

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-205261

(P2013-205261A)

(43) 公開日 平成25年10月7日(2013.10.7)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/532	(2006.01)	GO 1 N 33/532	B	2 G O 5 4
GO 1 N 21/76	(2006.01)	GO 1 N 21/76		4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/28	(2006.01)	C 1 2 Q 1/28		

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2012-75337 (P2012-75337)	(71) 出願人	000002288
(22) 出願日	平成24年3月29日 (2012. 3. 29)		三洋化成工業株式会社
			京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1
		(72) 発明者	古川 喜朗
			京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三洋化成工業株式会社内
		F ターム (参考)	2G054 AA06 AB02 AB07 BB02 BB13
			CA19 CA20 CA23 CE03 EA01
			4B063 QA01 QA18 QQ79 QR02 QR50
			QR64 QR66 QR90 QS33 QS36
			QX02

(54) 【発明の名称】 酵素免疫測定法及び酵素免疫測定法用化学発光試薬キット

(57) 【要約】

【課題】 生体中の微量物質を高感度に測定できる酵素免疫測定法及び酵素免疫測定法用化学発光試薬キットを提供する。

【解決手段】 化学発光物質 (a) 及び酸化剤 (b) を用いる化学発光酵素免疫測定法において、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩 (c) の存在下で化学発光を行うことを特徴とする酵素免疫測定法。アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩 (c) は、塩化カルシウム及び／又は臭化リチウムであることが好ましい。酵素はペルオキシダーゼであることが好ましく、化学発光物質 (a) はルミノールの金属塩であることが好ましい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化学発光物質（a）及び酸化剤（b）を用いる化学発光酵素免疫測定法において、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）の存在下で化学発光を行うことを特徴とする酵素免疫測定法。

【請求項 2】

アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）が、塩化カルシウム及び／又は臭化リチウムである請求項 1 に記載の酵素免疫測定法。

【請求項 3】

アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）の含有量が、酸化剤（b）のモル数を基準として 0.01～10 モル % である請求項 1 又は 2 に記載の酵素免疫測定法。

10

【請求項 4】

酵素がペルオキシダーゼであって、化学発光物質（a）がルミノール又はルミノールの金属塩である請求項 1～3 のいずれか記載の酵素免疫測定法。

【請求項 5】

化学発光物質（a）を含む溶液（A）と酸化剤（b）を含む溶液（B）、及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（C）から構成され、請求項 1～4 記載の測定法に用いられる酵素免疫測定法用化学発光試薬キット。

【請求項 6】

化学発光物質（a）及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（D）と、酸化剤（b）を含む溶液（B）とから構成され、請求項 1～4 記載の測定法に用いられる酵素免疫測定法用化学発光試薬キット。

20

【請求項 7】

化学発光物質（a）を含む溶液（A）と、酸化剤（b）及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（E）とから構成され、請求項 1～4 記載の測定法に用いられる酵素免疫測定法用化学発光試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は臨床検査薬等に使用される酵素免疫測定法に関する。更に詳しくは、生体中の微量物質を高感度に測定できる酵素免疫測定法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

酵素免疫測定法は、生体中の微量物質の測定法として知られており、臨床検査の分野においてはその測定値が病態の診断や経過観察等に用いられることから、生体中の微量物質をより高感度に測定できる試薬が望まれている。従来、微量物質をより高感度に測定するために、界面活性剤を添加した化学発光試薬キットで測定する方法（例えば特許文献 1 参照）、フラーレンを添加した化学発光試薬キットで測定する方法（例えば特許文献 2 参照）、フッ素原子含有界面活性剤を添加した化学発光試薬キットで測定する方法（例えば特許文献 3 参照）が知られている。しかしながら従来の測定方法では、近年益々要求が高ま

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開平 08-261943 号公報

【特許文献 2】特開 2003-254973 号公報

【特許文献 3】特開 2008-054585 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

50

本発明の目的は、生体中の微量物質を高感度に測定できる酵素免疫測定法及び酵素免疫測定法用化学発光試薬キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、上記の目的を達成すべく鋭意検討した結果、本発明に到達した。即ち本発明は、

化学発光物質（a）及び酸化剤（b）を用いる化学発光酵素免疫測定法において、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）の存在下で化学発光を行うことを特徴とする酵素免疫測定法；化学発光物質（a）を含む溶液（A）と酸化剤（b）を含む溶液（B）、及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（C）から構成され、前記測定法に用いられる酵素免疫測定法用化学発光試薬キット；化学発光物質（a）及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（D）と、酸化剤（b）を含む溶液（B）とから構成され、前記測定法に用いられる酵素免疫測定法用化学発光試薬キット；化学発光物質（a）を含む溶液（A）と、酸化剤（b）及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（E）とから構成され、前記測定法に用いられる酵素免疫測定法用化学発光試薬キット；である。

【発明の効果】

【0006】

本発明の酵素免疫測定法用化学発光試薬キットを用いた酵素免疫測定法により、生体中の対象物質を高感度に測定することができる。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明の酵素免疫測定法は、化学発光物質（a）及び酸化剤（b）を用いる化学発光酵素免疫測定法において、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）の存在下で化学発光を行うものである。

【0008】

化学発光物質（a）としては、例えば「生物発光と化学発光－基礎と実験－」（廣川書店、1989年発行）に記載の2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン化合物、1, 2-ジオキセタン化合物、アクリジン化合物、インドール化合物等が挙げられる。このうち、測定感度及び保存安定性の観点から、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン化合物〔ルミノール、イソルミノール、N-アミノヘキシル-N-エチルイソルミノール（AHEI）及びこれらの金属（アルカリ金属等）塩等〕、1, 2-ジオキセタン化合物〔3-ガラクトシドキシフェニルジオキセタン、4-メトキシ-4-（3-フォスフェートフェニル）スピロ〔1, 2-ジオキセタン-3, 2'-アダマンタン〕等〕が好ましい。更に例えば酵素としてペルオキシダーゼを用いた場合は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン化合物が好ましく、更に好ましくはルミノール及びルミノールの金属塩、特に好ましくはルミノールのナトリウム塩である。

【0009】

化学発光物質（a）の使用量はその種類及び適用する測定方法や測定条件等によって適宜設定されるが、測定感度及び保存安定性の観点から化学発光時に混合される全液量を基準として、好ましくは0.25～60mM、更に好ましくは0.9～30mM、特に好ましくは1.5～15mMとなる量である。

【0010】

酸化剤（b）としては、例えば、特開平8-261943号公報及び特開2000-279196号公報に記載の酸化剤の水溶液〔無機の過氧化物（過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム、過ホウ酸カリウム等）、有機過氧化物（過酸化ジアルキル、過酸化アシル等）、ペルオクソ酸化合物（ペルオクソ硫酸、ペルオクソリン酸等）等の水溶液等〕が挙げられる。これらのうち、測定感度及び保存安定性の観点から、過酸化水素水溶液、過ホウ酸ナトリウム水溶液及び過ホウ酸カリウム水溶液が好ましく、更に好ましくは過酸化水素水溶液である。

【0011】

酸化剤 (b) の含有量は、その種類及び適用する測定方法や測定条件等によって適宜設定されるが、化学発光物質 (a) のモル数を基準として、0.1～60モル%が好ましく、更に好ましくは0.2～30モル%、特に好ましくは0.3～20モル%である。

【0012】

アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩 (c) としては、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム等の第一族元素又はカルシウム、ストロンチウム、バリウム等の第二族元素のハロゲン化物 (塩化ナトリウム、塩化カリウム、臭化リチウム、フッ化ナトリウム及び塩化カルシウム等)、硫酸塩 (硫酸ナトリウム及び硫酸カリウム等) 及びリン酸塩 (リン酸ナトリウム及びリン酸カリウム等) 等があげられる。これらのうち測定感度の観点から塩化カルシウム及び臭化リチウムが好ましい。(c) は1種を単独で用いても2種以上を併用してもよい。

10

【0013】

アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩 (c) の含有量は測定感度及び保存安定性の観点から、酸化剤 (b) のモル数を基準として0.01～10モル%が好ましく、更に好ましくは0.02～8モル%、特に好ましくは0.05～5モル%である。

【0014】

化学発光物質 (a) は、化学発光増強剤と併用することができる。化学発光増強剤は化学発光物質 (a) の種類に応じて選択されるが、例えば、化学発光物質 (a) がルミノール又はルミノールの金属塩の場合、特開昭59-500252号、特開昭59-171839号、特開平7-143899号又は特開平4-293498号の各公報に記載された化合物 [チアゾール化合物 {6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-[2'-(4'-メチル)チアゾリル]フェノール、4-[4'-(2'-メチル)チアゾリル]フェノール等}、ナフトール化合物、フェノール化合物 {4-シアノメチルチオ-2-クロロフェノール、4-(シアノメチルチオ)フェノール、4-(2'-チエニル)フェノール、p-ヨードフェノール等}] が挙げられ、また、(a) が1,2-ジオキセタン化合物の場合、特開平3-53897号又は特開平4-124185号の各公報記載の化合物 [重合性4級アンモニウム塩 {ポリ(ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロライド)、ポリ{ビニルベンジル(ベンジルジメチルアンモニウムクロリド)}等] が挙げられる。特に (a) が4-メトキシ-4-(3-フォスフェートフェニル)スピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-アダマンタン]の場合、蛍光ミセル (例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミドと5-N-テトラデカノイル-アミノフルオレセインで形成したミセル) 等が挙げられる。

20

30

これらのうち、化学発光増強効果の観点から、チアゾール化合物、フェノール化合物が好ましく、更に好ましいのはフェノール化合物、次に更に好ましいのはp-ヨードフェノール、4-(シアノメチルチオ)フェノール及び4-シアノメチルチオ-2-クロロフェノールである。

【0015】

化学発光増強剤の含有量は化学発光物質 (a) のモル数を基準として、化学発光増強効果及び保存安定性等の観点から、0.1～15モル%が好ましく、更に好ましくは0.1～5モル%、特に好ましくは0.2～2モル%である。

40

【0016】

本発明で使用される酵素としては従来免疫測定法で使用されるペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等が挙げられる。これらのうち、測定感度及びT.A.T (Turn Around Time) などの観点から、ペルオキシダーゼが好ましい。

【0017】

測定対象物質としてはタンパク質関連物質 (AFP、CEA、CA19-9、CA125、CA15-3、CA72-4、CA50、トロポニンI、トロポニンT、ペプシノゲンI、ペプシノゲンII、ProGRP、BNP、NT-proBNP、PSA、PAP

50

、S C C、K M O 1、N S E、I g E、特異 I g E、 β 2-ミクログロブリン、フェリチン、I A P、C 3、C 4、C 5、C R P、 α 2-M G、I g A、I g M、I g G、I g E、I g D、C K-M B、C K-M M、ミオグロビン、ミオシン、トランスフェリン、アポリポタンパク、糖タンパク、アルブミン、マイクロアルブミン、ヘモグロビン、グリコヘモグロビン、フルクトサミン、H D L、L D L、R F、リンパ球サブセット、L E 細胞、抗サイログロブリン抗体、抗マイクロゾーム抗体及びA S O等）、ホルモン関連物質（インスリン、H G C、 β -H C G、成長ホルモン、T S H、L H、F S H、プロラクチン、T 3、T 4、F T 3、F T 4、T B G、C-ペプチド、T-U p t a k e、エストロゲン、H P L、E 2、コルチゾール、プロゲステロン、テストステロン及びソマトスタチン等）、薬物関連物質（ジゴキシン、フェニトイン、フェノバルビタール及びテオフィリン等）、感染症関連物質（真菌、連鎖球菌、大腸菌、結核菌、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、エイズウイルス、カンシダ、マイコプラズマ、トキソプラズマ、梅毒、マラリア原虫及び赤痢アメーバ等そのものの自体、並びにこれらに対する抗体及びこれらの代謝物等）が挙げられる。

10

【0018】

本発明の酵素免疫測定法用化学発光試薬キットは、例えば以下の（１）～（３）の形態を取り得る。

（１）化学発光物質（a）を含む溶液（A）と酸化剤（b）を含む溶液（B）、及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（C）から構成される試薬キット。

20

（２）化学発光物質（a）及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（D）と、酸化剤（b）を含む溶液（B）とから構成される試薬キット。

（３）化学発光物質（a）を含む溶液（A）と、酸化剤（b）及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）を含む溶液（E）とから構成される試薬キット。

【0019】

上記溶液（A）～（E）におけるその他の成分としては必須成分である精製水及び任意成分としての緩衝剤及びキレート剤が挙げられる。

【0020】

緩衝剤としては、慣用のものであれば特に制限はなく、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、G o o d 緩衝液（P I P E S、M E S、T E S、M O P S、H E P E Sなど）が挙げられる。

30

【0021】

キレート剤としては、公知（例えば、特開平 9-75099 号公報及び特開 2003-279489 号公報）のキレート剤が使用できる。これらのうち、保存安定性等の観点から、4 配位キレート剤が好ましく、更に好ましいのはエチレンジアミン四酢酸（E D T A）及びこの塩（ナトリウム、カリウム等）、並びにトランス-1, 2 ジアミノシクロヘキサン-N, N, N', N'-四酢酸（C y D T A）、特に好ましいのはエチレンジアミン四酢酸（E D T A）及びこのナトリウム塩である。

【0022】

本発明の酵素免疫測定法及び酵素免疫測定法用化学発光試薬キットは、臨床検査の分野において免疫測定を行う際に用いることができる。特に、生体中の微量物質をより高感度に測定できることから酵素免疫測定法及び酵素免疫測定法用化学発光試薬キットとして好適に使用できる。

40

【実施例】

【0023】

以下、実施例により本発明を更に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

〔実施例 1～5 及び比較例 1〕

<化学発光物質を含む溶液の調製>

ルミノールのナトリウム塩 0. 28 g、4-（シアノメチルチオ）フェノール（d 1）

50

0.056 g、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸1.26 g、水酸化ナトリウム0.40 gを秤量し、メスフラスコに仕込み、全重量が100 gとなるように精製水を加え、25℃で均一混合し、実施例1～5及び比較例1で使用する化学発光物質を含む溶液(A-1)を調製した。

【0024】

＜酸化剤及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を含む溶液の調製＞

表1に記載の濃度となるようアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩(c)を秤量し、更に酸化剤(b)としての30%過酸化水素水0.192 gを秤量した後、全重量が100 gとなるように精製水を加え、25℃で均一混合して実施例1～5の酸化剤及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を含む溶液(E-1)～(E-5)及び比較例1の酸化剤及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を含む溶液(E'-1)を調製した。

10

【0025】

＜抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズの調製＞

抗PSAポリクローナルウサギ抗体[ダコ・サイトメーション(株)製]をpH9の0.1M炭酸緩衝液に20 µg/mlの濃度で溶解させた。直径3 mmのガラスビーズ[(株)岡部製作所製ケイ酸塩ガラス]を加え、48時間反応させた後、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液でコーティングし乾燥させた。

【0026】

＜ペルオキシダーゼ標識抗PSAポリクローナルウサギ抗体試薬の調製＞

抗PSAポリクローナルウサギ抗体[ダコ・サイトメーション(株)製]及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(東洋紡社製)を用い、文献「エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール；ジェイ．バイオケム，Vol．92(1982)1413-1424」に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗PSAポリクローナルウサギ抗体を調製した。

20

【0027】

上記で調製した試薬を用いて、全自動酵素免疫測定装置[オリンパス(株)製「スフィアライト180」]により発光量の測定を行った。即ちまず、抗PSAポリクローナル抗体結合ビーズ1個が入った反応槽に後述の検体40 µL及び0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液100 µLを加え、37℃、約7分間反応させた(工程1)。次いで、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液をB/F分離で除いた(工程2)。次に工程1で得られた反応物に1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗PSAポリクローナル抗体を140 µL加えて反応させた(工程3)。次いで、1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液をB/F分離で除いた(工程4)。最後に上記化学発光物質を含む溶液70 µL及び上記酸化剤及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を含む溶液70 µLを更に加えて、工程3で得られた反応物中のペルオキシダーゼと反応させることにより、発光量を計測した(工程5)。

30

なお、上記検体として、0 ng/mL及び0.005 ng/mLの各濃度の標準PSA溶液を用いて測定し、0 ng/mLを用いた場合の発光量を、ブランクの発光量(X)、0.005 ng/mLを用いた場合の発光量を(Y)とし、発光量(Y)を、ブランクの発光量(X)で除した比(Y/X)、及び発光量(Y)からブランクの発光量(X)を減じた値(Y-X)を測定感度とした。結果を表1に示す。

40

【0028】

【表 1】

	アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩(c)		各PSA濃度における発光量(Counts/second) 及び測定感度に関する計算値			
	種 類	酸化剤及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を含む溶液中の濃度(mM)	0ng/mL(X)	0.005ng/mL(Y)	(Y/X)	(Y-X)
実施例1	塩化カルシウム	0.2	6,758	11,586	1.71	4,828
実施例2	塩化カルシウム	0.5	7,521	14,025	1.86	6,504
実施例3	塩化カルシウム	5	10,045	19,577	1.95	9,532
実施例4	塩化カルシウム	50	15,298	24,050	1.57	8,752
実施例5	臭化リチウム	5	7,897	14,406	1.82	6,509
比較例1	なし	0	6,678	10,204	1.53	3,526

【0029】

表1から、本発明の方法は比較例の場合に比べて(Y/X)及び(Y-X)の値が大きく向上していることから、測定感度が向上し、生体中の微量PSAをより高感度に測定す

10

20

30

40

50

ることができることが分かる。

【産業上の利用可能性】

【0030】

化学発光物質（a）及び酸化剤（b）を用いる化学発光酵素免疫測定法において、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩（c）の存在下で化学発光を行うことを特徴とする本発明の酵素免疫測定法を用いることにより、生体中の微量物質を高感度に測定することが出来るため、高感度な酵素免疫測定法として有用である。

专利名称(译)	用于酶免疫测定和酶免疫测定的化学发光试剂盒		
公开(公告)号	JP2013205261A	公开(公告)日	2013-10-07
申请号	JP2012075337	申请日	2012-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	古川喜朗		
发明人	古川 喜朗		
IPC分类号	G01N33/532 G01N21/76 C12Q1/28		
FI分类号	G01N33/532.B G01N21/76 C12Q1/28		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB02 2G054/AB07 2G054/BB02 2G054/BB13 2G054/CA19 2G054/CA20 2G054/CA23 2G054/CE03 2G054/EA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR50 4B063/QR64 4B063/QR66 4B063/QR90 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：为酶免疫测定提供酶免疫测定和化学发光试剂盒，能够以高灵敏度测量活体中的极少量物质。解决方案：提供使用化学发光物质（a）和氧化剂（b）的化学发光酶免疫测定，其中化学发光在碱金属或碱土金属的盐（c）存在下进行。碱金属或碱土金属的盐（c）优选为氯化钙和/或溴化锂。酶优选为过氧化物酶，化学发光物质（a）优选为鲁米诺的金属盐。

	7) 化学发光物质 (a) 的浓度 (mg/mL)	8) 氧化剂 (b) 的浓度 (mg/mL) 及 9) 碱金属或碱土金属的盐 (c) 的浓度 (mg/mL)				10) 化学发光物质的量 (Counts/second)
		氯化钙 (a)	溴化锂 (b)	氯化钙和溴化锂 (c)	(V/V)	
实施例1	0.2	0.2	0.2	0.2	1.71	4.00
实施例2	0.5	0.5	0.5	0.5	1.66	6.04
实施例3	5	5	5	5	1.95	9.02
实施例4	50	50	50	50	1.57	8.72
实施例5	5	5	5	5	1.46	6.00
比较例1	0	0	0	0	1.33	3.00