

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4521946号
(P4521946)

(45) 発行日 平成22年8月11日 (2010. 8. 11)

(24) 登録日 平成22年6月4日 (2010. 6. 4)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 A

請求項の数 3 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2000-227653 (P2000-227653)	(73) 特許権者	390014960
(22) 出願日	平成12年7月27日 (2000. 7. 27)		シスメックス株式会社
(65) 公開番号	特開2002-40025 (P2002-40025A)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
(43) 公開日	平成14年2月6日 (2002. 2. 6)		1号
審査請求日	平成19年7月24日 (2007. 7. 24)	(74) 代理人	100088867
前置審査			弁理士 西野 卓嗣
		(72) 発明者	小田原 卓哉
			兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際
			試薬株式会社 研究開発センター内
		(72) 発明者	石川 榮治
			兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際
			試薬株式会社 研究開発センター内
		(72) 発明者	竹中 久師
			兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際
			試薬株式会社 研究開発センター内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

磁性粒子及び標識リガンドを用いて、液体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応を利用する測定方法において、少なくとも1つのリガンドを固定した磁性粒子、標識リガンド及び被検物質の反応により磁性粒子上に形成された複合体の標識物質を含む少なくとも一部を磁性粒子上から遊離させることを所定の容器内で実行する工程と、前記遊離を実行した後に磁性粒子を前記容器の底部または側部に集磁する工程と、磁性粒子が集磁された状態で前記容器中の前記遊離した複合体の標識物質に基づくシグナルの測定を行う工程と、からなることを特徴とする被検物質の測定方法。

【請求項 2】

液体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応が少なくとも抗原抗体反応、又は核酸のハイブリダイズ反応である請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】

標識リガンドに使用する標識物質が、酵素、蛍光物質、発光性物質、または放射性物質である請求項 1 または請求項 2 に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は臨床検査に用いられ、主として免疫測定法を用いた検査及び遺伝子検査に用いられる。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

抗原抗体反応を利用する免疫測定法は広く利用されている。これらの中でも酵素や発光性物質を標識物質に用いた標識リガンドとリガンド（被検物質に対する相補物）を固相上に不溶化した固相を組み合わせる用いる免疫測定法は、高感度に物質を定量することが可能であるため、常用されている。

【 0 0 0 3 】

この方法では固相の材質及び形状と標識物質の選択により、その測定方法の性能が大きく異なってくる。現在一般に用いられている固相には、マイクロタイタープレート、チューブ、磁性粒子等がある。

10

【 0 0 0 4 】

一方、シグナルを計測する方法には、標識物質に酵素を用いた比色、蛍光、発光及び発光性物質を直接リガンドに標識する発光法等が利用されている。一般的に実施されている分析方法は、被検物質を含む試料と固相及び標識リガンドを反応させ、固相上に形成された複合体の標識物質の量を比色、蛍光或いは発光測定により求める方法である。

【 0 0 0 5 】

固相と指示反応の組み合わせの特色を考えると、マイクロタイタープレート及びチューブのような容器表面を固相に用いる場合には、固相表面積が限定されることと、反応液の一部のみが固相表面のリガンドと接触できるだけで、反応液中の全ての物質が接触できないため反応時間が多く必要であったり、感度が低いといった問題点がある。

20

【 0 0 0 6 】

一方、磁性粒子のような微粒子を固相に使用する場合には、マイクロタイタープレートやチューブの欠点を補うことが可能であり、高感度或いは反応時間の短縮が可能である。しかしながら、磁性粒子の光学的特性のため、すなわち、濁度或いは不透明性のため、指示反応の信号を計測する方法に制限があるといった問題点があった。

【 0 0 0 7 】

例えば、磁性粒子固相を用いて、化学発光性物質を標識に用いて発光測定をした場合、磁性粒子を懸濁させて化学発光反応を起こさせ、その発光強度を光電管で測定することになる。磁性粒子は一般に茶褐色であるため、発光された光が磁性粒子に、吸収されるためシグナルの利得率が低くなるといった問題があった。

30

【 0 0 0 8 】

この問題は、磁性粒子固相と指示反応が持続発光測定又は吸光或いは蛍光の経時的変化量測定（反応速度測定）の組み合わせにおいて特に問題であった。すなわち、濁度を持った磁性粒子を反応液中で分散させたままシグナルを計測する場合に特に問題となった。

【 0 0 0 9 】

また、反応速度及び反応効率を高めるため、多孔性のマトリックス固相や粒子状固相も利用されている。これらの場合にも、多孔性マトリックス内部のシグナルを如何に取り出すか、あるいは粒子の光学的測定におよぼす影響を如何に回避するかといった問題があった。

【 0 0 1 0 】

一方、免疫測定の感度を上昇させる手段として、固相に形成された標識リガンドを含む抗原抗体複合体を特異的に固相より分離して測定する方法（特開平2-73158）及び分類した複合体を再度別の固相にトラップして測定する方法（特開平1-254868及び特開平2-28558）が開示されている。これらは何れも、固相に形成された被検物質に特異的な標識リガンドを含む抗原抗体複合体を非特異的に固相に吸着した標識リガンドと分離して測定することによりバックグラウンドシグナルを低減させることにより感度上昇を期待する方法であるが、特異的な解離剤の選択や解離効率或いは操作の煩雑さから実用化には至っていない。

40

【 0 0 1 1 】

【解決しようとする課題】

本発明の目的は固相及び標識リガンドを用いて、流体試料中の被検物質と特異的リガンド

50

対を形成する反応を利用する測定方法において、固相上に形成される標識リガンドを含む抗原抗体複合体の量を測定するに際して、得られるシグナルを最大限獲得及び利用する方法及びその方法を用いる測定試薬を提供することである。

【 0 0 1 2 】

【解決する手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、磁性粒子及び標識リガンドを用いて、液体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応を利用する測定方法において、少なくとも1つのリガンドを固定した磁性粒子、標識リガンド及び被検物質を反応させた後、その結果磁性粒子上に形成された複合体の標識物質を含む少なくとも一部を磁性粒子上から遊離させることを所定の容器内で実行する工程と、磁性粒子を前記容器の底部または側部に集磁する工程と、磁性粒子が集磁された状態で前記容器中の前記遊離した複合体の標識物質に基づくシグナルの測定を行う工程と、により実質的に磁性粒子によるシグナル測定への影響を軽減できることを見出し、そのことにより得られるシグナルを最大限獲得及び利用できることを見出し本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 3 】

すなわち本発明は、

- 1．磁性粒子及び標識リガンドを用いて、液体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応を利用する測定方法において、少なくとも1つのリガンドを固定した磁性粒子、標識リガンド及び被検物質の反応により磁性粒子上に形成された複合体の標識物質を含む少なくとも一部を磁性粒子上から遊離させることを所定の容器内で実行する工程と、前記遊離を実行した後に磁性粒子を前記容器の底部または側部に集磁する工程と、磁性粒子が集磁された状態で前記容器中の前記遊離した複合体の標識物質に基づくシグナルの測定を行う工程と、からなることを特徴とする被検物質の測定方法、
- 2．液体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応が少なくとも抗原抗体反応、又は核酸のハイブリダイズ反応である前項1に記載の測定方法、
- 3．標識リガンドに使用する標識物質が、酵素、蛍光物質、発光性物質、または放射性物質である前項1または2に記載の測定方法、からなる。

【 0 0 1 4 】

【発明の実施の態様】

本発明において、流体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応とは、抗原抗体反応、核酸のハイブリダイズ反応、蛋白質・受容体間反応等を含む被検物質とその相補物質と相補的反応を意味する。例えば、臨床検査の分野で広く実施されている、抗原抗体反応を用いる免疫測定や遺伝子診断において利用されている相補的反応に適用される。なお本発明において、リガンドとは測定目的の被検物質に対する相補的結合能を有する物質を意味する。

【 0 0 1 5 】

免疫反応及び核酸のハイブリダイズ反応以外の例としては、ビオチン及びその類縁体とアビジン或いはストレプトアビジン、ヘモグロビンとハプトグロビン、ヘパリンとアンチトロンビン-III、レクチンと糖鎖等のリガンド対も応用できる。

【 0 0 1 6 】

標識リガンドを調製するための標識物質は、酵素、蛍光物質、発光性物質、または放射性物質等が用いられる。具体的には、酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコース脱水素酵素、ルシフェラーゼ等が用いられる。蛍光物質の例としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ユーロピウムキレート等の希土類元素のキレート等が挙げられる。発光性物質の例としては、アクリジニウムエステル誘導体、エクオリン等が利用できる。その他放射性同位元素或いは蓄光体や蛍光微粒子を標識物質として用いることも可能である。

【 0 0 1 7 】

本発明に用いられるリガンドを固定化する固相は、磁性粒子、多孔性マトリックス固相、例えば多孔性メンブラン、濾紙、多孔性プラスチック等、合成樹脂製粒子、金属粒子等、

固相より標識リガンドを含む複合体の少なくとも一部を分離できるものであれば特に限定されない。

【0018】

本発明による固相上に反応により形成された複合体、例えば標識リガンドを含む抗原抗体複合体を固相上から遊離する具体的な手段としては、固相上に形成された複合体の標識物質含む少なくとも一部を超音波により固相上から遊離させる手段が利用できる。超音波以外にも、ミキサー等による機械的な振動、尿素、塩化マグネシウム溶液、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒等の非特異的抗原抗体複合体の解離剤も用いることができる。

【0019】

遊離の度合いは、処理時間を長くすると遊離は進むが標識が失活する可能性があり、最適処理時間は実験的繰り返しにより個々決定される。

10

【0020】

標識から生じるシグナルは、固相である粒子により妨害され検出部での利得率が低下する。そのため粒子を検出に影響のないように分離をする必要がある。分離の方法は、粒子による標識から生じるシグナルの検出の妨害を防ぐ手段であれば、特に制限されない。例えば、検出に影響を与えないように粒子を集めるフィルター付きのピペット等で吸引し、粒子と分離する等の手段が例示される。

【0021】

さらに、本発明は、上記の測定方法を実施のために調製される測定試薬をも含む。

【0022】

20

本発明をより具体的に説明するために、以下の実施態様を例に説明する。

固相として、粒径 $0.1\mu\text{m}$ ～ $5\mu\text{m}$ の磁性粒子表面に被検物質に対する抗体（抗原）を固定化する。固定化する方法は、公知の化学結合法或いは物理吸着法が適用できる。

【0023】

固定化した磁性粒子は必要に応じて、牛血清アルブミン、カゼイン等の蛋白質でブロッキングしたのち、適当な緩衝液に懸濁させて反応に用いる。被検試料と磁性粒子の懸濁液を混合し一定時間反応させた後、未反応の物質を除去する目的で、適当な緩衝液で洗浄する。洗浄後、アルカリ性ホスファターゼ標識抗体（抗原）液を固相に加え、懸濁させ反応させる。一定時間反応させた後、再度洗浄して、未反応のアルカリホスファターゼ標識抗体（抗原）を除去し、固相上に標識物を含む抗原抗体複合体を形成させる。

30

【0024】

その固相にアルカリ性ホスファターゼの持続発光基質であるアダマンチル1.2 - ジオキセタンフェニルリン酸誘導体（AMPPD誘導体）を含む基質溶液を加えて、超音波処理を施す。

【0025】

超音波処理は28KHzの超音波を15秒間照射し、標識物を含む複合体を固相より分離させた後、予め、反応容器の低部又は側面のシグナルを測定する際に邪魔にならない適当な位置に磁石を用いて磁性粒子を集めておき、発光測定の妨害にならないようにして、発光強度を測定することができる。

【0028】

40

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0029】

【実施例1】

（材料の調製）

水溶性カルボジイミドを用いてカルボキシ基を活性化した磁性粒子と抗HBsモノクローナル抗体（クローンNo. HBs740）をカップリングさせて抗HBs抗体固定化磁性粒子を調製した。その粒子を、緩衝液で洗浄、牛血清アルブミンでブロッキング処理し、最終の粒子濃度が1%（w/v）となるように粒子濃度を調製した。

50

【 0 0 3 0 】

抗HBsモノクローナル抗体（クローンNo. HBs 85）にアルカリ性ホスファターゼを公知の方法で結合させ、アルカリ性ホスファターゼ標識抗HBs抗体を調製した。

【 0 0 3 1 】

（HBs抗原の測定）

固相懸濁液100 μ Lを試験管に採り、試験管外壁より磁界を与えて、磁性粒子固相を磁気分離し上清を除去した。その磁性固相に、5 IU/mLのHBs抗原を含む溶液及びHBs抗原を含まない溶液を各100 μ Lずつを加え混和した。室温で10分間静置条件下で反応させた後、試験管外壁より磁界を与えて、磁性粒子固相を磁気分離し上清を除去した。次いで、100 μ Lのアルカリホスファターゼ標識抗HBs抗体液を添加し攪拌後37 $^{\circ}$ Cで10分間静置反応させた後、磁気分離により上清を除去し、400 μ Lの洗浄液で3回洗浄後、100 μ Lの基質用緩衝液（pH9.8）を加え、攪拌混合した。

10

【 0 0 3 2 】

その後、200 μ LのAMPPD誘導体基質原液を加える前に、15秒間超音波処理したものと、しないもので、それぞれ37 $^{\circ}$ C 10分間反応後の発光強度を測定した。超音波処理したものは、固相を分離除去した後、AMPPD誘導体基質原液を加えて発光強度を測定した。一方未処理のものは、AMPPD誘導体基質原液を加えて、磁性粒子を懸濁させた状態で測定した。その結果を表1に示した。

【 0 0 3 3 】

（表1）超音波処理効果

20

	（カウント）	
	超音波処理	未処理
ブランク（HBs、0 IU/mL）	5,738	69
HBs、5 IU/mL	17,836	2,188
正味のシグナル	17,262	2,119

【 0 0 3 4 】

以上の結果より、超音波処理により固相より標識リガンドを含む複合体を遊離・分離させたものは、遊離・分離させないものに比べて6倍以上のシグナルを得ることができ、通常では計測できない低値領域でも計測可能であることが判った。

30

【 0 0 3 5 】

【実施例2】

超音波処理を行なう代わりに6Mの尿素溶液を用いて固相より標識リガンドを含む複合体を遊離・分離させる方法を用いた以外は実施例1に示した方法と同様に操作し、尿素による複合体の遊離・分離効果を確認した。その結果を表2に示した。

【 0 0 3 6 】

（表2）尿素処理効果

40

	（カウント）	
	6M尿素処理	未処理
ブランク（HBs、0 IU/mL）	556	103
HBs、5 IU/mL	14,834	2,928
正味のシグナル	14,278	2,825

【 0 0 3 7 】

以上の結果より、尿素処理により固相より標識リガンドを含む複合体を遊離・分離させたものは、遊離・分離させないものに比べて5倍以上のシグナルを得ることができ、超音波

50

処理と同様の効果があることが判った。

【 0 0 3 8 】

【発明の効果】

本発明の効果は磁性粒子及び標識リガンドを用いて、液体試料中の被検物質と特異的リガンド対を形成する反応を利用する測定方法において、少なくとも1つのリガンドを固定化した磁性粒子、標識リガンド及び被検物質を反応させた後、その結果磁性粒子上に形成された複合体の標識物質を含む少なくとも一部を磁性粒子上から遊離させることを所定の容器内で実行する工程と、磁性粒子を前記容器の底部または側部に集磁する工程と、磁性粒子が集磁された状態で前記容器中の前記遊離した複合体の標識物質に基づくシグナルの測定を行う工程と、により実質的に磁性粒子によるシグナル測定への影響を軽減でき、そのことにより得られるシグナルを最大限獲得及び利用できることである。すなわち、磁性粒子上に形成された標識物質を含む複合体を磁性粒子より溶液中に遊離させ、溶液中の標識物質の量を磁性粒子の存在有無に拘わらず測定可能になる。そのことにより磁性粒子のシグナル測定への影響を回避することができる。

フロントページの続き

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 1 0 5 2 3 6 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)