



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109564223 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780046302.4

(22)申请日 2017.09.05

(30)优先权数据

2016-173878 2016.09.06 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/031874 2017.09.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/047793 JA 2018.03.15

(71)申请人 富士瑞必欧株式会社

地址 日本国东京都新宿区西新宿二丁目1  
番1号

(72)发明人 山本纮辅 北村由之 八木慎太郎

青柳克己

(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理  
有限公司 11444

代理人 龚敏 王刚

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

肿瘤标记物的测定方法及测定试剂

(57)摘要

本发明公开一种测定方法、及测定试剂,所述测定方法在生物体试样中的肿瘤标记物的测定中,使自身抗体等的影响导致的假性低值、和HAMA等的影响导致的假性高值的产生均减少,可以进行更准确的测定。肿瘤标记物的测定方法包含前处理工序,所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合,通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的肿瘤标记物。肿瘤标记物的免疫分析用试剂具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。

1. 一种通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的肿瘤标记物的方法,其包含前处理工序,所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,  
所述前处理液含有酸性化剂,前处理工序中的酸性化剂的终浓度超过0.05N且为0.5N以下。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,  
所述前处理液含有表面活性剂,该表面活性剂为阴离子型表面活性剂。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,  
所述前处理工序在加热条件下进行。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,  
所述肿瘤标记物为PSA、甲胎蛋白、CA125、CA15-3、CA19-9、或癌胚抗原。

6. 一种肿瘤标记物的免疫分析用试剂,其具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。

## 肿瘤标记物的测定方法及测定试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤标记物的测定方法及测定试剂。

### 背景技术

[0002] 肿瘤标记物为通常在正常细胞中不产生、由肿瘤细胞特异性地产生的蛋白质的总称,特别是指可以从被检者的血液等的生物体试样中检出、测定的物质。在肿瘤的诊断中,生物体试样中的肿瘤标记物的测定值可以用于确认是否产生肿瘤、或用于确认患者在治疗后肿瘤消失等。在肿瘤标记物中,脏器特异性地存在多种物质,但作为主要的物质,已知有PSA(前列腺)、甲胎蛋白(AFP·主要是肝脏)、CA125(卵巢)、CA15-3(乳房)、CA19-9(消化器官)、癌胚抗原(CEA·主要是消化器官)等。

[0003] 生物体试样中的肿瘤标记物大多通过使用与肿瘤标记物特异性地结合的抗体的免疫分析系统进行测定。但是,已知在生物体试样中有时存在与肿瘤标记物结合的抗体、所谓的自身抗体等),在对这种试样进行测定时,有可能产生肿瘤标记物的测定值与实际相比变低、即假性低值(非专利文献1、2)。另一方面,也已知如下情况:在患者的治疗中,在接受了使用与肿瘤细胞上的表位结合的小鼠单克隆抗体来消灭癌细胞的治疗的患者血清中,有时产生抗小鼠抗体(HAMA),在该HAMA的影响下,有可能产生肿瘤标记物的测定值与实际相比升高的、即假性高值(非专利文献3)。进而,报道了以下情况:原因尚未确定,作为HAMA及抗动物抗体(HAAA:Humananti-animalantibody:以下与HAMA一起记为HAMA等)、低亲和性自身抗体被观察的嗜异性抗体(Heterophile antibody:以下与抗体一起记为自身抗体等)存在于血中,成为假性高值、假性低值的主要原因(非专利文献4)。

现有技术文献

非专利文献

[0004] 非专利文献1:俵木美幸等、JICLA Vol.37、No.1、pp.17-20(2012) 非专利文献2:阿部正树等、検査と技術Vol.40、No.2、pp.162-163(2012)

非专利文献3:F.J.Primus et al.,Clin.Chem.34/2,pp.261-264(1988)

非专利文献4:Kricka,L.J.,Clin.Chem.45/7,pp.942-956(1999)

### 发明内容

发明所要解决的技术问题

[0005] 本发明的目的在于,提供一种测定方法、及测定试剂,所述测定方法在生物体试样中的肿瘤标记物的测定中,使自身抗体等的影响导致的假性低值、或HAMA等的影响导致的假性高值的产生均减少,可以进行更准确的测定。

用于解决问题的技术方案

[0006] 本发明人等为了实现上述目的进行了深入研究,结果发现,在生物体试样中的肿瘤标记物的测定时,通过在将所述生物体试样供于免疫反应之前设置将含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液混合的前处理工序,则不受自身抗体等、HAMA等的

影响,可得到更准确的肿瘤标记物的测定值,完成了本发明。

[0007] 本发明的构成如下所述。

(1) 一种通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的肿瘤标记物的方法,其包含前处理工序,前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合。

(2) 根据(1)所述的方法,其中,所述前处理液含有酸性化剂,前处理工序中的酸性化剂的终浓度超过0.05N且为0.5N以下。

(3) 根据(1)所述的方法,其中,所述前处理液含有表面活性剂,该表面活性剂为阴离子型表面活性剂。

(4) 根据(3)所述的方法,其中,所述前处理工序在加热条件下进行。

(5) 根据(1)~(4)中任一项所述的方法,其中,所述肿瘤标记物为PSA、甲胎蛋白、CA125、CA15-3、CA19-9、或癌胚抗原。

(6) 一种肿瘤标记物的免疫分析用试剂,其具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。

发明效果

[0008] 根据本发明,可以提供一种测定方法、及测定试剂,其在生物体试样中的肿瘤标记物的测定中,使自身抗体等的影响导致的假性低值、或HAMA等的影响导致的假性高值的产生均减少,可以进行更准确的测定。

## 附图说明

[0009] 图1是表示酸性化前处理液的盐酸浓度与呈现CA19-9的假性高值的血清被检体的测定值的相关性的图。

图2是表示酸性化前处理液的盐酸浓度与CA19-9标准液的测定值的相关性的图。

图3是表示酸性化前处理液的盐酸浓度与CA19-9自身抗体模型被检体的测定值的相关性的图。

图4是表示酸性化前处理液的盐酸浓度与PSA自身抗体模型被检体的测定值的相关性的图。

## 具体实施方式

[0010] 本说明书中所记载的“%”的浓度,只要没有特殊说明,表示重量/体积(w/v)的浓度。

[0011] <肿瘤标记物的测定方法>

用本发明的方法测定的肿瘤标记物具体而言为选自PSA(前列腺)、甲胎蛋白(AFP·主要是肝脏)、CA125(卵巢)、CA15-3(乳房)、CA19-9(消化器官)、癌胚抗原(CEA·主要消化器官)中的源自人的肿瘤标记物。

[0012] 1. 前处理工序

本发明的方法为通过使生物体试样和抗体反应的免疫反应而测定存在于生物体试样中的肿瘤标记物的方法,其特征在于,在免疫反应(反应工序)之前,包含将生物体试样和前处理液进行混合的前处理工序。通过前处理工序而形成使肿瘤标记物从自身抗体等游离的

状态,且可以抑制HAMA等的非特异反应。前处理液可以含有表面活性剂及酸性化剂中的任一者,也可以含有两者。优选前处理液含有表面活性剂或酸性化剂中的任一者。

[0013] 在所述前处理工序中进行混合的生物体试样和前处理液的体积比优选设为1:10~10:1,特别优选设为1:5~5:1,进一步优选设为1:3~3:1。本发明中所使用的生物体试样只要是可能含有肿瘤标记物的试样,就没有特别限定,可列举例如:血清、血浆、全血、尿、便、口腔粘膜、咽粘膜、肠道粘膜及活检试样(例如肠道试样、肝脏试样)。优选生物体试样为血清或血浆。

[0014] 作为所述前处理液中所含的表面活性剂,阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、两性表面活性剂、非离子型表面活性剂均可以使用,特别优选阴离子型表面活性剂。作为阴离子型表面活性剂,可以优选使用十二烷基硫酸钠(SDS)、N-月桂酰肌氨酸、十二烷基硫酸锂、十二烷基苯磺酸钠、脱氧胆酸等,特别可以优选使用SDS。使用SDS的情况下,作为与生物体试样混合的前处理时的浓度,优选设为0.1~12.5%,特别优选设为0.25~10%,进一步优选设为0.5~7.5%。通过将SDS的浓度设为0.1~10%(w/v)而发挥如下效果:使与肿瘤标记物结合的自身抗体等或HAMA等非特异物质充分地游离、并且不易产生SDS的析出等。

[0015] 作为所述前处理液中所含的酸性化剂,可以优选使用盐酸、硫酸、醋酸等。使用酸性化剂的情况下,前处理液的酸的当量度优选设为以前处理时的浓度计超过0.05N且0.5N以下,特别优选设为0.1N以上且0.4N以下。通过将酸的当量度设为超过0.05N且0.5N以下,可充分地得到前处理的效果,且可以将对后段的反应工序的影响最小化。

[0016] 在前处理中使用酸性化剂的情况下,优选以在与生物体试样的混合时不产生沉淀的方式添加阳离子型表面活性剂。作为阳离子表面活性剂,特别优选在同一分子中具有碳原子数10个以上的一条链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂。作为这种表面活性剂的实例,可列举:癸基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基氯化铵(C16TAC)、癸基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化十二烷基吡啶鎓、氯化十四烷基吡啶鎓、氯化十六烷基吡啶鎓等。阳离子表面活性剂的添加量以与被检体混合时的浓度计优选为0.01%以上且15%以下,进一步优选0.05%~10%。

[0017] 在含有酸性化剂的前处理液中,除上述阳离子型表面活性剂之外,可以进一步含有非离子型表面活性剂等其它表面活性剂。通过其它表面活性剂的添加,可以进一步以高灵敏度检测肿瘤标记物。

[0018] 在前处理液中,可以进一步使用还原剂。作为还原剂,2-(二乙基氨基)乙硫醇盐酸盐(DEAET)、三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇、硫代甘油、亚硫酸钠、硼氢化物等的现有的还原剂均可以使用,但可以以溶液中的稳定性的理由特别优选使用DEAET、TCEP。作为还原剂的浓度,以与生物体试样的混合液的终浓度计优选设为0.5~100mM,特别优选设为1.0~50mM,进一步优选设为2.0~20mM。

[0019] 在前处理液中,可以根据需要含有尿素、硫脲等其它蛋白变性剂。变性剂的浓度以处理时浓度计优选0.1M以上,进一步优选0.5M以上且低于4M。另外,在前处理液中,为了使处理效果增强,可以添加单糖类、二糖类、柠檬酸、及柠檬酸盐类中的任一种、或将它们组合而添加。进而,可以在前处理液中含有EDTA等的螯合剂。

[0020] 就前处理工序而言,优选将生物体试样和前处理液混合之后,进一步进行加热。特别是在前处理液中使用表面活性剂的情况下,为了提高其效果,优选进行加热。加热温度优选设为35~95℃,特别优选设为50~90℃,进一步优选设为70~85℃。另外,加热时间优选设为1分钟以上,特别优选设为3分钟以上,进一步设为5分钟以上。加热时间不存在特别的上限,通常为60分钟以下、特别为30分钟以下的加热时间即可。

## [0021] 2. 反应工序

通过本发明方法的前处理工序处理后的生物体试样混合液接着供于反应工序。在反应工序中,使生物体试样混合液与缓冲液混合,使混合液中的抗原与针对测定对象的肿瘤标记物的抗体反应。

[0022] 作为所述缓冲液,可列举例如以MES缓冲液、磷酸缓冲液、Tris缓冲液、碳酸缓冲液为基础的缓冲液,特别可以优选使用以磷酸缓冲液为基础的物质。在使用含有表面活性剂的溶液作为前处理液的情况下,例如优选使用:含有以与前处理后的混合液混合时的终浓度计为0.01~10%、特别是0.05~5.0%左右的BSA、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、葡聚糖硫酸钠的水溶性高分子的缓冲液。另外,在使用含有酸性化剂的溶液作为前处理液的情况下,优选使用含有碱剂、或具有可缓和前处理液的酸的影响的缓冲能力的缓冲液。前处理工序的混合液和缓冲液的混合优选以体积比计设为1:10~10:1,特别优选设为1:5~5:1,进一步优选设为1:3~3:1。

[0023] 针对本发明的方法中使用的肿瘤标记物的抗体为将肿瘤标记物的氨基酸序列的至少一部分或糖链作为表位来识别的抗体。针对肿瘤标记物的抗体没有特别限定,识别已知的表位的抗体均可以使用,优选针对肿瘤标记物的抗体为识别肿瘤标记物中特异性表位的抗体。

[0024] 针对肿瘤标记物的抗体可以为多克隆抗体或单克隆抗体中的任一种。针对肿瘤标记物的抗体可以为免疫球蛋白(例如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、IgY)中的任一种同种型。针对肿瘤标记物的抗体另外可以为全长抗体。全长抗体是指包含各自含有可变区域及恒定区域的重链及轻链的抗体(例如含有2个Fab部分及Fc部分的抗体)。针对肿瘤标记物的抗体另外也可以为源自这种全长抗体的抗体片段。抗体片段为全长抗体的一部分,可列举例如恒定区缺失抗体(例如F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv)。针对肿瘤标记物的抗体另外也可以为单链抗体等的改造抗体。

[0025] 针对肿瘤标记物的抗体可以使用以往公知的方法而制作。例如,针对肿瘤标记物的抗体可以将上述的表位用作抗原而制作。另外,市售有识别如上所述的表位的针对肿瘤标记物的多种抗体,因此,也可以使用这种市售品。

[0026] 针对肿瘤标记物的抗体可以固相化于固相。本说明书中,有时将固相化于固相的抗体简称为固相化抗体。作为固相,可列举例如可收容或搭载液相的固相(例如板、薄膜、试管等支撑体及孔板、微流路、玻璃毛细管、纳米柱、独石柱等容器)、以及可悬浮或分散于液相的固相(例如粒子等的固相载体)。作为固相的材料,可列举例如玻璃、塑料、金属、及碳。作为固相的材料,另外可以使用非磁性材料、或磁性材料,但从操作的简便性等的观点出发,优选磁性材料。固相优选为固相载体,更优选为磁性固相载体,进一步更优选为磁性粒子。作为抗体的固相化方法,可以利用以往公知的方法。作为这种方法,可列举例如物理性吸附法、共价键法、利用亲和性物质(例如生物素、链霉亲和素)的方法、及离子键法。在特定

的实施方式中,针对肿瘤标记物的抗体为固相化于固相的抗体,优选为固相化于磁性的固相的抗体,更优选为固相化于磁性粒子的抗体。

[0027] 就反应工序而言,可以将前处理工序的混合液和缓冲液进行混合之后,与进行了固相化的抗体接触,另外,也可以为在缓冲液中预先放入例如固相化在粒子上的抗体而制成粒子液,使所述混合液和粒子液混合。就反应工序而言,例如可以如免疫凝集法或竞争法那样仅通过一次反应工序来实施,也可以设置二次反应工序。需要说明的是,设置二次反应工序的情况下,可以在一次反应工序和二次反应工序之间设置用于除去未反应成分的清洗工序。

[0028] 针对肿瘤标记物的抗体可以用标记物质进行标记化。本说明书中,有时将用标记物质进行了标记化的抗体简称为标记化抗体。作为标记物质,可列举例如:酶(例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、 $\beta$ 半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如链霉亲和素、生物素)、荧光物质或蛋白质(例如荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白)、发光或吸光物质(例如荧光素、水母蛋白、吖啶鎓、钆)、放射性物质(例如 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ )。另外,在本发明的方法中设置二次反应的情况下,用于二次反应的抗体也可以用这种标记物质进行标记化。

[0029] 在特定的实施方式中,本发明的方法包含其它抗体作为用于二次反应的抗体,所述其它抗体针对肿瘤标记物、且识别与针对肿瘤标记物的抗体不同的表位。这种其它抗体所识别的表位的详细情况与上述的关于针对肿瘤标记物的抗体而详述的表位同样(其中,并用的情况下,表位的种类不同)。针对肿瘤标记物的抗体所识别的表位与针对肿瘤标记物的其它抗体所识别的表位的组合没有特别限定。例如,在利用夹心法的情况下优选应用这种其它抗体。

### [0030] 3. 检测工序

在一抗或二抗使用了标记的情况下,通过适于所使用的标记的方法、例如在使用酶标记的情况下添加酶的底物而检测。例如,将碱性磷酸酶(ALP)用作标记抗体的情况下,可以设为将3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷·2钠盐(AMPPD)用作酶底物的化学发光酶免疫测定法(CLEIA)的体系。

[0031] 本发明的方法为使用针对肿瘤标记物的抗体的免疫分析。作为这种免疫分析,可列举例如直接竞争法、间接竞争法、及夹心法。另外,作为这种免疫分析,可列举:化学发光酶免疫测定法(CLEIA)、化学发光免疫分析(CLIA)、免疫比浊法(TIA)、酶免疫测定法(EIA)(例如直接竞争ELISA、间接竞争ELISA、及夹心ELISA)、放射免疫分析(RIA)、胶乳凝集反应法、荧光免疫分析(FIA)、及免疫色谱法。这些免疫分析本身为公知的,在此没必要详细地叙述,分别简单地进行说明。

[0032] 直接竞争法为如下方法:将针对待测定的靶抗原(本发明中为肿瘤标记物)的抗体固相化于固相(关于固相及固相化,如上所述),在用于防止非特异吸附的封闭处理(用血清白蛋白等蛋白质溶液处理固相)后,使该抗体、含有所述靶抗原的被检试样(本发明中为如上所述进行了前处理工序的生物体试样)和一定量的标记后的抗原(标记如上所述)反应,清洗后,对与固相结合标记进行定量。被检试样中的抗原和标记抗原与抗体竞争地结合,因此,被检试样中的抗原量越多,与固相结合的标记的量越少。制作各种已知浓度的抗原标准液,分别固相化于固相而测定标记量(根据标记的性质而测定吸光度、发光强度、荧光强

度等,以下相同),制作以抗原浓度为横轴、以标记量为纵轴的标准曲线。对未知的被检试样,测定标记量,通过将所测定的标记量代入标准曲线,可以测定未知的被检试样中的抗原量。直接竞争法本身在该领域中为公知的,例如记载于US20150166678A1。

[0033] 在间接竞争法中,将靶抗原(本发明中为肿瘤标记物)固相化于固相(关于固相及固相化,如上所述)。接着,在固相的封闭处理后,将含有靶抗原的被检试样(本发明中为如上述那样进行了前处理工序的生物体试样)和一定量的抗靶抗原抗体进行混合,使其与上述固相化抗原反应。清洗后,对与固相结合的有关抗靶抗原抗体进行定量。其可以通过使针对所述抗靶抗原抗体的标记的二抗(标记如上所述)反应、清洗后测定标记量而进行。制作各种已知浓度的抗原标准液,分别固相化于固相而测定标记量,制作标准曲线。对未知的被检试样,通过测定标记量并将所测定的标记量代入标准曲线,可以测定未知的被检试样中的抗原量。需要说明的是,也可以不使用标记二抗而使用标记的一抗。间接竞争法本身在该领域中为公知的,例如记载于上述的US20150166678A1。

[0034] 夹心法为如下方法:将抗靶抗原抗体固相化于固相(关于固相及固相化,如上所述),在封闭处理后,使含有靶抗原的被检试样(本发明中为如上述那样进行了前处理工序的生物体试样)反应,清洗后,使针对靶抗原的标记的二抗(标记如上所述)反应,清洗后,对与固相结合的标记进行定量。制作各种已知浓度的抗原标准液,分别测定固相化于固相的标记量,制作标准曲线。对未知的被检试样,通过测定标记量并将所测定的标记量代入标准曲线,可以测定未知的被检试样中的抗原量。夹心法本身在该领域中为公知的,例如记载于US20150309016A1。

[0035] 上述的各种免疫分析中,化学发光酶免疫分析法(CLEIA)、化学发光免疫分析(CLIA)、酶免疫分析法(EIA)、放射免疫分析(RIA)、荧光免疫分析(FIA)为基于在进行上述的直接竞争法、间接竞争法、夹心法等时使用的标记种类而进行分类的免疫分析。化学发光酶免疫分析法(CLEIA)为使用酶(例如上述的碱性磷酸酶)作为标记、使用产生化学发光性化合物的底物(例如上述的AMPPD)作为底物的免疫分析。酶免疫分析法(EIA)为使用酶(例如上述的过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等)作为标记的免疫分析。作为各酶的底物,使用可通过吸光度测定等而定量的化合物。例如,在过氧化物酶的情况下,使用1,2-亚苯基二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等,在碱性磷酸酶的情况下,使用对硝基苯基磷酸酯(pNPP)等,在 $\beta$ -半乳糖苷酶的情况下,使用MG:4-甲基伞形基半乳糖苷、NG:硝基苯基半乳糖苷等,在荧光素酶的情况下,使用荧光素等。放射免疫分析(RIA)为使用放射性物质作为标记的方法,作为放射性物质,如上所述可列举 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等放射性元素。荧光免疫分析(FIA)为使用荧光物质或荧光蛋白作为标记的方法,作为荧光物质或荧光蛋白,如上所述可列举荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白等。使用这些标记的免疫分析本身在该领域中为公知的,例如记载于US8039223B或US20150309016A1。

[0036] 免疫比浊法(TIA)为利用了因通过待测定的靶抗原(本发明中为肿瘤标记物)和针对该抗原的抗体的抗原抗体反应而生成的抗原抗体复合物而浊度增大的现象的免疫分析。在抗靶抗原抗体溶液中添加各种已知浓度的抗原,分别测定浊度,制作标准曲线。对未知的被检试样,同样地测定浊度,将所测定的浊度代入标准曲线,由此可以测定未知的被检试样中的抗原量。免疫比浊法本身为公知的,例如记载于US20140186238A1。胶乳凝集法与免疫

比浊法类似,为使用表面固定有抗靶抗原抗体的胶乳粒子的悬浮液取代免疫比浊法中的抗体溶液的方法。免疫比浊法及胶乳凝集法本身在该领域中为公知的,例如记载于US820,398B。

[0037] 免疫色谱法为在由滤纸、纤维素薄膜、玻璃纤维、无纺布等多孔性材料形成的基体(也称为基质或条板)上进行上述的夹心法或竞争法的方法。例如,利用夹心法的免疫色谱法的情况下,将固定化有抗靶抗原抗体的检测区域设置于上述基体上,将含有靶抗原的被检试样(本发明中为如上述那样进行了前处理工序的生物体试样)添加于基体,从上游侧使展开液流动而使靶抗原移动至检测区域,将其固定化在检测区域。将固定化的靶抗原用标记的二抗夹在中间,对被固定化在检测区域的标记进行检测,由此检测被检试样中的靶抗原。通过将含有标记二抗的标记区域形成于检测区域的更上游侧,靶抗原和标记二抗的结合体被固定化在检测区域。在标记为酶的情况下,含有酶的底物的底物区域也设置于检测区域的更上游侧。在竞争法的情况下,例如将靶抗原固定化在检测区域,可以使被检试样中的靶抗原和固定化在检测区域的靶抗原竞争。在检测区域的更上游侧设置标记抗体区域,使被检试样中的靶抗原和标记抗体反应,通过在检测区域固定化未反应的标记抗体并对标记进行检测或定量,可以检测或定量被检试样中的靶抗原。免疫色谱法本身在该领域中为公知的,例如记载于US6210898B。

[0038] <肿瘤标记物的测定试剂>

本发明的肿瘤标记物的测定试剂为可实现上述的肿瘤标记物的测定方法的测定试剂。本发明的测定试剂的特征在于,除通常的免疫分析中所使用的构成之外,包含含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液作为构成成分。

[0039] 本发明的试剂在相互隔离的形态或组合物的形态中含有各构成成分。具体而言,各构成成分可以以分别收容于不同的容器(例如管、板)的形态提供,也可以以一部分构成成分为组合物的形态(例如同一溶液中)提供。或者,本发明的试剂可以以器件的形态提供。具体而言,可以以构成成分全部收容于器件中的形态提供。或者,也可以是构成成分的一部分以收容于器件中的形态提供,剩余的部分以不收容于器件中的形态(例如收容于不同的容器的形态)提供。该情况下,没有收容于器件中的构成成分可以在测定靶物质时通过注入于器件中而被使用。

[0040] 在优选的实施方式中,本发明的试剂可以具有与应采用的免疫分析的种类相应的构成。例如,采用夹心法的情况下,本发明的试剂可以含有:作为必须的构成成分的i)前处理液、ii)针对肿瘤标记物的抗体、iii)缓冲液、以及作为任意的构成成分的iv)针对肿瘤标记物的其它抗体、v)标记物质、vi)稀释液、及根据需要的vii)与标记物质反应的底物。ii)及iii)的构成成分可以包含在同一溶液中。iv)的构成成分也可以用v)标记物质进行标记化。优选针对肿瘤标记物的抗体可以固相化于磁性粒子。

#### 实施例

[0041] <实施例1酸性化前处理的自身抗体干扰的避免>

##### (1) 被检体制备

取代含有自身抗体等的被检体,将Lumipuls Presto CA19-9、AFP、CA15-3、CA125、CEA的高浓度的标准液以被检体稀释液(组成:含有Tris缓冲液和BSA)稀释成5倍,以终浓度成为100 $\mu$ g/mL的方式添加与各试剂的固相化抗体(源自小鼠)相同的游离抗体,将其作为自身

抗体模型被检体使用。将使用的各标准液的浓度示于表1。同时,添加100 $\mu$ g/mL小鼠IgG取代固相化抗体,将其作为对照被检体使用。

[0042] [表1]

肿瘤标记物	高浓度标准液
CA19-9	500U/mL
AFP	2000ng/mL
CA15-3	400U/mL
CA125	1000U/mL
CEA	200ng/mL

[0043] 对各自身抗体模型被检体及对照被检体,将被检体50 $\mu$ L与酸性化前处理液(2.5M尿素、0.42M盐酸、0.08M柠檬酸水合物、2.5%麦芽糖、10.0%CTAB、4.9%TritonX-100(商品名))50 $\mu$ L混合,在1000rpm的振荡条件下在37 $^{\circ}$ C下加热6分钟。接着,加入缓冲液(500mM Bicine、50mM MOPS、200mM NaCl、20mM EDTA3Na、10.0%BSA、0.10%ProClin(注册商标)、NaOH( $\sim$ pH9.2))100 $\mu$ L,作为酸性化前处理样品。对同一被检体,另外将各50 $\mu$ L与预先混合有酸性化前处理液50 $\mu$ L和缓冲液100 $\mu$ L的液体进行混合,作为未处理样品。对自身抗体模型被检体和对照被检体,使用Lumipuls Presto CA19-9、AFP、CA15-3、CA125、CEA(Fujirebio社),如通常那样测定各肿瘤标记物。

[0044] 将测定结果示于表2。就CA19-9、AFP、CA15-3、CA125、CEA中的任一种肿瘤标记物而言,在未处理的情况下均通过固相化抗体的添加而抑制反应,与对照被检体相比,测定值(计数值)显著地变低。另一方面,关于进行了酸性化前处理的被检体,避免了固相化抗体导致的反应抑制,可得到与对照被检体同等的测定值。由这些结果暗示,在肿瘤标记物的测定体系中,由自身抗体等产生的假性低值可通过被检体的酸性化前处理而避免。

[0045] [表2]

	CA19-9		AFP		CA15-3		CA125		CEA	
	未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	前处理
小鼠 IgG 添加标准液	96,14 4	92,38 7	481,04 5	238,52 3	450,45 6	435,06 3	38,14 1	43,74 0	91,04 8	32,70 7
固相化抗体 添加标准液	2,297	83,96 5	20,602	234,46 3	133,02 1	439,88 5	2,025	43,24 9	1,903	30,71 6
固相化抗体/ 小鼠IgG	2%	91%	4%	98%	30%	101%	5%	99%	2%	94%

(单位:计数)

[0046] <实施例2酸性化前处理的HAMA抑制效果>

(1) 被检体前处理

对在CA19-9测定时由于HAMA的影响而显示假性高值的被检体1例,将20 $\mu$ L与各浓度的盐酸(0.025N、0.05N、0.1N、0.2N、0.4N、0.6N、0.8N、1.0N、1.2N、1.4N、1.6N、1.8N、2.0N)20 $\mu$ L进行混合,在37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。在各被检体溶液中添加与盐酸等摩尔的氢氧化钠溶液40 $\mu$

L并进行中和,进一步添加缓冲液(24mM磷酸二氢钾、76mM磷酸氢二钾、1.0%BSA、1.0%PVP、0.05%酪蛋白钠、0.05%Tween20(商品名)、0.05%氯化钠、20mM EDTA2Na、0.1%Proclin(注册商标)300、pH7.0)80 $\mu$ L而作为测定样品。同时,将LUMIPULSE CA19-9的500IU/mL、0IU/mL的标准液分别用PBS稀释3倍,与被检体同样地进行酸性化处理、中和、缓冲剂添加,作为对照样品。

对各测定用样品,使用Lumipuls Presto CA19-9(Fujirebio社),如通常那样进行测定。

[0047] 将前处理时的盐酸浓度和测定样品的计数值(表示反应强度)的关系示于图1,将对照样品的计数值示于图2。就对照样品而言,可知:通过盐酸处理而在计数值上几乎没有看到变动,因此,CA19-9自体不受前处理的影响。另一方面,对产生HAMA引起的假性高值的被检体,特别是通过0.1N以上的盐酸的前处理而计数值显著地降低。由此可知:在CA19-9的测定中,可以通过酸性化前处理而避免HAMA的影响。

[0048] <实施例3酸性化前处理避免自身抗体干扰的最适浓度>

对用于酸性化前处理的酸性化剂,研究了对避免自身抗体干扰有效的最适浓度。将LUMIPULSE CA19-9、PSA的高浓度的标准液(CA19-9:500IU/mL、PSA:100ng/mL)分别用阴性人血清稀释成1/10,以成为100 $\mu$ g/mL的方式添加与LUMIPULSE CA19-9、PSA的固相化抗体相同的游离抗体之后,在室温下静置2小时,制备自身抗体模型被检体。同时,制备取代固相化抗体而添加有100 $\mu$ g/mL小鼠IgG的对照被检体。将被检体各50 $\mu$ L与酸性化前处理液(2.5M尿素、盐酸、2.5%麦芽糖、10.0%CTAB、4.9%TritonX-100)50 $\mu$ L进行混合。就酸性化前处理剂而言,分别制备含有盐酸2N、1N、0.8N、0.6N、0.4N、0.2N、0.1N、0.05N、0.025N、0N的物质,对各浓度进行同样的研究。将与酸性化前处理液混合的被检体在1000rpm的振荡条件下在37 $^{\circ}$ C下加热6分钟。接着,加入与上述盐酸等量的氢氧化钠溶液100 $\mu$ L并进行中和。在中和后的溶液中添加与实施例2同样的缓冲液200 $\mu$ L,作为酸性化前处理样品。对各酸性化前处理样品,使用Lumipuls Presto CA19-9、PSA(Fujirebio社),如通常那样进行测定。

[0049] 将CA19-9、PSA的自身抗体模型被检体及对照被检体的酸性化前处理样品的测定结果分别示于图3、4。就CA19-9的自身抗体模型被检体而言,在将前处理的盐酸浓度设为0.5N~0.9N时可看到与对照被检体的测定计数值的差异减少的倾向。另一方面,就PSA的自身抗体模型被检体而言,在将前处理的盐酸浓度设为0.2N以上时可看到与对照被检体的计数值的差异减少的倾向。由这些结果暗示:通过被检体的酸性化前处理,可降低肿瘤标记物的自身抗体等引起的假性阴性的产生。需要说明的是,对使用与CA19-9、PSA的亲水性强的抗体取代自身抗体的模型被检体进行了这些研究,因此,就实际的含自身抗体的被检体而言,即使将酸性化前处理剂的酸浓度设为更低浓度,也有可以降低假性低值产生的可能性。

[0050] <实施例4SDS前处理的HAMA抑制效果>

(1) 被检体的SDS前处理

对在CA19-9测定时由于HAMA的影响而显示假性高值的被检体5例,将各50 $\mu$ L与SDS前处理液(10%SDS、1.5%Cl4APS、0.225%TritonX-100(商品名)、3.75%EDTA2Na、37.5mM-色氨酸、150mM咪唑、10mM TCEP)100 $\mu$ L进行混合,在1000rpm的振荡条件下于80 $^{\circ}$ C加热5分钟。同时,相对同一被检体,将取代前处理液而添加有PBS100 $\mu$ L的物质作为未处理样品。进而,对LUMIPULSE CA19-9标准液,也同样地制备SDS前处理样品、未处理样品。

## [0051] (2) CA19-9的测定

使用作为市售的CA19-9测定试剂的Lumipuls Presto CA19-9 (Fujirebio社) 和自动分析仪Lumipuls Presto II (Fujirebio社) 测定各被检体。测定试剂中,使用以体积比计5:1混合有磁性粒子液和20%BSA溶液的物质取代通常的磁性粒子液,除此之外,与通常的方法同样地使用。

## [0052] (3) 结果

将SDS前处理样品和未处理样品的CA19-9计数值的比较示于表3。在全部的被检体中,计数值显著地降低。另一方面,在标准液的计数值上没有大的变动,由此暗示:前处理对CA19-9分子自体没有给予负的影响,仅可避免HAMA的假性高值。

## [0053] [表3]

被检体No.	测定值(计数)		
	未处理	前处理	前处理/未处理
1	113,087	33,783	30%
2	992,619	11,518	1%
3	849,855	10,031	1%
4	840,282	7,015	1%
5	528,059	42,299	8%

## [0054] &lt;实施例5SDS前处理避免自身抗体干扰&gt;

用与实施例1同样的方法制备CA19-9的自身抗体模型被检体及对照被检体,用与实施例4同样的方法进行被检体前处理、CA19-9的测定。将CA19-9的测定结果示于表4。未处理的情况下,就自身抗体模型被检体而言,通过固相化抗体的添加而反应受到抑制,与对照被检体相比计数值显著地变低。另一方面,关于进行了SDS前处理的被检体,避免固相化抗体导致的反应抑制,可得到与对照被检体同等的测定值。由此暗示:在肿瘤标记物的测定体系中,通过被检体的SDS前处理可避免由于自身抗体等产生的假性低值。

## [0055] [表4]

	CA19-9 (计数)	
	未处理	前处理
小鼠IgG 添加标准液	118,150	110,974
固相化抗体 添加标准液	2,174	110,057
固相化抗体/ 小鼠IgG	2%	99%

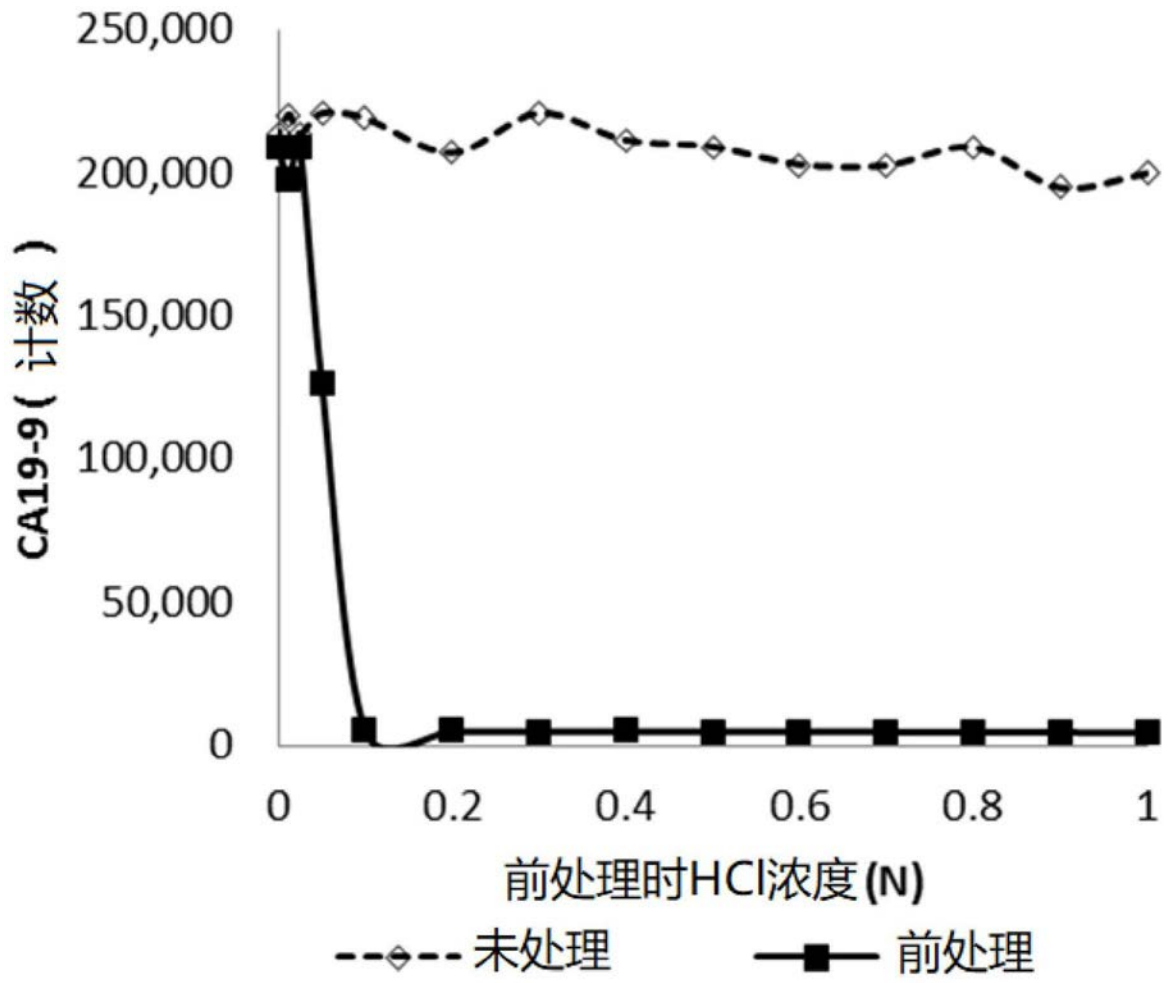


图1

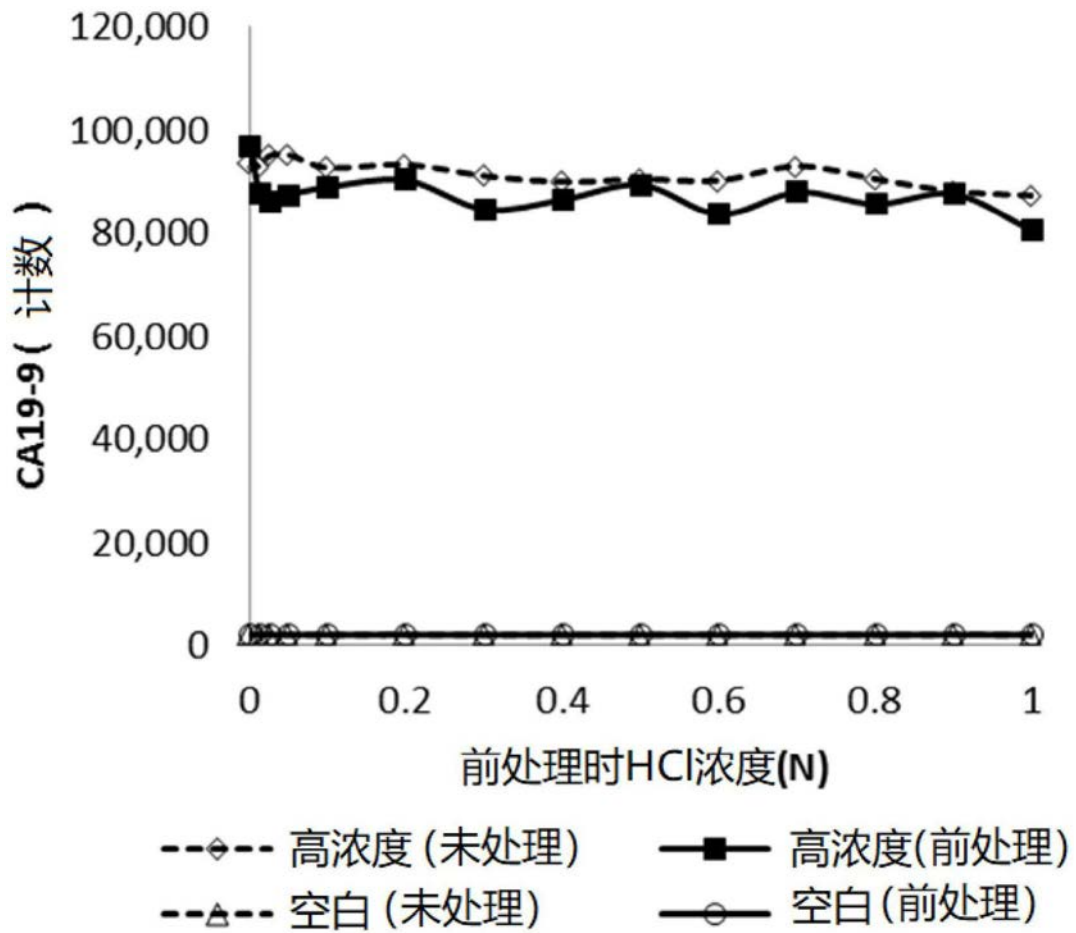


图2

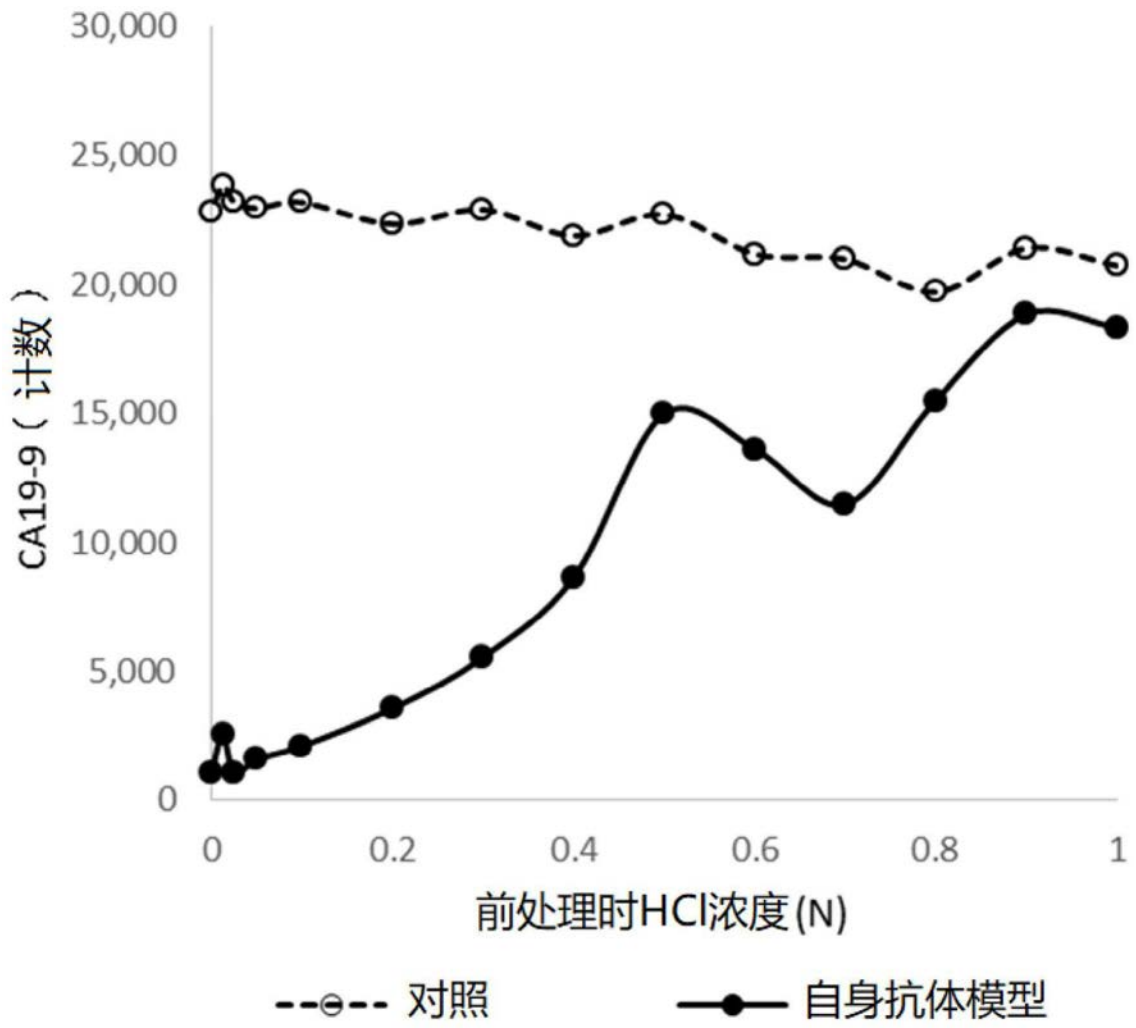


图3

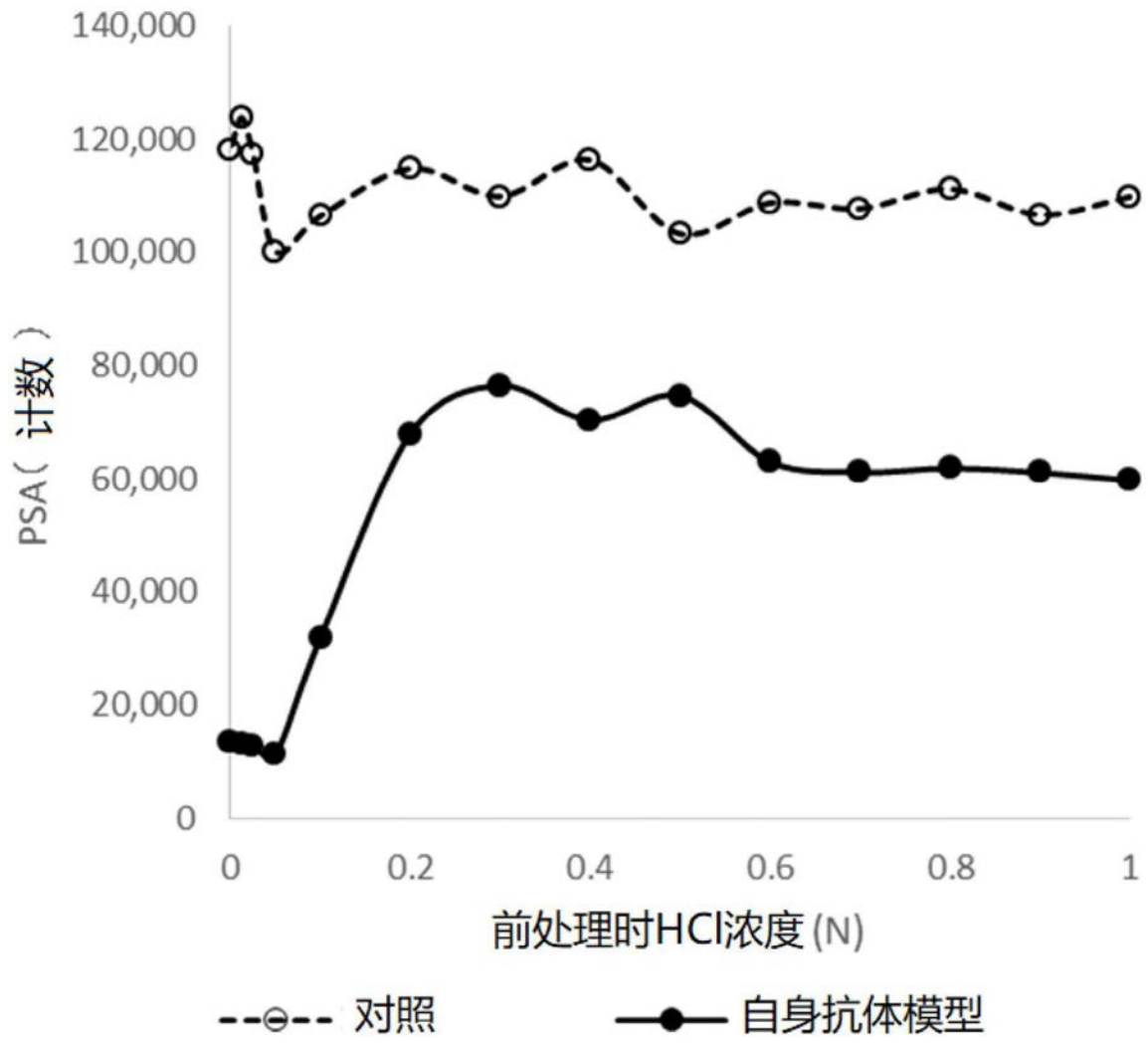


图4

专利名称(译)	肿瘤标记物的测定方法及测定试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN109564223A</a>	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201780046302.4	申请日	2017-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
[标]发明人	山本纮辅 北村由之 八木慎太郎 青柳克己		
发明人	山本纮辅 北村由之 八木慎太郎 青柳克己		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/57473 G01N33/57488 G01N33/531		
代理人(译)	龚敏 王刚		
优先权	2016173878 2016-09-06 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开一种测定方法、及测定试剂，所述测定方法在生物体试样中的肿瘤标记物的测定中，使自身抗体等的影响导致的假性低值、和HAMA等的影响导致的假性高值的产生均减少，可以进行更准确的测定。肿瘤标记物的测定方法包含前处理工序，所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合，通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的肿瘤标记物。肿瘤标记物的免疫分析用试剂具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。

	CA19-9		AFP		CA15-3		CA125		CEA	
	未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	前处理
小鼠IgG 添加标准液	96.14 4	92.38 7	101.04 5	238.52 3	450.45 6	435.06 3	38.14 1	43.74 0	91.04 8	32.70 7
固相化抗体 添加标准液	2,297	83,96 5	20,602	234,46 3	133,02 1	439,88 5	2,025	43,24 9	1,903	30,71 6
固相化抗体/ 小鼠IgG	2%	91%	4%	98%	30%	101%	5%	95%	2%	94%