

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3828614号

(P3828614)

(45) 発行日 平成18年10月4日(2006.10.4)

(24) 登録日 平成18年7月14日(2006.7.14)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 5
GO 1 N 33/557 (2006.01)	GO 1 N 33/557

請求項の数 15 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平8-174443	(73) 特許権者	398032751
(22) 出願日	平成8年7月4日(1996.7.4)		デイド・ペーリング・マルブルク・ゲゼル
(65) 公開番号	特開平9-21808		シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ
(43) 公開日	平成9年1月21日(1997.1.21)		フツング
審査請求日	平成15年5月26日(2003.5.26)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
(31) 優先権主張番号	19524414:1		番地なし)
(32) 優先日	平成7年7月5日(1995.7.5)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100087930
			弁理士 佐藤 辰男
		(74) 代理人	100080355
			弁理士 西村 公佑
		(72) 発明者	ペーター・トウエングラー
			ドイツ連邦共和国 35041 マルブルク、
			イム・ドルフェ4アー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過剰の抗原によって影響されない比濁分析および濁度分析によるタンパク質の定量

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程、

a) 測定すべきサンプルのアリコートをし、粒子とも結合できる少なくとも一種の被検物質特異的結合パートナーを含む全試剤に添加しインキュベーションを行い、第一の反応を行う；

b) 適当な測定装置によって被検物質依存性沈降反応の第一の測定を行う；

c) サンプルの残部を第一の反応混合物に加えてインキュベーションを行い、第二の反応を行う；

d) 前記の測定装置によって被検物質依存性沈殿反応の第二の測定を行う；

e) 第一および第二の測定から得られる結果を分析することによって被検物質濃度を測定する；

ことよる、被検物質特異的結合パートナーとの被検物質誘発沈降反応によって、生物学的材料のサンプル中の被検物質を定量する免疫化学的方法。

【請求項 2】

被検物質特異的結合パートナーが抗体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

被検物質依存性沈降反応の測定が濁度分析測定によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

被検物質依存性沈降反応の測定が比濁分析測定によって行われる請求項 1 に記載の方法。

10

20

【請求項 5】

被検物質依存性沈降反応の測定が速度論的測定によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

被検物質依存性沈降反応の測定が固定時間速度論的測定によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

被検物質依存性沈降反応の測定が固定値測定によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

被検物質依存性沈降反応の測定が終点測定によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

被検物質濃度は、第一の反応からの測定シグナルが所定の閾値より低い場合には、第二の反応からの測定シグナルにより計算される請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 10】

被検物質濃度は、元の混合物中における第一の反応からの測定シグナルが所定の閾値より高い場合には、サンプル含量を減少させて新たに行われる分析の第二の反応からの測定シグナルより計算される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

被検物質濃度は第一の反応からの測定シグナルが閾値より高い場合には、第一の反応からの測定シグナルより計算される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

サンプルを希釈せずに用いる請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 13】

サンプルを予備的希釈に付す請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

分析は測定結果を検量プロットと比較することによって行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

分析は、第一の反応の条件下に記録された検量プロットおよび第二の反応の条件下に記録された第二の検量プロットの 2 つの検量プロットと比較することによって行われる請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は均一溶液中のタンパク質の定量の分野に属し、抗体または抗体でコーティングされたラテックス材料の使用による抗原を介した沈降およびその沈降反応の続いたの比濁分析または濁度分析による光学的測定によってタンパク質を定量する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

免疫沈降に関するHeidelbergerとKendallのよく知られた反応プロットから明らかなように、このような反応は両義性を示す場合がある。すなわち、抗原濃度が高い場合には最高点を越えるとシグナルの低下が起こり、この場合の値は 1 回の測定では、抗原濃度が低い場合のシグナルの測定値と識別することができない。

40

【0003】

過剰に抗原が存在する場合のこの測定上の問題が、既知の比濁分析または濁度分析測定法の決定的な限界となることから、これまで既に多くの解決方法が提案されてきた。すなわち、反応速度（一次係数）の分析によって過剰の抗原の存在を確立し、ついで適当な再測定を設定する（Anderson, US 4,157,871）かまたは適当な技術工程によりプロットの一義的な分析を可能にする（DE-A-33 47 162）速度論的方法がある。

【0004】

さらに、被検物質の標準プレパレーションの特定量をついで添加し、以後の反応経過を記録するいわゆる「再開法」での問題の解決も試みられてきた。

50

【0005】

速度論的法の原理における欠点は、全インキュベーション時間を通じて測定値の記録が必要になるという事実である。これは、この相当する期間を通して光学的測定系を独占し、単位時間内に処理できるサンプル数は少数のみになってしまう。この分析はまた、したがって、記憶集約的である。再開法にはこの欠点はないが、適当な明確に特定された標準を必要とするために、試験経費の増大を伴うことになる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

したがって本発明の目的は、試験経費の増大を伴うことなく、単位時間内に多くのサンプルを処理できて、過剰の抗原によって影響されない試験スキームを可能にする測定方法を

10

【0007】

【課題を解決するための手段】

この目的は、本質的に、請求の範囲の項に記載の実施態様の提供によって達成される。

【0008】

本発明は、極端に高い抗原濃度を有し、したがって低すぎるシグナルを産生するサンプルでも、試験に付す以前に希釈することによって、常に正しい結果が得られるという観察に基づくものである。論理的には、一般に、臨界的なサンプルまたは臨界的な試験結果を与えるサンプルは、自動装置により異なる希釈サンプルについて数回検討し、ついでその結果の有効性をマニュアルによりチェックすればよい。しかしながら、これでは、それに

20

【0009】

本出願の基盤となる目的は、最初に、サンプル（または試験系に添加する前に希釈されたサンプル）量のアリコートを含み、全試剤を含有する試験系中でインキュベーションに付し、ある反応時間後に測定値（または、一定時間後の測定における初期値との測定値差）を記録することによって達成できることが見出されたのである。その後にはじめて、サンプル（またはサンプル希釈液）の残部を同じ反応混合物に添加し、ついでこれをさらにインキュベーション工程に付し、同様に測定を行う。アリコートは、サンプルの総量の1～25%、好ましくは2～20%、とくに好ましくは5～10%の割合とすることができる。

30

【0010】

【発明の実施の形態】

慣用の試験法で抗原過剰効果を生じるような高い抗原濃度を有するサンプルの場合には、予備反応において言及した調整混合物により、サンプル量が明らかに少ないため、明瞭な測定シグナルが生成することになり、分析装置によって閾値検査に基づき、迅速で、簡単なかつ信頼性のある検出が可能である。慣用の試験法により、Heidelberger & Kendallのプロットの上行枝上で問題なく正確に分析できるサンプルの場合は、予備反応において弱い測定シグナルしか与えないかまたは全くシグナルを示さず、すなわち、この場合は測定値が閾値以下であることにより分析装置が正常なケースであることを認知することになる。

40

【0011】

他の有利な実施態様においては、極端なサンプルの場合でも試験に対する2つ（予備反応と主反応）の検量プロットを作成することによって再測定を行わないで分析装置により定量分析を実施することができる。一般的にそれ程頻繁には起こらないこのようなサンプルでは、利用可能な測定シグナルの定量は行われぬ。これに対して、再測定は、主反応が定量可能になるまで実施される。一方、予備反応における閾値の純粋な検査は、測定シグナルの定量が必要な主反応の場合に比較して、一般に、インキュベーション時間は明らかに短くて済み、したがって、分析装置による単位時間内に処理可能な試験数はわずかに低下するにすぎない（たとえば、半分にはならない）。

【0012】

50

【実施例】

以下の実施例は本発明を例示するものである。

実施例 1 :

尿中アルブミンの測定

予め N 希釈液 (注文番号 : O U M T、Behringwerke AG) で 1 : 5 に希釈した尿サンプル 5 μ L を、N 反応緩衝液 (注文番号 : O U M S、Behringwerke AG) 55 μ L とともに反応キューベットに加える。反応は、40 μ L の試剤 (ヒトアルブミンに対する N 抗血清、注文番号 : O S A L、Behringwerke AG) を同様に反応緩衝液 (注文番号 : O U M S、Behringwerke AG) 100 μ L とともにキューベットに加えて開始させる。混合物を完全に混合し、初期シグナルを記録する。正確に 2 分後にもう一度測定を行い、初期シグナルとの差を予備反応からのシグナルとする。さらに 4 分後、最後の測定を実施し、この場合の初期シグナルとの差を主反応からのシグナルとする。

10

【0013】

以下のシグナルが、Behring 比濁計 II (Behringwerke AG, Marburg, Germany, 注文番号 : O V I A) により検量プロットで得られる (この場合の散乱光シグナルの測定の単位はビットである) 。

【0014】

【表 1】

尿中のアルブミンの測定

	予備反応からのシグナル	主反応からのシグナル
検量プロットの最低点 (希釈 1 : 10240)	5ビット	768ビット
検量プロットの最高点 (希釈 1 : 640)	566ビット	6255ビット
サンプル 1 (正常尿, 1 : 5)	2ビット	35ビット
サンプル 2 (病的尿, 1 : 5)	20ビット	1805ビット
サンプル 3 (血清, 1 : 5)	4456ビット	1895ビット

20

30

【0015】

サンプル 1 および 2 は、それぞれ試験混合物の測定範囲以下および測定範囲内のサンプルの典型的な挙動を示している。サンプル 3 は、予備反応において明らかに異なる反応を示し、検量プロット上の最高点の値を越えるシグナルを生じている。このようにして、たとえば、さらに高いサンプル希釈度での結果の定量のために別の測定を実行するフラッグを発生させることができる。予備反応のない従来の混合物では、測定範囲に対して極端に高い被検物質濃度を有するサンプル 3 は、サンプル 2 にまたサンプル 1 にでも匹敵するシグナルを発生する。したがって、従来の測定では、低すぎる誤った結果が示されることになる。

40

【0016】

実施例 2 :

血清中 I g M の測定

予め 1 : 20 に希釈した (N 希釈液中) 血清サンプル 50 μ L を、試剤としてヒト I g M に対する N 抗血清 (注文番号 : O S A T、Behringwerke AG) 40 μ L を用いて実施例 1

50

の測定と同様に操作する。

【0017】

【表2】

血清中のIgMの測定

	予備反応からの シグナル	主反応からの シグナル	
検量プロットの最低点 (希釈 1 : 80)	5ビット	60ビット	
検量プロットの最高点 (希釈 1 : 2.5)	460ビット	4494ビット	10
サンプル1 (正常血清, 1 : 20)	11ビット	700ビット	
サンプル2 (IgM骨髄腫, 1 : 20)	4414ビット	5128ビット	
同一, 再測定 1 : 100	864ビット	4368ビット	20
同一, 再測定 1 : 400	101ビット	2053ビット	
サンプル3 (IgM骨髄腫, 1 : 20)	5438ビット	>16384ビット	
同一, 再測定 1 : 400	180ビット	2792ビット	
サンプル4 (IgM骨髄腫, 1 : 20)	514ビット	4402ビット	30
同一, 再測定 1 : 100	43ビット	1421ビット	

【0018】

この場合の結果も実施例1の場合と同様である。極端に被検物質濃度の高い問題のサンプルの定量は、予備反応からの値が検量プロットに相当する値内または以下で、主反応におけるサンプルの測定値が検量プロットにおいて予め測定された値内に位置するようになるまで、サンプルを逐次希釈して定量することが可能である。IgM骨髄腫サンプル2および3ではいずれも主反応において測定値の範囲を上回っていることにより正しく同定が行われているが、IgM骨髄腫サンプル4の場合は異なっている。この場合は、予備反応で閾値を越える結果として、自動的再測定による定量が行われている。

40

フロントページの続き

審査官 竹中 靖典

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/543

G01N 33/557