世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 G01N 33/544	A1	(11) 国際公開番号	WO 94/18567
		(43) 国際公開日	1994年8月18日(18.08.94)

(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00136
(22) 国際出願日 1994年2月1日(01. 02. 94)

(30) 優先権データ
特願平5/16167 1993年2月3日(03. 02. 93) JP

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
日水製薬株式会社
(NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD)〔JP/JP〕
〒170 東京都豊島区巣鴨二丁目11番1号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
上野貴久(UENO, Takahisa)〔JP/JP〕
梅田 衛(UMEDA, Mamoru)〔JP/JP〕
柴田英昭(SHIBATA, Hideaki)〔JP/JP〕
〒307 茨城県結城市北南茂呂1075-2
日水製薬株式会社 診断薬研究所内 Ibaraki, (JP)
(74) 代理人
弁理士 光来出良彦(MITSUKUDE, Yoshihiko)
〒101 東京都千代田区神田淡路町1-1-7 田村ビル
Tokyo, (JP)

(81) 指定国
CA, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: REAGENT FOR IMMUNOAGGLUTINATION AND IMMUNOANALYTICAL METHOD

(54) 発明の名称 免疫凝集反応試薬及び免疫分析方法

(57) Abstract

A reagent for immunoagglutination to be used for determining the quantity of an antibody or antigen with a high sensitivity by causing the agglutination due to the antigen-antibody reaction of a liposomal agglutination reagent comprising an antibody or antigen immobilized onto the surface of a liposome as the support through covalent bonds and determining the quantity of the agglutination with the short wavelength of a light by which a turbidity change caused by the agglutination can be intensely observed. The liposome encloses therein a water-soluble high-molecular compound or a gelled compound, and the enclosed compound serves to increase the turbidity change caused by the agglutination caused by the antigen-antibody reaction.

(57) 要約

リポソームを担体として抗原や抗体を共有結合したリポソーム凝集試薬を抗原抗体反応により凝集させて、抗体又は抗原の量を凝集量によって測定するのに、凝集による濁度変化が大きく観察される光の短波長で、感度よく測定することができる免疫凝集反応試薬を提供する。免疫凝集反応試薬の担体としてリポソームが使用される。該リポソームの表面に抗体または抗原が固定化されており、該リポソームには水溶性高分子化合物又はゲル化処理された化合物が内包されている。この免疫凝集反応試薬によれば、抗原抗体反応により凝集が起こると内包されている物質が凝集による濁度変化を増大させる。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GE グルジア
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリー
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドバ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン共和国
VN ヴィェトナム

明　細　書

免疫凝集反応試薬及び免疫分析方法

技術分野

本発明は、免疫凝集反応試薬に関し、更に詳細には被検試料中に存在する広い濃度範囲の成分を簡単な操作で、又は自動分析機を用いて、感度よく測定することのできる免疫凝集反応試薬及びこれを用いた免疫分析方法に関する。

背景技術

抗原抗体反応を利用する免疫測定法は、各種内分泌疾患の臨床診断等において極めて重要であり、従来種々の免疫測定法が知られている。

その中でも、抗原性物質又は抗体を結合させた担体からなる免疫凝集反応試薬を被検物質中の抗体又は抗原性物質と反応させ、この抗原－抗体反応により生じた凝集量を目視により又は分光光度計により濁度として測定し、その結果を予め作成しておいた標準検量線と照合させて、抗体又は抗原性物質を定量する免疫測定法が知られている。このような免疫測定法に用いられる免疫凝集反応試薬の担体としては、従来、主としてポリスチレン等の合成ラテックス粒子が用いられている。

前記従来の合成ラテックス粒子を担体として用いた免疫凝集反応試薬はその表面が疎水性であるために、抗原－抗体反応を起こすための好適な水溶液中のｐＨ７～７．５では、特に、疎水結合による凝集が起こりやすくなって非特異凝集する傾向があり、分析精度において安定性に欠けるきらいがあった。このために合成ラテックス粒子を担体として用いた免疫凝集試薬には、このような非特異凝集を抑えるために種々の添加剤を加える技術が、既に特許出願（例え

ば、特公平３－１４２３６０号公報、特公平３－７６４２５号公報等）されている。

また、合成ラテックス粒子に固定した抗原又は抗体は、その結合が物理吸着によるものであるため、このような固定化抗原又は固定化抗体、即ち、ラテックス凝集試薬は、長期保存中にその抗原や抗体が担体である合成ラテックス粒子から遊離してしまい、測定感度の低下を引き起こすことがあった。

さらに最近では、このようなラテックス凝集試薬を汎用生化学自動分析機に適用し、被検体中の抗原または抗体を測定することが行なわれているが、合成ラテックス粒子を担体として用いた免疫凝集試薬が自動分析機の反応セルに付着して汚染し、測定精度に影響を与えることが問題となっている。

本発明者らは、これらの問題点を解決すべくラテックス粒子のかわりに、リポソームを担体とし、共有結合によりこの担体に抗原や抗体を結合したリポソーム凝集試薬を開発し、既に、特願平４－１６４７８３号として出願している。このリポソーム凝集試薬は、リポソーム表面に抗原または抗体が共有結合により固定化されているので、その試薬を長期間保存しても保存中に抗原や抗体が遊離することもなく、またリポソーム自体の表面が親水性であるために、疎水結合による凝集が起こり難く、したがって非特異凝集が起こり難いという利点がある。

また、自動分析機の反応セルを汚染することもないという、従来のラテックス凝集試薬にない長所を有している。

ところで、ラテックス凝集試薬は、試薬自体の濁度が高いため、即ち、試薬ブランクが高いため、分光光度計等で測定する場合には濁度変化が小さい長波長領域で測定しなければならず、そのために感度をあげることは困難であった。これに対して、リポソーム凝集

試薬はそれ自体屈折率が低いため、短波長領域、即ち、大きな濁度変化が観察される３４０ｎｍ程度の短波長で測定することができるという特徴を有している。

しかしながら、リポソームは水との屈折率の差が小さいという性質を持っており、そして、リポソームの製造は水溶液において製造され、リポソームの内部は水溶液であるために、リポソーム内部の水溶液とリポソームの分散媒である水との屈折率の差がほとんどない。しかも、リポソーム自体も屈折率が低い。このようなために、前記リポソーム凝集試薬は、リポソームが凝集を起こしてもその濁度が高くならず、したがって、３４０ｎｍの短波長で測定することができる利点を有しながらも分光光度計又は自動分析機等、或いは目視等による測定感度が低いという問題があった。

そこで本発明は、リポソームを担体として、抗原や抗体を共有結合したリポソーム凝集試薬の凝集において、前記した問題点を解決し、凝集による濁度変化が大きく観察される光の波長領域、即ち、短波長で、感度よく測定することができる免疫凝集反応試薬を提供することを目的とする。

また、本発明は、屈折率の増大されたリポソームを用いることにより、感度のよい免疫凝集反応試薬を提供することを目的とする。

さらに本発明は、被検体の濃度が低くても感度の良い免疫分析方法を提供することを目的とする。

発明の開示

前記した問題点を解決するために本発明は、抗原抗体反応で生じた凝集量を測定するための免疫凝集反応試薬において、免疫凝集反応試薬の担体としてリポソームが使用され、該リポソーム表面に抗体または抗原が固定化され、該リポソームには、水溶性高分子化合物又はゲル化処理された化合物が内包されていることを特徴とする

免疫凝集反応試薬とするものである。

本発明におけるリポソームには、リン脂質及びコレステロールを主要構成成分とするものであれば、従来リポソームに使用されている何れの材料も使用できる。リポソームの粒径は５０ｎｍ～５μｍ、好ましくは１００～６００ｎｍ、特に好ましくは１００～２００ｎｍがよい。この範囲においては、保存中に沈澱しづらいので試薬の安定性に優れ、しかも、分光光度計及びスライド凝集法等の濁度の測定において好ましい。

本発明における免疫凝集反応試薬のリポソーム内に含まれる水溶性高分子化合物又はゲル化処理された化合物には、アクリルアミド、グリコシルメタクリレート等の重合体或いはそれらの共重合体、セルロース又はその誘導体、メタクリル酸の重合体、アクリル酸又はアクリル酸エステルの重合体或いはその共重合体、Ｎ－ビニルピロリドンの重合体等が使用され、これらの水溶性高分子化合物又は重合体は、架橋剤によるゲル化処理が行なわれたものである。

本発明の免疫凝集反応試薬は、例えば、下記に示した抗体又は抗原をリポソーム表面に共有結合により固定する方法で製造されるが、本発明は、水溶性高分子化合物又はゲル化処理された化合物をリポソームに内包することを特徴とする免疫凝集反応試薬の発明であるので、抗体又は抗原とリポソーム表面との結合様式には限定されない。例えば、抗体又は抗原とリポソームとの結合には、従来の過ヨウ素酸法、Ｐａｓｓｉｖｅ法等も適用できる。

まず、リン脂質、コレステロール、架橋剤を導入したリン脂質からＶｏｒｔｅｘｉｎｇ法又はガラスビーズを使用する方法によってリポソームを調製する方法を説明する。

この方法に用いられる架橋剤としては、例えば、Ｎ－ハイドロオキシスクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート

（ＳＰＤＰ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ＳＭＰＢ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）アセテート（ＳＭＰＡ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）プロピオネート（ＳＭＰＰ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミド（ＧＭＢＳ）及びＮ－（ε－マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミド（ＥＭＣＳ）等が挙げられる。

上記のリン脂質、コレステロール、架橋剤を含む混合物に含まれる溶媒を留去し、吸引乾燥する。しかる後に、壁面に薄膜が形成されたフラスコ内に、重合性モノマーが溶解している水溶液を加え、必要があれば更にガラスビーズを加え密栓して振とうし、リポソーム懸濁液を得る。その後、一定のポアサイズを持ったポリカーボネートの膜を通すことによって、重合性モノマーが内包された均一な粒径のリポソームを得る。リポソームに内包されなかった重合性モノマーを透析により外液より取り除き、その後、重合開始剤によりリポソームに内包したモノマーを重合させる。

一方、抗体または抗原の分子中に上記架橋剤と反応する反応基を導入する。次いで、このようにして調製したリポソームと修飾抗体または修飾抗原を混合して緩衝液中で反応させれば、抗体または抗原がリポソーム表面に固定化されたものが得られる。

本発明においてリポソーム表面に固定される抗体は、被測定抗原生物質を認識するモノクローナル抗体及び／又はポリクローナル抗体が使用できる。これらの抗体とリポソームを組合せた免疫凝集反応試薬の種類は、モノクローナル抗体のみをリポソーム表面に固定した免疫凝集反応試薬、ポリクローナル抗体のみをリポソーム表面に固定した免疫凝集反応試薬、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を同一のリポソーム表面に固定した免疫凝集反応試薬、モノ

クローナル抗体をリポソーム表面に固定したものとポリクローナル抗体を別のリポソーム表面に固定したものとを混合した免疫凝集反応試薬が挙げられる。

前記のように、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を併用した免疫凝集反応試薬では、抗原との親和力の強いモノクローナル抗体がポリクローナル抗体の低親和力を補い、且つ凝集特性に優れたポリクローナル抗体がモノクローナル抗体の組み合わせの選択の煩雑を回避できる特徴を有する。

このリポソーム表面に固定される抗体は、例えば、ＩｇＧ分画のまま用いてもよいし、そのフラグメントである$F(ab')_2$化されたものを用いてもよい。本発明においてリポソーム表面に固定される抗原には、主に血漿タンパク、ウイルス性タンパク等が挙げられる。

本発明の免疫凝集反応試薬による免疫分析方法に適用される被測定抗原物質には、ホルモン（例えば、インシュリン、ＨＣＧ－β、成長ホルモン、ＴＳＨ、ＬＨ、ＦＳＨ、プロラクチン、サイロキシン、トリヨードサイロニン、ガストリン、グルカゴン、ソマトスタチン等）、酵素（例えば、エラスターゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、リボヌクレアーゼ、エノラーゼ、アルカリフォスファターゼ等）、血清タンパク質（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、ＲＦ、ＳＬＯ、マクログロブリン、ＴＢＧ、糖タンパク質、糖脂質、アポＡＩ、ＡII、Ｂ、ＣＩ、ＣII、ＣIII、Ｄ、Ｅ、Ｆタンパク質等）、腫瘍関連抗原（例えば、ＣＥＡ、α－フェトプロテイン、フェリチン、ＰＯＡ、ＣＡ１９－９、ＣＡ１２５等）、ＤＮＡ結合性タンパク質因子、サイトカイン（例えば、インターフェロン、インターロイキン１、インターロイキン２等）、種々の細菌、ウイルス、原虫等（例えば、真菌、連鎖球菌、肝炎ウ

イルス、ヘルペスウイルス、エイズウイルス、トキソプラズマ原虫、マラリア原虫、赤痢アメーバー等）などが挙げられる。これらのうち、特に大量の被検体を短時間で測定する必要のある血清タンパク質、腫瘍関連抗原、ウイルス等が好適に適用できる。

被測定抗体物質には、例えば、ウイルスに対する抗体（例えば、ＨＩＶ、ＡＴＬ、ＨＢ等）、抗核抗体等が挙げられる。

本発明の免疫凝集反応試薬を用いた免疫分析法による被検試料中の成分の定量は、例えば次のようにして行なわれる。まず、本発明の免疫凝集反応試薬及び測定対象物を含む試料を適当な緩衝液（例えば、ＴＥＳ緩衝液）中で混合し、抗原－抗体結合反応を引き起こさせ、それに伴うリポソームの凝集を形成させる。その凝集量に依存した光の透過光の減少を分光光度計または自動分析機（日立７０５，７０５０，７１５０，７３６，７０７０など）により測定し、例えば、予め作成した検量線との照合により、試料中の測定対象物の量を測定することができる。

図面の簡単な説明

第１図は、ゲル化合物内包リポソームとＴＥＳ緩衝液内包リポソームを担体として用いたＣＲＰ測定用免疫凝集反応試薬による標準曲線を示す。

第２図は、ゲル化合物内包リポソームとＴＥＳ緩衝液内包リポソームを担体として用いたＲＦ測定用免疫凝集反応試薬による標準曲線を示す。

発明を実施するための最良の形態

次の実施例１は、リポソーム比濁法によるＣＲＰ抗原検出用免疫凝集反応試薬の製造に本発明を適用したものである。実施例１においては、次に挙げる試薬及び測定用検体を使用した。

後述の実施例２及び比較例１、２においても特に指示のない限り

、同名の試薬及び検体については同じものを使用した。

ＤＰＰＣ： ジパルミトイルフォスファチジルコリン、

Ｃｈｏｌ： コレステロール、

ＤＴＰ－ＤＰＰＥ： ジチオピリジル化ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン

Ａａｍ溶液： アクリルアミド及びＢｉｓ－アクリルアミドを精製水に溶解し、ゲル濃度２．５％、架橋度５％となるように調製する。

ＴＥＳ： ＴＥＳ、塩化ナトリウム、ミラクルモルノン（商品名：片山化学工業研究所製）を精製水に溶解し、ＴＥＳ、塩化ナトリウム、ミラクルモルノン（商品名：片山化学工業研究所製）の終濃度がそれぞれ１０ｍＭ、１５０ｍＭ、０．０１％となるように溶解し、水酸化ナトリウムでｐＨを７．５に調製する。

酢酸緩衝液： 酢酸、塩化ナトリウム、ミラクルモルノンを精製水に溶解し酢酸、塩化ナトリウム、ミラクルモルノン（商品名：片山化学工業研究所製）の終濃度がそれぞれ１００ｍＭ、１５０ｍＭ、０．０１％となるように溶解し、水酸化ナトリウムでｐＨを４．５に調製する。

ＳＰＤＰ：Ｎ－ハイドロオキシスクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート

ＤＴＴ：ジチオスレイトール

ヤギ抗ＣＲＰ抗体：１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ緩衝液（１５０ｍＭ塩化ナトリウム含有ｐＨ７．５）に溶解したもの。

〔実施例１〕

（Ａ）リポソームの調製

ＤＰＰＣ ５０μｍｏｌ、Ｃｈｏｌ ５０μｍｏｌ、ＤＴＰ－ＤＰＰＥ ２．５μｍｏｌのクロロホルム溶液を１００ｍｌ容ナシ型

フラスコに分注し、加温しながらエバポレーションしてクロロホルムを留去する。このとき脂質及びコレステロールはフラスコ内壁に薄膜を形成する。更に1時間以上減圧下にフラスコを置き、溶媒を完全に除去する。

その後、2m1のAam溶液、2gのガラスビーズを加え激しく攪拌して薄膜を剥がしとる。ガラスビーズを除去した後、脂質懸濁液をエクストゥルーダーを用いて0．2μmまでサイジングして粒径の均一なリポソームを調製する。リポソームに内包されなかったAam溶液はTESに一昼夜透析することによって除去する。

その後、精製水に10%となるように溶解した過硫酸アンモニウム33μ1、N，N，N′，N′－テトラメチルエチレンジアミン14μ1を加え室温で4～16時間反応させ、内包したAam溶液を重合させる。反応後の過硫酸アンモニウム、N，N，N′，N′－テトラメチルエチレンジアミンをTESに一昼夜透析することによって除去し、ゲル化合物内包リポソームを調製する。こうして得られたリポソームの濃度はリン定量により決定する。

（B）抗体への反応基の導入

ヤギ抗CRP抗体（10mg／m1）1m1に30mM SPDP（エタノール溶解）10μ1を加え、室温で30分間反応させる。その後酢酸緩衝液で平衡化したセファデックスG－25でゲル濾過し、緩衝液の交換とともに未反応のSPDPを除去する。得られた抗体溶液にDTTを終濃度10mMとなるように添加し室温で30分間反応させる。その後TESで平衡化したセファデックスG－25でゲル濾過し、緩衝液の交換とともに、DTTを除去する。得られた抗体溶液は、分光光度計で280nmの吸光度を測定し濃度を決定する。

（C）抗体結合リポソームの調製

前記（Ａ）で調製したリポソーム（リン濃度１０ｎｍ）１ｍｌと前記（Ｂ）で調製した抗体溶液（濃度５ｍｇ／ｍｌ）１ｍｌを混合し、４℃で１６～２０時間反応させる。その後、ＴＥＳで平衡化したセファロースＣＬ－４Ｂでゲル濾過を行ない、未反応の抗体を除去し、リポソーム分画を分取する。得られた抗体が共有結合したリポソームについてリン定量を行ない濃度を決定した後、ローリー法によりリン当りのタンパク質結合量を求める。また、粒度分布測定機により粒径の確認を行なう。

（Ｄ）ＣＲＰ抗原の測定

前記（Ｃ）で調製した抗体が共有結合したリポソームをＴＥＳでリン濃度１ｍＭとなるように希釈して免疫凝集反応試薬とする。測定機には日立７１５０型自動分析装置を用いて、ＣＲＰ精製抗原７μｌ及び免疫凝集反応試薬２８０μｌを用い、測定主波長３４０ｎｍ、測定副波長７００ｎｍ、測定ポイント２４－５０の条件下でＣＲＰ抗原を測定する。その結果を第１図に示す。

第１図において、縦軸は各被検検体による吸光度の変化をｍＡＢＳの単位で示す。なお、吸光度は、ＣＲＰ抗原０濃度の時の試薬のブランクを差し引いたものである。また横軸はＣＲＰ抗原濃度をｍｇ／ｄｌの単位で示す。

〔比較例１〕

前記（Ａ）のＡａｍ溶液の代わりにＴＥＳを用いること、及び過硫酸アンモニウム、Ｎ，Ｎ，Ｎ′，Ｎ′－テトラメチルエチレンジアミンを使用しないことを除けば、前記実施例１と同様の操作を繰り返す。その結果を第１図に示す。縦軸、横軸の表示は同様である。第１図の結果から明らかなように、リポソームにゲル化合物を内包させて屈折率を上げることによって、抗体結合リポソームが反応した時の吸光度変化量は約１．７倍になり、感度が高いＣＲＰ抗原

検出用免疫凝集反応試薬が得られることが分かる。

なお、前記実施例１とこの比較例１で使用したリポソームの感作量は、リン量１モルに対して約１５０ｇであった。

〔実施例２〕

リポソーム比濁法によるＲＦ検出用免疫凝集反応試薬

リポソームの調製は前記実施例１と同じ方法で行う。また、抗原結合リポソームの調製方法は、前記実施例１における抗体結合リポソームの調製方法において、ヤギ抗ＣＲＰ抗体にかえて抗原として熱変性ヒトＩｇＧを使用する以外は前記実施例１と同様に調製して抗原結合リポソームを得る。

ＲＦの測定：

上記の方法で調製した抗原感作リポソームをＴＥＳでリン濃度０．２５ｍＭとなるように希釈して第二試薬とする。なお第一試薬は、ＴＥＳを使用するものをいう。測定機は日立７１５０型自動分析装置を用いて、ＲＦ陽性血清１０μｌ、第一試薬３００μｌ及び第二試薬１００μｌを使用し、測定主波長３４０ｎｍ、測定副波長７００ｎｍ、測定ポイント２４－５０の条件下でＲＦを測定する。その結果を第２図に示す。

第２図において縦軸は各被検検体による吸光度の変化をｍＡＢＳの単位で示す。なお吸光度はＲＦ抗原０濃度の時の試薬ブランクを差し引いたものである。また、横軸はＲＦ濃度を示す。

〔比較例２〕

熱変性ヒトＩｇＧを前記比較例１と同様にして感作し、前記実施例２の（Ａ）と同様にしてＲＦを測定し、得られた結果を第２図に示す。第２図の結果から明らかなように前記実施例１の場合と同様にリポソームにゲル化合物を内包させ、屈折率を上げることによって、リポソームが反応した時の吸光度変化量は約１．４倍になり感

度が高いＲＦ用診断試薬が得られることが分かる。なお、前記実施例２とこの比較例２共に感作量は、リン量１モルに対し約２１０ｇであった。

第１図及び第２図により、以下のことが示される。即ち、凝集反応を基にした免疫凝集反応試薬において、担体として用いるリポソームに水溶性高分子化合物又はゲル化処理された化合物を内包することで測定感度を上げることができることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明の免疫凝集反応試薬を用いて、被検物に含まれる抗原又は抗体の測定を行なえば、抗原－抗体反応に基づくリポソームの凝集により生じる濁度変化を高めることができるので、被検体中に存在する物質が低濃度であっても感度よく測定することができる。

また、本発明によれば、担体として抗原性の少ないリポソームを用いるため非特異的な凝集反応が起こりにくい。

更に、本発明の免疫凝集反応試薬を使用すれば、自動分析装置による測定が可能であるため、大量の検体を一度に短時間で測定することができる。また、自動分析装置内を汚染することがないので、安定して測定ができる。

請　求　の　範　囲

1．抗原抗体反応で生じた凝集量を測定するための免疫凝集反応試薬において、

（1）免疫凝集反応試薬の担体としてリポソームが使用され、

（2）該リポソーム表面に抗体または抗原が固定化され、

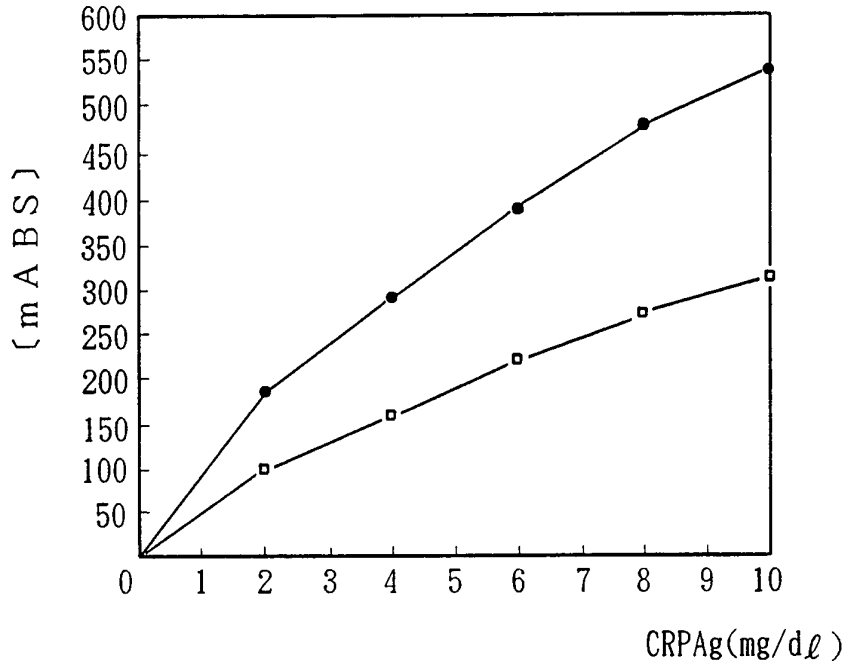
（3）該リポソームには、水溶性高分子化合物又はゲル化処理された化合物が内包されている、

ことを特徴とする免疫凝集反応試薬。

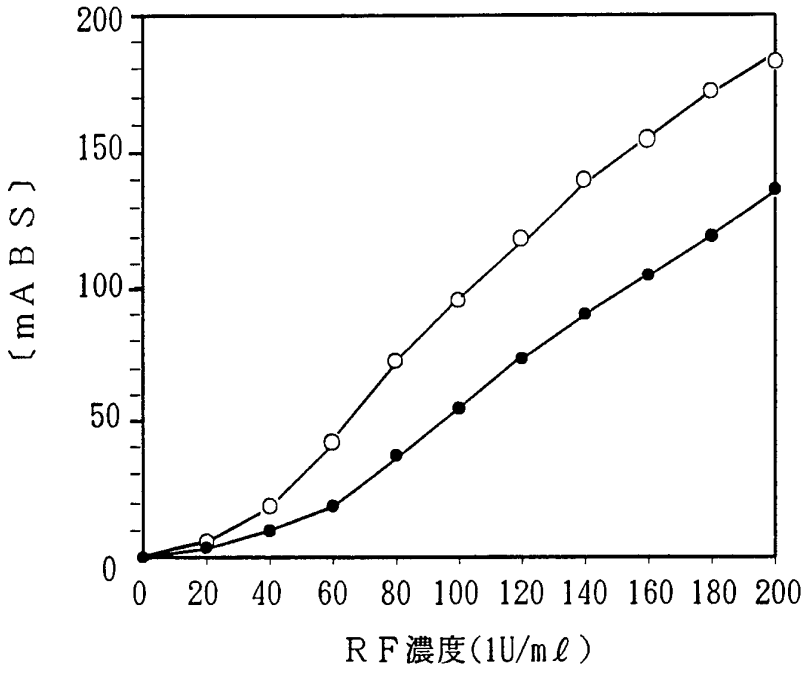
2．抗体または抗原が共有結合によりリポソーム表面に固定されたものである請求項1記載の免疫凝集反応試薬。

3．請求項1または2記載の免疫凝集反応試薬を被検体に作用せしめ、抗原抗体反応により生じたリポソームの凝集量を測定することを特徴とする免疫分析方法。

第 1 図


600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
〔mABS〕
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
CRPAg(mg/dℓ)
実施例1により得られた標準曲線
比較例1により得られた標準曲線

第 2 図



—○— 実施例1により得られた標準曲線
—●— 比較例1により得られた標準曲線

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/00136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^5 G01N33/544

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^5 G01N33/544

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Biosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 63-274870 (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), November 11, 1988 (11. 11. 88), (Family: none)	1-3
P, Y	JP, A, 6-3358 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), January 11, 1994 (11. 01. 94)	1-3
Y	BIOSIS Number 82054957 Journal of Immunological Methods 90(2), (1986) KUNG V. T. et. al. "LARGE LIPUSOME AGGLUTINATION TECHNIQUE FOR THE SEROLOGICAL DETECTION OF SYPHILIS" P. 189-196	1-3
Y	BIOSIS Number 76080317. Indian Journal of Experimental Biology. 20(7), (1982) SARKAR D. P. et. al. "ANTIBODY INDUCED AGGLUTINATION OF GALACTO CEREBROSIDE LIPOSOMES" P. 522-524	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
April 4, 1994 (04. 04. 94)	April 26, 1994 (26. 04. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/00136

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ G01N33/544

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ G01N33/544

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926－1994年
日本国公開実用新案公報 1971－1994年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Biosis

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	JP, A, 63－274870（工業技術院長），11. 11月. 1988（11. 11. 88）（ファミリーなし）	1－3
P.Y	JP, A, 6－3358（日水製薬株式会社），11. 1月. 1994（11. 01. 94）	1－3
Y	BIOSIS Number 82054957 Journal of Immunological Methods 90(2).(1986)	1－3

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
04. 04. 94

国際調査報告の発送日
26.04.94

名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
亀田宏之 印
2J9015

電話番号 03－3581－1101 内線 3252

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	KUNG V. T. et al.「LARGE LIPUSOME AGGLUTINATION TECHNIQUE FOR THE SEROLOGICAL DETECTION OF SYPHILIS」 p. 189－196	
Y	BIOSIS Number 76080317. Indian Journal of Experimental Biology. 20(7), (1982) SARKAR D. P. et al「ANTIBODY INDUCED AGGLUTINATION OF GALACTO CEREBROSIDE LIPOSOMES」p. 522－524	1－3