



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102834719 B

(45) 授权公告日 2015.03.25

(21) 申请号 201180017602.2
 (22) 申请日 2011.03.31
 (30) 优先权数据
 2010-083735 2010.03.31 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2012.09.27
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2011/058283 2011.03.31
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/125873 JA 2011.10.13
 (73) 专利权人 积水医疗株式会社
 地址 日本东京都
 (72) 发明人 阿部孝行 高桥由纪 大田哲也
 (74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
 代理人 苗莹 陈剑华
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/531(2006.01)
 G01N 33/53(2006.01)
 G01N 33/543(2006.01)

(56) 对比文件
 JP 2001-242171 A, 2001.09.07,
 WO 83/02672 A1, 1983.08.04,
 US 4605630 A, 1986.08.12,
 CN 10131408 A, 2009.01.07, 全文.
 JP H07103980 A, 1995.04.21,
 杨霁云. 抗磷脂综合征. 《中华儿科杂志》. 2003, 第41卷(第2期), 第154-157页.
 审查员 赵晓明

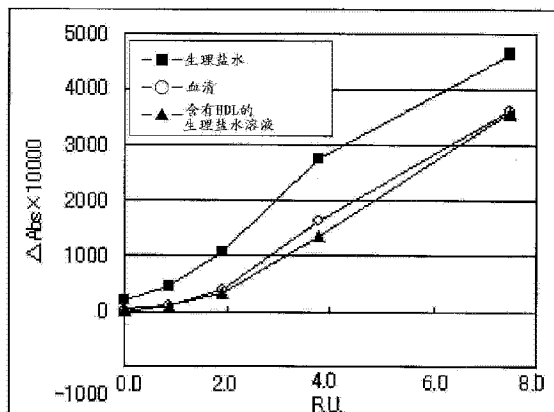
权利要求书1页 说明书11页 附图7页

(54) 发明名称

回避内源性脂蛋白的影响的方法及试剂

(57) 摘要

本发明提供一种查清血清、血浆中的干扰成分、回避该干扰成分影响的手段。本发明提供一种回避内源性脂蛋白的影响的方法，其特征在于，被测物为血中的抗体或抗原，在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂中，向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂。



1. 回避内源性脂蛋白的影响的方法,其特征在于,被测物为抗磷脂抗体或前列腺特异抗原,在被测物为抗磷脂抗体时通过与抗原的免疫反应、在被测物为前列腺特异抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂中,向免疫反应的反应系中添加溶解或分散状态的甘油磷脂。

2. 根据权利要求1所述的回避内源性脂蛋白的影响的方法,其特征在于,溶解或分散状态的甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸中的一种以上。

3. 根据权利要求1或2所述的回避内源性脂蛋白的影响的方法,其特征在于,被测物抗磷脂抗体为由于梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体或由于属于自身免疫疾病的抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

回避内源性脂蛋白的影响的方法及试剂

技术领域

[0001] 发明涉及一种回避内源性脂蛋白的影响的方法以及使用该方法的抗磷脂抗体测定试剂及前列腺特异抗原测定试剂。

背景技术

[0002] 抗磷脂抗体因下面二种疾病而在生物体内产生。一种是在感染了梅毒的病原体梅毒螺旋体(*Treponema Pallidum*)的情况下,另一种是在属于全身性红斑狼疮(SLE)等自身免疫疾病的抗磷脂抗体综合征发病的情况下。

[0003] 任何抗磷脂抗体均为对于以一种叫心磷脂的磷脂为主要成分的磷脂抗原而产生的抗体,其诊断中使用的检查试剂含有心磷脂。

[0004] 目前,作为使用上述磷脂的梅毒检查方法,正在使用的有以碳或高岭土粉末为载体的 VDRL (性病研究实验室)法、RPR (快速血浆反应素)卡片试验法(非专利文献 1)、以由聚苯乙烯共聚物等形成的乳胶为载体、用生化自动分析仪进行测定的乳胶凝集法(专利文献 1)等。

[0005] 另一方面,作为磷脂抗体综合征的检查方法,用 ELISA 法进行测定(专利文献 2)。

[0006] 前列腺癌是一种在男性中出现的恶性疾病,尤其是在美国及日本,是一种正在急剧增加的肿瘤。由于前列腺癌是一种增殖缓慢的肿瘤,而且具有放射疗法、抗雄激素疗法容易起效的特点,因而,其早期发现是一个很重要的课题。

[0007] 前列腺特异抗原(Prostate Specific Antigen,下面有时简称“PSA”)是一种由前列腺上皮细胞分泌的丝氨酸蛋白酶,是一种分子量为 33000 ~ 34000 道尔顿的糖蛋白。若前列腺发生疾病,则该 PSA 在血液中的浓度较健康正常人高,因而对前列腺疾病(尤其是前列腺癌)的早期发现有用。PSA 有在血中与蛋白酶抑制剂结合的复合物型和非结合的游离型 PSA (下面有时称“fPSA”),但血中的 PSA 多为复合物型,存在前列腺特异抗原- α 1-抗胰凝乳蛋白酶复合物(下面有时称“PSA-ACT”)、前列腺特异抗原- α 2-巨球蛋白复合物等。其中,能用免疫学测定方法测定的为 fPSA 和 PSA-ACT 二种。

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1 :日本特开平 7-103980 号公报

[0010] 专利文献 2 :日本特开平 6-148193 号公报

[0011] 专利文献 3 :日本特开 2001-242171 号公报

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献 1 :Public Health Reports Vol. 75 (1960), 985-988

发明内容

[0014] 通过对用抗原抗体反应进行的免疫凝集反应进行光学测定来诊断是否患有疾病的试剂一般会受到检体中的干扰成分的影响,测定值会出现不规则降低。这种现象可由将被测物添加到生理盐水、缓冲液等不受检体中的干扰成分影响的溶液中时和含有血清及血

浆等干扰成分时测定值大不相同这一点而变得清晰。

[0015] 作为由发生这种现象所引发的问题,可以列举以下二点。

[0016] (1) 检体中的抗体量或抗原量少时,由于干扰成分的影响,免疫凝集反应进行不充分,存在虽然患病但仍漏检的可能性。

[0017] (2) 要测定含有测定试剂的测定范围以上的抗体量或抗原量的检体的准确抗体量或抗原量,目前采用的方法是,用生理盐水或血清等对该检体进行稀释,使抗体量或抗原量减少至测定范围内进行测定,之后乘以稀释倍数,算出准确的抗体量或抗原量。然而,由于生理盐水中不含上述干扰成分,用不含抗体或抗原的血清对检体进行稀释时和用生理盐水进行稀释时的测定结果会背离,不能准确测定抗体量或抗原量。

[0018] 因此,本发明的课题在于提供一种查清上述血清、血浆中的干扰成分、回避该干扰成分的影响的手段。

[0019] 因此,为了查清存在于前述血清、血浆中的免疫测定干扰成分,本发明者进行了各种研究,结果,完全意外地,从通过抗原抗体反应测得的吸光度在用向生理盐水中添加脂蛋白而成的溶液作为检体时会下降这一事发现,该干扰成分为内源性脂蛋白。进一步研究发现,若向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂,则能回避该内源性脂蛋白对测定值的影响,可以更准确地测定检体中的抗体或抗原,由此完成了本发明。

[0020] 即,本发明提供以下发明。

[0021] (1) 回避内源性脂蛋白的影响的方法,其特征在于,被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂中,向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂。

[0022] (2) (1)所述的回避内源性脂蛋白的影响的方法,其中,甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺及磷脂酰丝氨酸中的一种以上。

[0023] (3) (1)或(2)所述的回避内源性脂蛋白的影响的方法,其中,被测物为抗磷脂抗体。

[0024] (4) (3)所述的回避内源性脂蛋白的影响的方法,其中,被测物抗磷脂抗体为因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体或因自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

[0025] (5) 血中的抗体或抗原测定试剂,其特征在于,被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂中,前述免疫反应的反应系中含有甘油磷脂。

[0026] (6) (5)所述的测定试剂,其中,甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺及磷脂酰丝氨酸中的一种以上。

[0027] (7) (5)或(6)所述的测定试剂,其中,被测物为抗磷脂抗体。

[0028] (8) (5)~(7)所述的测定试剂,其中,抗原或抗体负载在不溶性载体上。

[0029] (9) (7)或(8)所述的测定试剂,其中,被测物抗磷脂抗体为因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体。

[0030] (10) (7)或(8)所述的测定试剂,其中,被测物抗磷脂抗体为因自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

[0031] (11) (5)或(6)所述的测定试剂,其中,被测物为前列腺特异抗原。

[0032] (12) (5)、(6)或(11)所述的测定试剂,其中,抗体为抗前列腺特异抗原抗体,抗体负载在不溶性载体上。

[0033] 专利文献 3 公开了一种在计数免疫测定法中添加磷脂酰胆碱的方法,它是为了抑制在阴性检体中时而遇见的非特异凝集而添加的。非特异凝集是指由于人血液中稀有的成分(例如针对试剂中所含成分的抗体等)而在本来的特异性免疫凝集反应之外,也就是在作为检测目的的抗磷脂抗体与磷脂的免疫反应之外发生的凝集反应。专利文献 3 中的磷脂酰胆碱以抑制这种反应为目的,可以称作非特异凝集抑制剂。

[0034] 另一方面,本发明中的甘油磷脂旨在消除因人血液检体中普遍含有的脂蛋白而发生的正常免疫反应的凝集抑制这一现象,更准确地检测作为检测目的的抗体或抗原,可以称作脂蛋白影响的回避剂。

[0035] 本发明的甘油磷脂的效果与上述专利文献 3 的磷脂酰胆碱存在根本上的不同。

[0036] 本发明提供的试剂是一种以向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂为特征的回避内源性脂蛋白的影响的试剂,在受到内源性脂蛋白的影响的抗磷脂抗体测定试剂中,通过回避内源性脂蛋白的影响,可以更准确地进行测定。

附图说明

[0037] 图 1 是研究 1 中的比较例 1 的结果,反应系中不含甘油磷脂。

[0038] 图 2 是研究 1 中的实施例 2 的结果,是反应系中含有 0.06 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0039] 图 3 是研究 2 中的实施例 1 的结果,是反应系中含有 0.12 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0040] 图 4 是研究 2 中的实施例 2 的结果,是反应系中含有 0.06 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0041] 图 5 是研究 2 中的实施例 3 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0042] 图 6 是研究 2 中的实施例 4 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%的为合成磷脂酰甘油的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐时的结果。

[0043] 图 7 是研究 2 中的实施例 5 的结果,是反应系中含有 0.06 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺时的结果。

[0044] 图 8 是研究 2 中的实施例 6 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%的为合成磷脂酰胆碱的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱时的结果。

[0045] 图 9 是研究 2 中的实施例 7 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%的为合成磷脂酰胆碱的 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱时的结果。

[0046] 图 10 是研究 2 中的实施例 8 的结果,是反应系中含有鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油 0.015 重量%及鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺 0.015 重量%时的结果。

[0047] 图 11 是研究 2 中的比较例 1 的结果,是反应系中不含甘油磷脂时的结果。

[0048] 图 12 是研究 3 中的实施例 9 的结果,是反应系中含有鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油 0.015 重量%时的结果。

[0049] 图 13 是研究 3 中的比较例 2 的结果,是反应系中不含甘油磷脂时的结果。

具体实施方式

[0050] 本发明是一种回避内源性脂蛋白的影响的方法及回避内源性脂蛋白的影响的试剂,所述方法特征在于,被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂中,向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂。

[0051] 在本发明中,作为为回避内源性脂蛋白的影响而添加到免疫反应的反应系中的甘油磷脂,可以是磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸等。其中,优选磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸,尤其优选磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸。

[0052] 添加的甘油磷脂的浓度优选为在反应系中含有 0.005 ~ 0.20 重量%。更优选为 0.015 ~ 0.12 重量%,但由于添加量需要根据测定中使用的检体量做适当调节,因而并不局限于此范围。

[0053] 此外,甘油磷脂可添加在反应系中,也可添加在检体稀释液中,还可添加在含有抗体、抗原的试剂中,但从回避内源性脂蛋白的影响的效果的角度考虑,优选添加在检体稀释液中。

[0054] 上述磷脂酸不问其来源动物或植物。磷脂酸一般通过用磷脂酶 A2 分解磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油而得到。

[0055] 对上述磷脂酸中所含的二个酰基的碳数及不饱和度无限制。一般为碳数 10 ~ 18、含有 0 ~ 2 个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。动物、植物来源的磷脂酸一般是具有不同碳数的酰基的磷脂酸及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酸组合而成的混合物。

[0056] 上述磷脂酸可以是化学合成物。实际市售的磷脂酸有 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸钠盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸钠盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸钠盐等。

[0057] 作为上述磷脂酰胆碱,不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰胆碱。

[0058] 对上述磷脂酰胆碱中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数 10 ~ 22、含有 0 ~ 2 个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。动物、植物来源的磷脂酰胆碱一般是具有不同碳数的酰基的磷脂酰胆碱与具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰胆碱组合而成的混合物。

[0059] 上述磷脂酰胆碱可以是化学合成物。实际市售的磷脂酰胆碱有 1,2-二癸酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-肉豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-肉豆蔻酰-2-油酰-sn-

甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱等。

[0060] 作为上述磷脂酰甘油,不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰甘油。

[0061] 对上述磷脂酰甘油中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数10~22、含有0~2个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。动物、植物来源的磷脂酰甘油一般是具有不同碳数的酰基的磷脂酰甘油及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰甘油组合而成的混合物。

[0062] 上述磷脂酰甘油可以是化学合成物。实际市售的磷脂酰甘油有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油铵盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸甘油铵盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸甘油铵盐、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐等。

[0063] 作为上述磷脂酰乙醇胺,不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰乙醇胺。

[0064] 对上述磷脂酰乙醇胺中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数10~22、含有0~2个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。动物、植物来源的磷脂酰乙醇胺一般是具有不同碳数的酰基的磷脂酰乙醇胺及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰乙醇胺组合而成的混合物。

[0065] 上述磷脂酰乙醇胺可以是化学合成物。实际市售的磷脂酰乙醇胺有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺等。

[0066] 作为上述磷脂酰丝氨酸,不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰丝氨酸。

[0067] 对上述磷脂酰丝氨酸中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般情况下为碳数10~22、含有0~2个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。动物、植物来源的磷脂酰丝氨酸一般是具有不同碳数的酰基的磷脂酰丝氨酸及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰丝氨酸组合而成的混合物。

[0068] 上述磷脂酰丝氨酸可以是化学合成物。实际市售的磷脂酰丝氨酸有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐等。

[0069] 上述甘油磷脂优选以溶解或分散在反应系的缓冲液中的状态存在。对于难溶物,

可以用超声波处理进行分散或溶解。此外,也可通过添加表面活性剂使其溶解。

[0070] 作为上述表面活性剂,一般情况下,只要是能增溶脂质的表面活性剂均可使用,优选蔗糖单月桂酸酯等蔗糖脂肪酸酯、溶血磷脂酰胆碱、辛基葡糖苷、十二烷基麦芽糖苷等烷基糖苷、硫酸葡聚糖等。

[0071] 本发明的被测物只要是血中的抗体或抗原即可,无特殊限制,公知的抗体或抗原可作为被测对象。若例举代表性的被测物,则可以是抗梅毒螺旋体抗体、抗磷脂抗体、抗HBs抗体、HBs抗原、风疹抗体、流感病毒抗原、腺病毒抗原、轮状病毒抗原、幽门螺杆菌抗原、抗幽门螺杆菌抗体、人C反应蛋白、链球菌溶血素O、前列腺特异抗原、癌胚抗原、甲胎蛋白、免疫球蛋白G、免疫球蛋白M、免疫球蛋白A、免疫球蛋白E、胰岛素、风湿因子等公知的被测物。

[0072] 其中,优选内源性脂蛋白的影响大的抗磷脂抗体。这里,作为抗磷脂抗体,可以是因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体或因自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

[0073] 此外,还更优选前列腺特异抗原。

[0074] 在本发明的方法及测定试剂中,被测物为抗体时,使其与抗原进行免疫反应,被测物为抗原时,使其与抗体进行免疫反应。因此,通常,在本发明的测定试剂中含有与被测物进行免疫反应的抗原或抗体。作为该抗原或抗体,在被测物为抗磷脂抗体时为磷脂。被测物为前列腺特异抗原时为抗前列腺特异抗原抗体。

[0075] 作为用作上述磷脂抗原的磷脂,通常可以使用心磷脂、磷脂酰胆碱及胆固醇这三种,但这三种不必都含有,根据测定的疾病进行选择。当本发明的测定试剂为属于自身免疫疾病的抗磷脂抗体综合征的测定试剂时,其至少含有心磷脂即可,当本发明的测定试剂为抗梅毒磷脂抗体测定试剂时,其至少含有心磷脂和磷脂酰胆碱即可。为提高特异性、灵敏度,磷脂酰胆碱、胆固醇多与心磷脂混合使用。作为它们的优选混合比,以重量比计,为心磷脂:磷脂酰胆碱:胆固醇=1:(3~30):(0~10)左右,更优选为1:(3~30):(0.5~10)左右,但并不局限于此,可根据目的适当选择混合比。

[0076] 上述磷脂的获取方法有从动植物中获得的方法和合成的方法,根据目的适当选择。通常,心磷脂可使用从牛心脏中提取、精制而成的产物,磷脂酰胆碱可使用从蛋黄提取、精制而成的产物,胆固醇可使用由羊毛提取而成的产物及合成的产物。此外,也可使用市售产品。

[0077] 上述磷脂抗原等抗原、抗前列腺特异抗原抗体等抗体通常分散在适当的溶液中进行使用。作为该溶液,无特殊限制,可以是磷酸缓冲液、Tris盐酸缓冲液、甘氨酸缓冲液等。作为进行分散的方法,有使其负载在不溶性载体上进行分散的方法和使其形成脂质体进行分散的方法。

[0078] 作为前述不溶性载体,一直以来,在免疫学凝集反应及凝集抑制反应中,可以使用通常使用的微粒载体。其中,优选由工业上可大量生产的合成高分子构成的乳胶。作为上述合成高分子,例如有聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、醋酸乙烯-丙烯酸酯共聚物等。其中,由于对磷脂的吸附性优异、能保持生物学活性长时间稳定等理由,尤其优选聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸共聚物。此外,还可使用动物的红细胞、细菌的细胞等生物学粒子、膨润土、胶棉、胆固醇结晶、硅石、高岭土、碳粉等非生物学粒子等。上述不溶性载体的平均粒径因测

定方法、测定仪器而不同,但通常使用透射式电子显微镜装置测得的平均粒径为 0.1 ~ 1.0 μm 的不溶性载体,更优选使用 0.1 ~ 0.5 μm 的不溶性载体。

[0079] 作为将上述磷脂抗原负载在上述不溶性载体上的方法,无特殊限制,可以是用以往公知的方法、通过物理及 / 或化学结合进行负载的方法等。

[0080] 作为将磷脂抗原物理负载在上述不溶性载体上的方法,例如可以是以下方法:向溶解在乙醇等适宜溶剂中的磷脂(磷脂混合液)中混合具有适当粒径的乳胶,搅拌(致敏工序),经过一定时间后,用含有蛋白质、糖、肽等的溶液进行处理(封闭工序),分散在适当的溶剂中。

[0081] 作为分散上述乳胶的溶剂,可以是磷酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液、甘氨酸缓冲液等。

[0082] 作为用这些检查方法进行测定的检体,可以使用可能含有前述被测物的血液、血清、血浆、脑脊髓液等。

[0083] 作为测定方法,对这样得到的试剂与检体中的抗磷脂抗体等被测物的免疫反应而产生的凝集的程度进行光学测定,由此测定检体中的抗磷脂抗体量等被测物量。

[0084] 作为上述对凝集程度进行光学测定的方法,可以使用公知的方法,例如以浊度的增加来表征凝集形成的比浊法、以粒度分布或平均粒径的变化来表征凝集形成的方法、用积分球来测定凝集形成所引起的前向散射光的变化、比较与透射光强度之比的积分球光度浊度法等。在上述测定方法中,可以利用在不同时间点得到至少二个测定值,根据这些时间点上的测定值的增加速度求出凝集程度的速度试验(速率法)或者在某一时间点(通常为被认为是反应终点的时间点)得到一个测定值,根据该测定值求出凝集程度的终点试验(终点法)。从测定的简便性、迅速性的角度考虑,优选进行采用比浊法的速度试验。在光学测定方法中,可以使用能检测出散射光强度、透射光强度、吸光度等的光学仪器,尤其是通用的自动分析仪。测定波长可以使用 250 ~ 1000nm,优选 540 ~ 800nm。

[0085] 反应温度只要是能发生上述免疫反应的温度便无特殊限制,但优选恒温下在 10 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内进行,更优选 10 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 。反应时间可适当确定。

[0086] 作为进行上述免疫反应时的反应系的反应液,只要是满足能发生免疫反应的生理条件的水溶液便无特殊限制,例如可以是磷酸缓冲液、枸橼酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液、Good's 缓冲液等。反应液的 pH 优选为 5.5 ~ 8.5,更优选为 6.5 ~ 8.0。在上述反应液中,还可根据需要添加牛血清白蛋白、蔗糖等稳定剂、叠氮化钠等防腐剂、氯化钠等盐浓度调节剂等。

[0087] 为提高测定灵敏度及 / 或促进抗原抗体反应,本发明的抗磷脂抗体测定试剂可以含有水溶性高分子。作为上述水溶性高分子,例如可以是普鲁兰多糖、聚乙烯吡咯烷酮等,在本发明的抗磷脂抗体测定试剂中,尤其优选使用聚乙烯吡咯烷酮。

[0088] 实施例

[0089] 根据实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。

[0090] (实施例 1)

[0091] 1) 脂质抗原液的制作

[0092] 将心磷脂的乙醇溶液(5mg/mL, SIGMA 公司产品)2mL、磷脂酰胆碱(COATSOME NC-50, 日油公司产品)的乙醇溶液(10mg/mL)10mL、胆固醇(Nacalai Tesque 公司产品)的

乙醇溶液(10mg/mL) 3mL 混合, 制得脂质抗原液。

[0093] 2) 乳胶粒子的制作

[0094] 向装有搅拌器、回流用冷凝器、温度检测器、氮气导入管及夹套的玻璃反应容器(容量 2L) 中加入蒸馏水 1100g、苯乙烯 200g、苯乙烯磺酸钠 0.2g 及在蒸馏水 50g 中溶解过硫酸钾 1.5g 而成的水溶液, 用氮气置换容器内后, 在 70°C 下边搅拌边聚合 48 小时。

[0095] 聚合完毕后, 用滤纸对上述溶液进行过滤处理, 取出乳胶粒子。用透射式电子显微镜装置(日本电子公司产品, “JEM-1010 型”) 在 10000 倍的倍率下对乳胶粒子进行拍摄, 对最低 100 个以上的粒子进行图像解析, 由此测定了所得乳胶粒子的粒径。这样, 得到平均粒径: 0.40 μm 的乳胶 A。

[0096] 3) 脂质抗原致敏乳胶试剂的制作

[0097] 预先, 缓慢搅拌下将通过上述 2) 制得的乳胶 A (固体成分含量 10 重量%) 100 μL 保持在 37°C。向该乳胶中一下子添加上述脂质抗原液 330 μL , 在该状态下在 37°C 缓慢搅拌 2 小时。接着, 一下子添加含有牛血清白蛋白(下面称作 BSA)(组分 V, 试剂级, Millipore 公司产品) 1 重量%的 100mmol/L 磷酸缓冲生理盐水(100mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4), 0.9 重量% NaCl (下面称作 PBS)) 2mL, 在 37°C 下进一步搅拌 1 小时。将其离心分离, 除去上清, 将沉淀的乳胶再次悬浮在含有 1 重量% BSA 的 PBS 中。重复该操作, 最后悬浮在含有 1 重量% BSA、7.5 重量% 氯化胆碱、0.14 重量% EDTA-2Na 及 0.1 重量% 叠氮化钠的 100mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4) (下面称作 PB) 4mL 中, 制得乳胶试剂。

[0098] 4) 检体稀释液的制作

[0099] 向 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4) 中添加 BSA、普鲁兰多糖(分子量 20 万, 林原公司产品)、叠氮化钠、鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油(COATSOME NG-50LS, 日油公司产品), 使它们的浓度分别为 1 重量%、1.0 重量%、0.1 重量%、0.17 重量%, 搅拌后, 在冰冷条件下用超声波粉碎机超声波处理(在上述仪器中, 功率为 20%、使用 0.25 英寸的微锥探头) 30 分钟以上, 直至溶液透明, 由此制得检体稀释液。

[0100] (实施例 2)

[0101] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中使添加的鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油的浓度为 0.085 重量%以外, 按相同的方法进行。

[0102] (实施例 3)

[0103] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中使添加的鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油的浓度为 0.043 重量%以外, 按相同的方法进行。

[0104] (实施例 4)

[0105] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油而添加了为合成磷脂酰甘油的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐(COATSOME MG-4040, 日油公司产品)、并使其浓度为 0.043 重量%以外, 按相同的方法进行。

[0106] (实施例 5)

[0107] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油而添加了鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺(COATSOME NE-50, 日油公司产品)、并使其浓度为 0.085 重量%以外, 按相同的方法进行。

[0108] (实施例 6)

[0109] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油而添加了为合成磷脂酰胆碱的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(COATSOMEMC-4040, 日油公司产品)、并使其浓度为 0.043 重量%,以及作为表面活性剂而添加了溶血磷脂酰胆碱(COATSOME MC-40H, 日油公司产品)、并使其浓度为 0.014 重量%以外,按相同的方法进行。

[0110] (实施例 7)

[0111] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油而添加了为合成磷脂酰胆碱的 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(COATSOME MC-6080, 日油公司产品)、并使其浓度为 0.043 重量%,以及作为表面活性剂而添加了溶血磷脂酰胆碱(COATSOME MC-40H, 日油公司产品)、并使其浓度为 0.014 重量%以外,按相同的方法进行。

[0112] (实施例 8)

[0113] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中添加了鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油及鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺、并使它们的浓度分别为 0.021 重量%及 0.021 重量%以外,按相同的方法进行。

[0114] (比较例 1)

[0115] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中未添加甘油磷脂以外,按相同的方法进行。

[0116] (实施例 9)

[0117] 1) 乳胶粒子的生成

[0118] 向装有搅拌器、回流用冷凝器、温度检测器、氮气导入管及夹套的玻璃反应容器(容量 2L)中加入蒸馏水 1100g、苯乙烯 200g、苯乙烯磺酸钠 0.2g 及在蒸馏水 50g 中溶解过硫酸钾 1.5g 而成的水溶液,用氮气置换容器内后,在 70°C 下边搅拌边聚合 48 小时。

[0119] 聚合完毕后,用滤纸对上述溶液进行过滤处理,取出乳胶粒子。用透射式电子显微镜装置(日本电子公司产品,“JEM-1010 型”)在 10000 倍的倍率下对乳胶粒子进行拍摄,对最低 100 个以上的粒子进行图像解析,由此测定了所得乳胶粒子的粒径。这样,得到平均粒径:0.40 μm 的乳胶 B。

[0120] 2) 抗 PSA 抗体致敏乳胶试剂的制作

[0121] 将乳胶 B(固体成分含量 10% (w/v))、抗 PSA 抗体 63291 分别用 20mmol/L 的甘氨酸缓冲液(pH9.0)进行稀释,调制出 1% 乳胶液、0.4mg/mL 抗体液。将它们以 1:1(1 体积+1 体积)混合,搅拌约 1 小时。向该混合液 2 体积中添加封闭液(10 重量% BSA)0.1 体积,搅拌约 1 小时。接着,在 5mmol/L MOPS (pH7.0) 溶液中透析后,稀释至 3Abs/mL (600nm),得到抗 PSA 抗体致敏乳胶溶液 a。

[0122] 此外,除了使用了乳胶 B(固体成分含量 10% (w/v))、抗 PSA 抗体 63251 以外,与上述抗 PSA 抗体致敏乳胶溶液 a 的制作相同的方式进行操作,得到抗 PSA 致敏乳胶溶液 b。

[0123] 将这样得到的乳胶溶液 a 和乳胶溶液 b 以 1:1(1 体积+1 体积)进行混合,作为抗 PSA 抗体致敏乳胶试剂。

[0124] 3) 检体稀释液的制作

[0125] 向 30mmol/L HEPES 缓冲液(pH7.0)中添加 BSA、氯化钾、聚乙烯吡咯烷酮 K90 (和光纯药工业公司产品)、鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油(COATSOME NG-50LS, 日油公司产品),使它们的浓度分别为 0.1 重量%、0.5mol/L、0.3%、0.115 重量%,搅拌后,用超声波粉碎机超声波处理 30 分钟以上,直至溶液透明,由此制成检体稀释液。

[0126] (比较例 2)

[0127] 除了在实施例 9 的 3)检体稀释液的制作中未添加甘油磷脂以外,按相同的方法进行。

[0128] 下面显示对实施例 1 ~ 9 及比较例 1 及 2 进行研究后的结果。

[0129] (研究 1)

[0130] 1) 内源性脂蛋白的分离

[0131] 用溴化钾密度梯度离心法分离高密度脂蛋白(下面称作 HDL)。

[0132] 向 50mL 超离心管中分注 1.21g/mL 的溴化钾溶液 12mL。再缓慢分注 10mL 的梅毒阴性血清,使该血清不与溴化钾溶液混合,进行层叠。接着缓慢分注精制水 12mL,使其与血清一样不发生混合,进行层叠。

[0133] 用超离心分离机在 44000rpm、4°C 下离心分离 20 小时。

[0134] 将注射针与特氟龙(注册商标)管连接,使其可借助蠕动泵吸引溶液。将该注射针缓慢插入到超离心分离后的超离心管的底部,用蠕动泵将具有溴化钾密度梯度的血清吸上。将吸上的溶液分级分离,使每一流分为 0.7mL,得到 43 个流分。

[0135] 测定该 43 个流分的 HDL 胆固醇浓度,发现在流分 No. 5 ~ 15 的范围存在 HDL。将为 HDL 胆固醇浓度最高区域的流分 No. 9 ~ 13 合并在一起,为了除去溴化钾,用生理盐水进行了透析。用 Cholestest (注册商标)N HDL (积水医疗公司产品)测定透析后的 HDL 胆固醇浓度,为 40mg/dL。

[0136] 通过以上方法可以得到含有 HDL 的生理盐水溶液。

[0137] 2) 测定检体

[0138] 对具有 120R.U. (R.U. 为梅毒阳性抗体效价的单位,1R.U 相当于 RPR 卡片法的 1 倍,1R.U. 以上者诊断为梅毒阳性。对国际标准品进行了测定时,1R.U. 为 0.4IU。)的抗体效价的梅毒抗磷脂抗体阳性检体用通过上述研究 1 中的 1) 得到的含有 HDL 的生理盐水溶液、生理盐水或血清进行递次稀释,调制出测定检体。

[0139] 3) 凝集量的测定

[0140] 用日立 7180 型生化学自动分析装置测定了凝集量。将通过上述实施例 2 或比较例 1 制成的检体稀释液 180 μ L 与通过上述研究 1 中的 2)制成的各检体 20 μ L 在上述自动分析装置的样品池中混合,混合后在 37°C 培养了 5 分钟。接着添加通过上述实施例 1 中的 1) 制成的乳胶试剂 60 μ L,混合后在 37°C 培养了 5 分钟。用自动分析装置算出在测定波长 700nm 的刚添加乳胶试剂后的吸光度与添加乳胶试剂 5 分钟后的吸光度之差(下面,在结果中用 Δ Abs \times 10000 表示)。该吸光度之差为因免疫反应而增加的凝集量。

[0141] 4) 结果

[0142] 将结果示于图 1 和图 2。

[0143] 由图 1 及图 2 确认,比较例 1 中,用含有 HDL 的生理盐水进行稀释时,与用血清进行稀释时相同,吸光度降低。由此可以认为,血清中的 HDL 为干扰成分,是吸光度降低的原

因。与此相对,在添加了甘油磷脂的实施例 2 中,即使在用含有 HDL 的生理盐水、血清进行稀释的情况下,像比较例 1 那样的吸光度降低也受到抑制,为与生理盐水基本相同的吸光度。由上述情况可知,实施例 2 中添加的甘油磷脂抑制了 HDL 引起的干扰,从而抑制了吸光度降低。

[0144] (研究 2)

[0145] 1) 测定检体

[0146] 用生理盐水或血清递次稀释具有 120R. U. 的抗体效价的梅毒抗磷脂抗体阳性检体,调制出测定检体。

[0147] 2) 凝集量的测定

[0148] 用日立 7180 型生化学自动分析装置测定了凝集量。将通过上述实施例 1 ~ 8 或比较例 1 制成的检体稀释液 180 μ L 与通过上述研究 1) 中的 1) 制成的各检体 20 μ L 在上述自动分析装置的样品池中混合,混合后在 37°C 培养了 5 分钟。接着添加通过上述实施例 1 中的 1) 制成的乳胶试剂 60 μ L,混合后在 37°C 培养了 5 分钟。用自动分析装置算出在测定波长 700nm 的刚添加乳胶试剂后的吸光度与添加乳胶试剂 5 分钟后的吸光度之差(下面,在结果中用 $\Delta \text{Abs} \times 10000$ 表示),该吸光度之差为因免疫反应而增加的凝集量。

[0149] 3) 结果

[0150] 将结果示于图 3 ~ 图 11。

[0151] 在实施例 1 ~ 8 的任一个中,生理盐水和血清在各抗体浓度下的吸光度之差均较比较例 1 减小,表明各种甘油磷脂的添加改善了血清中的干扰成分引起的吸光度降低。

[0152] (研究 3)

[0153] 1) 测定检体

[0154] 用生理盐水及女性血清对 PSA 浓度 9.5ng/mL 的检体进行稀释后使用。

[0155] 2) 凝集量的测定

[0156] 用日立 7180 型生化学自动分析装置测定了凝集量。将通过上述实施例 9 及比较例 2 生成的检体稀释液 90 μ L 与通过上述研究 1) 中的 1) 制成的各检体 10.8 μ L 在上述自动分析装置的样品池中混合,混合后在 37°C 培养了 5 分钟。接着添加通过上述实施例 9 中的 1) 制成的乳胶试剂 90 μ L,混合后在 37°C 培养了 5 分钟。用自动分析装置算出在测定波长 800nm 的刚添加乳胶试剂后的吸光度与添加乳胶试剂 5 分钟后的吸光度之差(下面,在结果中用 $\Delta \text{Abs} \times 10000$ 表示),该吸光度之差为因免疫反应而增加的凝集量。

[0157] 3) 结果

[0158] 将结果示于图 12 及图 13。

[0159] 在实施例 9 中,生理盐水和血清在各 PSA 浓度下的吸光度差较比较例 2 减小,表明各种甘油磷脂的添加改善了血清中的干扰成分引起的吸光度降低。

[0160] 本发明是一种回避在通过免疫反应来测定血中被测物的试剂中的内源性脂蛋白的影响的方法,在抗磷脂抗体测定试剂中,通过回避内源性脂蛋白的影响,使得更准确的测定成为可能。

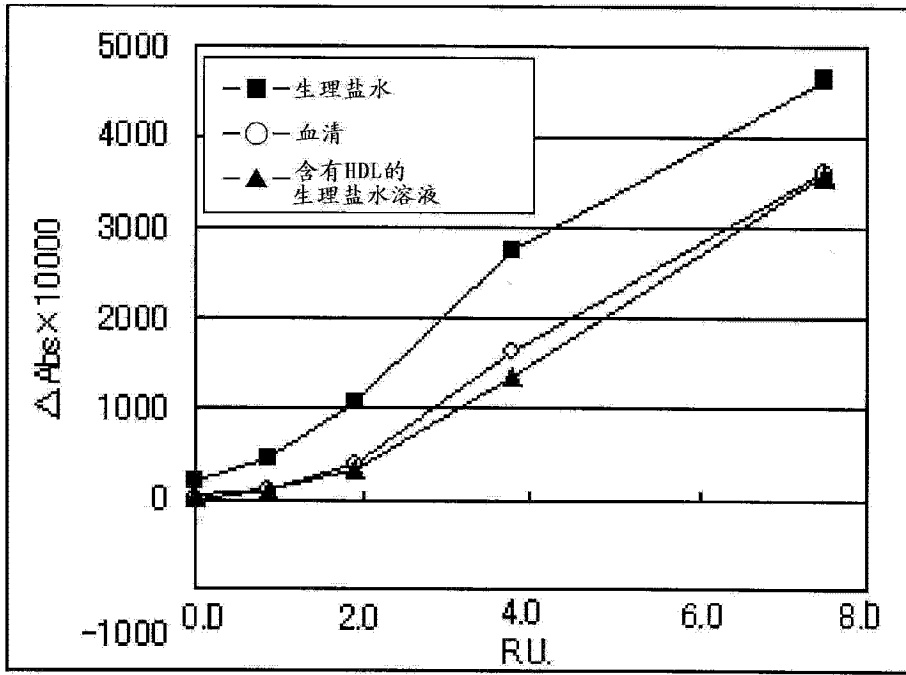


图 1

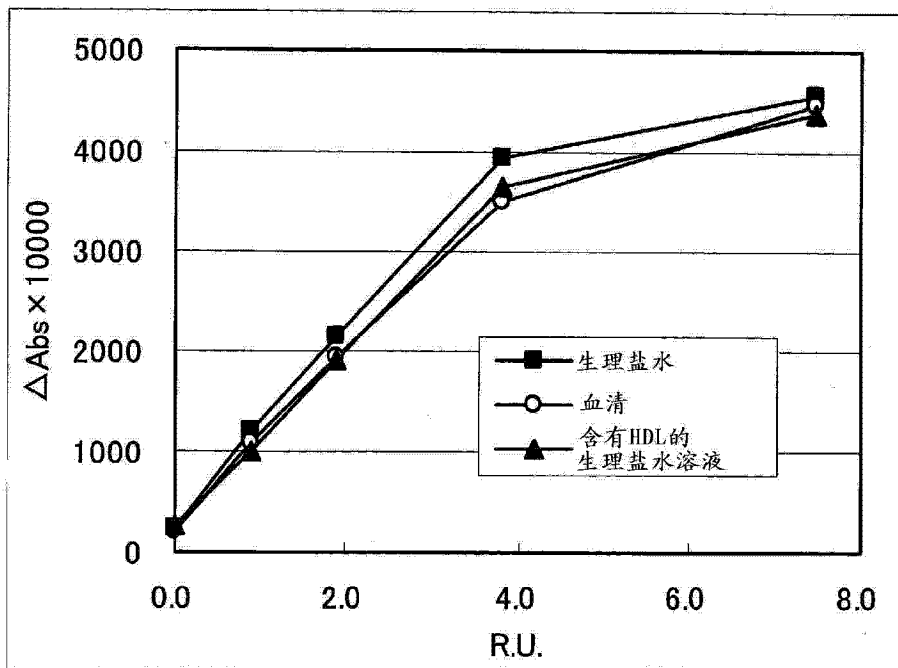


图 2

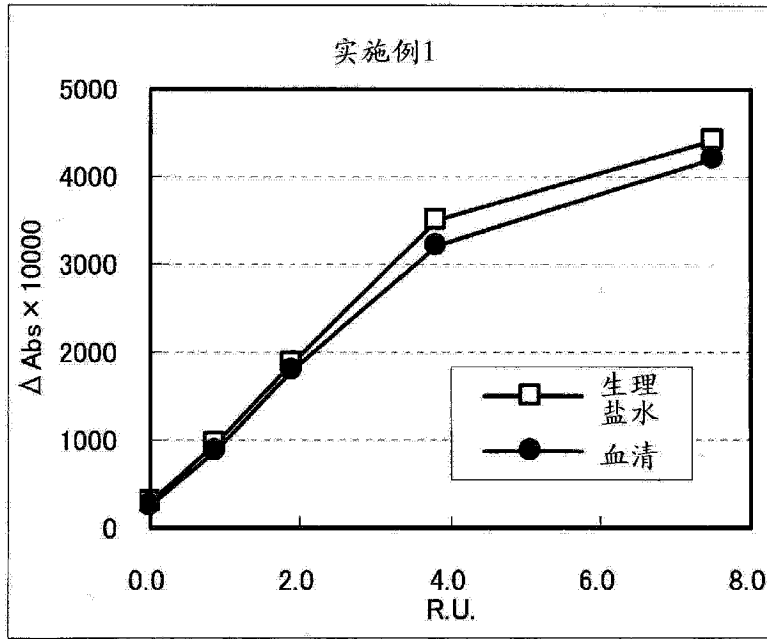


图 3

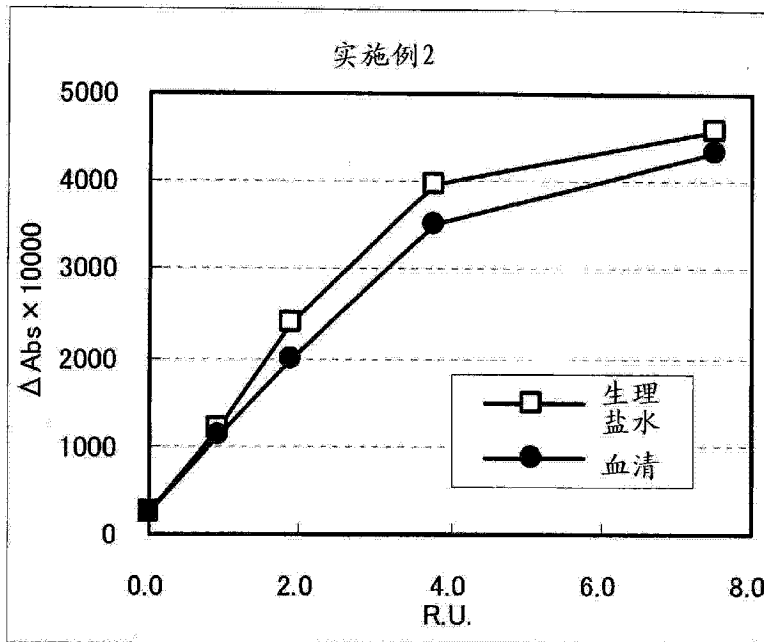


图 4

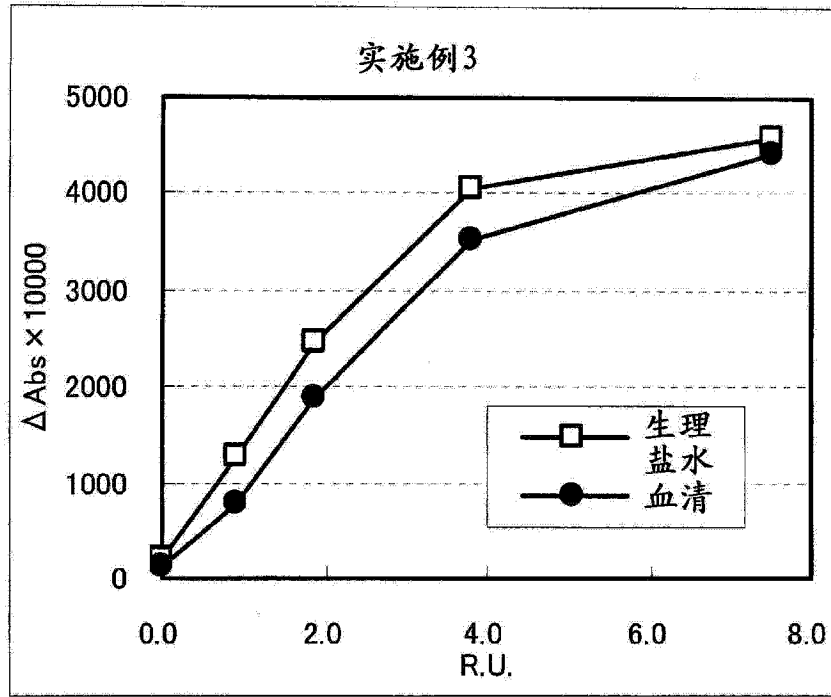


图 5

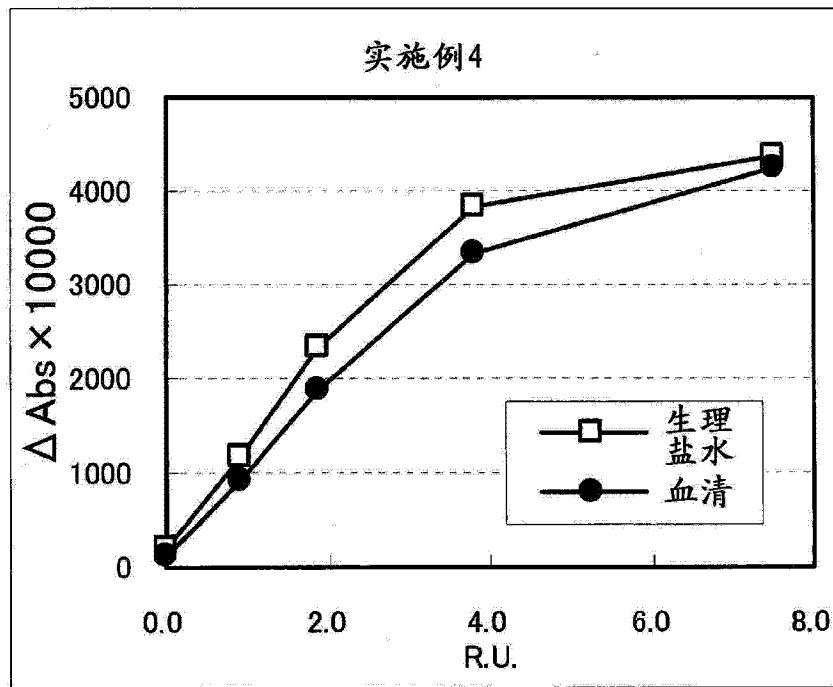


图 6

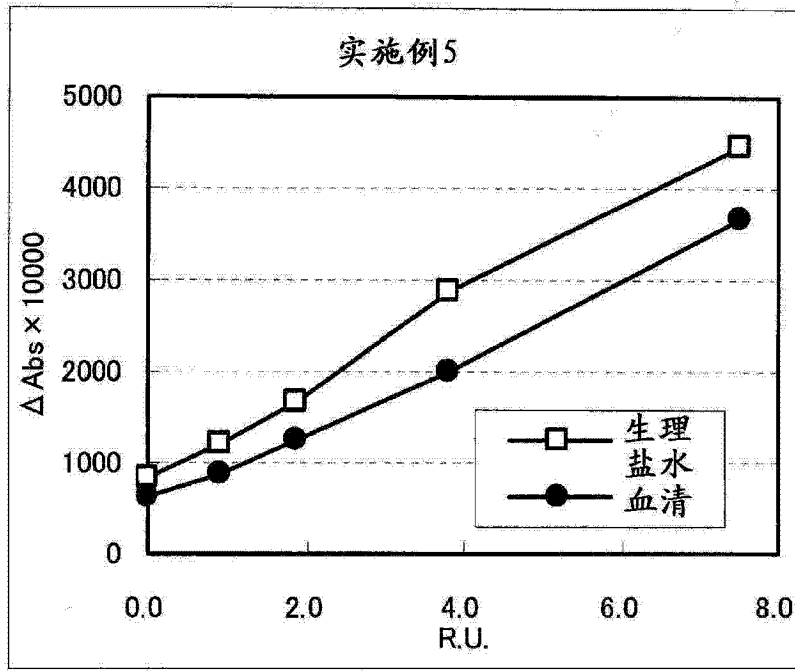


图 7

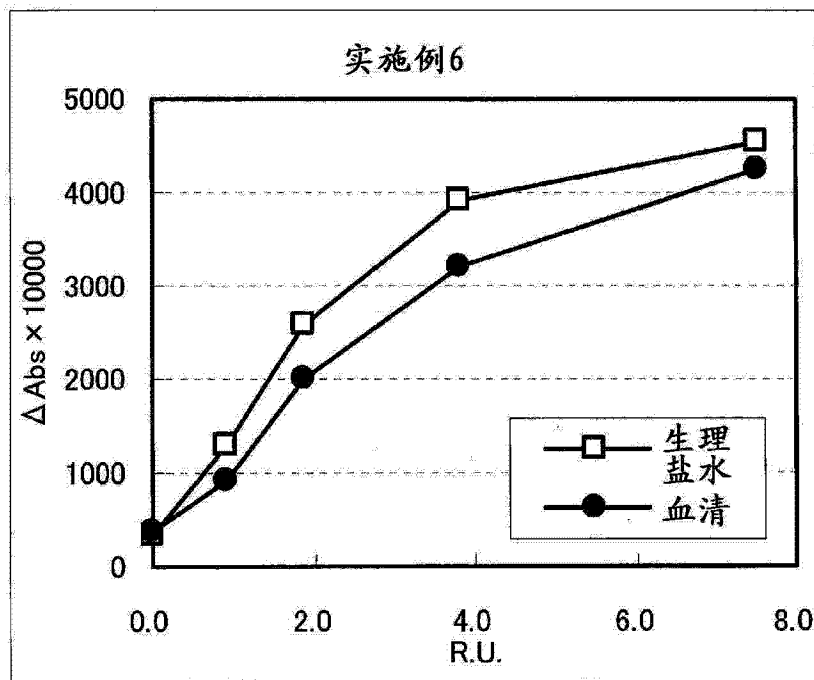


图 8

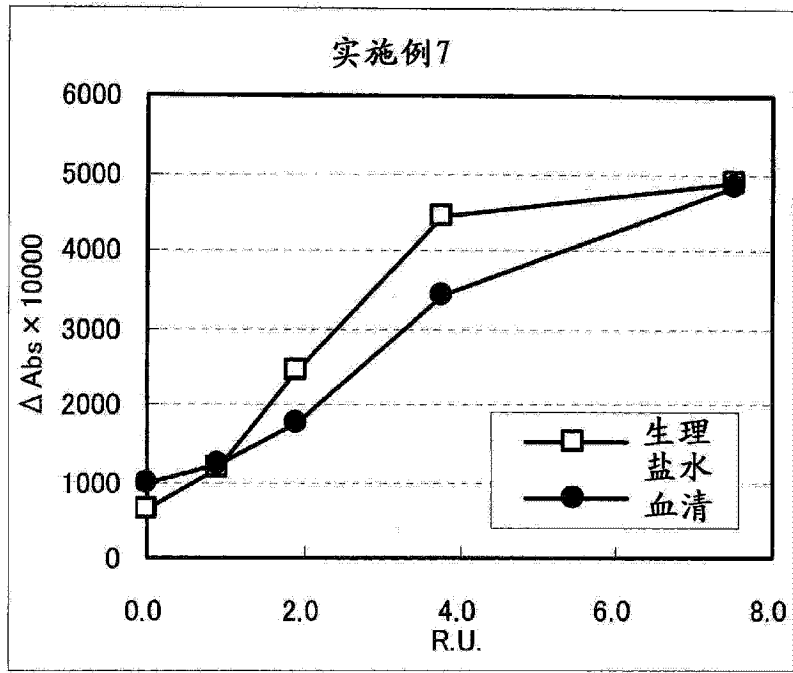


图 9

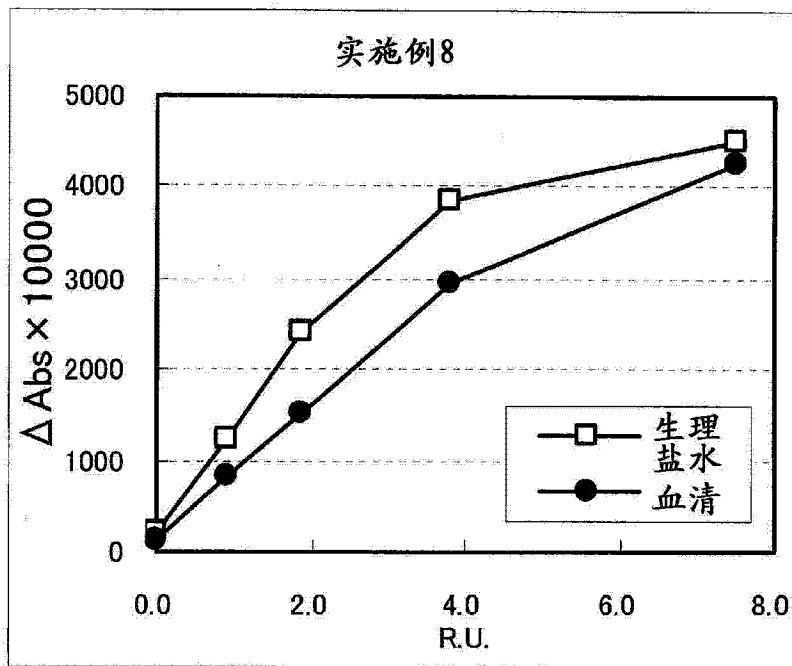


图 10

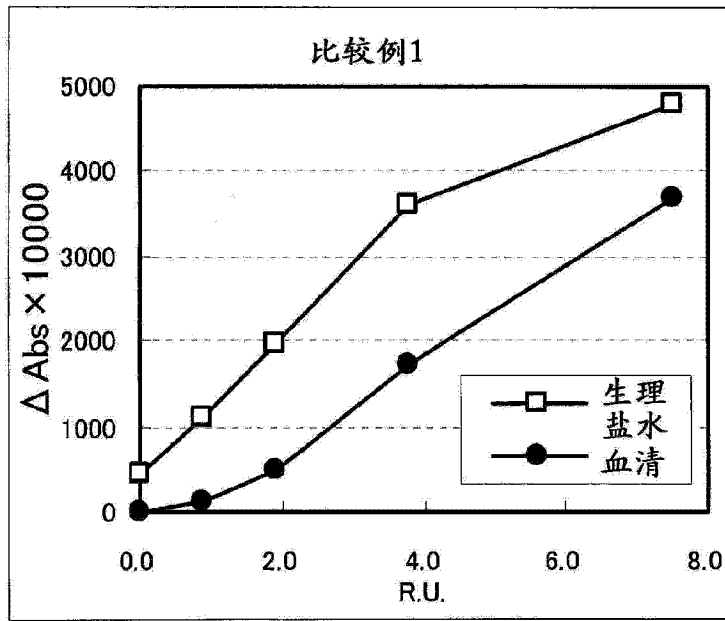


图 11

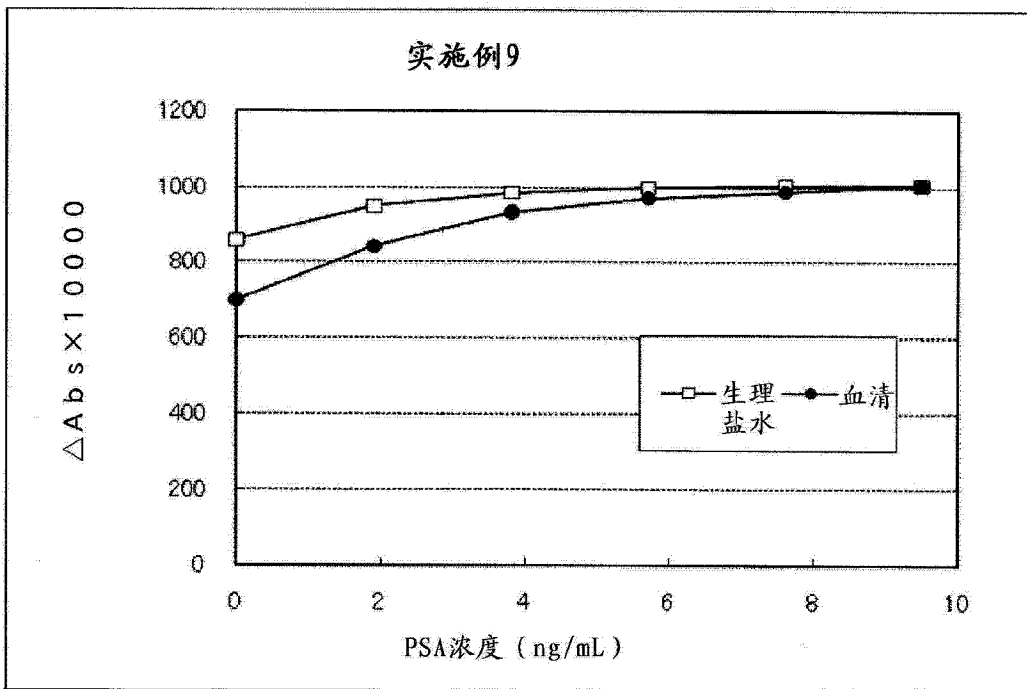


图 12

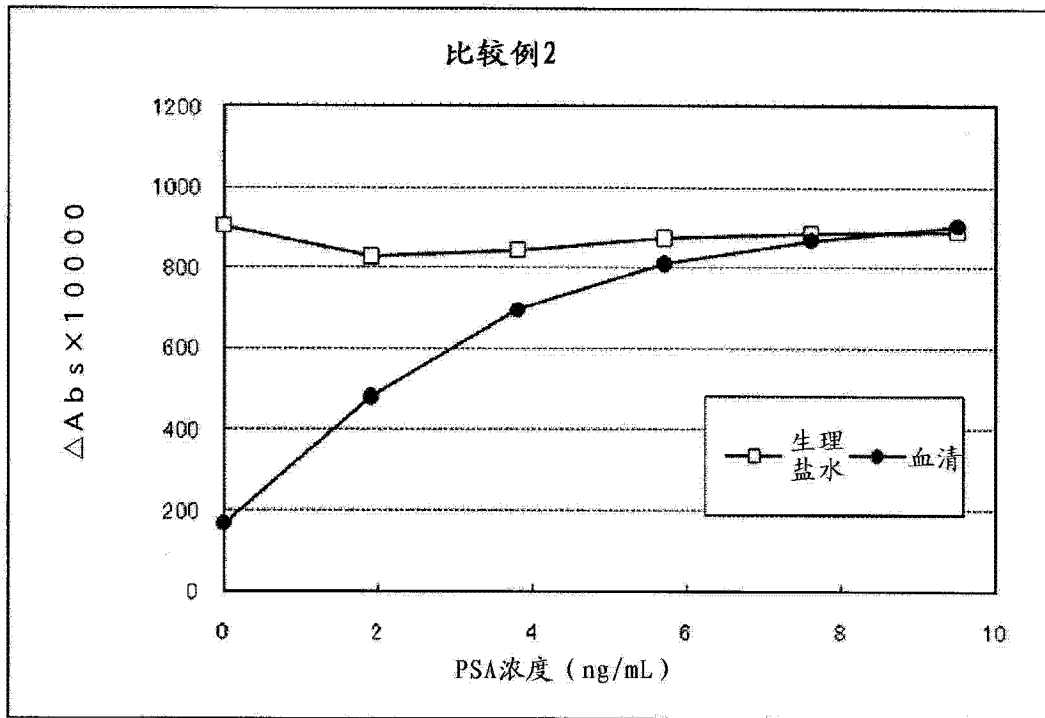


图 13

专利名称(译)	回避内源性脂蛋白的影响的方法及试剂		
公开(公告)号	CN102834719B	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201180017602.2	申请日	2011-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	阿部孝行 高桥由纪 大田哲也		
发明人	阿部孝行 高桥由纪 大田哲也		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N1/34 G01N2333/4718 G01N33/54393 G01N33/57434 G01N33/92 G01N2333/96455 G01N2405/04		
代理人(译)	苗堃 陈剑华		
审查员(译)	赵晓明		
优先权	2010083735 2010-03-31 JP		
其他公开文献	CN102834719A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种查清血清、血浆中的干扰成分、回避该干扰成分影响的手段。本发明提供一种回避内源性脂蛋白的影响的方法，其特征在于，被测物为血中的抗体或抗原，在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂中，向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂。

