

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-32360

(P2010-32360A)

(43) 公開日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	
	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2008-194754 (P2008-194754)	(71) 出願人	000002071
(22) 出願日	平成20年7月29日 (2008.7.29)		チッソ株式会社
			大阪府大阪市北区中之島三丁目3番23号
		(74) 代理人	100100549
			弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100106622
			弁理士 和久田 純一
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性粒子を用いた測定対象物質の濃度測定法

(57) 【要約】

【課題】測定対象物質を感度良く、迅速に且つ安価に測定できる測定方法を提供する。

【解決手段】検体と、標識物質で標識された第1抗体とを混合して混合液を調製する工程、互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した第2抗体と、該2種類の結合材の他方が結合した磁性粒子を、前記混合液に添加する工程、前記磁性粒子を回収する工程、及び前記標識を検出する工程を含み、前記第1抗体と前記第2抗体は測定対象物質に対する結合能を有し、その結合に際して互いに競合しないことを特徴とする、検体中の測定対象物質の濃度を測定する方法により、測定対象物質を安価に、高精度且つ高感度に測定する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体と、標識物質で標識された第 1 抗体とを混合して混合液を調製する工程、
互いに親和性を有する 2 種類の結合材の一方が結合した第 2 抗体と、該 2 種類の結合材
の他方が結合した磁性粒子を、前記混合液に添加する工程、
前記磁性粒子を回収する工程、及び
前記標識を検出する工程

を含み、

前記第 1 抗体と前記第 2 抗体は測定対象物質に対する結合能を有し、その結合に際して
互いに競合しないことを特徴とする、
検体中の測定対象物質の濃度を測定する方法。

10

【請求項 2】

前記第 2 抗体と前記磁性粒子とを、前記混合液に同時に添加することを特徴とする、請
求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 2 抗体を前記混合液に添加した後に、前記磁性粒子を添加することを特徴とする
、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記磁性粒子を前記混合液に添加した後に、前記第 2 抗体を添加することを特徴とする
、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記磁性粒子が、1 ~ 1000 nm の平均粒径であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4
のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記磁性粒子が、50 ~ 200 nm の平均粒径であることを特徴とする、請求項 5 に記
載の測定方法。

【請求項 7】

前記第 1 抗体及び前記第 2 抗体の少なくとも一方がモノクローナル抗体である、請求項
1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記測定対象物質がペプチドである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチドである、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、磁性粒子を使用した、試料中の測定対象物質の濃度を安価に、高精度且つ高
感度に測定する免疫測定法に関する。

【背景技術】**【0002】**

タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、糖鎖、核酸、脂質等の測定は、
臨床分野、産業分野において一般的に行われている。

40

【0003】

これらの測定方法のうち、汎用な方法の一つとして、2 種類の抗体を用いたサンドイッ
チ免疫測定法が挙げられる。この方法では、同一の測定対象物質に対して特異的な結合能
を有する 2 種類の抗体を用意し、一方の抗体を固相に結合させ、他方の抗体を標識させて
おく。これらを用いて、固相に結合させた一方の抗体に測定対象物質をトラップし、次い
で標識された他方の抗体を測定対象物質に結合させることで固相抗体 - 測定対象物質 - 標
識抗体からなる抗原抗体複合体を形成させる。その後、該標識を検出することで、測定対
象物質の濃度を測定することができる。

50

【 0 0 0 4 】

上記サンドイッチ免疫測定法においては、抗原抗体複合体中の標識を特異的に検出するために、抗原と結合していない標識抗体を取り除く操作（B / F 分離）が必要となる。そのため一方の抗体を固相に結合させておくのであるが、通常は抗体が反応容器表面等の固相に結合されているため、抗原抗体反応が反応溶液中の一部に限られた領域でしか起こらず、そのため、液相中での反応に比べて反応効率が大幅に低下してしまい、十分な感度を得るためには一定の反応時間を確保する必要があった。

【 0 0 0 5 】

上記問題点を改善するために、液相中に分散させることが可能な固相に抗体を結合し、液相中で固相抗体 - 測定対象物質 - 標識抗体を形成させ、その後、固相を一定の場所に集めて B / F 分離を行う方法が開発されている。例えば、磁性粒子は液相中に分散することができ、これを固相として使用することで、液相中で抗原抗体複合体を形成させることができる。その後、該複合体を磁石で集め（磁集し）、B / F 分離を行った後に標識を検出することができる。

10

【 0 0 0 6 】

磁性ナノ粒子は、その粒子径が 200 nm 以下である場合には、微小であることから水によく分散するが、分散状態が維持されてしまい磁集できない。しかしながら、例えば、下限臨界溶液温度を持つ温度応答性高分子で表面修飾した磁性粒子を利用して、その水溶液の温度を下限臨界溶液温度以上とした場合には、該下限臨界溶液温度を持つ温度応答性高分子で表面修飾した磁性粒子が析出、凝集する。この凝集物は磁力で容易に回収できることから、該下限臨界溶液温度を持つ温度応答性高分子で表面修飾し、抗体または抗原を固定化した温度応答性高分子表面修飾磁性粒子を用いる方法も開発されてきている（特許文献 1）。

20

【 0 0 0 7 】

臨床検査においては、近年、ポイント オブ ケア テスティング（POCT）と呼ばれるベッドサイドや診療現場で行われる迅速且つ高感度な検査の重要性が高まっている。患者検体を採取し、その場で測定を行って迅速に結果を出すことが求められる POCT の検査項目として、手術前の感染症の各種マーカーや、胸痛患者の脳性ナトリウム利尿ペプチド（以下、「BNP」と略することがある）等の心不全マーカー等が挙げられる。BNP は、慢性及び急性心不全の重症度が上昇するのと比例して、著しく血中濃度が上昇することが知られており、この濃度を測定することで心不全の診断を行うことができる。BNP の検査方法として、特許文献 2 には、哺乳類の α - BNP に反応する第 1 の抗体とプレプロ BNP もしくは γ - BNP 誘導体に反応するが α - BNP には反応しない第 2 の抗体とを用いることを特徴とする哺乳類の γ - BNP 誘導体に特異的な免疫測定方法が開示されている。

30

【 0 0 0 8 】

また、臨床現場においては、BNP の測定方法として、MIO2 シオノギ BNP（商品名：塩野義製薬製）を試薬に使用した免疫測定法が用いられている。この方法は、ビオチン標識した抗 BNP 抗体とアルカリフォスファターゼ標識した抗 BNP 抗体の 2 種類のモノクローナル抗体により、検体中の BNP をサンドイッチ様に挟んで反応させ、反応終了後、表面に抗ビオチン抗体を固定化した反応カップに移し、サンドイッチ様の BNP 抗原抗体複合体を反応カップの表面に結合させる。未反応の標識抗体を洗浄、除去し、発光基質を添加して発光強度を測定し、標準曲線を用いて検体中の BNP 量を測定する方法である。この方法は、検体と 2 種類の抗体試薬を同時に反応させる方法であり、全自動化学発光免疫装置により測定の自動化が行え、比較的短時間に、比較的高い精度で測定できるものの、2 段階インキュベーションが必要であり（第 1 段階が 5 分、第 2 段階が 4 分）、3 種類の抗体が必要であり、また、器材、抗体の固相化した反応カップ、酵素等が高価であるなど改良の余地が大いにある。

40

【 0 0 0 9 】

現在、BNP のみならず、様々な測定対象物質の濃度を、より高精度に、安価で、短時

50

間に測定結果が出せる測定方法が求められている。

【特許文献1】特開2005-082538号公報

【特許文献2】国際公開WO99/13331号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、測定対象物質の濃度を、より短時間で測定することができ、従来よりも安価に、高精度且つ高感度に測定できる測定方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した。その結果、磁性粒子を固相として使用するサンドイッチ免疫測定法において、検体及び抗体を含む試薬の添加を特定の順序で行うことにより、検体と全ての抗体試薬を同時に反応させる従来法と比較して、反応時間を増加させることなく、従来法よりも安価に、高精度且つ高感度に測定結果が得られることを見出し、これをもとに本発明を完成させた。

【0012】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 検体と、標識物質で標識された第1抗体とを混合して混合液を調製する工程、互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した第2抗体と、該2種類の結合材の他方が結合した磁性粒子を、前記混合液に添加する工程、前記磁性粒子を回収する工程、及び前記標識を検出する工程を含み、

前記第1抗体と前記第2抗体は測定対象物質に対する結合能を有し、その結合に際して互いに競合しないことを特徴とする、検体中の測定対象物質の濃度を測定する方法。

(2) 前記第2抗体と前記磁性粒子とを、前記混合液に同時に添加することを特徴とする、(1)に記載の方法。

(3) 前記第2抗体を前記混合液に添加した後に、前記磁性粒子を添加することを特徴とする、(1)に記載の方法。

(4) 前記磁性粒子を前記混合液に添加した後に、前記第2抗体を添加することを特徴とする、(1)に記載の方法。

(5) 前記磁性粒子が、1~1000nmの平均粒径であることを特徴とする、(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 前記磁性粒子が、50~200nmの平均粒径であることを特徴とする、(5)に記載の測定方法。

(7) 前記第1抗体及び前記第2抗体の少なくとも一方がモノクローナル抗体である、(1)~(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 前記測定対象物質がペプチドである、(1)~(7)のいずれかに記載の方法。

(9) 前記ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチドである、(8)に記載の方法。

【発明の効果】

【0013】

本発明の測定方法を用いることで、少ない試薬量で、反応のためのインキュベーションが短時間で処理でき、高精度且つ高感度に測定結果を出すことができる。これにより、例えば臨床現場では、受診頻度を高くしても安価に短時間で感度よく検査項目を測定できることから、経済的な負担を抑えながら病気を早期発見することができる。また、患者の予後の経過観察においても、本発明の方法を用いることにより、経済的な負担が軽減できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0015】

本発明において検体とは、測定対象物の濃度を測定するための検査に必要な試料であり、臨床検体、食品検体、環境サンプリング検体に大別することができる。

【0016】

臨床検体としては、血液、血漿、血清、リンパ液、尿、唾液、涙液、胃液、喀痰、鼻や咽等の粘膜から採取したぬぐい液等の体液や便等が挙げられるがこれらに限定されず、目的とする測定対象物質が含まれ得る検体であれば検体に含まれる。

本発明により測定できる臨床検体中の測定対象物質としては、微生物、細菌、ウイルス、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、脂質、糖脂質、核酸、毒素等またはこれらの複合体等が挙げられ、低分子物質がこれらと結合したものも含まれる。測定対象物質としては、例えば、癌胎児性抗原（CEA）、 α -フェトプロテイン（AFP）、前立腺性酸性ホスファターゼ（PAP）、CA19-9、CA125、CA15-3、前立腺特異抗原（PSA）、遊離PSA等の腫瘍マーカー、HBs抗原、HBs抗体、HBe抗原、HBe抗体、HBc抗体、HCV抗体、p24抗原等の感染症マーカー、FD P、Dダイマー、PIC、ATIII、FM等の凝固線溶マーカー、CK-MB、ミオグロビン、トロポニン、CRP、BNP等の心不全マーカー、TSH、HCG等のホルモン類、インスリン等が例示できるが、これらに限定されるものではなく、サンドイッチ免疫測定法で測定できるものは全て本発明の方法の測定対象物質に含まれる。

10

20

【0017】

食品検体としては、液体飲料、半固形食品、固形食品等が挙げられる。

本発明により測定できる食品検体中の測定対象物質としては、微生物、細菌、ウイルス、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、脂質、糖脂質、核酸、毒素、アレルギー等またはこれらの複合体等が挙げられ、低分子物質がこれらと結合したのも含まれるが、これらに限定されるものではなく、サンドイッチ免疫測定法又はこれに準じる方法で測定できるものは全て本発明の方法の測定対象物質に含まれる。

【0018】

環境サンプリング検体としては、土壌、河川、海水等の自然界のサンプルの他、工場内の生産ラインやクリーンルームに設置されたエアーサンプラーによるサンプリング検体や、ふき取り検体等も挙げられる。

30

本発明により測定できる環境サンプリング検体中の測定対象物質としては、微生物、細菌、ウイルス、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、脂質、糖脂質、核酸、毒素等またはこれらの複合体等が挙げられ、低分子物質がこれらと結合したものも含まれるが、これらに限定されるものではなく、サンドイッチ免疫測定法又はこれに準じる方法で測定できるものは全て本発明の方法の測定対象物質に含まれる。

【0019】

検体はそのまま本発明の方法に用いることもできるし、希釈や抽出等の処理を施した後に本発明に用いることもできる。

【0020】

サンドイッチ免疫測定法とは、測定対象物質に対して結合能を有する第2の抗体を固相に結合させたものと、測定対象物質に対して結合能を有するが、その結合に際して第2の抗体と競合しない第1の抗体を標識物質で標識したものを準備し、これらと測定対象物質を含む検体を反応させて、測定対象物質が前記2種類の抗体によりサンドイッチ様に挟み込まれた免疫複合体を固相表面上に形成させた後、標識物質を検出することを含む方法をいう。また、測定対象物質に結合する抗体がポリクローナル抗体である場合には、該ポリクローナル抗体は測定対象物質の複数の部位に結合することができ得るので、測定対象物質のサンドイッチ様の挟み込みは3つ以上の抗体分子によりなされることもある。

40

【0021】

本発明において、第1抗体及び第2抗体が測定対象物質に対する結合に際して互いに競合しない関係とは、第1抗体及び第2抗体がそれぞれ測定対象物質の異なるエピトープに

50

結合する関係、第1抗体がモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体で第2抗体がポリクローナル抗体であって、第2抗体は第1抗体と同一のエピトープに結合する抗体を含むが、異なるエピトープに結合する抗体も含む関係をいう。

【0022】

本発明における抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよいが、安定した品質の抗体を安定して供給するためには、モノクローナル抗体であることが好ましい。また、本発明における抗体には、抗体をペプシンやババインのようなタンパク質分解酵素で分解し、測定対象物質である抗原に対する結合性を維持した、F(a b')₂フラグメント、F a b'フラグメント、F a bフラグメントや、2本のH鎖同士を結びつけているジスルフィド結合を還元して解離させて、1本のH鎖と1本のL鎖からなるフラグメントとしたものも含まれる。また、本発明における抗体には、単鎖抗体やその2量体(ダイアボディー)もしくは3量体(トリアボディー)、又はミニボディーも含まれる。本発明に使用する抗体として、一般的に用いられているマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、トリ由来のもの等が使用できるがこれらに限定されず、測定対象物質に特異的に結合する抗体であれば何れも使用できる。

10

【0023】

本発明に用いられる標識物質としては、酵素、放射線同位元素、蛍光物質、発光物質、金コロイド等が挙げられる。標識物質のなかでも、西洋わさび過酸化酵素(HRP)や、アルカリフォスファターゼ(AP)標識がより好ましい。標識にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、酵素の基質としてAMPDP(3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩)、9-(4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン)-10-メチルアクリダン二ナトリウム塩等の発光基質を使用することができる。また、FITC(fluorescein isothiocyanate)、ローダミン等の蛍光色素等を使用することができる。

20

【0024】

互いに親和性を有する2種類の結合材の組み合わせは、アビジンとビオチン、ストレプトアビジンとビオチン、プロテインAとIgG、プロテインGとIgG、カルボキシル基+縮合剤と蛋白質、受容体とこれに結合するリガンド、核酸とこれに結合する相補的な核酸、レクチンとこれに結合する特異的な糖鎖等が挙げられる。親和性の高さや反応速度等から、アビジンとビオチン、ストレプトアビジンとビオチンの組み合わせがより好ましい。

30

【0025】

本発明において、磁性粒子は固相として用いられる。該磁性粒子は、例えば、特表2002-517085号公報等を開示された方法によって製造することができる。すなわち、鉄(II)化合物、または鉄(II)化合物及び金属(II)化合物を含有する水溶液を、磁性酸化物の形成のために必要な酸化状態下に置き、溶液のpHを7以上に維持して、酸化鉄、またはフェライト磁性体ナノ粒子を形成する方法である。また、金属(II)化合物含有の水溶液と鉄(III)化合物含有の水溶液をアルカリ性条件下で混合することによっても製造することができる。

40

【0026】

あるいは、磁性粒子は、多価アルコールとマグネタイトから製造することもできる。この多価アルコールは、構成単位に水酸基を少なくとも2個有し、鉄イオンと結合可能なアルコール構造体であれば、特に制限なく使用することができる。例えば、デキストラン、ポリビニルアルコール、マンニトール、ソルビトール、シクロデキストリン等が挙げられる。例えば、特開2005-082538号公報に、デキストランを用いた磁性粒子の製造方法が開示されており、この方法によって製造することもできる。また、グリシジルメタクリレート重合体のように、エポキシ基を有し、開環後多価アルコール構造体を形成する化合物も使用できる。

【0027】

50

磁性粒子は、良好な分散性を有するように、その平均粒径が、1～1000nmであることが好ましい。特に、磁性粒子表面の第2抗体と検出対象物質との反応速度を高めるためには、平均粒径が50～200nmであることが好ましい。粒子径測定は光散乱で行うことができ、このような粒子径測定を行える機器としては、ELS-8000（大塚電子株式会社製）が挙げられる。

【0028】

磁性粒子は、その平均粒径が1000nm以下であると、磁集に時間を要する。そこで、磁集速度を速めるために、刺激応答性高分子による表面修飾磁性粒子を使用することが好ましい。刺激としては、温度変化、pH変化等が挙げられる。例えば、温度応答性高分子で表面修飾した磁性粒子は、加熱または冷却により温度応答性高分子が凝集するために、磁性粒子が凝集塊を生成し、短時間で磁集が可能になる（特開2005-082538号公報）。このような温度応答性高分子表面修飾磁性粒子として、マグナビート社の「Therma Max（登録商標）」等が挙げられる。温度応答性高分子表面修飾磁性粒子の温度応答範囲は免疫反応に差し支えなければ特に限定しないが、例えば、下限臨界溶液温度を持つ該磁性粒子を用いる場合は25 から40、より好ましくは30 から37のものが好適に用いられる。

また、温度変化だけでなく、凝集剤を用いることで、凝集塊を生成させることもできる。凝集剤としては、例えば、硫酸リチウム、硫酸カリウム、硫酸ナトリウム等の硫酸金属塩等や、酢酸ナトリウムやクエン酸ナトリウム等のカルボン酸金属塩等が利用できる。凝集剤を使用して生成した凝集塊は、加熱または冷却により生成した凝集塊と同様に短時間で磁集が可能になる。

【0029】

また、特開2006-242597号公報には、ポリオキシエチレンアルキルエーテル酢酸で表面修飾した粒径1nm以上50nm以下の磁性粒子が開示されている。このようなポリオキシエチレンアルキルエーテル酢酸で表面修飾した磁性粒子は、クエン酸-リン酸緩衝液により凝集塊を生成し、磁集が可能になる。以上のように平均粒径が1000nm以下で良好な分散性を有し、かつ短時間で磁集可能な磁性粒子が好ましい。

【0030】

磁性粒子は、互いに親和性を有する2種類の結合材の組み合わせのうち一方を結合させて用いる。例えば、第2抗体にビオチンが結合されている場合は、アビジンまたはストレプトアビジンを結合した磁性粒子を使用し、第2抗体にアビジンが結合されている場合は、ビオチンを結合した磁性粒子を使用し、第2抗体にストレプトアビジンが結合されている場合は、ビオチンを結合した磁性粒子を使用する。

【0031】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

【0032】

本発明の第1の測定方法では、まず、測定対象物質を含む検体と、標識物質で標識された第1抗体とを混合して、検体中の測定対象物質と第1抗体とを反応させる。その際の反応時間は、好ましくは30秒以上、より好ましくは1分以上である。次に互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した第2抗体と他方が結合した磁性粒子との混合液を添加して、測定対象物質と標識された第1抗体からなる複合体と第2抗体とを反応させる。その際の反応時間に特に制限はないが、好ましくは10分以下、より好ましくは5分以下であり、3分以下、1分以下、30秒以下、10秒以下であってもよい。その後、磁性粒子を回収し、後述する方法で標識物質を利用して、測定対象物質を定量する。

【0033】

本発明の第2の測定方法では、まず、測定対象物質を含む検体と、標識物質で標識された第1抗体とを混合して、検体中の測定対象物質と第1抗体とを反応させる。その際の反応時間は、好ましくは30秒以上、より好ましくは1分以上である。次に互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した第2抗体を添加して、測定対象物質と標識された第1抗体からなる複合体と、第2抗体を反応させる。その際の反応時間に特に制限はない

が、好ましくは10分以下、より好ましくは5分以下であり、3分以下、1分以下、30秒以下、10秒以下であってもよい。続いて該結合材の他方が結合した磁性粒子を添加して、2種類の結合材を反応させる。その際の反応時間に特に制限はないが、好ましくは10分以下、より好ましくは5分以下、好ましくは3分以下であり、1分以下、30秒以下、10秒以下であってもよい。その後、磁性粒子を回収し、後述する方法で標識物質を利用して、測定対象物質を定量する。

【0034】

本発明の第3の測定方法では、まず、測定対象物質を含む検体と、標識物質で標識された第1抗体とを混合して、検体中の測定対象物質と第1抗体とを反応させる。その際の反応時間は、好ましくは30秒以上、より好ましくは1分以上である。次に互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した磁性粒子を添加する。続いて該結合材の他方が結合した第2抗体を添加して、測定対象物質と標識された第1抗体からなる複合体と第2抗体の反応と、2種類の結合材の反応を同時に進行させる。その際の反応時間に特に制限はないが、好ましくは10分以下、より好ましくは5分以下であり、3分以下、1分以下、30秒以下、10秒以下であってもよい。その後、磁性粒子を回収し、後述する方法で標識物質を利用して、測定対象物質を定量する。

10

【0035】

上述した3つの測定方法のうち第1の測定方法では、あらかじめ、互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した第2抗体と他方が結合した磁性粒子とを混合した混合液を使用するため、試薬を添加するステップを少なくでき、測定時間がより短縮でき得るので好ましい。この場合において、第2抗体と磁性粒子が、2種類の結合材を介して結合したものだけを分離精製して保存しておき、結合していない遊離の第2抗体及び遊離の磁性粒子を実質的に含まない溶液を添加することも本発明に含まれる。

20

【0036】

上記した本発明の第1～第3のいずれの測定方法でも、標識物質で標識された第1抗体と、磁性粒子の結合した第2抗体とで検体中の測定対象物質をサンドイッチ様に挟み込んだ複合体を得ることができる。この複合体を磁集し、洗浄して共雑物を除去し、複合体中の標識を利用して測定対象物質の濃度を定量する。磁性粒子として温度応答性高分子表面修飾磁性粒子を用いる場合には、反応混合物の温度を上昇させた後、又は凝集剤を添加した後に、磁集を行うことができる。標識物質の検出は、磁集した複合体を再度水やバッファ等に分散させて、溶液中の標識物質濃度を均一にしてから行うこともできるし、複合体を磁集したままの状態、又は別の位置に磁集して、局所的に標識物質の濃度を高めて検出することもできる。

30

【0037】

測定対象物質の定量方法は、標識の方法によって異なり、例えば、標識物質として蛍光物質を用いた場合、その蛍光強度を測定することで測定対象物質を定量することができるし、標識物質としてアルカリフォスファターゼ、HRP、グルコースオキシダーゼ等を用いた場合には、発色基質や発光基質を添加することで、吸光度や発光強度の変化を測定して測定対象物質を定量することができる。また、標識物質として放射性同位元素を用いた場合には放射能を測定することで測定対象物質を定量することができるし、標識物質として金コロイドを用いた場合には、吸光度を測定することで測定対象物質を定量することができる。これらの標識物質の測定方法は当業者に周知の方法で行うことができる。本発明に好適な標識物質としては、アルカリフォスファターゼが挙げられ、AMPDP(3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩)、9-(4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン)-10-メチルアクリダンナトリウム塩等の発光基質を添加して発光強度を測定することで測定対象物質を定量することができる。

40

【0038】

反応を行う温度、反応混合物、洗浄液等の組成、pH等は、一般的に行われるサンドイッチ免疫測定法に使用する条件でよい。反応温度としては、25～40℃が好ましく、3

50

0 ~ 37 がより好ましい。また、温度応答性高分子表面修飾磁性粒子を用いる場合は、温度応答性高分子が凝集しない温度で反応を行うことが好ましい。反応混合物、洗浄液としては、使用する標識物質に影響を与えないことが好ましく、例えば標識物質が酵素の場合には、酵素活性を阻害しないものを選択する必要がある。検出にアルカリフォスファターゼを使用するのであれば、一般的な、Trisバッファー、PIPESバッファー等を使用することができるし、これらのバッファーに塩や、Tween、Triton等の非イオン性の界面活性剤を加えたもの、アルブミンやカゼイン等を添加したものをを用いることもできる。測定に適した反応混合物や洗浄液の組成は、測定対象物質や使用する試薬の性質により変化し得るが、当業者が通常行う手段によって最適化することができる。

【0039】

本発明の方法は、用手法で行うこともできるし、専用の自動分析機で行うこともできる。

【実施例】

【0040】

以下BNPの測定に関する実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0041】

BNPは、心臓（主に心室）から分泌されるホルモンであり、健常者の血中BNP濃度は20 pg/mL以下であるが、心疾患または心不全の患者では重篤度によって濃度が上昇することが知られている。自覚症状のない軽度の患者の血中のBNP濃度も上昇することが知られている。

【0042】

〔実施例1〕

標識物質で標識された第1抗体として、アルカリフォスファターゼ標識抗BNP抗体（以下「R2抗体」と略すことがある）、互いに親和性を有する2種類の結合材の一方が結合した第2抗体としてビオチン標識抗BNP抗体（以下「R1抗体」と略すことがある）、及び互いに親和性を有する2種類の結合材の他方が結合した磁性粒子としてアビジンを固定した磁性粒子を用い、サンドイッチ免疫測定法によりBNPを定量した。

【0043】

検体である標準BNP試薬（塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP（商品名）、標準BNP試薬）をマイクロチューブに65 µL分注した。ここに、R2抗体（塩野義製薬株式会社、MI02シオノギBNP（商品名）、BNP第二抗体試薬）0.2 µLと標準試薬O（塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP（商品名）、標準BNP試薬、BNP不含）12.8 µLの混合液13 µLを加えてピペッティングにて攪拌し、30 で5分間、反応させた。

【0044】

反応が終了した検体とR2抗体との反応混合物に、R1抗体（塩野義製薬株式会社、MI02シオノギBNP（商品名）、BNP第一抗体試薬）0.2 µLと標準試薬O1.8 µLと磁性粒子（マグナビート株式会社製、Therma-Max（登録商標）LAAvidin、商品コードTML001、濃度4 mg/mL、平均粒径110 nm）20 µLを混合液として用意し、22 µL添加した。ここで、30 で5分間、反応させる工程を設けてもよいが、今回は、この工程を省略した。

【0045】

続いて、反応混合物に凝集剤30 µLを加え、ピペッティングにて攪拌し、30 で30秒反応後、Magna-Stand6（（商品名）、マグナビート株式会社、商品コードTMM001）にセットし、30 で1分間、磁気分離し、その後、上清を除去した。洗浄液（塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP（商品名）、ブロック液）100 µLにて沈殿物を再分散し、凝集剤30 µLを加えピペッティングにて攪拌し、30 で30秒反応後、30 で1分間、磁気分離し、洗浄を行なった。洗浄は同様の手順で2回繰り返した。最後に洗浄液100 µLにて沈殿物を再分散し、全量をマイクロプレートに

10

20

30

40

50

移し、APS-5 (Lumigen社製、商品コードAP5-101) 100 µLを混合し、5秒間攪拌した後、10秒反応させ、マルチラベルプレートリーダー (ベルトールドジャパン株式会社製、Mithras LB940 (商品名)) にて0.1秒間発光強度を測定した。測定結果を表1に示した。ここでは、凝集剤として、1M Na₂SO₄水溶液を用いた。

【0046】

【表1】

表1

BNP (pg/mL)	平均値 (N=12)	SD値	CV%
0	82	8	9.7
2	155	8	5.2
4	216	6	2.9
10	450	13	2.9
40	1489	43	2.9
150	5500	248	4.5
600	21715	868	4.0
2000	72822	2777	3.8

10

20

【0047】

最小検出濃度 (MDC値) 0.44 pg/mL

最小検出濃度は以下の方法で算出した。

(最小濃度 × 2SD / 最小濃度時の平均値 - 濃度0時の平均値)

【0048】

〔比較例1〕

比較例として、検体に磁性粒子とR1抗体及び、R2抗体の混合物を添加して、従来のサンドイッチ法によりBNPを定量した例を示す。

30

【0049】

磁性粒子、R1抗体、R2抗体同時混合サンドイッチ法

測定方法は、以下の通りである。検体として標準BNP試薬 (塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP (商品名)、標準BNP試薬) をマイクロチューブに65 µL分注した。ここに、R1抗体 (塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP (商品名)、BNP第一抗体試薬) 2 µL、R2抗体 (塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP (商品名)、BNP第二抗体試薬) 0.5 µLと標準試薬O (塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP (商品名)、標準BNP試薬) 12.5 µLと磁性粒子 (マグナビート株式会社製、Therma-Max (登録商標) LA Avidin、商品コードTML001、濃度4 mg/mL、平均粒径110 nm) 20 µLの混合液を35 µL加えてピペティングにて攪拌し、30 で5分間反応させた。反応終了後、反応混合物に凝集剤30 µLを加えてピペティングにて攪拌し、30 で30秒反応後、Magna-Stand 6 (商品名)、マグナビート株式会社製、商品コードTMM001) にセットし、30 で1分間磁気分離し、その後、上清を除去した。洗浄液 (塩野義製薬株式会社製、MI02シオノギBNP (商品名)、ブロック液) 100 µLにて沈殿物を再分散し、凝集剤30 µLを加えてピペティングにて攪拌し、30 で30秒反応後、30 で1分間磁気分離し、洗浄を行なった。洗浄は同様の手順で2回繰り返した。最後に洗浄液100 µLにて沈殿物を再分散し、全量をマイクロプレートに移し、APS-5 (Lumigen社製、商品コードAP5-101) 100 µLを混合し、5秒間攪拌した後

40

50

、10秒反応させ、マルチラベルプレートリーダー（ベルトールドジャパン株式会社製、Mithras LB940（商品名））にて0.1秒間発光強度を測定した。測定結果を表2に示した。ここでは、凝集剤として、1M Na₂SO₄水溶液を用いた。

【0050】

【表2】

表2

BNP (pg/mL)	平均値 (N=2)	SD値	CV%
0	328	48	14.5
2	498	42	8.3
4	645	53	8.2
10	1189	70	5.8
40	3556	66	1.9
150	11759	45	0.4
600	44089	584	1.3
2000	127345	887	0.7

10

20

【0051】

最小検出濃度(MDC値)0.98pg/mL

【0052】

実施例1では、R2抗体0.2μL及びR1抗体0.2μLを用いた。これに対して比較例1ではR2抗体0.5μL及びR1抗体2μLを用いた。これらを同じ測定時間で比較すると、表1及び表2の結果からわかるように、実施例1の測定方法は比較例1の測定方法よりも低い最小検出濃度を示していることがわかる。つまり測定時間を一定に設定した場合、本発明の測定方法は高感度にBNPを測定可能であるのに加えて、抗体の使用量が少なく、安価に測定することができた方法である。

30

【産業上の利用可能性】

【0053】

本発明の方法は、少ない試薬量で、短時間に、高精度且つ高感度に測定結果を出すことができるため、臨床分野、産業分野での利用が考えられる。本発明は、特にPOCT分野に適した測定方法であり、例えばBNPの検査に利用することができる。

フロントページの続き

- (72)発明者 高橋 由貴
千葉県市原市五井海岸 5 番地の 1 チッソ石油化学株式会社五井研究所内
- (72)発明者 謝 小毛
千葉県市原市五井海岸 5 番地の 1 チッソ石油化学株式会社五井研究所内
- (72)発明者 松井 景明
千葉県市原市五井海岸 5 番地の 1 チッソ石油化学株式会社五井研究所内