合する生理活性物質にリガンドが結合された結合体、例えば、リガンド標識抗原、あるいはリガンド標識抗体を含む溶液と測定試料物質を含む試料溶液とを、予め液中で反応させ、その後、この反応液をリガンド捕捉剤が結合している多孔性フィルタ固相上に直接滴下し、滴下した反応液がフィルタの縦方向に浸透した後、測定試料物質に特異的に結合する第二の生理活性物質であって、酵素で標識されたもの、たとえば、酵素標識抗体あるいは酵素標識抗原を滴下して反応させ、次いで洗浄液を滴下して未反応物を除去した後、繊維質多孔性フィルタ上の酵素活性の量を測定することにより、測定物質の量を測定することができるが、本発明の測定法においては、測定試料物質を含む試料溶液と、測定試料物質に特異的に結合する第一の生理活性物質にリガンドが結合された結合体とを、容量比で20:1~1:1までの範囲、好ましくは10:1~2:1の範囲とすることにより、たとえば、15分以下の短時間で、ng/mLレベルの微量の測定が可能になった。

【0017】

多孔性フィルタ（固相担体）の下部には、溶液の通過を迅速ならしめるための吸収体を設置することも好ましい。具体的には、固相担体として、例えば特開平4-318462号公報あるいは特開平7-218438号公報に記載されているごとく、通液性に優れ、蛋白質や糖蛋白質を物理的あるいは化学的に固定化する能力に優れ、適度な物理的強度を有するグラスファイバーを用い、その下部に固相担体を通過した溶液を吸収するためのセルロースから成る吸収層とを組み合わせた免疫学的測定用の反応容器（すなわち、プロット装置）を用いることが好ましい。

【0018】

スペーサあるいはリガンド捕捉剤の固相担体への固定化方法は、物理的固定化法としては、当該固相担体の上部から、順次、湿潤用緩衝液、ビオチンを特異的に認識する蛋白質溶液（リガンド捕捉剤溶液）、測定目的物質以外の夾雑物質の非特異的吸着を防止するためのブロッキング溶液及び安定化剤を含む緩衝液を添加し、凍結乾燥してリガンド捕捉剤固定化固相担体を調製する方法を利用することができる。また、化学的固定化法としては、グラスファイバー担体を、例えば、石川らの方法（酵素免疫測定法：医学書院、p94, 1978）に従って、アミノアルキルシラン-グルタルアルデヒドで処理した後、吸収層と組み合わせてプロット装置を作成し、前記の物理的固定化法と同様の溶液を、同様の順序で添加、凍結乾燥して、リガンド捕捉剤固定化固相を作製することができる。

【0019】

本発明の測定方法において、リガンド捕捉剤として、抗ビオチン抗体もしくはストレプトアビジンを用いることができるが、直接これらの蛋白質をグラスファイバー固相担体に固定化するよりも、以下に述べるスペーサを介して固定化したとき、より高感度が得られる。即ち、望ましくは、固相担体に抗ビオチン抗体に対する抗体を介して抗ビオチン抗体

10

20

30

40

50

を固定化し、若しくは、固相担体に抗ストレプトアビジン抗体を介してストレプトアビジンを固定化、あるいは、抗ストレプトアビジン抗体に対する抗体に抗ストレプトアビジン抗体を重層した固相にストレプトアビジンを固定化して作製した固相は、本発明の測定法の有利さをさらに増すことができる。

【0020】

本発明の測定方法では、免疫学的測定法において多種類の測定対象物質を迅速、高感度、特異的、高精度で測定するために、リガンド捕捉剤固定化固相が効果的に利用できる。

【0021】

試料中の測定対象物質（測定試料物質）と免疫学的に特異的に反応するリガンド標識抗原あるいはリガンド標識抗体のリガンドとして、小分子のビオチンを用いることが好ましい。ビオチン標識抗原あるいはビオチン標識抗体は、それ自身の免疫学的活性を損なうことなく測定対象物質と速やかに反応するため、測定時間の短縮が可能となる。ビオチン標識により、抗原あるいは抗体の活性の変化が認められる場合には、ビオチン化試薬の側鎖長を変更したり、抗原あるいは抗体の末端糖鎖を酸化後ビオチン標識にする方法などを利用することができる。

【0022】

本発明の測定方法において、リガンド捕捉剤固定化固相担体及びリガンド標識体を用いて試料中の測定対象物質を測定するとき、測定対象物質の検出に必要とされる測定感度あるいは測定対象物質とリガンド標識体との反応に応じて、測定対象の生理活性物質の溶液とリガンド標識体を含む溶液との容量比を変え、リガンド標識物質の濃度を上げ、測定対象物質の濃度を維持されるような容量比、即ち、リガンド標識体溶液：測定対象物質溶液を1：20から1：1、好ましくは1：10～1：2の範囲で反応させることにより、高感度、短時間の測定が可能になったものである。なお、感度がレンジオーバーした場合には適当な希釈液で測定試料を希釈後、リガンド標識体と混合することも可能であり、また測定試料とリガンド標識体を混合後、適当な希釈液で希釈し、その後その一定量を検体量として使用することも可能である。

【0024】

本発明の測定方法において、測定対象となる試料物質としては、アレルギー特異的IgE抗体、非特異的IgE、肝炎ウイルス（A、B、C、D、E型）、ウイルス感染症（HIV、HTLV、ヘルペス、ロタ、ルベラなど）、原虫性感染症（トキソプラズマ、スピロヘータなど）、真菌性感染症（クラミジア、カンジダ、トリコモナスなど）など各種感染症マーカー、CEA、AFP、PSA、CA19-9、CA125、フェリチン、DUPANIIなどの腫瘍マーカー、CRP、ASO、RFなどの炎症マーカー、トロポニンI、トロポニンT、ミオグロビンなどの心筋梗塞マーカーなどを例示することができる。

【0025】

次に本発明の実施例と比較例とを示す。

【0026】

【実施例】

[実施例1]

(1) 物理的固定化法による抗ビオチン抗体固定化多孔性固相の作製

1) 抗ビオチン抗体ヤギIgG抗体固定化固相の作製

グラスフィルターと吸収層とを組み込んだプロット装置（特開平7-218438号公報の記載参照）に、そのフィルター上部から室温で10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液（湿潤液：pH7.4）を添加、次いで1～1000μg/mLの抗ビオチン抗体ヤギIgG溶液（100mMクエン酸緩衝液：pH3～4、あるいは10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液：pH7.4）を添加、10～30分間放置した後、ブロックエース（大日本製薬（株）製）を含有するブロッキング剤と防腐剤とを含有する安定化剤混合液を添加した。前記プロット装置を一昼夜凍結乾燥して、抗ビオチン抗体固定化固相を作製した。

【0027】

2) 抗ヤギ抗体ウサギIgGに抗ビオチン抗体ヤギIgGを重層した固相の作製

ガラスフィルターを組み込んだプロット装置に、室温でフィルター上部から湿潤液を添加、次いで1～100 μg/mLの抗ヤギ抗体ウサギIgG溶液(100 mMクエン酸緩衝液：pH 3～4、あるいは10 mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液：pH 7.4)を添加して、10～30分間放置した。ついで、1～1000 μg/mLの抗ビオチン抗体ヤギIgG溶液(10 mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液：pH 7.4)を添加し、さらに10～30分間放置し、次いでブロック剤と安定化剤混合液を添加した。一昼夜凍結乾燥して、重層抗ビオチン抗体固定化固相を作製した。

【0028】

(2) 標準IgEを使用した検出感度比較

上記の(2)で作製した抗ビオチン抗体固定化固相担体を組み込んだプロット装置にブロックエースと防腐剤とを含有するブロック液を各50 μL添加し、次いで、予めヒトIgE抗体標品50 μLに抗ヒトIgEモノクローナル抗体をビオチン化試薬で標識した試薬5 μLを加え、5分間37℃で加温混合した液50 μLを滴下した。2分間37℃で加温後、ペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgEモノクローナル抗体を20 μL滴下し、37℃2分間加温後、0.5%の非イオン界面活性剤(Tween-20)を含有する緩衝生理食塩水から成る洗浄液80 μL、2回をそれぞれが完全に吸収された後滴下し、フィルター固相担体に残った過剰の標識抗体を除去した。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン(TMBZ)溶液をそれぞれ40 μLずつ添加して37℃で反応させ、670 nmのレーザー光を光源とする積分球検出器で固相担体表面の青色の色調の反射率(K/S)を測定した。測定に際しては、プロット装置に液を滴下後6分以内で酵素反応の初速度を測定し終えた。基質の添加時からa、b秒後の反射率をそれぞれ(K/S)<sub>a</sub>、(K/S)<sub>b</sub>とすると、初速度(K/S)は、下記の式で表わされる。

$$K/S = ((K/S)_b - (K/S)_a) \times 60 / (b - a)$$

【0029】

上記の本発明の測定方法で用いる固相との比較のために、未感作のガラス繊維を打ち抜いて組み上げたプロット装置を用いて、フィルター上部から室温で10 mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液(湿潤液：pH 7.4)を添加、次いで1～100 μg/mLの抗ヒトIgEモノクローナル抗体溶液(100 mMクエン酸緩衝液：pH 3～4、あるいは10 mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液：pH 7.4)50 μLを添加、10～30分間放置した後、ブロックエースを含有するブロック剤と防腐剤を含有する安定化剤混合液を添加した。前記プロット装置を一昼夜凍結乾燥して、抗ヒトIgEモノクローナル抗体固定化固相を作製した。この固相担体を用い、測定操作に際して、希釈液と検体を1：1で混ぜ合わせ、検体として50 μLを使用し、上記の本発明方法と同様な操作をしてヒトIgE標品を測定し、測定値を求めた(比較例1)。

測定結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

10

20

30

表1 標準ヒトIgE抗体濃度の感度比較

| 検体             | 本発明方法<br>( $\Delta K/S$ ) | 比較例1<br>( $\Delta K/S$ ) | 本発明方法/比較例 |    |
|----------------|---------------------------|--------------------------|-----------|----|
| IgE標準液 (iu/mL) |                           |                          |           |    |
| 0              | 0.00552                   | 0.00670                  | 0.82      | 10 |
| 0.35           | 0.02851                   | 0.00819                  | 34.8      |    |
| 1.00           | 0.08816                   | 0.02036                  | 43.3      |    |

## 【0031】

表1の結果から、本発明に従う測定法では、比較例に比べて、30倍～40倍測定感度が高いことが確認された。

## 【0032】

(3) 患者血清中のアレルギー特異的IgEの測定

前記の(1) - (2)で作製した抗ビオチン抗体固定化固相を組み込んだプロット装置を5個×3名分計15個準備した。各々の上部からブロックエースを含有するブロッキング剤と防腐剤を含有するブロック液を各50 $\mu$ Lを添加し、次いで、ビオチン化ハウスダスト2・アレルギー液(H2)、ビオチン化コナヒョウダニ・アレルギー液(D2)、ビオチン化カモガヤ花粉・アレルギー液(G3)、ビオチン化ブタクサ花粉・アレルギー液(W1)、ビオチン化アルテルナリア・アレルギー液(M6)の各々5 $\mu$ Lに患者血清を各50 $\mu$ L加え37 $^{\circ}$ Cで5分間加温した。

## 【0033】

これらを各々のプロット装置に、50 $\mu$ Lずつ添加して37 $^{\circ}$ Cで2分間加温した後、それぞれのプロット装置に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgEマウスモノクローナル抗体溶液を各々20 $\mu$ Lずつ加えて、37 $^{\circ}$ Cで2分間加温した。各々のプロット装置を0.5% Tween-20を含有する緩衝化生理食塩水から成る洗浄液80 $\mu$ Lを2回、直前に供給した溶液が完全に吸収された後供給し、フィルター固相に残った過剰の標識抗体を除去し、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン(TMBZ)溶液をそれぞれ40 $\mu$ Lずつ添加して37 $^{\circ}$ Cで反応させ、次いで、670nmのレーザー光を光源とする積分球検出器で固相表面の青色の色調の反射率(K/S)を測定した。測定に際しては、プロット装置に液を滴下後6分以内で酵素反応の初速度を測定し終えた。その結果を表2に示す。

## 【0034】

比較のために、各種のアレルギー液(1～5 $\mu$ g/mL濃度)を用いて、ガラスフィルターと吸収層とを組み込んだプロット装置に、フィルター上部から室温で10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液(湿潤液: pH7.4)50 $\mu$ mを添加、次いで1～5 $\mu$ g/mLのアレルギー液100mMクエン酸緩衝液: pH3～4、あるいは10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液(湿潤液: pH7.4)100 $\mu$ mを添加し、10～30分間放置した後、ブロックエースを含有するブロッキング剤と防腐剤を含有する安定化剤混合液50 $\mu$ Lを添加した。前記プロット装置を一昼夜凍結乾燥してアレルギー固定化固相を得た。

## 【0035】

上記の固相を使用し、ブロック液を添加後、患者血清を各25 $\mu$ Lに希釈液25 $\mu$ Lを加え混合した後、プロット装置に50 $\mu$ Lずつ添加して、37 $^{\circ}$ Cで2分間加温した後、それぞれのプロット装置に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体マウスモノク

ーナル抗体溶液を各々20 $\mu$ Lずつ加えて、37 $^{\circ}$ Cで2分間加温した。各々のプロット装置を0.5% Tween-20を含有する緩衝化生理食塩水から成る洗浄液80 $\mu$ Lを2回、直前に供給した溶液が完全に吸収された後供給し、フィルター固相に残った過剰の標識抗体を除去した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン(TMBZ)溶液をそれぞれ40 $\mu$ Lずつ添加して37 $^{\circ}$ Cで反応させた。そののち、670nmのレーザー光を光源とする積分球検出器で固相表面の青色の色調の反射率(K/S)を測定した(比較例2)。その結果を表2に示す。

【0036】

【表2】

表2 抗ビオチン抗体固相による患者血清中の  
アレルゲン特異的IgE抗体反応性

| 患者 | アレルゲン | 本発明方法<br>( $\Delta K/S$ ) | 比較例2<br>( $\Delta K/S$ ) |
|----|-------|---------------------------|--------------------------|
| A  | H2    | 2.54016                   | 1.21961                  |
|    | D2    | 2.60332                   | 1.42753                  |
|    | G3    | 11.51162                  | 5.93553                  |
|    | W1    | 5.57485                   | 3.16917                  |
|    | M6    | 2.74481                   | 0.94953                  |
| B  | H2    | 0.35537                   | 0.11558                  |
|    | D2    | 0.56343                   | 0.14109                  |
|    | G3    | 1.51130                   | 0.66317                  |
|    | W1    | 0.21810                   | 0.07252                  |
|    | M6    | 0.16459                   | 0.02248                  |
| C  | H2    | 0.00109                   | 0.00181                  |
|    | D2    | 0.00093                   | 0.00016                  |
|    | G3    | 0.00963                   | 0.00287                  |
|    | W1    | 0.01234                   | 0.00510                  |
|    | M6    | 0.00244                   | 0.00156                  |

【0037】

上記の結果から、比較例の測定操作(比較例2)に比して本発明に従う測定操作では測定感度(即ちK/Sの値)が二倍以上であり、比較例に比して、低い値(患者C)でも、本発明方法では感度よく測定され、判定が容易であることが明らかである。

【0038】

[実施例2]

10

20

30

40

50

## (1) 物理的固定化法によるストレプトアビジン固定化多孔性固相の作製

## 1) ストレプトアビジン固定化固相の作製

グラスフィルターを組み込んだプロット装置に、室温でそのフィルター上部から湿潤液を添加、次いで1~1000 $\mu$ g/mLのストレプトアビジン溶液(100mMクエン酸緩衝液:pH3~4、あるいは10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液:pH7.4)を添加、10~30分間放置した後、ブロッキング剤と安定化剤混合溶液を添加した。一昼夜凍結乾燥して、ストレプトアビジン固定化固相を作製した。

## 【0039】

## 2) 抗ストレプトアビジン抗体ヤギIgGにストレプトアビジンを重層した固相の作製

グラスフィルターを組み込んだプロット装置に、室温でフィルター上部から湿潤液を添加、次いで1~100 $\mu$ g/mLの抗ストレプトアビジン抗体ヤギIgG溶液(100mMクエン酸緩衝液:pH3~4、あるいは10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液:pH7.4)を添加、10~30分間放置した後、1~1000 $\mu$ g/mLのストレプトアビジン溶液(10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液:pH7.4)を添加し、10~30分間放置した後、ブロッキング剤と安定化剤混合溶液を添加した。一昼夜凍結乾燥して、重層ストレプトアビジン固定化固相を作製した。

## 【0040】

比較例として、実施例1に記載の比較例2(アレルゲンを直接固相上に結合させたもの)をそのまま使用し、上記の2)の固相を使用して、実施例1と同じ方法で患者血清のアレルゲン特異的IgEを測定した場合も、実施例1とほぼ同じ値が得られ、感度として、二倍くらいの高感度を示した。即ち、固相をストレプトアビジンに変えても同じ結果が得られることが確認された。

## 【0041】

## [実施例3]

## (1) 化学的固定化法による抗ビオチン抗体固定化多孔性固相の作製

直径8mmに打ち抜いたグラスフィルターを、2%の3-アミノプロピルエトキシシラン-アセトン溶液に45分間一昼夜浸漬した後、アセトンで洗浄して乾燥した。次いで、これを1%グルタルアルデヒド(GA)水溶液に室温で1時間浸漬した後、0.25Mリン酸塩緩衝液(pH7.4)を用いてグルタルアルデヒド臭が消えるまで洗浄して、グルタルアルデヒド活性化フィルターを調製した。これをプロット装置に組み込み、室温でフィルター上部から、1~100 $\mu$ g/mLの抗ヤギ抗体ウサギIgG溶液(10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液:pH7.4)を添加、室温で10~30分間放置した後、1~1000 $\mu$ g/mLの抗ビオチン抗体ヤギIgG溶液(10mMリン酸塩-生理食塩水緩衝液:pH7.4)を添加して、室温で10~30分間放置した。次いで、ブロッキング剤と安定化混合溶液を上から加え、一昼夜凍結乾燥して重層抗ビオチン抗体固定化固相を作製した。

上記で得られた固相を用いて、実施例1と同じ方法で検出感度を求めた結果、実施例1と同様な結果が得られることが確認された。

## 【0042】

## [実施例4]

## (1) 重層抗ビオチン抗体固相を用いた患者血清中のアレルゲン特異的IgEの測定

サンプルカップを8個 $\times$ 8名分計64個用意し、各々に、ビオチン化ギョウギシバ花粉・アレルゲン液(G2)、ビオチン化オオアワガエリ花粉・アレルゲン液(G6)、ビオチン化アキノキリンソウ花粉・アレルゲン液(W12)、ビオチン化シラカンバ花粉・アレルゲン液(T3)、ビオチン化ペニシリウム(M1)・アレルゲン液、ビオチン化クラドスポリウム・アレルゲン液(M2)、ビオチン化ピーナッツアレルゲン液(F13)、ビオチン化卵黄・アレルゲン液(F75)を各々5 $\mu$ L分取し、これに患者血清を各々50 $\mu$ Lずつ添加して37 $^{\circ}$ Cで5分間加温した。即ち、ビオチン化アレルゲン液1容量に対して被検試料液10容量を用いた。予めブロック液50 $\mu$ Lを添加して湿潤させた実施例1の(1)-2)で作製したプロット装置の各々のフィルター上部から、これらの反応混合

10

20

30

40

50

液をそれぞれ50  $\mu$ L加えて、2分間37  $^{\circ}$ Cで加温した。加温後、各々のプロット装置の上部から西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgEマウスモノクローナル抗体溶液を20  $\mu$ Lずつ加えて37  $^{\circ}$ Cで2分間加温した。次いで、各々のプロット装置の上部から洗浄液100  $\mu$ Lを2回ずつ加えて過剰の標識抗体を除去した後、TMBZ溶液を各々40  $\mu$ Lずつ添加し、37  $^{\circ}$ Cで反応させ、積分球検出器で固相担体表面に呈する青色の反射率(K/S)を測定した。全反応時間は10分間で終わった。予め同様な操作法でヒトIgE抗体標品を用いて作製した検量線から、8名の患者血清中の各々8種類のアレルゲン特異的IgE抗体濃度を算出した。結果を表3に示した。

【0043】

【表3】

表3 重層抗ビオチン抗体固相による

患者血清中のアレルゲン特異的IgE濃度

| アレル<br>ゲン | アレルゲン特異的IgE濃度 (iu/mL) |      |     |      |       |       |       |     |
|-----------|-----------------------|------|-----|------|-------|-------|-------|-----|
|           | 患者D                   | 患者E  | 患者F | 患者G  | 患者H   | 患者I   | 患者J   | 患者K |
| G2        | 88.0                  | 10.1 | 2.3 | 73.5 | 91.5  | 91.3  | 94.2  | 2.6 |
| G6        | 75.0                  | 44.6 | 1.7 | 75.4 | 182.0 | 122.6 | 111.9 | 1.4 |
| W1        | 6.1                   | 0.4  | 0.7 | 9.9  | 144.3 | 9.1   | 3.5   | 1.8 |
| T3        | 8.9                   | 0.4  | 0.6 | 11.8 | 90.5  | 8.6   | 0.9   | 0.4 |
| M1        | 6.8                   | 0.2  | 0.2 | 3.7  | 1.2   | 3.1   | 2.1   | 0.0 |
| M2        | 6.5                   | 0.9  | 0.4 | 4.4  | 25.8  | 2.9   | 59.4  | 0.1 |
| F13       | 1.2                   | 0.3  | 0.6 | 0.9  | 4.1   | 0.6   | 0.5   | 0.5 |
| F75       | 0.5                   | 0.1  | 0.5 | 0.3  | 0.8   | 0.0   | 0.5   | 0.1 |

【0044】

表3の結果から、本発明に従う測定方法によれば、各種のアレルゲン特異的IgEを感度よく測定することが可能であることが確認された。

【0045】

[実施例5]

(1) アレルゲン特異的IgE濃度の相関

抗ビオチン抗体固定化固相を用いて、実施例4と同じ方法にて、5名の患者について28種類のアレルゲン特異的IgE(H1:ハウスダスト、H2:ハウスダスト2、D1:ヤケヒョウダニ、D2:コナヒョウダニ、E1:ネコ上皮、E2:イヌ上皮、E5:イヌ皮膚、G1:ハルガヤ、G3:カモガヤ、G6:オオアワガエリ、W1:ブタクサ、W6:ヨモギ、W12:アキノキリンソウ、T17:スギ、F1:卵白、F2:牛乳、F4:小麦、F9:米、F11:ソバ、F14:大豆、F23:カニ、F24:エビ、F75:卵黄、M1:ペニシリウム、M2:クラドスポリウム、M3:アスペルギルス、M5:カンジダ、M6:アルテルナリア)を測定した。市販のファルマシア・アップジョン社のアレルゲン特異的IgE測定試薬(比較)を用いて同じ検体を測定し、本発明の測定方法(発明)と相関を求めた。結果を表4と表5に示した。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

【 表 4 】

表 4 患者血清中アレルギー特異的 I g E の相関

| アレルギー | I g E 濃度 ( i u / m L ) |      |      |      |      |      |       |       |       |       |
|-------|------------------------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
|       | 患者 A                   |      | 患者 B |      | 患者 C |      | 患者 D  |       | 患者 E  |       |
|       | 比較                     | 発明   | 比較   | 発明   | 比較   | 発明   | 比較    | 発明    | 比較    | 発明    |
| H 1   | 57.9                   | 38.7 | 100) | 100) | 29.7 | 9.6  | 0.8   | 1.1   | 17.6  | 6.9   |
| H 2   | 62.1                   | 57.1 | 100) | 100) | 14.2 | 8.8  | 2.0   | 2.5   | 2.65  | 2.7   |
| D 1   | 38.0                   | 25.0 | 100) | 100) | 26.0 | 13.2 | 0.65  | 2.4   | 0.53  | 0.34< |
| D 2   | 58.4                   | 83.2 | 100) | 100) | 14.9 | 11.3 | 1.35  | 3.4   | 0.5   | 0.34< |
| E 1   | 16.1                   | 17.7 | 17.0 | 18.0 | 2.0  | 3.3  | 2.25  | 1.3   | 24.2  | 16.7  |
| E 2   | 19.8                   | 29.2 | 45.4 | 100) | 13.5 | 8.4  | 3.75  | 0.8   | 27.4  | 20.4  |
| E 5   | 39.5                   | 55.3 | 86.6 | 100) | 24.5 | 12.4 | 3.55  | 4.8   | 48.6  | 44.5  |
| G 1   | 100)                   | 100) | 100) | 100) | 47.5 | 33.3 | 1.5   | 2.4   | 33.3  | 37.7  |
| G 3   | 53.2                   | 100) | 100) | 100) | 45.9 | 31.6 | 2.3   | 3.7   | 47.4  | 37.4  |
| G 6   | 100)                   | 100) | 100) | 100) | 30.9 | 35.2 | 1.6   | 3.3   | 10.7  | 34.8  |
| W 1   | 100)                   | 100) | 28.4 | 28.3 | 10.4 | 7.0  | 2.9   | 2.8   | 1.07  | 0.5   |
| W 6   | 100)                   | 100) | 11.8 | 8.1  | 13.5 | 11.1 | 0.34< | 0.34< | 0.7   | 1.2   |
| W12   | 100)                   | 100) | 6.5  | 1.9  | 5.4  | 4.7  | 0.34< | 2.1   | 0.34< | 1.3   |
| T17   | 33.2                   | 50.2 | 7.8  | 16.2 | 5.6  | 7.9  | 1.45  | 1.7   | 1.63  | 3.7   |

【 0 0 4 7 】

【 表 5 】

10

20

30

表5 患者血清中アレルギー特異的IgEの相関

| アレルギー | IgE濃度 (iu/mL) |      |       |      |       |       |       |       |       |       |    |
|-------|---------------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
|       | 患者A           |      | 患者B   |      | 患者C   |       | 患者D   |       | 患者E   |       |    |
| ゲン    | 比較            | 発明   | 比較    | 発明   | 比較    | 発明    | 比較    | 発明    | 比較    | 発明    |    |
| F1    | 2.2           | 6.4  | 2.0   | 4.9  | 0.34< | 0.6   | 0.7   | 1.1   | 0.63  | 0.34< | 10 |
| F2    | 1.8           | 4.6  | 1.0   | 2.8  | 0.34< | 0.34< | 1.05  | 1.4   | 0.65  | 0.34< |    |
| F4    | 18.3          | 14.0 | 1.2   | 2.5  | 0.75  | 8.3   | 0.34< | 1.7   | 0.34< | 2.2   |    |
| F9    | 24.2          | 23.7 | 5.7   | 11.7 | 1.1   | 2.6   | 0.4   | 0.5   | 0.5   | 1.9   |    |
| F11   | 36.6          | 43.3 | 0.34< | 1.1  | 0.34< | 2.4   | 0.5   | 2.4   | 0.34< | 2.0   |    |
| F14   | 72.1          | 97.1 | 0.9   | 3.6  | 2.9   | 4.2   | 1.65  | 2.1   | 0.77  | 0.9   |    |
| F23   | 13.5          | 8.3  | 6.3   | 7.4  | 0.34< | 1.9   | 0.34< | 2.8   | 0.34< | 2.7   |    |
| F24   | 10.9          | 6.7  | 4.0   | 14.0 | 0.34< | 0.34< | 0.34< | 2.1   | 0.34< | 2.1   | 20 |
| F75   | 5.9           | 6.2  | 0.7   | 1.4  | 0.34< | 0.34< | 0.34< | 1.6   | 0.34< | 1.6   |    |
| M1    | 7.2           | 7.6  | 0.8   | 0.35 | 5.6   | 2.0   | 0.34< | 0.6   | 0.34< | 1.3   |    |
| M2    | 54.6          | 24.4 | 28.5  | 6.6  | 5.4   | 2.3   | 0.34< | 0.34< | 0.34< | 2.5   |    |
| M3    | 100>          | 100> | 17.8  | 12.0 | 6.2   | 3.2   | 1.1   | 1.0   | 1.45  | 1.5   |    |
| M5    | 30.5          | 23.7 | 21.0  | 17.6 | 2.8   | 0.34< | 0.34< | 0.34< | 2.0   | 2.0   |    |
| M5    | 76.7          | 48.3 | 17.8  | 9.1  | 8.5   | 2.8   | 1.25  | 1.1   | 20.1  | 7.7   | 30 |

【0048】

アレルギースコアは表6に従って分類した。

【0049】

【表6】

表6 I g E単位とアレルギースコア

| I g E単位 (i u/mL) | アレルギースコア |
|------------------|----------|
| 0.34<            | 0        |
| 0.35~0.7         | 1        |
| 0.7 ~3.5         | 2        |
| 3.5 ~17.5        | 3        |
| 17.5 ~50         | 4        |
| 50 ~100          | 5        |
| 100>             | 6        |

10

## 【0050】

表4及び表5に示された比較用の市販アレルギー特異的I g E測定試薬を用いた場合と本発明方法を用いた場合との相関は、次の通りである。

20

測定総数  $n = 140$ 、アレルギー特異的I g E単位 (i u/mL) では

$$Y = 0.911X + 1.769 \quad (r = 0.9542),$$

アレルギースコアでは

$$Y = 0.978X - 0.123 \quad (r = 0.8668).$$

従って、両測定法の相関は良好であることが確認された。

## 【0051】

## [実施例6]

試料物質溶液とリガンド結合体溶液との混合の際の容量比の影響の検討

1) 試料物質溶液 (標準I g E溶液: 100 i u/mL) とリガンド結合体溶液 (ビオチン化抗ヒトI g E溶液 (LW) と) を用いて、その混合比 (容量比) の測定感度への影響を、実施例1-1) で作成した抗ビオチン抗体ヤギI g G抗体固定化固相担体を用いて同様な方法での測定を行なって調べた。その測定と結果を表7に示す。

30

## 【0052】

## 【表7】

表7 標準IgE液量/ビオチン化抗ヒトIgE液量(μL)の検討

|      | 標準IgE液量/ビオチン化抗ヒトIgE液量(μL) |         |         |         |
|------|---------------------------|---------|---------|---------|
|      | 55/5                      | 50/10   | 30/30   | 10/50   |
| 容量比率 | 11/1                      | 5/1     | 1/1     | 1/5     |
| 測定液量 | 50 μL                     | 50 μL   | 50 μL   | 50 μL   |
| ΔK/S | 2.36552                   | 2.35153 | 1.30979 | 0.30871 |
| 相対感度 | 195                       | 194     | 100     | 26      |

## 【0053】

表7の結果から、試料物質溶液とリガンド結合体溶液との混合の際の容量比の測定感度を与える影響が大きく、前者/後者の比で、1/1以上であることが望ましいこと、そして感度上昇は、約5/1でほぼ飽和状態となることが分る。

## 【0054】

2) 各種の試料物質溶液(アレルギー陽性血清)とそれに対応するリガンド結合体溶液(ビオチン化アレルギー溶液)とを用いて、その混合比(容量比)の測定感度への影響を混合比5/1(混合系A)と混合比1/1(混合系B)について、測定時のサンプリング量を共に50 μLとして、実施例1-1)で作成した抗ビオチン抗体ヤギIgG抗体固定化固相を用いて同様な方法での測定を行なって調べた。その測定と結果を表8に示す。

## 【0055】

## 【表8】

10

20

30

表8 感度測定結果 ( $\Delta K/S$ )

| アレルゲン | 混合系A<br>(5/1) | 混合系B<br>(1/1) | 感度比<br>(混合系A/混合系B) |
|-------|---------------|---------------|--------------------|
| H1    | 1. 23978      | 0. 44445      | 2. 79              |
| H2    | 1. 11038      | 0. 33981      | 3. 27              |
| D1    | 0. 62250      | 0. 32875      | 1. 89              |
| D2    | 1. 05743      | 0. 33024      | 3. 20              |
| T17   | 0. 44030      | 0. 20788      | 2. 12              |
| M5    | 0. 23293      | 0. 17990      | 1. 29              |
| W6    | 2. 76923      | 1. 62059      | 1. 71              |
| G6    | 4. 35569      | 2. 05935      | 2. 12              |
| F4    | 0. 18331      | 0. 09790      | 1. 87              |
| E2    | 0. 32497      | 0. 11364      | 2. 86              |
| M1    | 0. 04295      | 0. 01872      | 2. 29              |

平均値 2. 31

## 【0056】

表8の結果から、アレルゲン測定に際しても、前処理した繊維質多孔性固相を用いての測定において予め行なうアレルゲン溶液/ビオチン化アレルゲン溶液の混合比の増加が感度の明らかな向上をもたらすことが分る。

## 【0057】

3) 試料物質溶液 (IgE 溶液) の濃度を種々変え、IgE 溶液 (試料溶液) とビオチン化抗ヒトIgE 液の混合比 (容量比) の測定感度への影響を混合比 5/1 (混合系A) と混合比 1/1 (混合系B) について、測定時のサンプリング量を共に 50  $\mu$ L として、前記1) と同様な実験を行なった (検量線の作成)。

その結果を表9に示す。

## 【0058】

## 【表9】

10

20

30

40

表9 検量線：I g E溶液の濃度を変えての感度測定結果 ( $\Delta K/S$ )

| I g E溶液<br>濃度 | 混合系A<br>(5/1) | 混合系B<br>(1/1) | 感度比<br>(混合系A/混合系B) |
|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| 0 (iu/mL)     | 0.00055       | 0.00133       | 0.41               |
| 1             | 0.00957       | 0.00430       | 2.23               |
| 5             | 0.10379       | 0.04680       | 2.22               |
| 25            | 0.83763       | 0.38643       | 2.17               |
| 100           | 2.55494       | 1.76600       | 1.45               |
| 平均値           |               |               | 2.02               |

10

## 【0059】

表9の結果から、検量線の感度も試料物質溶液とリガンド結合体溶液との混合の際の混合比の増加により明らかな向上が現れることが分る。

20

## 【0065】

## 【発明の効果】

本発明の生理活性物質の存在量や感度の測定方法によれば、免疫学的測定法を利用して、測定対象物質に応じた別々の固相を調製・設置することなく単一のリガンド捕捉剤固定化固相を用いて、多種類の測定対象物質を簡便、迅速、高感度、かつ高精度で測定することができる。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/543 5 9 1

- (72)発明者 田島 敏男  
神奈川県鎌倉市山ノ内1045番地
- (72)発明者 羽生 恒男  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内
- (72)発明者 種部 勝  
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号 東洋紡績株式会社内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表昭60-500731(JP,A)  
特開平02-145967(JP,A)  
特開平10-253632(JP,A)  
特開平11-201969(JP,A)  
特開平11-326326(JP,A)  
特開平4-318462(JP,A)  
特開2000-088851(JP,A)  
特開昭61-502214(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)