

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4830114号  
(P4830114)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 N 33/531 (2006.01)** GO 1 N 33/531 B  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 4 5 M

請求項の数 5 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2007-84314 (P2007-84314)	(73) 特許権者	504155293 国立大学法人島根大学 島根県松江市西川津町1060
(22) 出願日	平成19年3月28日(2007.3.28)	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
(65) 公開番号	特開2008-241551 (P2008-241551A)	(74) 代理人	100076510 弁理士 掛樋 悠路
(43) 公開日	平成20年10月9日(2008.10.9)	(74) 代理人	100108084 弁理士 中野 睦子
審査請求日	平成21年10月14日(2009.10.14)	(72) 発明者	大谷 浩 島根県出雲市塩冶町89-1 国立大学法人島根大学医学部内
		(72) 発明者	八田 稔久 島根県出雲市塩冶町89-1 国立大学法人島根大学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 汎用的高感度ELISA法およびその試薬キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(a)および(b)の試薬をそれぞれ個別に包装された形態で含む、アミノプレートELISA法のためのELISA試薬キット：

(a) 抗原固相化用緩衝液としてTris-buffered saline、

(b) ブロッキング剤としてポリエチレンイミン

【請求項2】

さらにアミノプレートを含有する、請求項1に記載するELISA試薬キット。

【請求項3】

- 下記の工程(1)~(4)を有するアミノプレートELISA法であって、  
 (1)(a) 抗原固相化用緩衝剤の存在下で、アミノプレートに抗原を固定化する工程、  
 (2)(b) ブロッキング剤で、上記抗原固相化プレート进行处理する工程、  
 (3) 上記プレート上に固相化された抗原と標識抗体とを反応させる工程、および  
 (4) 形成された抗原-標識抗体を識別して、当該抗原-標識抗体を測定する工程、  
 - 上記の(a)抗原固相化用緩衝剤としてTris-buffered salineを用い、かつ上記の(b)ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いることを特徴とする、アミノプレートELISA法。

【請求項4】

(a) 抗原固相化用緩衝剤として、0.005~0.5MのTris-buffered salineを用いることを特徴とする、請求項3に記載するアミノプレートELISA法。

## 【請求項5】

(b)ブロッキング剤として、0.1~3重量%ポリエチレンイミンを用いることを特徴とする、請求項3または4に記載するアミノプレートELISA法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、汎用的に使用できしかも高感度な検出が可能なELISA法、ならびにその方法に使用される試薬キットに関する。特に本発明は、感度が高く汎用性に富むELISA法であるアミノプレートELISA法について、従来のノイズやオーバーブロッキング現象といった問題を解消し、より一層の高感度化を図ることによって少量試料での検出を可能にした、汎用的高感度ELISA法、ならびにその方法に使用される試薬キットに関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) は、抗原の量を抗原抗体反応を利用して測定する方法であり、従来から生化学的検査などで広く用いられている（例えば、非特許文献1など参照）。

## 【0003】

現在市販されているELISAキットでは、高感度であるという点から、コンペティション法、あるいはサンドイッチ法が主に用いられている。また、計測者自身により構築する汎用的なELISA法としては、ダイレクト法およびインダイレクト法がある。アミノプレート法はこのうちのダイレクト法に属する方法である。

20

## 【0004】

コンペティション法においては、大量の精製抗原が必要であり、コストがかかる。また、コンペティション法の測定原理は競合反応であり、それがアッセイ系の不安定性につながる。特に、計測者が競合ELISAを構築するとき、再現性の高い結果が得られる至適条件の設定が難しいという特徴がある。そのため低コストかつ簡便・汎用的でありながら高感度で安定した結果が得られるアッセイ系を構築するという目的には、コンペティション法はそぐわない。

## 【0005】

ダイレクト法は、プレートの表面に直接、タンパク質などの測定対象物である抗原（標的物）を固定化し、次いで標識抗体と反応させて、標識抗体と結合した抗原（標的物）の量を測定する方法である。この方法は、簡易で汎用的で低コストといった長所はあるものの、感度が低いと標的物の量が少ない試料の計測には向いていないという短所がある。この理由の一つとして、ダイレクト法は、標的物がプレート表面に直接付着しているため、エピトープがプレートの凹凸や他の夾雑物に囲まれてしまい、抗体と十分に反応できないことが挙げられる。またダイレクト法は、標的物がプレート表面に物理的に付着しているだけなので、プレートへの標的物の添加と洗浄を繰り返すことによる濃縮化、すなわち高感度化することが難しい。

30

## 【0006】

サンドイッチ法は、あらかじめプレート上に、標的物と特異的に反応する抗体を固定化しておき、この固相化抗体に抗原（標的物）を捕捉させ、次いでこれを標識抗体（二次抗体）と反応させて、当該標識抗体と結合した抗原（標的物）の量を測定する方法である。この方法は、抗原（標的物）に対する反応特異性を利用した方法であるため、一般的に高感度である。しかし、この長所が十分に享受できるのは、抗原（標的物）を含む試料が十分量ある場合である。すなわち、プレートへの試料の添加と洗浄を繰り返すことによって標的物をプレート上に濃縮できるほど、標的物を含む試料が十分量があることが必要となる。また、サンドイッチ法は、特異的な抗原抗体反応を利用するため汎用性に欠き、また高コストであるという短所がある（例えば、サンドイッチELISAキットは、プレート単位（1プレート96well）で3~10万円と高価である）。

40

## 【0007】

50

一方、アミノプレート法は、アミノ基と共有結合するように表面処理がなされたプレート（アミノプレート）を用いることによって、アミノ基を有する抗原（標的物）を、当該プレートに特異的に捕捉させ、次いでこれを標識抗体と反応させて、当該標識抗体と結合した抗原（標的物）の量を測定する方法である。このため、ペプチドやタンパク質（酵素および抗体を含む）などのアミノ基を有する標的物が高感度に検出できるという長所を有する。また、アミノ基を有する標的物を対象として汎用的に使用でき、しかも低コストであるという長所もある。すなわち、アミノプレート法は、前述するダイレクト法の長所である汎用性および低コスト性と、サンドイッチ法の長所である高感度とを兼ね備えた方法である。

#### 【0008】

しかし、抗原（標的物）を標識するために使用する標識抗体もまた、タンパク質であるため、標的物だけでなくプレート表面にも結合してしまい、これから生じるシグナル（非特異的反応シグナル）は、ノイズとなって標的物のシグナル（特異的反応シグナル）の検出感度を低下させてしまうという問題がある。

#### 【0009】

この問題を解消する方法として、抗原（標的物）をアミノプレートに固定化した後、標識抗体との反応前に、上記のプレート表面をカゼインやBSA等のブロッキング剤で処理して、標識抗体との非特異的結合を抑制（ブロック）する方法が用いられている。しかしながら、確かに、かかるブロッキング処理によって、アミノプレートと標識抗体との非特異的結合は抑制できるものの（ノイズの低下）、同時に抗原（標的物）と標識抗体との特異的結合までもが抑制され、検出シグナル（特異的反応シグナル）が低下することも知られている（これを「オーバーブロッキング現象」という）（非特許文献1参照）。

【非特許文献1】Tijssen P、石川栄治 訳：『エンザイムイムノアッセイ』、東京化学同人、8 345（1992）

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

本発明は、汎用的で低コストでありながらも、少量の試料で高感度な検出が可能なELISA法を提供することを目的とする。より詳細には、前述するアミノプレートELISA法において、アミノプレート表面における抗原（標的物）の固相化率を向上させ、および/または、上記アミノプレートと標識抗体との非特異的反応に起因して生じるノイズを有意に抑制することによって、少量の試料でより高い感度を有するELISA法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、かかる高感度ELISA法に使用される試薬キット、特に、抗原（標的物）をプレートに固定化する際に使用される抗原固相化用緩衝剤、および/またはブロッキング剤として、特定の試薬を含む試薬キットを提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明者らは、上記目的を達成するために日夜鋭意検討していたところ、アミノプレートELISA法において、上記抗原固相化用緩衝剤としてTBS（Tris-buffered saline）を用いることによって、アミノプレート表面への抗原（標的物）の固相化率が格段に上昇して、その結果、高い検出シグナル（特異的反応シグナル）が得られること、また、ブロッキング剤としてポリエチレンジアミンを用いることによって、アミノプレートと標識抗体との非特異的結合が抑制されてノイズが低下し、その結果、高い検出シグナル（特異的反応シグナル）が得られることを見出し、これらの試薬を用いることによって、より高感度で少量の試料の測定も可能なアミノプレートELISA法が実現できることを確認した。

#### 【0012】

本発明はかかる知見に基づいて完成されたものであり、下記の態様を含むものである。

#### 【0013】

#### （I）ELISA試薬キット

（I-1）下記の少なくとも1つの試薬を含む、ELISA試薬キット：

10

20

30

40

50

- (a) 抗原固相化用緩衝液としてTris-buffered saline (TBS)、  
 (b) ブロッキング剤としてポリエチレンイミン。

(I-2) アミノプレートELISA法のためのELISA試薬キットである、(I-1)に記載するELISA試薬キット。

(I-3) さらにアミノプレートを含有する、(I-1)または(I-2)に記載するELISA試薬キット。

【0014】

(II) アミノプレートELISA法

(II-1) 下記の工程(1)~(4)を有するアミノプレートELISA法であって、

(1)(a) 抗原固相化用緩衝剤の存在下で、アミノプレートに抗原を固定化する工程、

(2)(b) ブロッキング剤で、上記抗原固相化プレートを処理する工程、

(3) 上記プレート上に固相化された抗原と標識抗体とを反応させる工程、および

(4) 形成された抗原-標識抗体を識別して、当該抗原-標識抗体を測定する工程、

- 上記の(a) 抗原固相化用緩衝剤としてTBSを用いるか、

- 上記の(b) ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いるか、または、

- 上記の(a) 抗原固相化用緩衝剤としてTBSを用い、かつ、上記の(b) ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いることを特徴とする、アミノプレートELISA法。

(II-2) (a) 抗原固相化用緩衝剤として、0.005~0.5MのTBSを用いることを特徴とする、

(II-1)に記載するアミノプレートELISA法。

(II-3) (b) ブロッキング剤として、0.1~3重量%のポリエチレンイミンを用いることを特徴とする、(II-1)または(II-2)に記載するアミノプレートELISA法。

【発明の効果】

【0015】

本発明が提供する抗原固相化用緩衝剤(TBS)を用いたアミノプレートELISA法によれば、アミノプレートへの抗原の固相化率が向上するため、検出シグナル(抗原と標識抗体との特異的反応によって生じるシグナル)を上げることができる(高感度化)(実験例1参照)。また、本発明が提供するブロッキング剤(ポリエチレンイミン)を用いたアミノプレートELISA法によれば、アミノプレートと標識抗体との非特異的結合を抑制することができるため、ノイズを低下させることによって、特に低濃度領域の測定可能レンジを拡大し、検出限界を低下させることが可能となる(高感度化)(実験例2参照)。すなわち、抗原固相化用緩衝剤としてTBSを用い、および/または、ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いた本発明のアミノプレートELISA法によれば、測定対象となる標的物の量(抗原量)の少ない少量の試料を検体として、高感度な検出が可能となる。

【0016】

サンドイッチELISAは通常、プレート単位(1プレート96well)でキットとして販売されており、価格は3万円~10万円と高価である(高コスト)。またプレートにはあらかじめ抗体が固相化されていることから、当該抗体と反応する特定の抗原以外の検出に用いることができない(非汎用的)。たとえば、マウス胎児から採取したような少量の抗原試料の場合、わずかに数well分の計測のために、数万円もするプレートを一つ購入しなければならない。

【0017】

これに対して、本発明のアミノプレートELISA法は、抗原固相化用緩衝剤およびブロッキング剤として用いる試薬が安価に入手できるものであって、さらに、測定対象物(標的物)がアミノ基を有するものであればプレートに固相化することができるため、1枚のプレート(例えば、1プレート96wellなど)を多くの種類の標的物の検出に使用することができるため(汎用性)、1枚のプレートを最大限利用することができる(安価)。また、本発明のアミノプレートELISA法は、一回の標識抗体との反応により、サンドイッチELISA並みの高い感度を得ることができる(高感度)。

【0018】

すなわち、本発明によれば、安価で汎用性かつ高感度なELISA法、ならびにそれに使用

10

20

30

40

50

するELISA試薬キットの提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

#### I. ELISA試薬キット

本発明のELISA試薬キットは、アミノプレートELISA法において好適に使用される試薬であって、その内容成分として、下記の(a)または(b)のいずれか一方、または両方を含むことを特徴とする：

(a) 抗原固相化用緩衝剤として、Tris-buffered saline (TBS)

(b) ブロッキング剤としてポリエチレンイミン。

【0020】

より高い感度を実現するためには、(a)と(b)の両方を含むことが好ましい。

【0021】

#### (a) 抗原固相化用緩衝剤

本発明で、抗原固相化用緩衝剤として用いられるTris-buffered saline (TBS) は、Trizma (登録商標) base (SIGMA社) と塩化ナトリウムを水に溶解して調製される緩衝剤であり、例えば、10×TBS (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH7.6) は下記のようにして調製することができる。

【0022】

< 10×TBS (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH7.6) >

Trizma (登録商標) base (SIGMA社) 61 g

NaCl 90 g

蒸留水 1000 ml

上記の割合でTrizma (登録商標) baseと塩化ナトリウムを蒸留水に溶解して、塩酸を用いて、pH7.6に調整する。

【0023】

本発明で抗原固相化用緩衝剤として用いるTBSの濃度は、上記10×TBS (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH7.6) を基準として、通常その1/100~1倍希釈濃度 (0.1~10×TBS)、好ましくは1/50~1/10倍希釈濃度 (0.2~1×TBS) を挙げることができる。なお、本発明では上記濃度を、Tris Baseの濃度 (M) に対応させて、通常0.005~0.5M、好ましくは0.01~0.05Mと称する。

【0024】

本発明において抗原固相化用緩衝剤として用いるTBSは、上記pH7.6に限定されず、例えばpH5~11の範囲、好ましくはpH6~9.5にあるものを用いることができる。かかるpHには、上記のように塩酸を用いて調整することができる。

【0025】

抗原固相化用緩衝剤は、アミノプレートに測定する対象となる標的物 (抗原) を固定化させるときに用いられる緩衝剤であり、当該抗原固相化用緩衝剤として上記のTBSを用いることによって、アミノプレートへの抗原の固定率 (固相化率) を増大させることができる。なお、当該TBSは、標的物 (抗原) を固相化する際に、その系に共存していればよい。通常は、アミノプレートのウェルに注入する標的物 (抗原) を含む試料を、当該TBSを用いて調製することによって、上記の共存状態を実現できるが、これに限定されない。

【0026】

本発明のELISA試薬キット、特にアミノプレートELISA用の試薬キットは、当該TBSを、抗原固相化用緩衝剤として、個別に包装された形態で含むことができる。この場合、TBSは上記使用濃度に関わらず、保存安定性を考慮して濃縮された状態であってもよい。この場合は、使用時に上記濃度になるように、蒸留水、イオン交換水または滅菌水などを利用して、希釈して使用することができる。

【0027】

#### (b) ブロッキング剤

ブロッキング剤は、標的物 (抗原) を固相化したアミノプレートのウェルに標識抗体を添

10

20

30

40

50

加して標的物（抗原）と反応させる前に、あらかじめ当該アミノプレートを処理して、アミノプレートと標識抗体との非特異的な結合を抑制するために使用される試薬である。

【0028】

本発明においてブロッキング剤として使用するポリエチレンイミンは、通常、水溶液の状態で使用される。その濃度は、特に制限されないが、通常0.1~3重量%、好ましくは0.5~2重量%、より好ましくは0.7~1.5重量%の範囲を挙げることができる。

【0029】

本発明のELISA試薬キット、特にアミノプレートELISA用の試薬キットは、上記TBSと同様に、当該ポリエチレンイミンを、ブロッキング剤として、個別に包装された形態で含むことができる。この場合、ポリエチレンイミンは上記使用濃度に関わらず、保存安定性を考慮して濃縮された状態であってもよい。この場合は、使用時に上記濃度になるように、蒸留水、イオン交換水または滅菌水などを利用して、希釈して使用することができる。

【0030】

#### (c) その他の成分

本発明のELISA試薬キットは、上記の抗原固相化用緩衝剤、および/または、ブロッキング剤に加えて、他の成分として、アミノプレートを含むことができる。

【0031】

ここでアミノプレートは、ペプチドやタンパク質などが有するアミノ基と共有結合を形成することができる求電子性官能基を、表面に直接またはスパーサーを介して結合させたELISA用プレートであり、ELISA用プレート（アミノ）またはイモビライザープレート（アミノ）として、市販され汎用されているものを広く用いることができる。通常、これらのプレートは、反応容器に相当する複数個のウェルを有している。本発明で用いるアミノプレートは、そのウェル数を特に制限するものではないが、通常1枚あたり8~96個、好ましくは96個のウェルを有することができる。

【0032】

市販されているアミノプレートとしては、後述する実験例で使用のImmobilizer Amino Plate Clear Strip、およびImmobilizer Amino Plate White（以上、Nunc社）；イモビライザーアミノ96ウェルプレート、イモビライザーアミノ96ウェルプレート、イモビライザーアミノロックウェルモジュールプレート（以上、Nalge Nunc International K.K.）；イモビライザーアミノF96クリア/Plate、イモビライザーアミノF96シロ/Plate、イモビライザーアミノF96クロ/Plate、イモビライザーアミノF8モジュールクリア/Plate、イモビライザーアミノC8ロックウェルクリア/Plate（以上、コスモバイオ社）などを例示することができる。なお、ここで透明なプレート（クリアプレート）は吸光度測定系に適したプレートであり、一方シロやクロの不透明なプレートは発光測定系や蛍光測定系に適したプレートであり、それぞれ測定に使用する検出系に応じて適宜選択することができる。

【0033】

また本発明のELISA試薬キットは、そのほか、プレートカバーガラス、標識抗体、検出試薬（例えば、標識抗体と反応して発色、発光または蛍光する試薬）、反応停止薬（例えば、前記標識抗体と検出試薬との反応を停止する試薬）、緩衝液、および本発明のELISA試薬を用いたアミノプレートELISA操作を解説した仕様書などを、1つまたは2以上含むことができる。

【0034】

#### II. アミノプレートELISA法

本発明が提供するアミノプレートELISA法は、下記の工程(1)~(4)を有する方法であって、下記(a)抗原固相化用緩衝剤、および/または、(b)ブロッキング剤として、前述するTBSおよび/またはポリエチレンイミンを用いることを特徴とするものである：

(1)(a)抗原固相化用緩衝剤の存在下で、アミノプレートに抗原を固定化する工程（抗原固相化工程）、

(2)(b)ブロッキング剤で、上記抗原固相化プレートを処理する工程（ブロッキング処理工

10

20

30

40

50

程)、

(3)上記プレート上に固定された抗原と標識抗体とを反応させる工程(標識工程)、および

(4)形成された抗原-標識抗体を識別して、当該抗原-標識抗体を測定する工程(検出工程)。

【0035】

本発明のELISA法は、上記の(1)抗原固相化工程だけに(a)抗原固相化緩衝剤としてTBSを用いる方法、または、(2)ブロッキング処理工程だけに(b)ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いる方法であってもよいが、好ましくは、(1)抗原固相化工程に(a)抗原固相化緩衝剤としてTBSを用い、且つ、(2)ブロッキング処理工程に(b)ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いる方法である。

10

【0036】

なお、(1)抗原固相化工程だけに(a)抗原固相化緩衝剤としてTBSを用いる場合、(2)ブロッキング処理は、従来公知のブロッキング剤であるウシ血清アルブミン(例えば、0.5%BSA)やカゼイン(例えば、0.5%)、または市販のブロッキング試薬(例えば、「EZ-Block」(Atto社製)など)を用いて行うことができる。また、(2)ブロッキング処理工程だけに(b)ブロッキング剤としてポリエチレンイミンを用いる場合、(1)抗原固相化工程は、従来公知の緩衝液であるPBS(phosphate buffered saline)、またはSBS(sodium bicarbonate buffered saline)を用いて行うことができる。

【0037】

(1)抗原固相化工程を、(a)抗原固相化用緩衝剤としてTBSの存在下で行う場合、その濃度としては、前述するように10×TBS(0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH7.6)を基準として、通常その1/100~1倍希釈濃度(0.005~0.5M TBS)、好ましくは1/50~1/10倍希釈濃度(0.01~0.05M TBS)を挙げることができる。また、そのpHとしてはpH5~11、好ましくはpH6~9.5を挙げることができる。なお、当該TBSは、標的物(抗原)をアミノプレート表面に固相化する際に、その系に共存していればよい。通常は、アミノプレートのウェルに注入する標的物(抗原)を含む試料を、当該TBSを用いて調製することによって、上記の共存状態を実現できるが、これに限定されない。

20

【0038】

アミノプレートのウェルに注入する標的物(抗原)を含む試料の調製は、制限されないが、タンパク質濃度が、通常3pg/ml~50ng/ml、好ましくは50pg/ml~10ng/ml程度になるように適宜調製することができる。

30

【0039】

なお、ここで使用されるアミノプレートは、前述するように、アミノ基と共有結合を形成することができる求電子性官能基を、表面に直接またはスペーサーを介して結合させたELISA用プレートである。

【0040】

当該抗原固相化工程は、アミノプレートのウェル内に標的物(抗原)を含む試料を注入し、TBSの存在下で反応させることによって行うことができる(アミノプレートの求電子性官能基と標的物(抗原)のアミノ基との共有結合の形成)。反応条件は、特に制限されないが、通常、常温で10分~数時間、好ましくは30分~2時間程度、静置するかまたは振盪させる条件を挙げることができる。

40

【0041】

(2)ブロッキング処理工程を、(b)ポリエチレンイミンを用いて行う場合、その水溶液の濃度としては、前述するように通常0.1~3重量%、好ましくは0.5~2重量%、より好ましくは0.7~1.5重量%の範囲を挙げることができる。

【0042】

当該ブロッキング処理は、前述する(1)抗原固相化工程後に、得られたアミノプレート(抗原固相化プレート)を、通常、水などで洗浄した後に行われる。ここで洗浄液としては、通常、蒸留水、イオン交換水、および滅菌水などの水のほか、Tween20等の界面活性

50

剤を含む緩衝液を用いることができる。

【0043】

ブロッキング処理条件は、特に制限されないが、抗原固相化プレートを、ポリエチレンイミンを含有する水溶液で、通常、常温で10分～数時間、好ましくは30分～2時間程度、静置するかまたは振盪させることによって処理する方法を挙げることができる。

【0044】

かかる(2)ブロッキング処理工程後、処理したアミノプレート(ブロッキング処理プレート)は、通常、水などで洗浄した後、(3)アミノプレート上の抗原と標識抗体とを反応させる標識工程、および(4)形成された抗原-標識抗体を識別して、当該抗原-標識抗体を測定する検出工程を行うことができる。なお、上記洗浄は、前述するように、蒸留水、イオン交換水、滅菌水などの水や界面活性剤を含む緩衝液を用いて行うことができる。

【0045】

なお、(2)ブロッキング処理工程後の(3)標識工程および(4)検出工程は、いずれも定法のELISA法に従って行うことができ(例えば、前述する非特許文献1など参照)、測定対象とする標的物の種類や測定目的に応じて、当業者の技術常識に基づいて最適な方法を採用することができる。

【0046】

(3)標識工程において標識剤として使用される酵素はいずれも公知のものを区別なく使用することができる。例えば、代表的なものとしては、アルカリホスファターゼ、およびペルオキシダーゼ(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ)などを挙げることができる。またこれらの標識剤と結合した標識抗体としては、測定対象とする抗原(タンパク質)と結合する抗体を挙げることができる。なお、当該標識抗体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれであってもよく、また商業的に入手できるものを使用することもできる。

【0047】

(4)検出工程は、上記(3)標識工程で形成された抗原-標識抗体を検出する工程であり、定法に従って、上記標識抗体に用いる標識剤の基質の種類に応じた検出系(吸光度検出系、蛍光検出系、化学発光検出系)を用いることができる。斯くして、吸光度、蛍光または化学発光の有無やその強度から、被験試料における測定対象抗原(標的物)の存在の有無、またはその含有量を測定することができる。

【実施例】

【0048】

以下、実験例および実施例を示して本発明を説明するが、本発明はかかる実施例などによって制限されるものではない。なお、下記の実験例等において、特に言及しない限り、「%」は「重量%」を意味する。

【0049】

実験例1 抗原のプレートへの固定化に対する緩衝液の影響

アミノプレートELISA法において、次の3種類の緩衝液を用いて、アミノプレートへの抗原(標的物)の固定化に対する各緩衝液の影響を調べた。

(i) TBS: Tris-buffered saline (SIGMA) (pH7.6)

2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール(1.39 g/l)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩(6.06 g/l)、および塩化ナトリウム(9 g/l)を含有する水溶液

(ii) PBS: phosphate buffered saline (和光純薬) (pH6.5)

8.1mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.47mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、137mmol/l NaCl及び2.68mmol/l KClを含有する水溶液

(iii) SBS: sodium bicarbonate buffered saline (pH9.8)

重炭酸ナトリウム10.6 g/lを含有する水溶液。

【0050】

(1) 実験方法

(1)まず、アミノプレート ( Immobilizer Amino Plate Clear Strip : Nunc製 ) のウエルに、上記各緩衝液を100  $\mu$  l/wellの割合で注ぎ ( 1 緩衝液毎、3ウエルに注入 )、26 の条件下、100 rpmで振盪させながら、60分間放置した ( 緩衝液での前処理 )。

(2)次いで、ウエルを0.1%のTween20を含む0.05M TBSで洗浄した後、各緩衝液で1  $\mu$  g/mlとなるように希釈した抗原anti-GOAT-IgG ( SIGMA ) を100  $\mu$  l/wellの割合で注ぎ、再度26 の条件下、100 rpmで振盪させながら 60分間放置した ( 抗原固相化处理 )。なお、ここで抗原として使用したanti-GOAT-IgG は、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ ( HRP ) で標識されている。

【 0 0 5 1 】

(3)次いで、各ウエルを0.1%のTween20を含む0.05M TBSで洗浄した後、HRPと反応して青色を示すTMB ( 3,3',5,5' tetramethylbenzidine : (SIGMA) ) を100  $\mu$  l/wellの割合で添加して15 分間静置した。

(4)これに反応停止液 ( ELISA Stop-solution : リン酸水溶液1mol/l ) を100  $\mu$  l/wellの割合で注いで、上記TMBの反応を停止し、各ウエルの反応液の吸光度 ( 450nm ) を、MICROPLATE READER ( BIO RAD ) で測定した。

【 0 0 5 2 】

なお上記では、(2)抗原固相化处理前に、あらかじめアミノプレートを各緩衝液で前処理したが ( 緩衝液前処理あり )、かかる前処理を行わない系 ( 緩衝液前処理なし ) についても、同様に実験を行った。

【 0 0 5 3 】

## ( 2 ) 実験結果

結果を図 1 に示す。横軸は使用した緩衝液の種類を、縦軸はELISA法で得られた吸光度 ( 450nm ) を示す。なお、横軸の緩衝液名の後ろの ( + ) と ( - ) は、それぞれ「緩衝液前処理あり」と「緩衝液前処理なし」を意味する。

【 0 0 5 4 】

この結果からわかるように、緩衝液としてTBSを用いた場合に格段に高いシグナルが検出され、TBSの存在によってアミノプレートに対する抗原の固相化率が向上したことが認められた。一方、すべての緩衝液について、抗原固定化前の緩衝液処理の有無による影響は認められなかった。これらのことから、アミノプレートに抗原 ( 標的物 ) を固定化する際に、緩衝液としてTBSを使用することによって、プレートに対する抗原の固相化率を上げることができ、その結果、高感度化が可能になることがわかる。

【 0 0 5 5 】

この方法によれば、抗原の固相化率を向上させることによって、検出シグナル ( 抗原と標識抗体との特異的反応に基づくシグナル ) を増大させることができるという効果が得られるが、これによって、特にノイズ ( バックグラウンド ) の影響が大きい低濃度領域の測定可能レンジが拡大し、検出限界を低下させることが可能となる ( 図 2 参照 )。すなわち、緩衝液としてTBSを用いた本発明のELISA法によれば、対象となる抗原量の少ない少量の試料を検体として、高感度な検出が可能である。

【 0 0 5 6 】

## 実験例 2 ブロッキング性能の評価

アミノプレートELISA法において、10種類の試薬 [ グリシン、ニコチンアミド、モノエタノールアミン、グルタミン酸ナトリウム、ゼラチン、カゼイン、ポリビニルアルコール ( 以上、和光純薬 )、ウシ血清アルブミン ( BSA )、ポリエチレンイミン ( 以上、SIGMA ) ] を用いて、各試薬のブロッキング性能を調べた。なお、これらの試薬のうち、カゼインとBSAは、アミノプレートELISA法において、従来からブロッキング剤として使用されている公知の試薬である。

【 0 0 5 7 】

なお、各試薬は、0.1~1重量%の範囲で複数濃度のものを調製して使用し、またカゼインとBSAは、一般に使用される濃度 ( 0.5% ) で使用した。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

( 1 ) 実験方法

(1) TBSを用いて各濃度 ( 3.12 ng/ml、1.56 ng/ml、781 pg/ml、390 pg/ml、195 pg/ml、97 pg/ml、48 pg/ml ) になるように希釈したmouse-IgG ( DAKO社 ) を、アミノプレート ( Immobilizer Amino Plate White : Nunc製 ) の各ウエルに100  $\mu$  l/wellの割合で注ぎ、これにTBSを100  $\mu$  l/wellの割合で注入して、26 の条件下、100 rpmで振盪させながら、60分間放置した ( 抗原固定化処理 ) 。なお、ここでTBSとして、実験例 1 と同様に、2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール1.39 g/l、およびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩6.06 g/lを含有する水溶液を用いた。

【 0 0 5 9 】

(2) 次いで、各ウエルを0.1%のTween20を含む0.05M TBSで洗浄した後、これに各種の試薬 ( ブロッキング剤候補 ) を200  $\mu$  l/wellの割合で入れ、26 条件下、100 rpmで振盪しながら60分間放置した。

【 0 0 6 0 】

(3) 0.1%のTween20を含む0.05M TBSで洗浄した後、TBSで30ng/mlに希釈した標識抗体anti-mouse-IgG-HRP ( VECTOR ) を100  $\mu$  l/well 入れ、26 条件下、100 rpmで振盪しながら60分間放置した。

【 0 0 6 1 】

(4) 次いで洗浄した後、ECL Western blotting solution ( Amersham ) を100  $\mu$  l/well の割合で入れ、15分間静置した。

【 0 0 6 2 】

(5) 反応後、各ウエルの反応液の発光強度 ( 428nm ) をフルオロスキャン ( 大日本製薬 ) で測定した。

【 0 0 6 3 】

( 2 ) 実験結果

測定した発光強度 ( シグナル強度 ) から、各試薬 ( ブロッキング剤候補 ) の最適濃度を決定した。その結果、グリシンの最適濃度は0.5%前後、ニコチンアミドは0.8%前後、モノエタノールアミンは4mM/L前後、グルタミン酸ナトリウムは0.5%前後、ゼラチンは0.5%前後、ポリエチレンジアミンは1%前後、ポリビニルアルコールの最適濃度は0.7%前後であると認められた。

【 0 0 6 4 】

そこで、これらの各試薬をこの最適濃度でブロッキング剤として用いて得られた発光強度を、従来公知のブロッキング剤 ( BSA、カゼイン、各0.5%で使用 ) を使用した場合と比較した。その結果、ポリエチレンジアミン ( PEI ) を使用した場合にのみ、上記従来公知のブロッキング剤を使用した場合よりも強い発光強度が得られ、ブロッキング性能が優れていることが判明した。図 3 に、ポリエチレンジアミン ( PEI ) とBSAとのブロッキング性能を対比した結果 ( n=3の平均値 ) を示す。ANOVAで各群 ( PEI使用群、BSA使用群 ) の判別を行ったところ、Pが0.01以下で2つの群は有意に判別することができた。これを受けて、ポストホックテストを用いて要因分析を行った。Pの値が0.05以下の値にはアスタリスクを2つ、0.1以下の値にはアスタリスクを1つ付している。また、図 4 にPEIとカゼインとのブロッキング性能を対比した結果を示す。なお、図 3 は測定したn=3の平均値を、図 4 はn=3の各値を示す。各図において、横軸は使用した抗原濃度 ( log(ng/ml) ) を、縦軸は使用したELISA法で得られた発光強度 ( 428nm ) を示す。

【 0 0 6 5 】

また、図 5 ~ 9 に、ポリエチレンジアミン ( PEI ) と他の試薬 ( グリシン、ニコチンアミド、モノエタノールアミン、グルタミン酸ナトリウムおよびポリビニルアルコール ) のブロッキング性能 ( 発光強度 ) を対比した結果 ( n=3の各値 ) を示す。これからわかるように、他の試薬はいずれもPEIよりも劣っていた。

【 0 0 6 6 】

以上の結果からわかるように、ポリエチレンジアミンは、従来公知のブロッキング剤よりも優れたブロッキング性能を備えており、抗原 ( 標的物 ) と標識抗体との特異的反応 ( 特

10

20

30

40

50

異的反応シグナル)を減弱させることなく、標識抗体のプレートへの非特異的結合を抑え、ノイズの低下(ノイズ除去)に有効であることが判明した。

【0067】

当該方法によれば、図10に示すように、ノイズを低減下させることによって、低濃度領域の測定可能レンジが拡大し、検出限界を低下させることが可能となる(高感度化)。すなわち、ブロッキング剤としてポリエチレンジアミンを用いた本発明のELISA法によれば、対象となる抗原量の少ない少量の試料を検体として、高感度な検出が可能である

実施例 白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor:LIF)の検出

マウス胎児から採取した脳脊髄液(CSF)、羊水(AF)、血清(SEおよびSD)を、等量の50%エチレングリコールと混合した溶液を用いて、本発明のアミノプレートELISA法を行った。具体的には、アミノプレートとして、Nunc Immobilizer Amino plate(Nalge Nunc International)を用い、抗原固定化用緩衝液として、0.05MのTris-buffered saline(TBS)を使用し、またブロッキング剤として1重量%のポリエチレンジアミンを使用する以外は、定法のダイレクトELISA法(Harlow E, Lane DP. Antibodies.: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor laboratory; 1988)に従って行った。具体的には、上記検体を上記のTBSで所定濃度になるように調製し、これをアミノプレートの各ウエルに注入して、室温で1時間処理した(固相化)。次いで、得られたプレートの各ウエルを蒸留水で洗浄した後、1重量%のポリエチレンジアミン水溶液を注入して室温で30分間処理してブロッキングした。次いで、得られたプレートの各ウエルを蒸留水で洗浄した後、1重量%のポリエチレンジアミン水溶液を注入して室温で30分間処理してブロッキングした。

【0068】

次いで、得られたプレートの各ウエルを蒸留水で洗浄した後、N-hydroxysuccinimidyl 6-(biotinamido) hexanate [biotine (long arm)-NHS](Vector社)で標識したgoat anti-LIF antibody(SIGMA社)(ビオチン標識化-抗LIF抗体)のTBS溶液を注入して、室温で90分間反応させ、さらにextra-avidin-peroxidase(1:3000)(SIGMA社)と室温で15分間反応させた。さらにこれを、Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare社)と反応させて、生じた化学発光シグナルを、Fluoroskan Ascent FL(Thermo Electron Corporation)で測定した。

【0069】

その結果、マウス胎児から調製した微量な検体から、マウスの胎生期における白血病抑制因子(LIF)の濃度の変動を把握することができた。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】実験例1において、抗原のアミノプレート固定化における緩衝液の影響(固定化効率の評価)を調べた結果を示す。各グラフは、各緩衝液の吸光度(450nm)の平均を、エラーバーは標準偏差を表す。検定はt検定を行った。

【図2】抗原固相化率向上によるシグナルの増大と、低濃度領域の計測可能レンジの拡大(検出限界の低下=高感度化)との関係を示す模式図を示す。

【図3】実験例2において、ポリエチレンジアミン1%とBSA0.5%とのブロッキング性能を対比した結果(n=3の平均値)を示す。縦軸は発光強度(シグナル)(428nm)、横軸は抗原濃度(log(ng/ml))を示す(以下の図面において同じ)。

【図4】実験例2において、ポリエチレンジアミン(PEI)1%とカゼイン0.5%とのブロッキング性能を対比した結果(n=3の各値)を示す。

【図5】実験例2において、ポリエチレンジアミン(PEI)1%とグリシン0.5%とのブロッキング性能を対比した結果(n=3の各値)を示す。

【図6】実験例2において、ポリエチレンジアミン(PEI)1%とニコチンアミド0.5%とのブロッキング性能を対比した結果(n=3の各値)を示す。

【図7】実験例2において、ポリエチレンジアミン(PEI)1%とモノエタノールアミン4mM/Lとのブロッキング性能を対比した結果(n=3の各値)を示す。

【図8】実験例2において、ポリエチレンジアミン(PEI)1%とL-グルタミン酸ナトリウム0

10

20

30

40

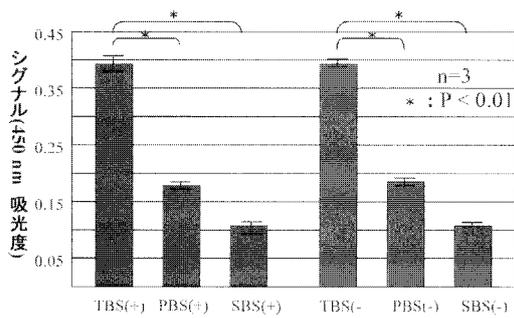
50

.5%とのブロッキング性能を対比した結果 (n=3の各値) を示す。

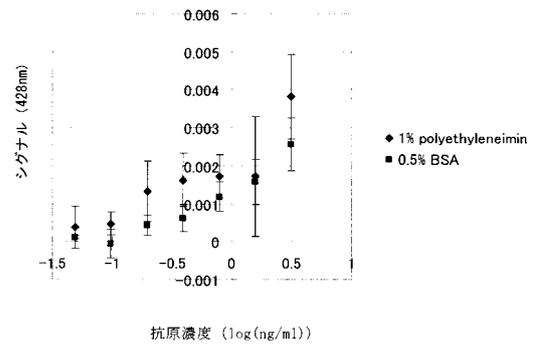
【図9】実験例2において、ポリエチレンイミン (PEI) 1%とポリビニルアルコール0.7%とのブロッキング性能を対比した結果 (n=3の各値) を示す。

【図10】ブロッキング性能向上によるノイズの低下と、低濃度領域の計測可能レンジの拡大 (検出限界の低下 = 高感度化) との関係を示す模式図を示す。

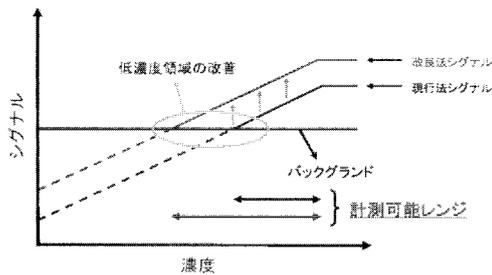
【図1】



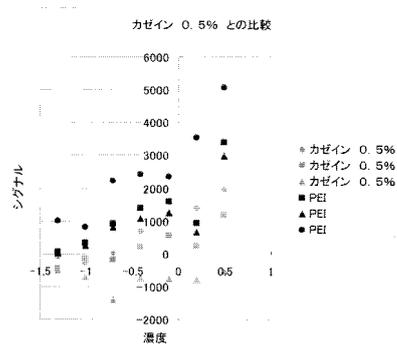
【図3】



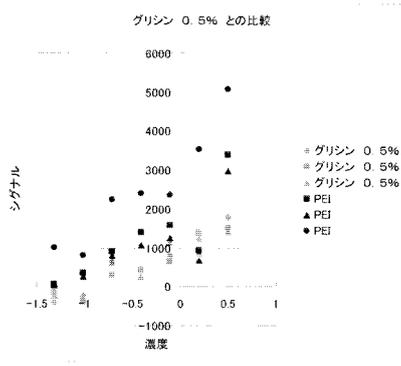
【図2】



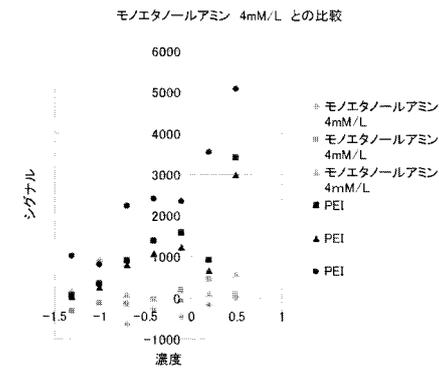
【図4】



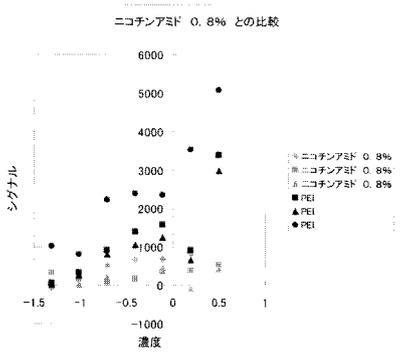
【 図 5 】



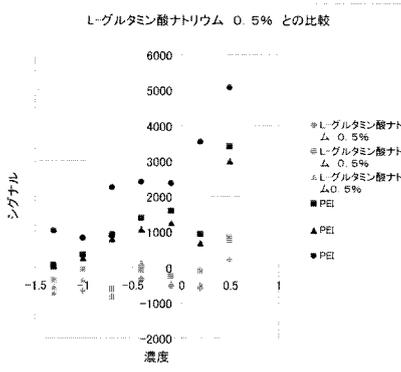
【 図 7 】



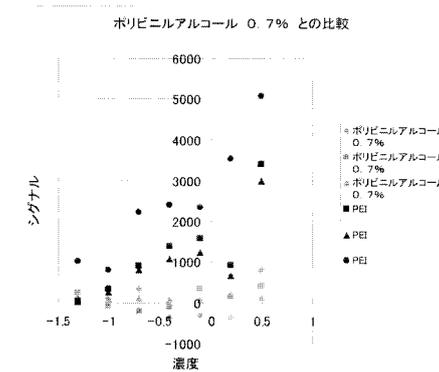
【 図 6 】



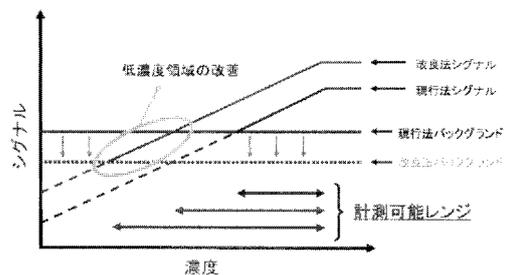
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 小野 篤輝

島根県出雲市塩冶町89-1 国立大学法人島根大学医学部内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開平05-052847(JP,A)  
特開2005-201689(JP,A)  
特開2006-258805(JP,A)  
特開2000-193667(JP,A)  
特開2006-226982(JP,A)  
特開平03-254693(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/531

G01N 33/543