

(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2018-105866

(P2018-105866A)

(43) 公開日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/532 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/532

B

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2017-249054 (P2017-249054)
 (22) 出願日 平成29年12月26日 (2017.12.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2016-252606 (P2016-252606)
 (32) 優先日 平成28年12月27日 (2016.12.27)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000003160
 東洋紡株式会社
 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
 (72) 発明者 西村 研吾
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡
 株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定用組成物および免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】優れた安定性を有する化学発光分析用組成物を得、該組成物を用いて安定に化学発光分析を行うこと。

【解決手段】免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、(1)発光基質及び/又はエンハンサーを含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が0.01mg/L以下である、免疫学的測定用組成物、または、(2)発光基質添加前のB/F分離用の洗浄液を含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が0.01mg/L以下である、免疫学的測定用組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、発光基質及び/又はエンハンサーを含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が 0.01 mg/L 以下である、免疫学的測定用組成物。

【請求項 2】

発光基質を利用する免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、発光基質添加前の B/F 分離用の洗浄液を含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が 0.01 mg/L 以下である、免疫学的測定用組成物。

【請求項 3】

銅イオン濃度が 0.001 mg/L 以下である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

発光基質が、2 - クロロ - 5 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - (5 - クロロトリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] デカン)] - 4 - イル) - 1 - フェニルリン酸二ナトリウム (商標名 : C D P - S t a r) 、 3 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - (5 ' - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] デカン - 4 - イル) フェニルリン酸二ナトリウム (商標名 : C S P D) 、 3 - (2 ' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 " - ホスホリルオキシ) フェニル - 1 , 2 - ジオキセタン (商標名 : A M P P D) 、 3 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] デカン - 4 - イル) フェノール二水素リン酸二ナトリウム塩 (商標名 : L u m i g e n P P D 、 商標名 : L u m i - P h o s 5 3 0) 、 及び [(4 - クロロフェニル) スルファニル] (10 - メチル - 9 (10 H) - アクリジニリデン) メチルホスフェート二ナトリウム ; [(4 - クロロフェニル) チオ] (10 - メチル - 9 (10 H) - アクリジニリデン) - メタノール 1 - (二水素リン酸) 二ナトリウム塩 (1 : 2) (商標名 : L u m i g e n A P S - 5) からなる群の中から選択される少なくとも一種の発光基質である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

ホスファターゼを用いる免疫学的測定方法で使用される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の免疫学的測定用組成物。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の組成物を含む、免疫学的測定用キット。

【請求項 7】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の組成物、または、請求項 6 に記載のキットを用いる、免疫学的測定方法。

【請求項 8】

免疫学的測定方法において、発光基質及び/又はエンハンサーが含まれる組成物の銅イオン濃度を 0.01 mg/L 以下にする、免疫学的測定用組成物の安定性を向上させる方法。

【請求項 9】

発光基質を利用する免疫学的測定方法において、発光基質添加前の B/F 分離用の洗浄液用組成物の銅イオン濃度を 0.01 mg/L 以下にする、免疫学的測定用組成物の安定性を向上させる方法。

【請求項 10】

キレート剤を用いて、前記組成物の銅イオン濃度を 0.01 mg/L 以下にすることを特徴とする、請求項 8 又は 9 に記載の免疫学的測定用組成物の安定性を向上させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学的測定用組成物および免疫学的測定方法に関する。更に詳しくはホ

10

20

30

40

50

スファターゼを用いる化学発光分析において優れた安定性を有する化学発光分析用組成物、および、該組成物を用いて化学発光分析を行う方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

ホスファターゼは、リン酸モノエステルを加水分解し、アルコールと無機リン酸を生じる反応を触媒する酵素である。

ホスファターゼとしては種々のものが知られているが、例えばアルカリホスファターゼ（EC 3.1.3.1、以下ALPとも称する）（たとえば特許文献1、2）は、遺伝子工学用酵素として利用されるほか、酵素免疫測定法における標識酵素として広く利用されており、化学発光基質と組み合わせて様々な分析方法に利用されている（たとえば特許文献3）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】WO2012/115023

【特許文献2】WO2014/007229

【特許文献3】特開2009-085753

【特許文献4】WO2010/041595

【特許文献5】特許3994337

【特許文献6】特開2013-87069

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、免疫学的測定において、より精度の高い結果が得られるような免疫学的測定用組成物を得ることである。より詳しくは、ホスファターゼを用いた化学発光測定において、より精度の高い結果が得られるような化学発光測定用組成物を得ることである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、発光基質の1種であるCDP-Star（商標）（2-クロロ-5-（4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5-クロロトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン）]-4-イル）-1-フェニルリン酸二ナトリウム、CAS番号160081-62-9）とALPとを用いた化学発光免疫測定法において、原因不明の測定値低下を経験した。そこで本発明者は、試薬組成について検討した。その結果、意外なことに、試薬組成物中に銅イオンが存在するとその濃度に比例して測定感度が低下することを見出した。そして、試薬組成物中の銅イオン濃度を一定以下にすることで、種々の発光基質を用いてホスファターゼ系で安定的に良好な測定ができることを見出し、本発明を完成した。

30

【0006】

すなわち、本発明は以下の構成からなる。

40

[項1] 免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、発光基質及び/又はエンハンサーを含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が0.01mg/L以下である、免疫学的測定用組成物。

[項2] 発光基質を利用する免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、発光基質添加前のB/F分離用の洗浄液を含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が0.01mg/L以下である、免疫学的測定用組成物。

[項3] 銅イオン濃度が0.001mg/L以下である、項1または2に記載の組成物。

[項4] 発光基質が、2-クロロ-5-（4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5-クロロトリシクロ[3.3.1.1(3,7)]デカン）]-4-

50

イル) - 1 - フェニルリン酸二ナトリウム (商標名: CDP - Star)、3 - (4 - メトキシスピロ [1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ)トリシクロ [3.3.1.1(3, 7)]デカン - 4 - イル) フェニルリン酸二ナトリウム (商標名: CSPD)、3 - (2' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3" - ホスホリルオキシ)フェニル - 1, 2 - ジオキセタン (商標名: AMPPD)、3 - (4 - メトキシスピロ [1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - トリシクロ [3.3.1.1(3, 7)]デカン - 4 - イル)フェノール二水素リン酸二ナトリウム塩 (商標名: LumigenPPD、商標名: Lumi - Phos530)、及び [(4 - クロロフェニル)スルファニル] (10 - メチル - 9 (10H) - アクリジニリデン)メチルホスフェート二ナトリウム; [(4 - クロロフェニル)チオ] (10 - メチル - 9 (10H) - アクリジニリデン) - メ

10
タノール 1 - (二水素リン酸)二ナトリウム塩 (1:2) (商標名: Lumigen APS - 5) からなる群の中から選択される少なくとも一種の発光基質である、項 1 から 3 のいずれかに記載の組成物。

[項 5] ホスファターゼを用いる免疫学的測定方法で使用される、項 1 ~ 4 のいずれかに記載の免疫学的測定用組成物。

[項 6] 項 1 から 5 のいずれかに記載の組成物を含む、免疫学的測定用キット。

[項 7] 項 1 から 5 のいずれかに記載の組成物、または、項 6 に記載のキットを用いる、免疫学的測定方法。

[項 8] 免疫学的測定方法において、発光基質及び / 又はエンハンサーが含まれる組成物の銅イオン濃度を 0.01 mg / L 以下にする、免疫学的測定用組成物の安定性を向上させる方法。

20

[項 9] 発光基質を利用する免疫学的測定方法において、発光基質添加前の B / F 分離用の洗浄液用組成物の銅イオン濃度を 0.01 mg / L 以下にする、免疫学的測定用組成物の安定性を向上させる方法。

[項 10] キレート剤を用いて、前記組成物の銅イオン濃度を 0.01 mg / L 以下にすることを特徴とする、項 8 又は 9 に記載の免疫学的測定用組成物の安定性を向上させる方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明により、ホスファターゼを用いた化学発光測定において、より精度の高い結果を得ることができるようになる。

30

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図 1】本発明の免疫学的測定方法で用いる試薬カートリッジの例を示す図である。

【図 2】本発明の免疫学的測定方法で用いる反応容器の例を示す図である。

【図 3】洗浄液における阻害物質の検討結果を示す図である。

【図 4】洗浄液に含まれる銅イオンの濃度検討結果を示す図である。

【図 5】洗浄液に含まれる銅イオンの濃度検討 (発光基質を Lumigen APS - 5 (商標) に変更した場合) の結果を示す図である。

【図 6】 [A] ブロック液、 [C] R1 試薬 (ビオチン標識抗測定対象抗体)、 [D] R2 試薬 (アルカリホスファターゼ標識抗測定対象抗体) および [E] R3 試薬 (発光基質及び / 又はエンハンサー) への銅添加による影響を評価した結果を示す図である。

40

【図 7】 R3 試薬 (発光基質及び / 又はエンハンサーを含む) に含まれる銅イオンの濃度検討結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の実施形態の一つは、免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、発光基質及び / 又はエンハンサーを含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が 0.01 mg / L 以下である、免疫学的測定用組成物である。さらに、本発明の別の実施形態の一つは、発光基質を利用する免疫学的測定方法に用いるための組成物であって、発光基質添加前の B /

50

F分離用の洗浄液を含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が0.01mg/L以下である、免疫学的測定用組成物である。なお、本明細書では銅のことをCuと表記することがある。

【0010】

本発明の対象となる免疫学的測定方法は、ガラスフィルター担体または磁性粒子等を固相に用い、該固相上で、測定対象物質と種々の試薬成分とが、結合（可逆的または非可逆的）、解離、洗浄、反応（発色、発光など）等を行い、そこで生じた種々の物理化学的变化を検出するものであれば特に限定されるものではなく、種々の公知の方法が利用できる。

また、これらの方法を適用できる自動分析機が種々知られている。たとえば、ガラスフィルター担体を固相に用いる方法が適用できる自動分析機として、特許文献4に記載の測定システムが例示できる。また、市販のものではPOCUBE（登録商標、東洋紡製）などが例示できる。

【0011】

前記の免疫学的測定方法の一態様（第一の態様）として、以下の組成物[A]～[F]を含む測定キットを用いる方法が挙げられる。

[A] ブロック液

[B] 洗浄液

[C] R1試薬（ビオチン標識抗測定対象抗体を含む）

[D] R2試薬（アルカリホスファターゼ標識抗測定対象抗体を含む）

[E] R3試薬（発光基質及び/又はエンハンサーを含む）

[F] 抗ビオチン抗体が固定化された固相。

【0012】

本発明の免疫学的測定方法の別の態様（第二の態様）としては、前記[C]と[F]とをビオチンを介して結合させず、[F]の固相に直接、[C]に相当する抗測定対象抗体を結合させてもよい。この第二の態様としては、以下のような測定キットを例示することができる。

[A] ブロック液

[B] 洗浄液

[D] R2試薬（アルカリホスファターゼ標識抗測定対象抗体を含む）

[E] R3試薬（発光基質及び/又はエンハンサーを含む）

[F] 抗測定対象抗体が固定化された固相。

【0013】

前記の第一及び第二の態様のいずれにおいても、前記[E]R3試薬は、一つの試薬中に発光基質及びエンハンサーの両方を含んでもよいし、発光基質のみを含む試薬であってもよいし、発光基質とエンハンサーとを別々に含有する試薬の形態（例えば、発光基質を含むR3(I)試薬とエンハンサーを含むR3(II)試薬のいずれか一方）であってもよい。エンハンサーは通常、発光基質の発光強度の増強及び/又は発光時間の延長等を目的として添加される。従って、発光基質とエンハンサーを別々に含有する試薬の形態であっても、各試薬は相前後して実質的に同じタイミングで添加されることが多い。

【0014】

前記[F]の固相としてはビーズ、磁性粒子、マイクロタイタープレート、チューブ、膜など種々のものを使用できる。

固相化担体としてマイクロタイタープレートやチューブを用いる場合は、固相化担体自体を反応容器とすることができるが、固相化担体とは別途に各種の反応容器を用いることもできる。

例えば、固相化担体としてガラスフィルターを用いる場合は、図2のような形態からなる反応容器（特許文献5や特許文献6などに記載の反応容器）を用いることができる。図2において、(a)はこの容器の斜視図であり、(b)はこの容器の断面図である。図2において、1：反応容器（全体）、2：開口部、3：多孔性担体、4：吸水層、5：液

10

20

30

40

50

体不透過性容器、をそれぞれ示す。

この反応容器は、例えば前記の特許文献4に記載の測定システムに適用することができる。

【0015】

この反応容器を用いる免疫学的測定方法としては、上記第一の態様の測定キットを例として説明すると、以下のような工程を含む方法が例示できる。これらの工程は、例えば前記の特許文献4に記載の測定システムに適用することができる。

(1) 測定対象を [C] R1 試薬 (ビオチン標識抗測定対象抗体) と [D] R2 試薬 (アルカリホスファターゼ標識抗測定対象抗体) とで挟んだ複合体を作製する。

(2) 工程(1) で得られた複合体を、反応容器の開口部から固相に滴下し、そのビオチン標識部分と [F] の固相に標識された抗ビオチン抗体との相互作用により固相に結合させる。なお、工程(2) が開始される前に、固相には、予め [A] ブロック液を反応容器の開口部から固相に滴下して非特異反応のブロッキングをしておくことが好ましい。

(3) [B] 洗浄液を反応容器の開口部から固相に滴下して、工程(1) で複合体を形成しなかった [C] R1 試薬と [D] R2 試薬などを反応系外である固相の下の吸水層に移動させる。(発光基質添加前の B/F 分離)

(4) [E] R3 試薬 (発光基質及び/又はエンハンサー) を反応容器の開口部から固相に滴下して、固相に結合した前記複合体のアルカリホスファターゼ標識部分と反応させ、発光強度を測定する。

ここで、B/F 分離とは、抗原と抗体とが結合している結合型分画 (Bound、B) と、結合していない遊離型分画 (Free、F) とを分離することをいう。

【0016】

本発明の免疫学的測定方法において自動分析機を用いる場合、前記 [A] ~ [E] の各試薬はボトル等に分注され、直接分析装置にセットして用いることができる。

または、本発明のキットの構成として、例えば、図1のような形態からなるカートリッジ (特許文献4に記載の試薬カートリッジ) を用い、その各ウェルに前記 [A] ~ [E] の溶液が別々に保持されていてもよい。

【0017】

本発明の免疫学的測定方法の測定対象物質を成分として含有する検体としては、血清、血漿、血液、髄液等の各種体液や尿等の排泄物、便等の希釈物から固形分を除去したもの、鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液、咽頭ぬぐい液、唾液、鼻汁などから採取した各種組織の抽出液等が挙げられ、特に限定されない。これらに希釈や前処理等の操作を行って得たものも、検体となりうる。なお、検体には必ずしも測定対象物質が成分として含有されている必要はなく、測定対象物質を成分として含有する可能性があることを前提とした検体であってもよい。

【0018】

本発明の免疫学的測定用組成物の一態様は、発光基質及び/又はエンハンサーを含み、かつ、銅イオン濃度が 0.01 mg/L 以下であることを特徴とする。銅イオン濃度は、さらに好ましくは 0.001 mg/L 以下である。すなわち、本発明の免疫学的測定用組成物は遊離の銅イオンを実質的に含まないことが好ましく、なかでも遊離の銅イオンを含まないことが好ましい。発光基質とエンハンサーを別々に含有する試薬の形態とする場合、両方の試薬中における銅イオン濃度が上記範囲内になることが好ましい。

このような組成物は、前記の組成物 [A] ~ [F] を含む測定キットのうち、[E] R3 試薬 (発光基質及び/又はエンハンサー) に該当する。前記キットの構成において [E] R3 試薬の銅イオン濃度が 0.01 mg/L 以下であれば、[E] R3 試薬単独で本発明の免疫学的測定用組成物に該当するし、また、組成物 [A] ~ [F] を含む測定キットも本発明の免疫学的測定用キットに該当する。

【0019】

本発明で用いる発光基質は特に限定されない。例えば、2-クロロ-5-(4-メトキシスピロ [1, 2-ジオキセタン-3, 2']-(5-クロロトリシクロ [3.3.1.

10

20

30

40

50

1 (3 , 7)] デカン)] - 4 - イル) - 1 - フェニルリン酸二ナトリウム (英名 ; D i s o d i u m 2 - c h l o r o - 5 - (4 - m e t h o x y s p i r o { 1 , 2 - d i o x e t a n e - 3 , 2 ' - (5 - c h l o r o) - t r i c y c l o [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] d e c a n } - 4 - y l) - 1 - p h e n y l p h o s p h a t e 、 商 標 名 ; C D P - S t a r) 、 3 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - (5 ' - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] デカン - 4 - イル) フェニルリン酸二ナトリウム (英名 ; D i s o d i u m 3 - (4 - m e t h o x y s p i r o { 1 , 2 - d i o x e t a n e - 3 , 2 ' - (5 ' - c h l o r o) t r i c y c l o [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] d e c a n } - 4 - y l) p h e n y l p h o s p h a t e 、 商 標 名 ; C S P D) 、 3 - (2 ' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 " - ホスホリルオキシ) フェニル - 1 , 2 - ジオキセタン (英名 ; 3 - (2 ' - s p i r o a d a m a n t a n e) 4 - m e t h o x y - 4 - (3 " - p h o s p h o r y l o x y) p h e n y l - 1 , 2 - d i o x e t a n e 、 商 標 名 ; A M P P D) 、 3 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] デカン - 4 - イル) フェノール二水素リン酸二ナトリウム塩 (英名 ; 3 - (4 - M e t h o x y s p i r o [1 , 2 - d i o x e t a n e - 3 , 2 ' - t r i c y c l o [3 . 3 . 1 . 1 (3 , 7)] d e c a n] - 4 - y l) p h e n o l d i h y d r o g e n p h o s p h a t e d i s o d i u m s a l t 、 商 標 名 ; L u m i g e n P P D 又は商標名 ; L u m i - P h o s 5 3 0) 、 [(4 - クロロフェニル) スルファニル] (1 0 - メチル - 9 (1 0 H) - アクリジニリデン) メチルホスフェート二ナトリウム ; [(4 - クロロフェニル) チオ] (1 0 - メチル - 9 (1 0 H) - アクリジニリデン) - メタノール 1 - (二水素リン酸) 二ナトリウム塩 (1 : 2) (英名 ; D i s o d i u m [(4 - c h l o r o p h e n y l) s u l f a n y l] (1 0 - m e t h y l - 9 (1 0 H) - a c r i d i n y l i d e n e) m e t h y l p h o s p h a t e ; [(4 - C h l o r o p h e n y l) t h i o] (1 0 - m e t h y l - 9 (1 0 H) - a c r i d i n y l i d e n e) - m e t h a n o l 1 - (d i h y d r o g e n p h o s p h a t e) d i s o d i u m s a l t (1 : 2) 、 商 標 名 ; L u m i g e n A P S - 5) からなる群の中から選択される 1 以上が挙げられる。好ましくは C D P - S t a r (商 標) または A P S - 5 (商 標) である。さらに好ましくは C D P - S t a r (商 標) である。

【 0 0 2 0 】

本発明の免疫学的測定用組成物の別の態様は、発光基質添加前の B / F 分離用の洗浄液を含み、かつ、該組成物の銅イオン濃度が 0 . 0 1 m g / L 以下であることを特徴とする。銅イオン濃度は、さらに好ましくは 0 . 0 0 1 m g / L 以下である。すなわち、本発明の免疫学的測定用組成物は遊離の銅イオンを実質的に含まないことが好ましく、なかでも遊離の銅イオンを含まないことが好ましい。

このような組成物は、前記の組成物 [A] ~ [F] を含む測定キットのうち、[B] 洗浄液に該当する。前記キットの構成において [B] 洗浄液の銅イオン濃度が 0 . 0 1 m g / L 以下であれば、[B] 洗浄液単独で本発明の免疫学的測定用組成物に該当するし、また、組成物 [A] ~ [F] を含む測定キットも本発明の免疫学的測定用キットに該当する。

【 0 0 2 1 】

本発明の免疫学的測定用組成物は、銅イオン濃度を一定以下にすることで安定に化学発光分析を行うことができる。従って、本発明の免疫学的測定用組成物は、遊離の銅イオンを発生させる成分を含まないか、又は、遊離の銅イオン濃度が一定以下になるようにその配合量の調整を行うことが好ましい。銅イオンを発生させる成分としては、例えば、塩化銅、酸化銅、シアン化銅、硝酸銅、硫酸銅、アズリン、ステラシアニン、プラスチックシアニン、ラスティシアニン、シュードアズリン、ラッカーゼ、アスコルビン酸酸化酵素、銅含有亜硝酸還元酵素、スーパーオキシドディスムターゼ、ガラクトース酸化酵素、ドーパミン- - ヒドロキシラーゼ、銅アミン酸化酵素、ヘモシアニン、チロシナーゼ、カ

テコール酸化酵素、セルロプラスミン、シトクロムc酸化酵素等を挙げることができる。本発明の免疫学的測定用組成物に、前記のような銅イオンを発生させる成分を配合する場合には、組成物中の銅イオン濃度が0.01mg/L以下となるように、好ましくは0.001mg/L以下となるように添加量を調整すればよい。特定の態様では、本発明の免疫学的測定用組成物は、前記のような銅イオンを発生させる成分を実質的に含まないことが好ましく、全く含まないことがより好ましい。

【0022】

本発明の免疫学的測定用組成物における銅イオン濃度を一定以下にする方法としては、上記のように銅イオン発生成分の添加量を調整する以外に、銅イオンをキレート作用等によって不活化してもよい。このように銅イオンを不活化するために用いられるキレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、トリエチレントトラアミン六酢酸(TTHA)、1,3-プロパンジアミン四酢酸(PDTA)、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン四酢酸(DTPA-OH)、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(HIDA)、ジヒドロキシエチルグリシン(DHEG)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)、ジカルボキシメチルグルタミン酸(CMGA)、(S,S)-エチレンジアミンニコハク酸(EDDS)、ヒドロキシエチリデンジホスホン酸(HEDP)、ニトリロトリス(メチレンホスホン酸)(NTMP)、ホスホノブタントリカルボン酸(PBTC)、エチレンジアミンテトラ(メチレンホスホン酸)(EDTMP)、グルコン酸、O,O'-ビス(2-アミノフェニル)エチレングリコール-N,N,N'-四酢酸、テトラカリウムシオ、水和物(BAPTA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、トランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N,N',N'-四酢酸、一水和物(CyDTA)、イミノ二酢酸(IDA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、N,N,N',N'-テトラキス(2-ピリジルメチル)エチレンジアミン(TPEN)、又はそれらの塩(例えば、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)等を挙げることができる。好ましくは、エチレンジアミン四酢酸又はその塩が用いられる。本発明の免疫学的測定用組成物における、このようなキレート剤を添加する場合の配合量は、本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、例えば、発光基質及び/又はエンハンサーを含むR3試薬中に、0.01~10mM程度、好ましくは0.1~10mM程度、より好ましくは0.1~5mM程度とすることができる。洗浄液中の銅イオン濃度を一定以下にする場合にも、上記と同様の配合量でキレート剤を添加すればよい。

【0023】

本発明の免疫学的測定用組成物の調製に用いる溶媒は、本発明の効果を阻害しない限り特に限定されないが、例えば、水を用いることができる。溶媒として水を用いる場合には、重金属イオンを実質的に又は全く含まない水であることが好ましく、蒸留水、精製水、脱イオン水、イオン交換水、純水、超純水、MilliQ水、バイオメディカル用水等を用いることがより好ましい。

【0024】

本発明で用いる[A]ブロック液の組成は、特に限定されない。ブロック液には、酵素抗体反応および酵素反応に無関係なタンパク質で固相表面を覆い、後のステップで作用させるタンパク質が固相表面に吸着されるのを防ぐためのブロッキング剤を含む。

本発明で用いるブロッキング剤は、特に限定されない。例えば、カゼイン、スキムミルク、ウシ血清アルブミン(BSA)、ゼラチンなどのほか、血液タンパク質または植物タンパク質を有効成分とするもの、兔血液成分などを用いることができる。なかでもカゼインが好ましい。

【0025】

本発明において、[B]洗浄液はB/F分離等の目的で用いられる。洗浄液の組成は、測定対象物質に未結合の標識物を洗浄する機能を実用上保持するものであれば、特に限定されない。例えば、非イオン界面活性剤(例えば0.5%のTween(登録商標) -

10

20

30

40

50

20やTriton(登録商標) X-100)を含有する緩衝化生理食塩水が挙げられる。

【0026】

本発明において、測定対象物質の検出用に用いる抗体としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用可能であり、産生動物種も限定されない。前記の第一の態様である組成物[A]~[F]を含む測定キットの態様では、[C]R1試薬(ビオチン標識抗測定対象抗体)、および、[D]R2試薬(アルカリホスファターゼ標識抗測定対象抗体)が該当する。

前記[C]R1試薬としては、アミノ基またはスルフヒドリル基にビオチンを標識した抗体を用いることが好適であり、前記R1試薬中の成分としては防腐剤や蛋白成分等を含んでよい。

前記[D]R2試薬としては、検出に利用する酵素標識の態様は特に限定されないが、アミノ基またはスルフヒドリル基にアルカリホスファターゼを標識した抗体を用いることが好適であり、前記R2試薬中の成分としては防腐剤や蛋白成分等を含んでよい。

また、前記の第二の態様である測定キットで用いられる抗体も、上記と同様のものを使用することができる。

【0027】

本発明において、検出に利用する酵素標識に対応する基質についても特に限定されない。

例えば、アルカリホスファターゼを用いる系の場合は、前記[E]R3試薬に含まれる発光基質として、Lumigen APS-5(商標)、Lumigen PPD(商標)、Lumi-Phos 530(商標)(以上Lumigen社)、CDP-Star(商標)、CSPD(商標)、AMP PD(商標)(以上Tropix社)等を使用することができるが、これらに限定されない。

前記で示した基質は、市販品を用いることができる。基質を含む基質液の組成は、その機能を損ねない範囲で、特に限定されない。

【0028】

銅イオン濃度はICP発光分光分析法(ICP-AES)やICP質量分析法(ICP-MS)で求めることができる。

本明細書においては、銅イオン濃度は、ICP-AES(アメテック社のSPECTROBLUE(登録商標)を使用)で測定した値で定義される。ただし、ICP-AESで検出限界を下回ったため検出できなかったと判断される場合は、さらに、ICP-MS(アジレント・テクノロジー社のAgilent 7700s ICP-MSを使用)で測定した値を採用する。

【実施例】

【0029】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0030】

[実施例1] 洗浄液における阻害物質の検討

本発明者は、発光基質の1種であるCDP-StarとALPとを用いた化学発光免疫測定法において、原因不明の測定値低下を経験した。本発明者は、試薬組成について検討を行い、洗浄液中に含まれる重金属イオンの影響について評価を行った。

以下の実験では、蒸留水を用いて重金属イオンを含まない洗浄液を作成し、検討のベース組成とした。このベース組成の洗浄液に、各金属を表1のように添加して影響を及ぼす金属を特定した。金属はチタンおよびモリブデン以外は塩化物塩で添加した。チタンは酸化チタン硫酸塩、モリブデンはモリブデン酸ナトリウムを用いた。表1に示す金属濃度(mg/L)は、塩としての添加濃度ではなく金属としての添加濃度である。

【0031】

10

20

30

40

【表 1】

添加量 (mg/L)	Ca	K	Zn	Mg	Cu	Al	Mn	Fe	Na	Ti	Ni	Co	Mo	Li	添加なし
	1000	1000	1	1000	1	0.2	0.05	0.3	200	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	-

10

20

30

40

小型化学発光免疫自動分析装置 P O C u b e (登録商標、東洋紡製)を用いて以下の様に検討した。

【試薬】

[A] ブロック液 (1重量%カゼイン)

[B] 洗浄液 (水に、表1に記載の濃度の各金属を添加)

[C] R1 試薬 (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ビオチン標識抗CRP抗体液)

[D] R2 試薬 (5.0 ng/ml アルカリホスファターゼ標識抗CRP抗体液)

[E] R3 試薬 (ロシュ社 CDP - StarTM Ready - to - Use With Emerald - II ; 発光基質共にエンハンサーを含む混合物)

[F] P O C u b e (登録商標)専用反応容器 (第一抗体に結合したリガンドを特異的に認識するリガンド捕捉剤が結合された多孔性フィルタ (抗ビオチン抗体を結合させたガラスフィルタ-固相)を含む容器)

10

【0033】

【操作】

(1) R1 試薬 30 μL と R2 試薬 20 μL および試料として予め生理食塩水で20倍希釈した血清 10 μL を別のウェルに自動分注・混合し、40 で2分30秒インキュベートし抗原-抗体のサンドイッチ複合体を形成した。

(2) P O C u b e (登録商標)専用反応容器に、ブロック液を50 μL 添加した後、(1)でインキュベート後の液 40 μL を反応容器に滴下し、40 で20秒インキュベートし抗原-抗体のサンドイッチ複合体を反応容器に結合させた。

20

(3) インキュベート後、反応容器に表1に記載の各洗浄液 80 μL を2回分注し、B/F分離を行った後、R3 試薬 30 μL を添加し、発光強度を測定した。

【0034】

測定結果を図3および表2に示す。実施例1で作製したベース組成の洗浄液 (金属添加なし) を対象として、各金属を添加した場合の測定結果 (発光値) を相対%で示す。上記の結果より、銅を添加した場合のみ測定値が著しく低下することを確認した。

【0035】

【表 2】

	Ca	K	Zn	Mg	Cu	Al	Mn	Fe	Na	Ti	Ni	Co	Mo	Li	添加なし
添加量 (mg/L)	1000	1000	1	1000	1	0.2	0.05	0.3	200	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	-
測定値	106%	110%	113%	95%	0%	105%	102%	95%	91%	108%	108%	107%	101%	98%	100%

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

[実施例 2] 洗浄液に含まれる銅イオンの濃度検討

実施例 1 と同様の方法で、ベース組成の洗浄液に添加する銅の濃度を 0 mg / L、0 . 0 0 1 mg / L、0 . 0 1 mg / L、0 . 1 mg / L、1 mg / Lとして、測定値を確認した。

【 0 0 3 7 】

測定結果を図 4 および表 3 に示す。銅の添加濃度 0 mg / L を対象として、銅を各濃度添加した場合の測定結果（発光値）を相対%で示す。上記の結果より、0 . 1 mg / L 以上の銅を添加した場合、測定値が著しく低下することを確認した。

【 0 0 3 8 】

【表 3】

Cu濃度 (mg/L)	0	0.001	0.01	0.1	1
測定値	100%	97%	48%	4%	0%

10

【 0 0 3 9 】

[実施例 3] 洗浄液に含まれる銅イオンの濃度検討（発光基質を変更した場合）

実施例 1 と同様の方法で、用いる発光基質を Lumigen APS - 5（商標）に変更し、洗浄液に添加する銅の濃度を 0 mg / L、0 . 0 0 1 mg / L、0 . 0 1 mg / L、0 . 1 mg / L、1 mg / Lとして測定値を確認した。

【 0 0 4 0 】

測定結果を図 5 および表 4 に示す。添加濃度 0 mg / L を対象として、各濃度添加した場合の測定結果（発光値）を相対%で示す。上記の結果より、0 . 1 mg / L 以上の銅を添加した場合、測定値が著しく低下することを確認した。

【 0 0 4 1 】

【表 4】

Cu濃度 (mg/L)	0	0.001	0.01	0.1	1
測定値	100%	97%	78%	21%	9%

20

30

【 0 0 4 2 】

[実施例 4] 各試薬への銅添加による影響

実施例 1 と同様の方法で、[B] 洗浄液には銅などの金属を添加せず、そのかわりに、以下の [A] [C] [D] および [E] の各試薬にそれぞれ 1 mg / L の銅を添加して、測定値を確認した。

[A] ブロック液

[C] R 1 試薬（ビオチン標識抗測定対象抗体）

[D] R 2 試薬（アルカリホスファターゼ標識抗測定対象抗体）

[E] R 3 試薬（発光基質と共にエンハンサーを含む混合物）

【 0 0 4 3 】

測定結果を図 6 および表 5 に示す。Cu 無添加を対象として、各濃度添加した場合の測定結果（発光値）を相対%で示す。上記の結果より、[E] R 3 試薬に 1 mg / L の銅

40

50

を添加した場合、著しく感度低下することを確認した。

【 0 0 4 4 】

【表 5】

添加試薬	無添加	R1試薬	R2試薬	R3試薬	ブロック液
測定値	100%	102%	95%	11%	93%

10

【 0 0 4 5 】

[実施例 5] R 3 試薬 (発光基質を含む) に含まれる銅イオンの濃度検討

実施例 1 と同様の方法で、[B] 洗浄液には銅などの金属を添加せず、そのかわりに、R 3 試薬に添加する銅の濃度を 0 m g / L、0 . 0 0 1 m g / L、0 . 0 1 m g / L、0 . 1 m g / L、1 m g / L として測定値を確認した。

【 0 0 4 6 】

測定結果を図 7 および表 6 に示す。添加濃度 0 m g / L を対象として、各濃度添加した場合の測定結果 (発光値) を相対 % で示す。上記の結果より、[E] R 3 試薬に 0 . 1 m g / L 以上の銅を添加した場合、著しく感度低下することを確認した。

20

【 0 0 4 7 】

【表 6】

Cu濃度 (mg/L)	0	0.001	0.01	0.1	1
測定値	100%	99%	94%	27%	11%

30

【 0 0 4 8 】

[実施例 6] キレート剤添加による銅イオンの影響低減検討

実施例 1 と同様の方法で、[B] 洗浄液に銅を 1 m g / L となるように添加した。さらに、[E] R 3 試薬にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (E D T A ・ 2 N a) を 0 m M、0 . 0 1 m M、0 . 1 m M、1 m M、5 m M、1 0 m M となるように添加し、測定値を確認した。

【 0 0 4 9 】

測定結果を表 7 に示す。銅を添加しなかった洗浄液を対象として、銅を 1 m g / L 加えた洗浄液を用い、かつ R 3 試薬中の E D T A ・ 2 N a を各濃度添加した場合の測定結果 (発光値) を相対 % で示す。本結果より、[E] R 3 試薬に 0 . 0 1 m M 以上の E D T A ・ 2 N a を添加した場合、銅イオンによる感度低下を抑制できることを確認した。

40

【 0 0 5 0 】

【表 7】

洗浄液中のCu濃度	1 mg/L						0 mg/L
R3 試薬中のEDTA濃度(mM)	0	0.01	0.1	1	5	10	0
測定値	3%	48%	99%	102%	105%	104%	100%

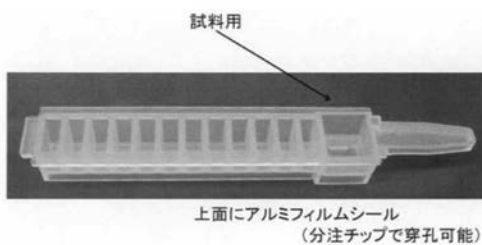
10

【産業上の利用可能性】

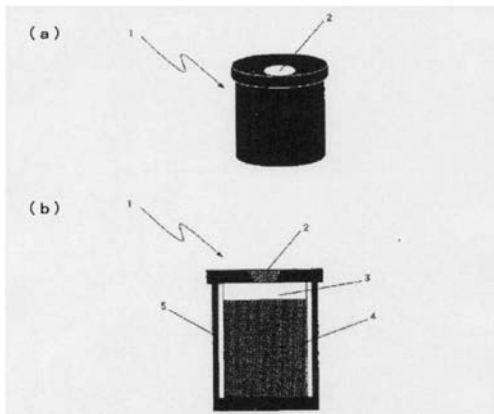
【0051】

アルカリホスファターゼを用いる化学発光分析において、発光基質及び/又はエンハンサーを含む組成物中、或いはB/F分離用の洗浄液中の銅イオン濃度を低減することで、優れた安定性を有する化学発光分析用組成物を得ることができる。また、該組成物を用いて安定に化学発光分析を行うことが可能となる。

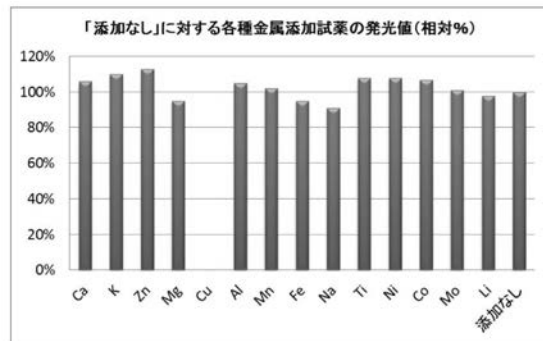
【図 1】



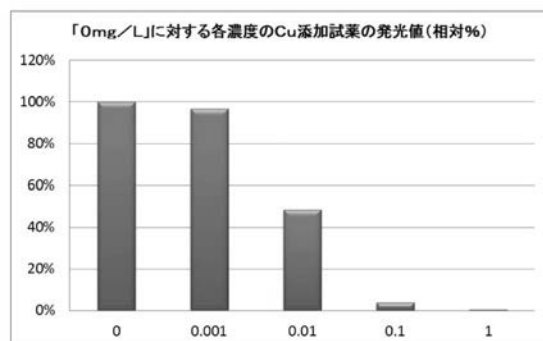
【図 2】



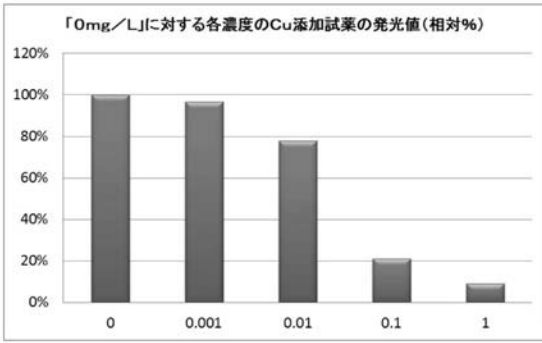
【図 3】



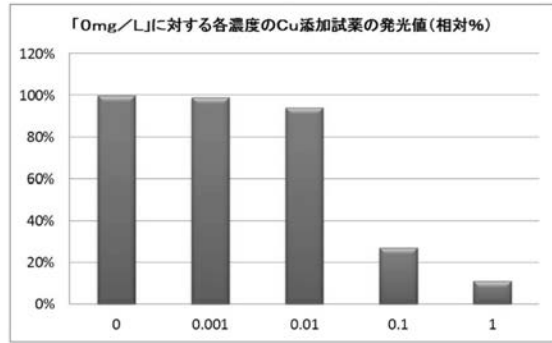
【図 4】



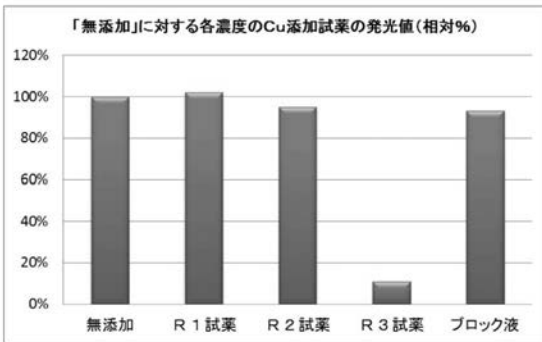
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



专利名称(译)	用于免疫学测量和免疫学测量方法的组合物		
公开(公告)号	JP2018105866A	公开(公告)日	2018-07-05
申请号	JP2017249054	申请日	2017-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	东洋纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	东洋纺株式会社		
[标]发明人	西村研吾		
发明人	西村 研吾		
IPC分类号	G01N33/532		
FI分类号	G01N33/532.B		
优先权	2016252606 2016-12-27 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得具有优异稳定性的化学发光分析用组合物，并使用该组合物稳定地进行化学发光分析。溶液：用于免疫学测量方法的该组合物包含（1）发光底物和/或增强剂，并且组合物的铜离子浓度为0.01mg/L或更低，免疫组合物或，（2）发光底物加入的B/F分离之前清洗液，并且在组合物中铜离子的浓度小于0.01毫克/升按组合物的重量计。

(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2018-105866 (P2018-105866A)
		(43) 公開日 平成30年7月5日 (2018.7.5)
(51) Int. Cl. G01N 33/532 (2006.01)	F I G01N 33/532	B テーマコード (参考)
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 16 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-249054 (P2017-249054)	(71) 出願人 000003160 東洋紡株式会社	
(22) 出願日 平成29年12月26日 (2017.12.26)	大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号	
(31) 優先権主張番号 特願2016-252606 (P2016-252606)	(72) 発明者 西村 研吾	
(32) 優先日 平成28年12月27日 (2016.12.27)	福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡株式会社内	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		
(54) 【発明の名称】 免疫学的測定用組成物および免疫学的測定方法		