【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第６部門第１区分
【発行日】平成17年6月9日(2005.6.9)

【公開番号】特開2000-214165(P2000-214165A)
【公開日】平成12年8月4日(2000.8.4)
【出願番号】特願平11-14785
【国際特許分類第７版】
　Ｇ０１Ｎ　33/542
// Ｃ１２Ｎ　15/02
　Ｃ１２Ｐ　21/08
　Ｃ１２Ｑ　 1/40
　Ｇ０１Ｎ　33/543
【ＦＩ】
　Ｇ０１Ｎ　33/542　　Ｂ
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　Ｃ
　Ｃ１２Ｐ　21/08
　Ｃ１２Ｑ　 1/40
　Ｇ０１Ｎ　33/543　５９１

【手続補正書】
【提出日】平成16年8月23日(2004.8.23)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２３】
反応液中の標識酵素の酵素活性は、反応液に不溶性基質を添加して測定することができる。必要に応じて、酵素反応生成物に発色試薬組成物を加えて、酵素活性に応じた発色反応をさせ、これを比色分析してもよい。あるいは、水不溶性基質を含有する基質層を備える乾式分析要素で酵素活性を測定するようにしてもよい。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２６】
　このような抗原として、ポリペプチド、低分子量タンパク質、蛋白質のサブユニットなどが挙げられる。例えば、ヒトヘモグロビン（MW 約6.4万、４つのサブユニットからなり、１つのサブユニットの分子量は約1.6万）、ＨＣＧ（ヒト絨毛性ゴナドトロピン：M.W. 約3.7万）等は、本発明の分析方法で分析することができる。その他の抗原として、ＴＳＨ（甲状腺刺激ホルモン：MW約28,000、ＬＨ（黄体形成ホルモン：MW 約29,000）、インスリン（MW 約5,800）、アポ蛋白Ａ－Ｉ（MW 約28,000）、アポ蛋白Ａ－II（MW 約18,000）、アポ蛋白Ｃ－II（MW 約8,500）、アポ蛋白Ｃ－III（MW 約8,500）、アポ蛋白Ｅ（MW 約36,000）、ＡＴIII（アンジオテンシンIII：MW 約59,000）、ＡＦＰ（アルファフェトプロテイン：MW 約68,000）、β_2－マイクログロブリン（MW 約11,800）などがある。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３６

【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３６】
マレイミドーサクシイミド法では、例えば以下のようにして酵素とＦab'とを結合させる。まずマレイミドーサクシイミド試薬で酵素のアミノ基をマレイミド化する。これをゲル濾過で精製した後、チオール基を有する抗体（Ｆab'）との複合化に付する。この複合化反応は酵素１モルに対し、抗体３～７モルの範囲で行なうのが好ましい。抗体としてＦab'（分子量約５万）を、酵素としてα－アミラーゼ（分子量約５万）を使用する場合には、Ｆab'量に対してα－アミラーゼ重量を1/3 ～1/7 の範囲で結合反応を行うのが好ましい。この結合反応は通常４℃～室温で進行する。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３８】
分析方法
まず、検体に含まれる抗原と酵素－抗体複合体の結合物とを溶液中で接触させる。その後、第２抗体（第１抗体とは異なる抗原エピトープを認識するモノクローナル抗体），第３抗体（第２抗体を認識して結合する）を順次添加する。その際、溶液の温度は20～45℃程度、pHは通常約4.0 ～約8.5 の範囲内が適当である。pHを一定に保つために必要により、燐酸緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液を用いてもよい。抗原と酵素－抗体複合体との接触時間は十分に反応しうる程度であればよく、例えば溶液の温度が37℃の場合には20～30分が適当である。その後の第２抗体、第３抗体との反応時間も、それぞれ十分に反応しうる程度であればよく、例えば溶液の温度が37℃の場合には５～１０分が適当である。以上の免疫反応を行った後、酵素基質を加え、標識酵素の酵素活性を測定する。検体中に被検抗原が存在すれば酵素活性の抑制として検出することができる。予め既知量の被検抗原を含む溶液で検量線を描いておけば、検体中の被検抗原量を定量することができる。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５３】
得られた各検量線を図１に示す。図１に示すように、抗原（Ｈｂ）に酵素標識抗体（Ab-Ｅ）を反応させただけでは、抗原添加による、酵素活性の阻害はほとんど観察できなかった（図１、－●－）。抗原（Ｈｂ）に酵素標識抗体（Ab-Ｅ）を反応後、第２抗体（Ab_2）を反応させた場合には、抗原量の増加に伴い、酵素活性の抑制が観察された（図１、－○－）。しかし、その抑制効果は少なく十分なＳ／Ｎ比とはいえなかった。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５４】
これに対し、抗原（Ｈｂ）に酵素標識抗体（Ab-Ｅ）を反応後、第２抗体（Ab_2）、さらに第３抗体（anti-Ab_2）を反応させた場合には、抗原量の増加に伴い観察される酵素活性の抑制は比較例２（－○－）に比べ大きかった（－□－）。このように第３抗体を使用する本実施例では、抗原添加による酵素活性の抑制が大きくなり、十分なＳ／Ｎ比が確保できることが確認できた。。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】図面の簡単な説明
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図面の簡単な説明】
【図１】
実施例６の測定における検量線を示す図である。図中シンボル－●－は抗原に酵素標識抗体のみを反応させた場合（比較例１）を示し、シンボル－○－は、抗原に酵素標識抗体と第２抗体を反応させた場合（比較例２）を示す。いずれも対照である。シンボル－□－は、本発明に従い、抗原に酵素標識抗体、第２抗体、第３抗体を反応させた場合を示す。