

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4440540号
(P4440540)

(45) 発行日 平成22年3月24日(2010.3.24)

(24) 登録日 平成22年1月15日(2010.1.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 33/543 5 1 5 D

請求項の数 23 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2002-534837 (P2002-534837)	(73) 特許権者	502043547
(86) (22) 出願日	平成13年10月8日 (2001.10.8)		フアディア・アー・ペー
(65) 公表番号	特表2004-511778 (P2004-511778A)		スウェーデン国、7 5 1 3 7・ウブサラ
(43) 公表日	平成16年4月15日 (2004.4.15)		、ボックス・6 4 6 0
(86) 国際出願番号	PCT/SE2001/002185	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02002/031503		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成14年4月18日 (2002.4.18)	(74) 代理人	100105131
審査請求日	平成16年7月14日 (2004.7.14)		弁理士 井上 満
(31) 優先権主張番号	0003662-4	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成12年10月11日 (2000.10.11)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ方法およびそのためのキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) サンプルを既知量の受容体と接触させる工程、前記受容体は分析物に特異的に結合して分析物 / 受容体複合体を形成し、前記受容体の既知量はサンプル中の全分析物と結合するために要求される量より多く、

b) 分析物 / 受容体複合体および未反応の受容体を含む、分析物と接触した受容体の一部を固相上で単離する工程であって、固相上に単離される受容体の量は既知量であり、受容体と特異的に結合するリガンドが既知量固相上に結合されており、固相が受容体に結合できる量がサンプルと接触した受容体の量よりも小さい前記工程、

c) 前記単離された受容体の一部における分析物 / 受容体複合体の量を検出する工程、および

d) 分析物 / 受容体複合体の検出された量からサンプル中の分析物の濃度を決定する工程を含む、

サンプル中の分析物を測定する方法。

【請求項 2】

サンプルが 1 ナノモル / リットルを超える高い濃度を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

サンプルが希釈されていない、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

受容体が、分析物に特異的に結合する第 1 の部分と、固相に結合する第 2 の部分とを含

10

20

む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

受容体の固相結合部分が特異的な結合対の一方のメンバーを含み、結合対のもう一方のメンバーが固相に固定化される、請求項 4に記載の方法。

【請求項 6】

工程 c)において、前記分析物 / 受容体複合体が、分析物に特異的に結合する標識された検出試薬によって検出される、請求項 1 から 5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

分析物結合性受容体の量の前記単離された部分とサンプルと接触した分析物結合性受容体の総量との比率が、1 : 2 から 1 : 1 0 0 0 の範囲内である、請求項 1 から 6のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

分析物結合性受容体の量の前記単離された部分とサンプルと接触した分析物結合性受容体の総量との比率が、1 : 5 から 1 : 1 0 0 の範囲内である、請求項 7に記載の方法。

【請求項 9】

分析物結合性受容体の量の前記単離された部分とサンプルと接触した分析物結合性受容体の総量との比率が、1 : 5 から 1 : 2 0 の範囲内である、請求項 7に記載の方法。

【請求項 10】

受容体に対する前記固相結合部位が、流動マトリックスの反応域内に固定化される、請求項 1 から 9のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 11】

流動マトリックスが、側方流動マトリックスである、請求項 10に記載の方法。

【請求項 12】

流動マトリックスが、メンブランストリップである、請求項 10に記載の方法。

【請求項 13】

受容体が抗体またはその免疫活性フラグメントである、請求項 1 から 12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

検出試薬が抗体またはその免疫活性フラグメントである、請求項 6に記載の方法。

【請求項 15】

検出試薬が蛍光基または発色基によって標識されている、請求項 6に記載の方法。

30

【請求項 16】

特異的な結合対がビオチン - アビジンまたはビオチン - ストレプトアビジンである、請求項 5に記載の方法。

【請求項 17】

サンプルが未希釈の血清サンプルである、請求項 1 から 16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

サンプルが未希釈の全血サンプルである、請求項 1 から 16のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 19】

分析物に特異的に結合する第 1 の部分を有する既知量の受容体、および受容体の第 2 の部分に特異的に結合するリガンドが表面に固定化されている固相部材を含み、固相部材上の前記リガンドが受容体に結合できる量が既知量の受容体の量よりも小さい、サンプル中の分析物を測定するための試験キットであって、
請求項 1 から 18のいずれか一項に記載の方法を行うための前記試験キット。

【請求項 20】

固相上に固定化されたリガンドが受容体に結合できる量と分析物に特異的な受容体の量との比率が、1 : 2 から 1 : 1 0 0 0 の範囲内である、請求項 19に記載の試験キット。

【請求項 21】

50

固相上に固定化されたりガンドが受容体に結合できる量と分析物に特異的な受容体の量との比率が、1：5から1：100の範囲内である、請求項19に記載の試験キット。

【請求項22】

固相上に固定化されたりガンドが受容体に結合できる量と分析物に特異的な受容体の量との比率が、1：5から1：20の範囲内である、請求項19に記載の試験キット。

【請求項23】

メンブランの反応域内または反応域上に固定化された前記受容体結合性リガンドを有し、および反応域の上流のメンブラン内またはメンブラン上に溶解可能に前もって置かれた前記分析物結合性受容体を有する側方流動メンブランストリップを含む、請求項19から22のいずれか一項に記載の試験キット。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、サンプル中の分析物（特に、高濃度の分析物）を定量的または半定量的に測定する方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

サンプル中の分析物を定性的または定量的に測定する場合、いわゆるサンドイッチアッセイが使用されることが多い。この場合、分析物の異なるエピトープに対する2つの受容体が、分析物を含有するサンプルとインキュベーションされ、受容体の1つが、例えば、それに結合する標識によって検出可能である。不均一型のアッセイ形式では、第2の受容体が固相に固定化（例えば、連結）されるか、または第2の受容体に、固相（アビジンもしくはストレプトアビジンが被覆された固相など）に結合し得る結合剤成分（ビオチンなど）が配置される。

20

【0003】

特に、分析物がサンプル中に高濃度で存在する場合、多くの場合多大な費用を要する多量の固定化された受容体および標識された受容体のそれぞれの使用を避けるために、または多量の受容体を使用することができない技術的困難を避けるために、アッセイを行う前にサンプルを希釈することが通例である。そのような希釈は手間がかかるだけでなく、さらなる誤差源をアッセイに持ち込む。

30

【0004】

従って、希釈を必要としないアッセイ手法が求められている。

【0005】

(発明の概要)

サンプルを希釈する必要がなく、サンプル中の高濃度の分析物さえも測定することができる不均一型のサンドイッチアッセイを行う方法を提供することが本発明の目的の1つである。

【0006】

使用される捕捉試薬および検出試薬の量が少ない不均一型のサンドイッチアッセイを行う方法を提供することが本発明の別の目的である。

40

【0007】

そのような方法を行うための試験キットを提供することが本発明のさらに別の目的である。

【0008】

従って、本発明の1つの態様において、サンプル中の分析物、特に、1ナノモル/リットルを越える濃度で見出される高濃度の分析物を測定する方法が提供される。この方法は、a) サンプルを受容体の指定された量と接触させる工程、前記受容体は、分析物に特異的に結合して、分析物/受容体複合体を形成し、受容体の前記指定された量は、サンプル中の全分析物と結合するために要求される量より多く、

b) 分析物/受容体複合体および未反応の受容体を含む、分析物と接触した受容体の量の

50

指定された部分を、固相上で、好ましくはメンブランストリップなどのマトリックス上で単離する工程、

c) 前記単離された指定された部分における分析物 / 受容体複合体の量を検出する工程、および

d) 分析物 / 受容体複合体の検出された量からサンプル中の分析物の濃度を決定する工程、を含む。

【0009】

本発明の別の態様において、(i) 分析物に特異的に結合する第1の部分を持つ受容体物質の指定された量、および(ii) 受容体の第2の部分に特異的に結合するリガンドが表面に固定化されている固相部材、を含み、固相部材における前記リガンドの量が受容体物質の前記指定された量よりも小さい、サンプル中の分析物を測定するための試験キットが提供される。

10

【0010】

本発明のさらに別の態様において、(i) 分析物に特異的に結合する第1の部分を持つ受容体物質の指定された量、受容体物質の量の指定された部分のみが、特異的なリガンドに結合し得る第2の部分を持つ、および(ii) 前記特異的なリガンドが表面に固定化されている固相部材、を含む、サンプル中の分析物を測定するために試験キットが提供される。

【0011】

本発明のなおさらに別の態様において、(i) 受容体物質の第1の指定された量、および(ii) 受容体物質の第2の指定された量が表面に固定化されている固相部材、を含む、サンプル中の分析物を測定するために試験キットが提供される。

20

【0012】

本発明の方法および試験キットを、目的とする分析物を定量的に測定するために使用することが好ましいが、本発明の方法および試験キットはまた、半定量的な測定および定性的な測定のためにも使用することができる。

【0013】

(発明の詳細な説明)

本発明の必須の要素は、サンプル中に存在するすべての分析物を分析物に特異的な受容体に結合させること、形成された分析物 - 受容体複合体の少量の部分を固相で単離すること、単離された分析物 - 受容体複合体の量を検出すること、および固相上の分析物のこの検出された量からサンプル中の分析物の総量を決定することにある。本発明によれば、これは、様々な方法で達成することができる。

30

【0014】

本発明の方法の1つの実施形態において、すべての分析物が、分析物を含むサンプルと、分析物に対する親和性に加えてリガンド(L)に対する親和性を持つ第1の受容体(R1)を過剰に含む溶液とを接触させることによって、固相に結合させられ、その結果、分析物 - 受容体複合体の少量の部分が、リガンド(L)が固定化されている固相に結合させられる。この少量部分のこの結合は、(i) 制限(指定)された量のリガンド(L)を使用して、分析物 - 受容体複合体(および未反応の受容体)の一部を抽出すること、または(ii) この、少量の(指定された)部分のみがリガンド(L)に結合し得る第1の受容体(R1)を使用して、分析物 - 受容体複合体(および未反応の受容体)の所望部分を抽出すること、のいずれかによって達成することができる。後者の場合(ii)において、固定化されたリガンド(L)の量は、通常、リガンド(L)に結合し得る第1の受容体の量よりも多い。固相に結合した分析物 / 受容体複合体の量が、その後、通常的には、固相を、分析物に対する標識された結合剤の形態にある検出剤(標識された第2の受容体(R2)など)と接触させることによって検出される。

40

【0015】

上記の第1の場合(i)において、分析物に特異的な受容体(R1)に結合し得る固定化されているリガンド(L)の量は、サンプルと接触する分析物特異的な受容体(R1)の量

50

の指定された一部である。従って、固相上の検出された分析物とサンプル中の分析物の総量との比率は、固定化されている分析物結合性リガンド（L）と添加された受容体（R1）の総量との比率に対応し、それにより、サンプル中の分析物の濃度を計算することができる。

【0016】

上記の第2の場合（ii）において、固定化されているリガンド（L）に結合し得る分析物特異的受容体（R1）の量は、受容体（R1）の総量の指定された部分である。従って、固相上の検出された分析物とサンプル中の分析物の総量との比率は、リガンド（L）と反応し得る分析物特異的受容体（R1）と受容体（R1）の総量との比率に対応し、それにより、サンプル中の分析物の濃度を計算することができる。

10

【0017】

本明細書中で使用される用語「受容体」は、活性な分析物結合性の受容体、および適切な場合、活性なリガンド結合性の受容体をそれぞれ示し、不活性な状態または非結合性の状態にあるそのような受容体を含むことを意味しない。同様に、用語「受容体結合性リガンド」は、活性な受容体結合性のリガンドを示し、不活性な状態または非結合性の状態にあるそのようなリガンドを含むことを意味しない。

【0018】

本明細書中で使用される用語「量」は、通常、結合能力を意味する。従って、例えば、分析物に特異的な受容体の量が分析物の量よりも多いと述べられるとき、それは、すべての分析物と結合するために必要とされるよりも多い分析物特異的受容体が存在することを意味する。通常、1：1の反応比が、例えば、分析物と分析物に特異的な受容体との間に、または分析物に特異的な受容体と固定化された受容体に結合するリガンドとの間に存在する。そのような場合、それぞれの化学種の結合能力はそれらのモル量に対応する。しかし、他の反応比率も可能である。例えば、固定化されたリガンドは、2つ以上の分析物特異的受容体と結合し得ることがある。

20

【0019】

本発明の方法の別の実施形態において、サンプルは、サンプルと、溶液中、少量部分の、固相に固定化された分析物特異的受容体とを、接触させ、それにより、サンプル中に存在する分析物の少量部分を固相に結合させることができる。溶液中の受容体（R1）の量と固定化されている受容体（R1）の量との比率が既知である場合、サンプル中の分析物の濃度を、固相に結合した分析物の検出された量から計算することができる。

30

【0020】

上記の手法は、サンプルを希釈するのと同じ効果をもたらすことが容易に理解される。当然のことではあるが、操作者には好都合である、希釈工程が避けられることに加えて、試薬（すなわち、分析物を固相に捕捉するための試薬、および高価であることが多い検出試薬の両方）のかなりの節約が得られる。これに関連して、本発明のアッセイでは、分析物と受容体との間の反応は、固定化されている受容体の約10%から20%のみが反応する対応する従来のアッセイの場合のように固相表面においてではなく、（Butler, J. E. 他、Molecular Immunology、第30巻、第13号、1165頁～1175頁、1993）、むしろ、殆んどすべての受容体が活性である溶液中で生じることには留意しなければならない。

40

【0021】

サンプルと接触した分析物特異的受容体の総結合能力と、（i）固相に固定化されている受容体結合性リガンドの結合能力（これが制限されているとき）、または（ii）分析物に特異的な受容体のリガンド結合能力（これが制限されているとき）との、必要とされる比率は、とりわけ、測定される特定の分析物および使用される特定のアッセイ形式に依存して当業者によって容易に決定され、広い範囲内で選ぶことができる。通常、この比率は約2：1から約1000：1であり、特に約5：1から約100：1であり、好ましくは約10：1よりも大きく、より好ましくは約20：1よりも大きい。

【0022】

50

サンプル中の分析物の量に対する過剰な分析物受容体もまた、それぞれの特定の場合について当業者によって容易に決定される。

【0023】

サンプルと接触する受容体は、通常、分析物に特異的に結合する1つの部分と、固相表面に固定化されたりガンドに特異的に結合する別の部分とを有する二重受容体タイプまたは二反応性結合剤タイプである。分析物に結合する部分は、例えば、抗体（モノクローナルもしくはポリクローナル）もしくはその活性なフラグメント（組換え抗体およびフラグメントを含む）または核酸であり得るが、これに対して、リガンドに結合する部分は特異的な結合対の一方のメンバーであり得る。例示的なそのような特異的な結合対には、抗原 - 抗体およびハプテン - 抗体などの免疫学的な結合対、ビオチン - アビジンまたはビオチン - ストレプトアビジン、レシチン - 糖、ホルモン - ホルモン受容体、ならびに核酸二重鎖が含まれる。例えば、固相は、ストレプトアビジンをそれに結合させることができ、分析物に対する受容体をビオチン化することができる。分析物の濃度が高いとき、免疫沈殿を避けるために、一価の受容体を使用することが好ましいであろう。

10

【0024】

分析物は、好ましくは、1ナノモル/リットルを越える濃度でサンプル中に存在する分子であるが、分析物は、当然のことではあるが、天然に存在する分析物特異的な結合性メンバーが存在する任意の物質であり得るか、または分析物特異的な結合性メンバーが調製され得る任意の物質であり得る。

【0025】

20

固相によって捕捉された分析物は、通常、標識された、分析物について特異的な結合剤との反応によって検出される。そのような標識された結合剤は、特異的な結合性メンバーに共有結合的または非共有結合的に結合した検出可能な標識を含むコンジュゲートであり得る。この場合、「標識」は、視覚的手段または装置的手段によって検出可能なシグナルを生じさせることができる任意の物質（特に蛍光基または発色基）を示す。

【0026】

サンプルは、通常的には生物学的起源のものであり、例えば、血液（血清、血漿、全血）、唾液、涙液、尿、脳脊髄液、汗などである。本発明は、当然のことではあるが、発酵液、反応混合物などの他のタイプのサンプルにもまた適用可能である。しかしながら、特に、サンプルは未希釈の血清サンプルまたは全血サンプルである。

30

【0027】

本発明は一般に適用可能であるが、本発明は、好都合には、免疫クロマトグラフィータイプの固相アッセイにおいて使用することができる。そのようなアッセイでは、ニトロセルロースまたはガラス繊維などからなる吸収性材料のプレート形状の流動マトリックス（通常、メンブランマトリックス）を含むデバイスが使用される。この場合、液体が、メンブランにおける毛管力によって横方向に（すなわち、ストリップの平面内を）移動し得る。メンブランは、通常、サンプル適用域、およびサンプル適用域の下流にある検出（または反応）域を有する。検出域において、通常、分析物に対する捕捉用試薬が固定化される。アッセイを行うために、適用域が、目的とする分析物についてアッセイされる液体サンプルと接触させられる。デバイスは、目的とする分析物がサンプル中に存在する場合、液体の毛管作用により、目的とする分析物を、分析物が捕捉される検出域にメンブランストリップを通して移動させるために十分な条件のもとで維持される。毛管作用による液体の流れは、通常、ストリップの下流端に置かれた吸収パッドまたは同様なものによって確保される。その後、通常の場合には標識されている検出試薬が検出域の上流に加えられ、捕捉された分析物と検出域において反応し、捕捉された分析物の量が測定される。多くの場合、検出試薬は、メンブランストリップ内またはメンブランストリップに、例えば、蛍光基または発色基を含有する拡散的に移動し得る粒子の形態で、サンプル適用域の上流に、またはサンプル適用域と検出域との間に、そのいずれかで前もって置かれる。

40

【0028】

本発明による免疫クロマトグラフィー的アッセイにおいて、受容体は、サンプルをメンブ

50

ランストリップに適用する前にサンプルに添加されるか、または検出域の上流のメンブランストリップ内もしくはメンブランストリップに前もって置くことができる。

【0029】

本発明の方法を行うための試験キットは、(i)メンブラン中または内に固定化された、受容体に特異的に結合するリガンドおよび(ii)メンブラン中または内に溶解可能に前もって置かれた、分析物特異的受容体の指定された量、を有するメンブランを含んでいよう。固相部材におけるリガンドの量は、受容体物質の指定された量と結合するために必要とされる量よりも少なく、通常かなり少ない。

【0030】

試験キットの別の実施形態において、分析物に特異的な受容体の部分のみが、固定化されているリガンドに結合することができる。そのようなキットは、試験キットのさらに別の形態において、このキットは、(i)メンブラン中または内に固定化された、受容体に特異的に結合するリガンドおよび(ii)メンブラン中または内に溶解可能に前もって置かれた、分析物特異的受容体の指定された、その指定された部分だけが固定化されたりリガンドに結合することができる量、を含んでいよう。

10

【0031】

試験キットのさらに別の形態は、(i)メンブラン中または内に溶解可能に前もって置かれた、分析物特異的物質の第1の指定された量、および(ii)メンブラン中または内に固定化された、分析物特異的物質の第2の指定された量、を含んでいよう。

【0032】

代替の実施形態において、固相は、マイクロタイタープレートウエルなどの固相ウエルである。試験キットのそのような固相は、分析物結合性受容体の第2の量がそれに固定化され、かつ分析物結合性受容体の第1の量がウエル内またはウエルとの密な接触状態に溶解可能に前もって置かれている1つ以上のウエルを有する固体支持体を含むことができる。

20

【0033】

下記において、本発明は、具体的な非限定的な実施例によって、より詳しく例示される。

【0034】

実施例1

未希釈血清サンプルにおけるC反応性タンパク質(CRP)の免疫アッセイ

30

測定範囲: 10 mg / l から 200 mg / l

原理

サンプルを過剰のビオチン化抗CRP-fabと混合して、混合物を、反応域に不足量のストレプトアビジンを有する試験ストリップに適用する。中間洗浄の後、抗CRP蛍光基コンジュゲートを加え、洗浄後、反応域に結合しているこのコンジュゲートを測定する。ビオチン化抗CRP-fabの少量のみが反応域に結合し得るので、蛍光基コンジュゲートの消費がかなり削減される。

【0035】

試験ストリップ

ポリエステル支持体における5×48mmのニトロセルロースメンブラン(Whatman、細孔度: 8 μm)を使用した。ストリップは、一方の端にサンプル適用域を有し、アッセイ手法において添加されるビオチン化抗CRPの約6%と結合し得る量でストレプトアビジンが固定化されている下流の反応域を有した。

40

【0036】

サンプル

様々なCRP濃度のCRP含有サンプルを、hCRP除去血清における200 mg / lの組換えCRP(Fitzgerald)から調製した。

【0037】

手順

15 μlのビオチン化抗CRP-fab(モノクローナル抗体の一価fabフラグメント

50

）および15 μ lのCRP含有血清を混合して、混合物をメンブランストリップの適用域に加えた。ビオチン化抗CRP-fabの量は試験ストリップあたり3 μ gであった。これは、200 mg/lの標準CRPに対して2 $\times$ モル過剰の抗CRPである。15 μ lの試験緩衝液（50 mMホウ酸塩緩衝液（pH 8.0）、3% BSA、5%スクロース、0.15 M NaCl、0.005% CaCl₂、0.05% NaN₃）による中間洗浄の後、15 μ lの検出コンジュゲート溶液[0.1 μ mのTransFluoSphere-SO₄/CHO（633/720 nm）（モルキュラープローブ社（Molecular Probes Inc.））に連結された3 μ gの抗CRPモノクローナル抗体（Fitzgerald）、上記試験緩衝液]を加え、続いて15 μ lの試験緩衝液で2回洗浄した。その後、ストリップの蛍光を測定した。結果を下記の表1に示す。

10

【0038】

【表1】

表1

CRP 濃度 (mg/l)	得られたビーク面積 (V $\times$ mm)
0	0.08
0	0.07
10	2.56
10	2.50
30	3.62
30	4.01
100	5.24
100	4.87
200	6.28
200	5.82

20

【0039】

実施例2（比較例）

30

1/20に希釈された血清サンプルにおけるCRPの免疫アッセイ

測定範囲：10 mg/lから200 mg/l

原理

サンプルを試験緩衝液で希釈して、過剰の抗CRPを反応域に有する試験ストリップに加える。その後、抗CRP蛍光基コンジュゲートを加え、続いて洗浄する。その結果、反応域に結合したコンジュゲートが測定される。サンプルの希釈は、検出コンジュゲートの場合と同様に反応域における不適切なほど多量の抗CRPを避けるために必要である。

【0040】

試験ストリップ

ポリエステル支持体における5 $\times$ 48 mmのニトロセルロースメンブラン（Whatman、細孔度：8 μ m）を使用した。ストリップは、一方の端にサンプル適用域を有し、10 mg/mlの標準CRP血清に関して13 $\times$ モル過剰である2.6 μ gの固定化された抗CRPモノクローナル抗体（Fitzgerald）を伴う下流の反応域を有した。

40

【0041】

サンプル

様々なCRP濃度のCRP含有サンプルを、hCRP除去血清における200 mg/lの組換えCRP（Fitzgerald）から調製した。

【0042】

手順

試験緩衝液（50 mMホウ酸塩緩衝液（pH 8.0）、3% BSA、5%スクロース、0

50

、15 M NaCl、0.005% CaCl₂、0.05% NaN₃)で1/20に希釈されたCRP含有血清の15 μ lをメンブランストリップの適用域に加えた。その後、15 μ lの検出コンジュゲート溶液[0.1 μ mのTransFluoSpheres - SO₄/CHO(633/720 nm)(モルキュラープローブ社(Molecular Probes Inc.))に連結された抗CRPモノクローナル抗体(Fitzgerald)、上記試験緩衝液]を加えた。抗CRPコンジュゲートの量は試験ストリップあたり3 μ gであり、これは、最高の標準値に対して15 $\times$ モル過剰であった。コンジュゲートを添加した後、15 μ lの試験緩衝液で洗浄した。その後、ストリップの蛍光を測定した。結果を下記の表2に示す。

【0043】

10

【表2】

表 2

CRP 濃度 (mg/l)	得られたピーク面積 (V $\times$ mm)
0	0.41
0	0.60
10	7.51
10	7.130
20	8.86
20	9.42
40	11.97
40	10.67
80	11.70
80	12.91
200	14.27
200	14.16

20

【0044】

30

従って、上記の実施例1および実施例2により、本発明の方法論を使用したとき、非常に多量の試薬を使用することなく、未希釈の高濃度サンプルに対してアッセイを行うことが可能であることが明らかにされる。

フロントページの続き

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 メンデル - ハートビイ, イブ

スウェーデン国、エス - 7 5 6 ・ 5 5 ・ ウブサラ、ラーベニウスベーゲン・2 8

(72)発明者 ウーデルスタッド, レネ

スウェーデン国、エス - 7 5 5 ・ 9 8 ・ ウブサラ、ダンマルクス・ビー

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開 2 0 0 1 - 2 3 5 4 7 1 (J P , A)

特開平 0 2 - 1 4 5 9 6 7 (J P , A)

特開平 0 6 - 3 1 7 5 9 2 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48 - G01N 33/98