

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 294753

(P2003 - 294753A)

(43)公開日 平成15年10月15日(2003.10.15)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	583		G 0 1 N 33/543	583
	33/531		33/531	B

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11数)

(21)出願番号 特願2002 - 98989(P2002 - 98989)

(22)出願日 平成14年4月1日(2002.4.1)

(71)出願人 390023951

極東製薬工業株式会社

東京都中央区日本橋小舟町7番8号

(72)発明者 三輪 昭成

茨城県高萩市大字上手綱字朝山3333 - 26

極東製薬工業株式会社高萩工場

(72)発明者 荒木 一

茨城県高萩市大字上手綱字朝山3333 - 26

極東製薬工業株式会社高萩工場

(74)代理人 100113402

弁理士 前 直美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 凝集反応増感剤、免疫測定用試薬及び免疫測定法

(57)【要約】

【解決課題】 凝集反応の測定系での使用に適し、増感作用が高く、しかも検体や反応混合液の粘度の上昇を起こしにくく、再現性・精度が良好であり、取り扱いの容易な凝集反応増感剤、特にラテックス凝集法において高い測定感度及び定量性を実現することができる凝集反応増感剤、及びそれを用いる免疫測定用試薬、及びそれらを使用する免疫測定法を提供する。

【解決手段】 少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤、この凝集反応促進剤を含有する免疫測定用試薬及びこの免疫測定用試薬を含むキット、及びそれらを使用する免疫測定法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤。

【請求項2】 少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含む免疫測定用試薬。

【請求項3】 検体希釈液である、請求項2記載の免疫測定用試薬。

【請求項4】 測定対象物である抗原に対する抗体又は測定対象物である抗体に対する抗原を更に含む凝集試薬である、請求項2記載の免疫測定用試薬。

【請求項5】 請求項2～4のいずれか1項記載の免疫測定用試薬と、他の試薬、容器又は使用法説明書の少なくとも1つを含むことを特徴とする、免疫測定用キット。

【請求項6】 測定対象物に対する抗原又は抗体を、少なくとも1種のアルギン酸の存在下で、測定対象物を含む可能性のある検体と接触させる工程及び前記工程の結果として生じる凝集反応を検出する工程を含むことを特徴とする免疫測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、凝集反応に基づく免疫測定法のための増感剤及びそれを使用する免疫測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】抗原・抗体による凝集反応を利用して特定の抗原又は抗体を測定する免疫測定法（イムノアッセイ）は、臨床検査、生化学研究等の領域において広く使用されている。このような測定法においては、一般に、測定対象の抗原に対する抗体又は測定対象の抗体に対する抗原を、担体を利用し又は利用せずに、測定対象物を含む可能性のある検体と接触させ、測定対象物が存在する場合に抗原抗体反応の結果として反応混合液中で起こる凝集反応を検出する。担体を利用する方法は、担体を利用しない方法に比べて性能がよいため、担体を利用する方法（例えば担体としてポリスチレンビーズを使用するラテックス凝集法）は特に広く行われている。

【0003】凝集の検出は、通常、凝集によって生じる散乱光を測定する免疫比濁法（ネフェロメトリー）又は透過光を測定する免疫比濁法のいずれかによって行われる。これらの検出法は、それぞれ一長一短を有し、いずれも一般的に使用されている。

【0004】免疫測定法において、一般に、測定感度・精度の向上、抗原抗体反応の促進・安定化等を目的として、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース等の種々のポリマー化合物が使用されている。

【0005】しかし、これらの化合物は、いずれも粘性が高いため扱いにくく、非特異反応も同時に促進し、凝集反応の測定系における使用には難点があった。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、凝集反応の測定系での使用に適し、増感作用が高く、しかも検体や反応混合液の粘度の上昇を起こしにくく、再現性・精度が良好であり、取り扱いの容易な凝集反応増感剤、特にラテックス凝集法において高い測定感度及び定量性を実現することができる凝集反応増感剤、及びそれを用いる免疫測定用試薬、及びそれらを使用する免疫測定法を提供することを目的とする。

## 10 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を用いることにより、上記の目的を達成し得ることを見出した。即ち、本発明の凝集反応増感剤は、アルギン酸、特にアルギン酸ナトリウム又はアルギン酸プロピレングリコールを少なくとも1種含有することを特徴とする。

【0008】また、本発明の免疫測定用試薬は、少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含むことを特徴とする。本発明の免疫測定用試薬は、例えば、アルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含む検体希釈液であることもでき、また、アルギン酸を含有する凝集反応増感剤と、測定対象物に対する抗原又は抗体とを含む凝集試薬であることもできる。また、検体希釈液と凝集試薬との両方の用途を兼ねる試薬であることもできる。

【0009】本発明の免疫測定用試薬は、測定に用いる他の試薬及び/又は容器類等と組み合わせて免疫測定用キットとして提供することもできる。即ち、本発明の免疫測定キットは、少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含む免疫測定用試薬と、他の試薬、容器又は使用法説明書の少なくとも1つを含むことを特徴とする。

【0010】本発明の免疫測定法は、測定対象物に対する抗原又は抗体を、少なくとも1種のアルギン酸の存在下で、測定対象物を含む可能性のある検体と接触させる工程及び前記工程の結果として生じる凝集反応を検出する工程を含むことを特徴とする。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】1．凝集反応増感剤

本発明の凝集反応増感剤は、必須成分として少なくとも1種のアルギン酸を含有することを特徴とする。本発明に関して、「アルギン酸」という用語は、アルギン酸、アルギン酸の塩、及びアルギン酸のアルコールエステル（アルギン酸プロピレングリコール）の総称として用いられる。アルギン酸は、カソウ類の構造多糖類であって、D-マンノウロン酸が-1,4結合によって重合した直鎖分子である。アルギン酸塩としては、アルギン酸のナトリウム塩等が挙げられる。アルギン酸ナトリウムは保存安定性及び溶解性の点から好ましい。アルギン酸ナトリウムは、水溶性の白色ないし淡黄色の粉末であ

り、乳化剤、安定剤、吸水剤等として用いられている。アルギン酸プロピレングリコールも好ましい。これらのアルギン酸は、本発明の増感剤、免疫測定用試薬及び方法において、単独で又は組み合わせて使用することができる。

【0012】本発明の増感剤においてアルギン酸が凝集反応の増感作用を有するメカニズムは、粒子が互いに接近すると有限の広がりをもつ溶存高分子が粒子の間隙から排除される、いわゆる枯渇効果であり、アルギン酸の直鎖状分子内に検体由来の抗原又は抗体が入り込み、測定試薬由来の抗体又は抗原との接触回数が増え、それによって凝集反応が促進されるものと考えられる。

【0013】アルギン酸には、その粘性に応じて100~150cp、300~400cp、500~600cp等のグレードのものがあるが、本発明において使用されるアルギン酸、特にアルギン酸ナトリウム及びアルギン酸プロピレングリコールは、それらのいずれであってもよい。本発明においては、水性溶液としたときの粘性が低い方が、扱い易さ及び同時再現性の点から優れているが、その意味においては300cp以下が好ましく、200cp以下が更に好ましく、100~150cpが最も好ましい。

【0014】本発明の増感剤は、pH緩衝剤、塩類、ウシ血清アルブミン(BSA)、界面活性剤等の付加的成分を含んでいてもよい。

【0015】本発明の増感剤は、粉末の形態であって、使用時に水性媒体に溶解して使用するものであってもよい。溶解するための水性媒体としては、精製水、生化学分野において通常使用され得る、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液、アンモニア緩衝液等の各種緩衝液等が挙げられる。特に、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッド緩衝液等が好ましい。あるいは、本発明の増感剤は、アルギン酸を精製水又は上記のような成分を含有する水性媒体に予め溶解させた水性溶液の形態であってもよい。水性溶液形態の増感剤中のアルギン酸の濃度は、溶解性の点から、0.001~1(W/V)%が好ましく、使用上の便宜の点からは0.05~1(W/V)%が好ましい。

【0016】本発明の増感剤は、少量の添加で十分な効果を得ることができる。凝集反応を起こさせる液体(各種試薬及び検体等を含む反応混合液)中でのアルギン酸の最終濃度は、濃度が高すぎると液体の粘度が上昇して精度や扱い易さが損なわれ易くなり、一方、濃度が低すぎると十分な凝集促進効果が得られにくいいため、0.001~1(W/V)%が好適であり、好ましくは0.01~0.5(W/V)%である。少量の添加で十分な効果を得ることができる本発明の利点を利用するうえで、0.01~0.3(W/V)%が好適であり、最も好ましくは0.03~0.1(W/V)%である。

【0017】2. 免疫測定用試薬

本発明の凝集反応増感剤を、免疫測定法において使用される各種の試薬に含有させて、増感作用の高い免疫測定用試薬を作製することができる。

【0018】例えば、免疫測定法において、一般に血清、血漿等の各種生物学的液体サンプルを適当な濃度に希釈することが行われるが、このような検体希釈液に本発明の凝集反応増感剤を含有させてもよい。検体希釈液は、通常、pH緩衝剤、アルブミンやグロブリン等のタンパク質、アミノ酸、及び/又は界面活性剤等の成分を含有する水性溶液である。検体希釈液中のアルギン酸の濃度は、溶解性の点から、0.001~1(W/V)%が好ましい。

【0019】また、凝集法において使用される凝集試薬に本発明の増感剤を含有させることもできる。凝集試薬は、一般に、測定対象物に対する抗原又は抗体を含む液体、又は測定対象物に対する抗原又は抗体を担持する不溶性担体を含む懸濁液であることが多い。

【0020】凝集反応に基づく免疫測定法において測定対象とされる物質は、抗原又は抗体である。測定対象物としては、レセプター、酵素、血中タンパク(例えばガン胎児性タンパク)、感染症関連抗原(例えばB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、梅毒病原体、ヒト免疫不全ウイルス、病原性大腸菌等の抗原)、及びそれらに対する抗体が挙げられる。

【0021】したがって、凝集試薬は、測定対象が抗原であればそれに対する抗体を、測定対象が抗体であればそれに対する抗原を、必須の構成要素とする。例えば測定対象がヘリコバクター・ピロリ菌に対する抗体であれば、凝集試薬はヘリコバクター・ピロリの抗原を含む。なお、本明細書において「抗体」というときは、特定の抗原に対する結合性を有する限りにおいて各種の抗体のフラグメント等をも含む。

【0022】本発明の増感剤は、凝集法であれば、凝集試薬に抗原又は抗体の担体を使用するか否かにかかわらず、用いることができる。凝集試薬に担体を使用する場合には、直径0.1~0.5μm程度の不溶性微粒子が一般に使用される。具体的には、赤血球、炭素粉末、ベントナイト、カオリン、レシチンのミセル、ゼラチン粒子等が挙げられるが、特にポリスチレン微粒子(ラテックス粒子)が好適に使用される。このような担体に測定対象に対する抗原又は抗体を担持させる方法は、当業者には周知である。

【0023】更に、本発明の免疫測定用試薬は、本発明の凝集反応増感剤とともに、上述したような検体希釈液の成分と凝集試薬の必須成分とを含み、検体希釈液と凝集試薬との両方の用途を兼ねた試薬であってもよい。このような試薬を使用すれば、検体を予め希釈することなく、直接この試薬と混合するだけで適正な凝集反応を生じさせることができる。

【0024】3. 免疫測定用キット

上記のような本発明の免疫測定用試薬を、測定に用いる他の試薬及び/又は容器類等と組み合わせ、免疫測定用キットとして提供することができる。即ち、本発明の免疫測定用キットは、少なくとも1種のアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含む免疫測定用試薬と、他の試薬、容器又は使用法説明書の少なくとも1つとを含むことを特徴とする。例えば、キットがアルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含む検体希釈液を含む場合、キットの他の構成要素としては、特定の測定対象物の陽性対照試料、キャリアレーション用標準物質、陰性対照試料、測定対象物に対する抗原又は抗体を担持させた微粒子担体を含有する凝集試薬、反応容器、及び/又は使用法説明書等が挙げられる。使用法説明書には、通常、検体の必要量、キットに含まれる試薬の使用量、反応条件、検出方法、結果の判定方法等の説明が記載される。

【0025】また、キットがアルギン酸を含有する凝集試薬を含む場合、そのキットにはアルギン酸を含有しない検体希釈液を含ませてもよい。キットが、アルギン酸を含有する凝集反応増感剤を含む免疫測定用試薬として、検体希釈液としても作用する溶液中に、測定対象物に対する抗原又は抗体を担持させた微粒子担体を含有する凝集試薬を含む場合、キットの他の構成要素は使用法説明書のみであってもよい。

【0026】4. 免疫測定法

本発明の免疫測定法は、測定対象物に対する抗原又は抗体を、少なくとも1種のアルギン酸の存在下で、測定対象物を含む可能性のある検体と接触させる工程(反応工程)及び前記工程の結果として生じる凝集反応を検出する工程(検出工程)を含むことを特徴とする。

【0027】反応工程においては、凝集試薬、アルギン酸、及び検体を液体中において共存させることが必須であるが、これらを一緒にする順序は問わない。したがって、これらを同時に一緒にしてもよく、また、反応工程の前に、凝集試薬とアルギン酸、凝集試薬と検体、又はアルギン酸と検体、のいずれかを予め一緒にしておいてもよい。例えば、検体を、アルギン酸を含有する検体緩衝液で希釈しておき、これに凝集試薬を添加することができる。また、アルギン酸を含む溶液中に懸濁させた凝\*

\*集試薬を、検体と一緒にしてもよい。反応温度は、通常は4 ~ 50 の範囲であるが、温度が低すぎると抗原抗体の衝突が低減し、温度が高すぎると免疫複合体の安定性が低下するため、15 ~ 40 が好ましく、特に30 ~ 40 が好ましい。反応時間は、通常は0分~60分の範囲である。したがって、反応工程と検出工程とは同時に行ってもよい。しかし、反応時間が短いと検体中の測定対象物濃度が低い場合等には免疫複合体の形成が不十分になることがあり、また、長すぎると免疫複合体が不安定になることがある。好ましくは、1分~30分の範囲である。反応は、生化学の分野において通常好適に使用される緩衝液中で行うことが好ましい。反応工程の反応混合液のpHは、通常5~10の範囲である。免疫複合体の安定性の点からは、特にpH6~9が好ましい。

【0028】検出工程においては、肉眼で凝集の形成を判定してもよいが、判定の再現性及び大量の検体の処理の点からは、光学的機器を用いて凝集の程度を測定することが好ましい。測定機器は、ネフェロメトリー及び比濁法のいずれの原理に基づくものであってもよい。

【0029】

【実施例】実施例1：凝集促進作用の試験

1. 検体希釈液の調製

リン酸一ナトリウム及びリン酸二ナトリウムを精製水に溶解して、リン酸の最終濃度が0.1M、pHが7.4のリン酸緩衝液を調製した。このリン酸緩衝液に、ウシ血清アルブミン(BSA)を1%(W/V)になるように溶解し、1%BSA/リン酸緩衝液(1%BSA-PB)を調製して、これを増感剤なしの検体希釈液(「検体希釈液0」)とした。この検体希釈液に、0.080(W/V)%のアルギン酸ナトリウム(グレード300~400cp;和光純薬(株)製)を添加して本発明の増感剤を含む検体希釈液(「検体希釈液1」)とした。更に、比較のため、同様にして表1に挙げる各種の物質を表1に記載の濃度で添加し、検体希釈液2~11を調製した。

【0030】

【表1】

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1	アルギン酸ナトリウム300~400cp	和光純薬	0.080%	0.067%
2	ポリビニルピロリドンK-90 M.W.=1,200,000	純正化学	0.700%	0.583%
3	ヘクサチン	和光純薬	0.250%	0.208%
4	ヒドロキシエチルセルロース 1000~4000cp	和光純薬	0.230%	0.192%
5	アルギン酸プロピレングリコール	和光純薬	0.150%	0.125%
6	FICOLL Approx.Mol.Wt. 400,000 Type400	SIGMA	5.000%	4.167%
7	ポリビニル硫酸カリウム	ナカライテスク	1.150%	0.958%
8	ポリアクリル酸250,000	和光純薬	0.220%	0.183%
9	カルボキシメチルセルロースナトリウム	和光純薬	0.140%	0.117%
10	ポリエチレングリコール500,000 M.W.=300,000~500,000	和光純薬	0.375%	0.313%

表1

【0031】2. 試験方法

上記で調製した各検体希釈液の増感作用を梅毒抗体測定系にて試験した。検体(梅毒陽性標準血清;積水化学工業(株)製、濃度は0、39、121、237又は405TU) 20μL、検体希釈液(上記の各種検体希釈液0~11のいずれか) 350μL、及び梅毒抗原を担持させたラテックス担体粒子を含む懸濁液形態の凝集試薬(「メディエースTPLAラテックス懸濁液」;積水化学工業(株)製) 50μLを混合し、生化学自動分析装置「日立7080形」を使用して、測定波長700nmで吸光度を測定し、キャリブレーションを行った。

【0032】結果を表2及び図1に示す。

【表2】

No.	物質名	n	ブランク	標準液濃度:単位T.U.				
				0	39	121	237	405
0	増感剤なし	1	10874	-42	-34	13	85	198
		2	10905	-59	-11	76	95	195
		平均	10890	-51	-23	45	90	197
1	アルギン酸ナトリウム	1	11619	-43	400	1730	2899	3484
		2	11407	-52	419	1733	2935	3504
		平均	11513	-48	410	1732	2917	3494
2	ポリビニルピロリドン	1	11427	-10	298	1195	2058	2697
		2	11390	-20	318	1192	2081	2683
		平均	11409	-15	308	1194	2070	2690
3	ペクチン	1	11882	-36	379	1544	2612	3209
		2	11760	-16	385	1549	2616	3228
		平均	11821	-26	382	1547	2614	3219
4	ヒドロキシエチルセルロース	1	11409	-32	319	1449	2532	3180
		2	11464	-21	333	1455	2562	3175
		平均	11437	-27	326	1452	2547	3178
5	アルギン酸プロピレングリコール	1	11433	4	430	1749	2866	3402
		2	11456	-11	411	1757	2842	3398
		平均	11445	-4	421	1753	2854	3400
6	FICOLL	1	10949	-43	112	473	908	1330
		2	10933	-52	93	448	900	1331
		平均	10941	-48	103	461	904	1331
7	ポリビニル硫酸カリウム	1	11433	-18	484	1655	2322	2462
		2	11362	-112	482	1646	2187	2388
		平均	11398	-65	483	1651	2255	2425
8	ポリアクリル酸 250,000	1	10013	-25	295	1135	1810	2308
		2	10254	-50	312	1166	1925	2438
		平均	10134	-38	304	1151	1868	2373
9	カルボキシメチルセルロースナトリウム	1	10351	-11	358	1499	2483	3064
		2	10284	-26	377	1522	2521	3116
		平均	10318	-19	368	1511	2502	3090
10	ポリエチレングリコール 500,000	1	10608	-23	520	1696	2470	2914
		2	10769	-31	511	1687	2452	2967
		平均	10689	-27	516	1691	2461	2941

表3

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1~4	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	和光純薬	0.05~0.1%	0.042~0.083%
5	ポリビニルピロリドンK-90 M.W.=1,200,000	純正化学	0.700%	0.583%
6	ポリエチレングリコール500,000 M.W.=300,000~500,000	和光純薬	0.375%	0.313%

【0037】結果を表4及び図2に示す。

\*【0033】表2及び図1に示すように、増感剤なしの場合と比較して、試験した1~11のいずれの物質についてもラテックス凝集促進効果は認められた。しかし、FICOLLは他の物質と比較して特に効果が低く、また、ポリビニル硫酸カリウム及びポリアクリル酸は、梅毒抗体高濃度領域において反応性が低かった。

【0034】これに対し、アルギン酸ナトリウム及びアルギン酸プロピレングリコールは、低濃度領域から高濃度領域にわたって一貫して増感作用が高く、非常に少ない添加量であったにもかかわらず、他の物質と同等以上の効果が得られた。

【0035】実施例2:アルギン酸ナトリウム添加濃度の検討

\* 実施例1と同様に調製した1%BSA-PBに表3に示す物質を示した濃度で添加した検体希釈液を調製し、実施例1と同様の方法でキャリブレーションを測定した。

【0036】

【表3】

20

30

【表4】

表4

No.	名称	検体希釈液中の濃度(w/v)	n	ブランク	Abs. × 10000 標準液濃度：単位T.U.				
					0	39	121	237	405
1	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	0.10%	1	11496	-56	1091	3246	3866	3902
			2	11483	-54	1092	3207	3908	3837
			平均	11490	-55	1062	3227	3887	3870
2		0.08%	1	11619	-43	400	1730	2899	3484
			2	11407	-52	419	1733	2935	3504
			平均	11513	-48	410	1732	2917	3494
3	0.07%	1	11499	-46	341	1452	2622	3339	
		2	11427	-46	394	1457	2607	3309	
		平均	11463	-46	338	1455	2615	3324	
4	0.05%	1	11542	-44	101	491	1051	1748	
		2	11383	-42	87	480	1017	1777	
		平均	11463	-43	94	486	1034	1763	
5	ポリビニルピロリドン	0.70%	1	11427	-10	298	1195	2058	2697
			2	11390	-20	318	1192	2081	2683
			平均	11409	-15	308	1194	2070	2690
6	ポリエチレングリコール 50万	0.375%	1	10608	-23	520	1696	2470	2914
			2	10769	-31	511	1687	2452	2967
			平均	10689	-27	516	1691	2461	2941

【0038】アルギン酸ナトリウムの添加濃度は、高いほど反応性の上昇が認められた。しかし、0.1%の添加濃度では抗体高濃度領域においてキャリブレーションカーブが湾曲し、直線領域が狭くなることがわかった。

【0039】実施例3：保存試験  
表5

実施例1と同様にして表5に示す物質を添加した検体希釈液を調製した。

【0040】

【表5】

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	和光純薬	0.080%	0.067%
2	ポリビニルピロリドンK-90 M.W.=1,200,000	純正化学	0.700%	0.583%
3	ヘクシン	和光純薬	0.250%	0.208%
4	ヒドロキシエチルセルロース 1000~4000cp	和光純薬	0.230%	0.192%
5	アルギン酸プロピレングリコール	和光純薬	0.150%	0.125%
6	ポリアクリル酸250,000	和光純薬	0.220%	0.183%
7	カルボキシメチルセルロースナトリウム	和光純薬	0.140%	0.117%
8	ポリエチレングリコール500,000 M.W.=300,000~500,000	和光純薬	0.375%	0.313%

【0041】各検体希釈液を実施例1と同様の方法で試験し、キャリブレーションを行った(「0日」)。また、各々の検体希釈液を40で1日及び7日保存した後も同様の測定を行って保存安定性を試験した(「1日」及び「7日」)。

【0042】結果を表6に示す。表中、「変化率

(%)」は、以下のようにして算出した：

変化率(%) = [(1日目又は7日目の測定値の平均値) / (0日目測定値の平均値) × 100] - 100。

【0043】

20 【表6】

表6

No.	増感剤	添加濃度	日	プランク	標準液濃度:単位T.U.				
					0	39	121	237	405
1	7-アキニ酸 ナトリウム	0.080%	0	11456	-22	262	1281	2347	3083
			11421	-16	269	1264	2338	3085	
			平均	11439	-19	266	1273	2343	3084
			1	11528	-12	285	1234	2430	3117
			11535	-20	313	1344	2386	3118	
			平均	11532	-16	304	1289	2408	3118
			変化率(%)	100.8	-	14.5	1.3	2.8	1.1
			7	11450	17	300	1327	2480	3116
11533	23	288	1380	2361	3095				
平均	11492	20	294	1354	2421	3106			
変化率(%)	106.5	-	10.7	6.4	3.3	0.7			
2	ポリビニル ピロリドン	0.700%	0	11427	-10	298	1195	2058	2697
			11390	-20	318	1192	2081	2683	
			平均	11409	-15	308	1194	2070	2690
			1	11508	-9	312	1218	2089	2720
			11529	-9	321	1213	2116	2726	
			平均	11519	-9	317	1216	2103	2723
			変化率(%)	101.0	-	2.8	1.8	1.6	1.2
			7	11419	-10	328	1260	2165	2739
11461	-2	331	1260	2157	2787				
平均	11440	-6	330	1260	2161	2763			
変化率(%)	100.3	-	7.0	5.6	4.4	2.7			
3	ヘクセン	0.250%	0	11777	-3	413	1629	2652	3225
			11766	-19	381	1581	2694	3207	
			平均	11772	-11	397	1605	2673	3216
			1	11786	-21	288	1137	2069	2825
			11776	-26	276	1112	2088	2813	
			平均	11781	-24	282	1125	2079	2819
			変化率(%)	100.1	-	-29.0	-29.9	-22.2	-12.3
			7	11740	-17	82	376	821	1381
11725	-32	87	395	831	1367				
平均	11733	-25	85	386	826	1374			
変化率(%)	99.7	-	-78.7	-76.0	-69.1	-57.3			
4	ヒドロキシ エチル セルロース	0.230%	0	11409	-32	319	1449	2532	3180
			11464	-21	333	1455	2562	3175	
			平均	11437	-27	326	1452	2547	3178
			1	11552	-7	358	1384	2465	3147
			11476	-5	344	1391	2476	3170	
			平均	11514	-6	351	1388	2471	3159
			変化率(%)	100.7	-	7.7	-4.4	-3.0	-0.6
			7	11474	-29	253	1026	1911	2680
11486	-12	242	1000	1929	2718				
平均	11480	-21	248	1013	1930	2699			
変化率(%)	100.4	-	-24.1	-30.2	-24.6	-15.1			
5	7-アキニ酸 プロピレン グリコール	0.150%	0	11562	-16	262	1163	2212	2996
			11615	-6	231	1158	2177	3029	
			平均	11589	-11	247	1161	2195	3013
			1	11594	-38	95	415	884	1447
			11423	-43	81	401	847	1440	
			平均	11509	-41	88	408	866	1444
			変化率(%)	100.6	-	-73.0	-71.9	-66.0	-54.6
			0	10013	-25	295	1135	1810	2308
10254	-50	312	1196	1925	2438				
平均	10134	-38	304	1151	1868	2373			
7	10110	10	299	1091	1861	2290			
9969	-6	306	1098	1862	2348				
平均	10040	2	303	1095	1862	2319			
変化率(%)	99.1	-	-0.3	-4.9	-0.3	-2.3			
7	カルボキシメチル セルロース ナトリウム	0.14%	0	11228	-35	483	1889	2965	3620
			11186	-10	433	1900	3011	3536	
			平均	11207	-23	458	1885	2988	3578
			1	11267	-22	420	1566	2781	3323
			11347	-4	423	1541	2646	3362	
			平均	11307	-13	422	1554	2714	3343
			変化率(%)	100.9	-	-8.0	-17.6	-9.2	-6.6
			7	9564	-31	238	998	1916	2621
10148	-43	246	978	1907	2599				
平均	9856	-37	242	988	1912	2565			
変化率(%)	87.9	-	-47.2	-47.6	-36.0	-28.3			
8	ポリエチレン グリコール 50000	0.375%	0	10344	3	399	1384	2153	2504
			10304	-11	402	1382	2086	2687	
			平均	10324	-4	401	1383	2120	2596
			1	10340	-6	359	1252	1988	2616
			10425	-15	350	1251	2022	2568	
			平均	10383	-11	359	1257	2005	2592
			変化率(%)	100.6	-	-10.3	-9.1	-5.4	-0.1
			7	10119	-40	245	975	1691	2181
10247	-19	291	961	1765	2293				
平均	10183	-30	268	968	1728	2237			
変化率(%)	98.6	-	-33.2	-30.0	-18.5	-13.8			

【0044】アルギン酸ナトリウム及びポリアクリル酸は40条件下で7日保存しても安定であり、凝集促進効果が低下しないことがわかった。これは、ポリビニルピロリドンと同等の安定性であった。他の物質については反応性の低下が認められた。

【0045】実施例4：同時再現性の比較  
実施例1と同様に表7に示す物質を添加した検体希釈液を調製した。

【0046】  
【表7】

表7

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	和光純薬	0.080%	0.067%
2	ポリビニルピロリドンK-90 M.W.=1,200,000	純正化学	0.700%	0.583%
3	ポリアクリル酸250,000	和光純薬	0.220%	0.183%
4	カルボキシメチルセルロースナトリウム	和光純薬	0.140%	0.117%
5	ポリエチレングリコール500,000 M.W.=300,000~500,000	和光純薬	0.375%	0.313%

【0047】実施例1と同様にキャリブレーションを行った後、測定値約18.6TUの梅毒陽性血清を検体として連続10回測定し、変動係数(CV値)を算出し、\*

表8

n	アルギン酸ナトリウム 0.080%	ポリビニルピロリドン 0.700%	ポリアクリル酸 0.220%	カルボキシメチル セルロースナトリウム 0.140%	ポリエチレングリコール 0.375%
1	20.0	19.8	24.9	14.5	16.9
2	19.0	18.0	18.8	14.0	16.8
3	20.1	18.0	17.4	15.4	18.5
4	21.6	19.2	16.4	13.1	17.8
5	19.9	21.1	17.1	14.2	15.5
6	20.3	21.2	20.0	15.3	18.6
7	20.3	19.2	18.2	16.0	17.1
8	20.2	17.6	17.7	15.8	19.2
9	19.3	20.2	18.3	15.9	19.7
10	19.4	19.8	20.6	16.2	18.6
平均	20.0	19.4	18.9	15.0	17.9
標準偏差(S.D.)	0.7	1.3	2.5	1.0	1.3
変動係数(CV(%))	3.6%	6.5%	12.9%	6.9%	7.2%
平均+SD	20.7	20.7	21.4	16.1	19.2
平均-SD	19.3	18.1	16.5	14.0	16.6
最大	21.6	21.2	24.9	16.2	19.7
最小	19.0	17.6	16.4	13.1	15.5
範囲	2.6	3.6	8.5	3.1	4.2

\*比較検討した。

【0048】結果を表8に示す。

【表8】

【0049】アルギン酸ナトリウムは他の物質と比較してCV値が小さく、良好な再現性を示すことがわかった。

【0050】実施例5：粘度の測定

表9

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	和光純薬	0.080%	0.067%
2	ポリビニルピロリドンK-90 M.W.=1,200,000	純正化学	0.700%	0.583%
3	ポリアクリル酸250,000	和光純薬	0.220%	0.183%
4	カルボキシメチルセルロースナトリウム	和光純薬	0.140%	0.117%
5	ポリエチレングリコール500,000 M.W.=300,000~500,000	和光純薬	0.375%	0.313%

\*実施例1と同様に表9に示す物質を添加した検体希釈液を調製した。

【0051】

【表9】

【0052】上記で調製した検体希釈液の粘度を、オストワルド計(相対粘度計;TOP-K-11212-1308、(株)相互理化学硝子製作所製)を用いて室温条件下(約24℃)で測定した。具体的には、オストワルド計内部に、予め24℃にした試料(検体希釈液)5.0mlをピペットを注入し、この試料をオストワルド計の一端から吸い上げ、試料を自然落下させて、オストワルド計管内の一定部位間を落下するのに要した時間(秒)を測定した。

【0053】結果を表10に示す。

【表10】

表10

物質名	添加濃度	n	測定時間(sec.)	平均
アルギン酸ナトリウム	0.080%	1	375.0	375
		2	375.0	
ポリビニルピロリドン	0.700%	1	394.0	395
		2	395.0	
ポリアクリル酸	0.220%	1	619	618
		2	617	
カルボキシメチルセルロースナトリウム	0.140%	1	374	376
		2	377	
ポリエチレングリコール	0.375%	1	404	405
		2	405	

【0054】アルギン酸ナトリウム及びカルボキシメチルセルロースナトリウムは、他の物質と比較して粘性が低く、良好であった。

40 【0055】実施例6：アルギン酸ナトリウムのグレー

ドの比較

\*【0056】

実施例1と同様に表11に示す物質を添加した検体希釈液を調製した。

【表11】

表11

No.	物質名	タイプ	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1	ポリビニルピロリドンK-90 M.W.=1,200,000		純正化学	0.700%	0.583%
2	アルギン酸ナトリウム	100~150cp	和光純薬	0.090%	0.075%
3	アルギン酸ナトリウム	300~400cp	和光純薬	0.080%	0.067%
4	アルギン酸ナトリウム	500~600cp	和光純薬	0.075%	0.063%

【0057】実施例5と同様の方法で粘度を測定した。10\*果を、表12~14に示す。

また、実施例1と同様の方法でキャリブレーションを行

【0058】

い、実施例4と同様の方法で同時再現性を試験した。結

【表12】

増感剤名	タイプ	PVP	アルギン酸ナトリウム		
			100~150cp	300~400cp	500~600cp
検体希釈液中の濃度(w/v)		0.70%	0.09%	0.08%	0.075%
n	1	394.0	345.0	375.0	406.0
	2	395.0	347.0	375.0	407.0
平均		394.5	346.0	375.0	406.5

単位:sec.

【0059】  
表13

\*20\*【表13】

△Abs. × 10000

物質名	タイプ	検体希釈液中の濃度(w/v)	n	ブランク	標準液濃度: 単位T.U.				
					0	39	121	237	405
PVP		0.70%	1	10607	-7	384	1456	2402	2938
			2	10828	-12	361	1504	2449	2986
			平均	10718	-10	373	1480	2426	2962
アルギン酸ナトリウム	100~150cp	0.09%	1	10881	-21	352	1541	2631	3363
			2	10879	-8	369	1521	2620	3356
			平均	10880	-15	361	1531	2626	3360
	300~400cp	0.08%	1	10730	-29	377	1574	2800	3444
			2	10702	-13	388	1570	2707	3459
			平均	10716	-21	383	1572	2754	3452
	500~600cp	0.075%	1	10798	-14	382	1613	2730	3431
			2	10658	-30	388	1533	2750	3506
			平均	10728	-22	385	1573	2740	3469

【0060】

【表14】

表14

単位:T.U

増感剤名	タイプ	PVP	アルギン酸ナトリウム		
			100~150cp	300~400cp	500~600cp
検体希釈液中の濃度(w/v)		0.70%	0.09%	0.08%	0.075%
n	1	18.9	15.2	17.2	19.4
	2	18.4	17.0	16.4	17.3
	3	16.9	17.2	14.0	17.6
	4	15.5	16.4	18.0	15.2
	5	17.5	16.7	18.0	16.4
	6	19.9	16.8	18.0	19.0
	7	18.5	17.0	15.7	17.3
	8	17.8	17.4	16.5	15.0
	9	16.9	16.6	16.0	14.8
	10	17.8	16.6	17.1	17.2
平均		17.8	16.7	16.7	16.9
標準偏差(S.D.)		1.2	0.6	1.3	1.6
変動係数(CV(%))		6.9%	3.6%	7.6%	9.4%
平均+SD		19.0	17.3	18.0	18.5
平均-SD		16.6	16.1	15.4	15.3
最大		19.9	17.4	18.0	19.4
最小		15.5	15.2	14.0	14.8
範囲		4.4	2.2	4.0	4.6

【0061】試験したアルギン酸ナトリウムは、いずれのタイプのものについても充分な凝集促進効果が認められた。特に、100~150cpタイプのものが最も粘性が低く、同時再現性についても良好であった。

【0062】実施例7: H B s 抗原測定系における効果  
実施例1と同様に表15に示す物質を添加した検体希釈液を調製した。

50 【0063】

【表15】 表15

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1~6	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	和光純薬	0.1~0.2%	0.047~0.093%
7	ポリビニルピロリドン K-90 M.W.=1,200,000	純正化学	1.200%	0.560%
8	ポリエチレングリコール6000	和光純薬	2.000%	0.93%

【0064】上記で調製した各検体希釈液の増感作用を HBs 抗原 (B型肝炎表面抗原) 測定系にて試験した。10 検体 (HBs 抗原標準物質; 極東製薬工業 (株) 製、濃度は 0、9.6、48.2、96.4、289.3 又は 482.2 IU/mL) 20  $\mu$ L、検体希釈液 (上記の各種検体希釈液 0~8 のいずれか) 140  $\mu$ L、及び HBs 抗体を相持させたラテックス相体粒子を含む懸濁液形態の凝集試薬 (「ランピアラテックス HBs 抗原ラテックス懸濁液」; 極東製薬工業 (株) 製) 140  $\mu$ L を混合し、生化学自動分析装置「日立 7080 形」を使用して、測定波長 800 nm で吸光度を測定し、キャリブレーションを行った。【0065】結果を表 16 に示す。【表 16】

\*濁液形態の凝集試薬 (「ランピアラテックス HBs 抗原ラテックス懸濁液」; 極東製薬工業 (株) 製) 140  $\mu$ L を混合し、生化学自動分析装置「日立 7080 形」を使用して、測定波長 800 nm で吸光度を測定し、キャリブレーションを行った。【0065】結果を表 16 に示す。【表 16】

No.	物質名	検体希釈液中の濃度 (w/v)	n	ブランク	標準液濃度: 単位 IU/mL				
					0.0	9.6	48.2	96.4	482.2
1	アルギン酸ナトリウム 300~400cp	0.20%	1	18540	151	302	932	1769	5514
			2	18574	175	294	934	1748	5504
			平均	18557	163	298	933	1759	5509
2		0.18%	1	18266	20	88	527	1119	4830
			2	18273	6	110	499	1118	4838
			平均	18270	13	99	513	1119	4834
3		0.16%	1	18138	-47	15	362	772	3996
			2	18148	-48	57	320	785	4011
			平均	18143	-48	36	341	779	4004
4		0.14%	1	18089	-28	49	289	606	3146
	2		18084	-12	26	286	594	3154	
	平均		18087	-20	38	288	600	3150	
5	0.12%	1	18096	-6	47	228	470	2379	
		2	18133	-13	37	214	471	2407	
		平均	18115	-10	42	221	471	2393	
6	0.10%	1	18019	-14	28	179	356	1760	
		2	18094	-4	46	175	339	1748	
		平均	18057	-9	37	177	348	1754	
7	ポリビニルピロリドン K-90 M.W.=1,200,000	1.20%	1	18778	57	102	512	1042	4534
			2	18637	42	120	483	1055	4555
			平均	18708	50	111	498	1049	4545
8	ポリエチレングリコール 6000	2.00%	1	17550	-9	19	125	312	665
			2	17268	-9	25	170	309	686
			平均	17409	-9	23	153	323	701

【0066】この系においても、アルギン酸ナトリウムは優れた凝集促進作用を示し、その添加濃度の上昇につれて測定感度の向上が認められた。

【0067】

【発明の効果】本発明によれば、凝集反応の測定系での使用に適し、増感作用が高く、しかも検体や反応混合液の粘度の上昇を起こしにくく、再現性・精度が良好であり、取り扱いの容易な凝集反応増感剤が提供される。本発明の増感剤を使用すると、特にラテックス凝集法にお

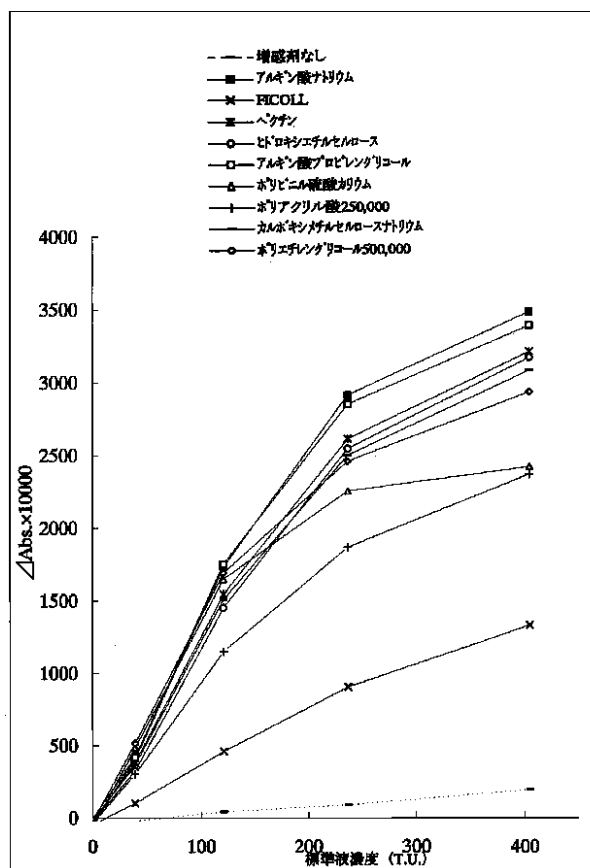
いて高い測定感度及び定量性を実現することができる。また、本発明の免疫測定法によれば、反応混合液の粘度の上昇を起こしにくく、再現性・精度が良好な凝集反応に基づく免疫測定結果を、簡便に得ることができる。

【図面の簡単な説明】

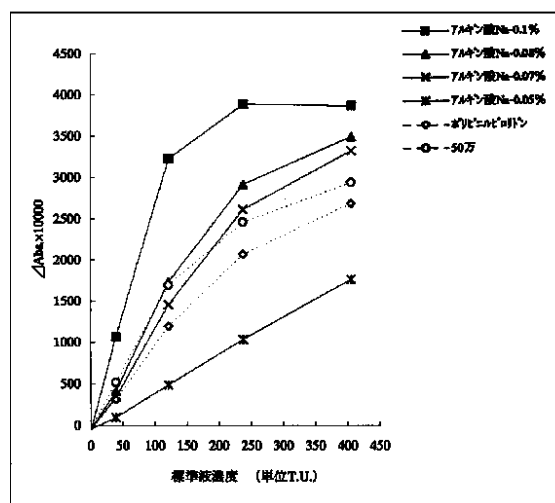
【図 1】 各種物質を添加した検体希釈液のラテックス凝集促進効果を示す図である。

【図 2】 各種濃度のアルギン酸ナトリウムを添加した検体希釈液のラテックス凝集促進効果を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 山岸 昇芳  
 茨城県高萩市大字上手綱字朝山3333 - 26  
 極東製薬工業株式会社高萩工場

(72)発明者 皆川 健治  
 茨城県高萩市大字上手綱字朝山3333 - 26  
 極東製薬工業株式会社高萩工場

专利名称(译)	凝集反应敏化剂，免疫测定试剂和免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003294753A</a>	公开(公告)日	2003-10-15
申请号	JP2002098989	申请日	2002-04-01
申请(专利权)人(译)	远东药业有限公司		
[标]发明人	三輪 昭成 荒木 一 山岸 昇芳 皆川 健治		
发明人	三輪 昭成 荒木 一 山岸 昇芳 皆川 健治		
IPC分类号	G01N33/543 C08L5/04 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	C08L5/04 G01N33/5306		
FI分类号	G01N33/543.583 G01N33/531.B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[解决方案]适合于凝集反应测量系统的凝集反应，具有高的敏化作用，不太可能引起样品或反应混合物的粘度增加，具有良好的可重复性和准确性，并且易于处理。 本发明提供在乳胶凝集法中能够实现高的测定灵敏度 and 定量性的敏化剂，特别是凝集反应敏化剂，使用其的免疫测定试剂和使用其的免疫测定方法。 包含至少一种海藻酸的凝集反应敏化剂，包含凝集反应促进剂的免疫测定试剂，包含免疫测定试剂的试剂盒以及使用其的免疫测定方法。

表A

No.	物質名	製造元	検体希釈液中の濃度(w/v)	反応混合液中の最終濃度(w/v)
1	7-β-D-グルコシド A-300~400cp	和光純薬	0.080%	0.067%
2	β-D-グルコシド K-90 M.W.=1,200,000	純正化学	0.700%	0.583%
3	トリス	和光純薬	0.250%	0.208%
4	β-D-グルコシド A-1000~4000cp	和光純薬	0.230%	0.192%
5	7-β-D-グルコシド B-1000	和光純薬	0.150%	0.125%
6	FICOLL Approx.Mol.Wt. 400,000 Type400	SIGMA	5.000%	4.167%
7	β-D-グルコシド A	ナカテック	1.150%	0.958%
8	β-D-グルコシド 250,000	和光純薬	0.220%	0.183%
9	β-D-グルコシド A-1000	和光純薬	0.140%	0.117%
10	β-D-グルコシド C-1500,000 M.W.=300,000~500,000	和光純薬	0.375%	0.313%