

(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2004-325414

(P2004-325414A)

(43) 公開日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/543 5 8 3

GO 1 N 33/531

GO 1 N 33/543 5 8 7

// GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/531 B

GO 1 N 33/53 R

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-124338 (P2003-124338)

(22) 出願日 平成15年4月28日 (2003. 4. 28)

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(72) 発明者 平田 治

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学

工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法及び免疫測定キット

(57) 【要約】

【課題】 検体測定値の経時的な変動を抑え検体測定値の安定性が飛躍的に向上した免疫測定方法及び免疫測定キットを提供する。

【解決手段】 被測定物質である抗原又は抗体と、前記被測定物質に対する抗体又は抗原との凝集反応の度合いを検出することにより前記被測定物質を測定する免疫測定方法であって、反応系に抗補体抗体を存在させる免疫測定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被測定物質である抗原又は抗体と、前記被測定物質に対する抗体又は抗原との凝集反応の度合いを検出することにより前記被測定物質を測定する免疫測定方法であって、反応系に抗補体抗体を存在させることを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 2】

抗補体抗体は、抗 C 3 c 抗体及び / 又は抗 C 4 c 抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の免疫測定方法を実施するために用いることを特徴とする免疫測定キット。 10

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、検体測定値の経時的な変動を抑え検体測定値の安定性に優れた免疫測定方法及び免疫測定キットに関する。

【0002】**【従来技術】**

各種生体成分から特定の被測定物質を検出又は定量するため、被測定物質に対する抗原又は抗体との凝集反応を、肉眼にて観察又は光学的に検出する方法が行われている。また、より検出感度を向上するため、被測定物質に対する抗体又は抗原を不溶性担体に担持し、被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより被測定物質を測定する方法が近年広く用いられており、このような測定法としてはラテックス凝集法、赤血球凝集法等がある。 20

【0003】

このような方法では試料として血清、血漿、尿、体液、その他の生体成分を用いることが一般的であるが、測定する項目や試料によっては、試料中の被測定物質には変動がないにもかかわらず、被測定物質以外の成分の変動により、採取後経時的に測定値が変動する場合があります。 30

このような場合には、試料採取後より測定までの時間や保存条件を管理する等の対応がとられているが、非常に煩雑である。

また、測定値が変動する試料では、測定結果に基づいた正確な疾病の診断ができないため、従来より大きな問題となっていた。

各種添加物により、試料中に存在する非特異的反應物質の影響を抑制する方法は従来より提案されているが、試料が本質的にもっている影響因子による経時的な変動を抑えることはできなかった。

【0004】

特許文献 1 には、予め検体をヒトリウマチ因子 (RF) の反応部位に結合能を有する動物由来抗体の充分量で前処理して、検体中のヒト RF に起因する非特異的反應を減少させる免疫学的検出方法が記載されている。 40

【0005】**【特許文献 1】**

特開平 7 - 1 2 8 1 8 号公報

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、上記現状に鑑み、検体測定値の経時的な変動を抑え検体測定値の安定性が飛躍的に向上した免疫測定方法及び免疫測定キットを提供することを目的とする。

【0007】**【課題を解決するための手段】**

本発明は、被測定物質である抗原又は抗体と、上記被測定物質に対する抗体又は抗原との 50

凝集反応の度合いを検出することにより上記被測定物質を測定する免疫測定方法において、反応系に抗補体抗体を存在させる免疫測定方法である。

以下に本発明を詳述する。

【0008】

本発明の免疫測定方法は、被測定物質である抗原又は抗体と、上記被測定物質に対する抗体又は抗原との凝集反応の度合いを検出することにより上記被測定物質を測定する方法である。

上記被測定物質としては特に限定されないが、血液中に存在する抗原又は抗体が好ましく、例えば、変性 - グロブリン、リウマチ因子、ストレプトリジン O (S L O)、抗 S L O 抗体、ペプシノーゲン、抗ペプシノーゲン抗体、カルジオライピン、抗カルジオライピン抗体、インスリン、抗インスリン抗体、C 反応性蛋白 (C R P)、抗 C R P 抗体、 - フェトプロテイン (A F P)、抗 A F P 抗体、癌胎児性抗原 (C E A)、抗 C E A 抗体、H B s 抗原、抗 H B s 抗体、抗トレポネーマ抗体に対する抗原、H C V 抗原、フィブリノーゲン、抗フィブリノーゲン抗体、フィブリン及びフィブリノーゲン分解産物 (F D P) に対する抗体等が挙げられる。

10

【0009】

上記被測定物質に対する抗体又は抗原としては、生体由来のもの、遺伝子組換え等の技術を用いて得られたもの、それらの処理物等が用いられる。

上記被測定物質に対する抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであっても好適に用いることができ、また、F (a b ') 2、F a b ' であってもよい。

20

上記測定対象物に対する抗原としては特に限定されず、抗原能を有する物質以外にハプテンであってもよい。

【0010】

上記被測定物質に対する抗体又は抗原は、不溶性担体に担持されていてもよい。上記不溶性担体としては特に限定されず、例えば、ポリスチレン、スチレン - スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリル - ブタジエン - スチレン共重合体、塩化ビニル - アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル - アクリル酸エステル共重合体等からなるラテックス粒子；不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストラン等のその他有機高分子からなる粒子；シリカ、アルミナ等からなる無機粒子；

30

金、チタン、鉄、ニッケル等の金属粉末；赤血球等の生体由来粒子等が挙げられる。なかでもラテックス粒子が好適に用いられる。

上記不溶性担体の粒径としては、0 . 0 5 ~ 5 . 0 μ m の範囲において検出濃度又は測定機器により適宜選択すればよい。

【0011】

本発明の免疫測定方法は、抗原抗体反応系に抗補体抗体を存在させることを特徴とするものである。

上記補体としては特に限定されず、C 1、C 2、C 3、C 4、C 5、C 6、C 7 C 8、C 9、及び、それらの分解物が挙げられる。なかでも、C 3 c や、C 4 c に対する抗体を反応系に存在させた場合に測定値の安定効果が高く好ましい。

40

上記抗補体抗体としては、生体由来のもの、遺伝子組換え等の技術を用いて得られたもの、それらの処理物等が用いられる。

上記抗補体抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであっても好適に用いることができ、また、F (a b ') 2、F a b ' であってもよい。

【0012】

上記抗補体抗体を反応系に存在させる方法としては特に限定されず、例えば、(1) 抗補体抗体の溶液を用意して、被測定物質を含む検体に、被測定物質に対する抗体又は抗原を反応させる前に抗補体抗体の溶液を反応させる方法、(2) 被測定物質に対する抗体若しくは抗原の溶液、又は、被測定物質に対する抗体若しくは抗原を不溶性担体に担持する場合には、抗体若しくは抗原が担持された不溶性担体の懸濁液に抗補体抗体を添加する方

50

法等が挙げられる。

【0013】

上記抗補体抗体の使用量としては、最終的な試薬性能を考慮して決定すればよく特に限定されないが、上記(1)における抗補体抗体の溶液中又は(2)における被測定物質に対する抗体又は抗原の溶液中に、免疫グロブリン濃度として0.01~10mg/mLを存在させるのが好ましい。

本発明の免疫測定方法に供する検体としては特に限定されないが、血清、血漿、血液等が好適に用いられる。

【0014】

抗原抗体反応時には、感度を高めるために、公知の水溶性添加剤を反応系に存在させてもよい。上記水溶性添加剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリグリコシルエチルメタクリレート、プルラン、デキストラン等の水溶性高分子等が挙げられる。

10

【0015】

抗原抗体反応時には、非特異的反応の抑制、試薬の安定性向上等のために、更に他の添加剤を反応系に存在させてもよい。上記添加剤としては、例えば、カゼイン、ゼラチン等の蛋白質又はその分解物・変性物；塩化コリン等の第4級アンモニウム塩；EDTA、ポリアニオン；Cl⁻、I⁻、SCN⁻等のカオトロピックイオン；アミノ酸、界面活性剤等が挙げられる。

【0016】

反応系のpHとしては、5~10であることが好ましい。より好ましい下限は6であり、より好ましい上限は9である。反応温度としては、0~50であることが好ましい。より好ましい下限は20であり、より好ましい上限は40である。反応時間は適宜決定すればよい。

20

【0017】

本発明の免疫測定方法を実施するために用いる免疫測定キットもまた、本発明の1つである。

本発明の免疫測定キットは、少なくとも、上記抗補体抗体、及び、上記被測定物質に対する抗体又は抗原を構成成分として含有するものである。

本発明の免疫測定キットは更に、上記水溶性添加剤、その他の添加剤を含有していてもよい。

30

【0018】

【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0019】

<実施例1> フィブリン及びフィブリノーゲン分解産物(FDP)の測定

(1) 緩衝液の調製

50mM PBS(pH6.5)に、1重量%牛血清アルブミン、1重量%ポリエチレングリコール6000、0.1重量%アジ化ナトリウム及び0.21mg/mLの抗ヒトC3c補体成分ウサギポリクローナル抗体(ダコジャパン社製、A0062)を溶解した。

40

【0020】

(2) 抗ヒトフィブリノーゲン抗体感作ラテックス試薬の調製

抗ヒトフィブリノーゲンヤギポリクローナル抗体を蛋白質濃度として3mg/mLで50mM PBS(pH6.5)に溶解した液2mLに、平均粒径0.1µmのポリスチレン系ラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1mLを添加し、37にて60分間攪拌した。次いで、ウシ血清アルブミン(以下、BSAという)を2重量%濃度で含有する50mM PBS(pH6.5)3mLをラテックス懸濁液に加え、37にて60分間攪拌した後、この混合液を遠心分離を行って上清を廃棄し、ポリスチレン系ラテックスに担持されていない抗体を取り除いた。得られた沈殿物に、0.1重量%アジ化ナト

50

リウム及び1重量%BSAを溶解した50mM PBS (pH6.5) 10mLを加えて再懸濁し、FDP測定用試薬を製造した。

【0021】

(3) 試料

血清検体3例を用いた。試料の測定は、血清採取直後(0時間)、3時間後、6時間後の計3回行った。

【0022】

(4) 検体の測定

本実施例のFDP測定試薬は、上記(1)の緩衝液からなる第1試薬及び上記(2)のラテックス試薬からなる第2試薬から構成される2液系の試薬とした。

測定用の標準液としては、50µg/mLに希釈したヒトフィブリノーゲン液(カピ社製)を生理食塩水にて希釈して0、6.3、12.5、25、50µg/mLのものを調製した。

標準液各5µLに、各々上記(1)項の緩衝液(第1試薬)150µLを混和し、37で適時保持した後、上記(2)のラテックス試薬(第2試薬)150µLを添加攪拌し、この後、約80秒から300秒間の波長700nmでの吸光度の変化量を測定し、吸光度変化量(Abs)とした。測定には日立自動分析装置7150形を使用した。

試料である血清検体についても、上記標準液と同様に操作して吸光度変化量を求め、標準液より得られた検量線より試料中のFDP濃度を求めた。

【0023】

<実施例2>

緩衝液の調製において、抗ヒトC3c補体成分ウサギポリクローナル抗体を、0.8mg/mL抗ヒトC4c補体成分ウサギポリクローナル抗体(ダコジャパン社製、A0065)に変えた以外は実施例1と同様に操作し、試料中のFDP濃度を求めた。

【0024】

<比較例1>

緩衝液の調製において、抗ヒトC3c補体成分ウサギポリクローナル抗体を添加しなかったこと以外は実施例1と同様に操作し、試料中のFDP濃度を求めた。実施例1、2及び比較例1の結果を表1及び表2に示した。

【0025】

【表1】

時間経過とFDP測定値(実測値)

保存条件	試料No.	実施例1(抗C3c抗体)			実施例2(抗C4c抗体)			比較例1		
		0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間
4℃	1	12.5	13.2	12.9	12.0	11.3	10.5	13.0	11.0	9.1
	2	8.5	9.2	8.8	9.0	8.1	7.7	8.1	6.8	5.5
	3	22.2	21.1	22.0	21.6	21.0	21.7	20.8	18.8	13.2
25℃	1	11.8	10.9	12.1	11.8	13.6	14.1	12.8	16.5	20.3
	2	9.1	9.2	8.5	9.5	10.8	11.1	9.9	7.8	6.6
	3	23.0	23.4	22.5	23.8	24.5	25.1	22.7	26.8	33.3

単位: µg/mL

【0026】

【表2】

10

20

30

40

時間経過とFDP測定値（0時間に対する相対値）

保存条件	試料No.	実施例1（抗C3c抗体）			実施例2（抗C4c抗体）			比較例1		
		0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間
4℃	1	100	106	103	100	94	88	100	85	70
	2	100	108	104	100	90	86	100	84	68
	3	100	95	99	100	97	100	100	90	63
25℃	1	100	92	103	100	115	119	100	129	159
	2	100	101	93	100	114	117	100	79	67
	3	100	102	98	100	103	105	100	118	147

単位：%

10

【0027】

表1及び表2に示された結果から明らかなように、抗補体抗体を加えた実施例1及び実施例2では、無添加の比較例1と比べ、FDP測定値の変動が顕著に抑えられていた。

【0028】

<実施例3> ヒト - フェトプロテイン（AFP）の測定

（1）緩衝液の調製

100mMリン酸緩衝液（pH7.4）に、1重量%牛血清アルブミン、1重量%プルラン、0.1重量%アジ化ナトリウム及び0.5mg/mLの抗ヒトC3c補体成分ウサギポリクローナル抗体（ダコジャパン社製、A0062）を溶解した。

20

【0029】

（2）抗ヒト - フェトプロテイン抗体感作ラテックス試薬の調製

抗ヒト - フェトプロテインモノクローナル抗体を蛋白質濃度として50µg/mLで50mMリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解した液4mLに、平均粒径0.3µmのポリスチレン系ラテックス（固形分10重量%、積水化学工業社製）1mLを50mMリン酸緩衝液（pH7.4）で2.5%に希釈したもの1mLを加え、25℃にて60分間攪拌した。次いで、ウシ血清アルブミン（以下、BSAという）を1重量%濃度で含有する100mMリン酸緩衝液（pH7.4）10mLをラテックス懸濁液に加え、25℃にて120分間攪拌した後、この混合液に対し遠心分離を行って上清を廃棄し、ポリスチレン系ラテックスに担持されていない抗体を取り除いた。得られた沈殿物に、0.1重量%アジ化ナトリウム及び1重量%BSAを含むリン酸緩衝液（pH7.4）20mLを加えて再懸濁し、AFP測定用試薬を製造した。

30

【0030】

（3）試料

血清検体3例を用いた。試料の測定は、血清採取直後（0時間）、3時間後、6時間後の計3回行った。

【0031】

（4）検体の測定

本実施例のAFP測定試薬は、上記（1）の緩衝液からなる第1試薬及び上記（2）のラテックス試薬からなる第2試薬から構成される2液系の試薬とした。

40

測定用の標準液としては、AFP標準品（ダコジャパン社製）110µg/mLを生理食塩水にて希釈して、0、5、20、100、500、2000ng/mLのものを調製した。

標準液各20µLに、各々上記（1）項の緩衝液（第1試薬）210µLを混和し、37℃で適時保持した後、上記（2）のラテックス試薬（第2試薬）30µLを添加攪拌し、この後、約80秒から300秒間の波長570nmでの吸光度の変化量を測定し、吸光度変化量（Abs）とした。測定には日立自動分析装置7150形を使用した。

試料である血清検体についても、上記標準液と同様に操作して吸光度変化量を求め、標準液より得られた検量線より試料中のAFP濃度を求めた。

【0032】

50

< 実施例 4 >

緩衝液の調製において、抗ヒトC3c補体成分ウサギポリクローナル抗体を、2mg/mL抗ヒトC4c補体成分ウサギポリクローナル抗体（ダコジャパン社製、A0065）に変えた以外は実施例3と同様に操作し、試料中のAFP濃度を求めた。

【0033】

< 比較例 2 >

緩衝液の調製において、抗ヒトC3c補体成分ウサギポリクローナル抗体を添加しなかった以外は実施例3と同様に操作し、試料中のAFP濃度を求めた。

実施例3、4及び比較例2の結果を表3及び表4に示した。

【0034】

【表3】

時間経過とAFP測定値（実測値）

保存条件	試料No.	実施例1（抗C3c抗体）			実施例2（抗C4c抗体）			比較例1		
		0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間
4℃	4	79	77	77	73	70	69	80	68	50
	5	155	158	152	139	129	131	135	99	68
	6	456	451	483	455	428	419	446	294	214
25℃	4	82	81	80	81	83	83	79	97	126
	5	148	142	151	138	146	149	136	199	226
	6	438	425	416	433	455	472	429	399	352

単位：μg/mL

10

20

【0035】

【表4】

時間経過とAFP測定値（0時間に対する相対値）

保存条件	試料No.	実施例1（抗C3c抗体）			実施例2（抗C4c抗体）			比較例1		
		0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間
4℃	4	100	98	98	100	96	95	100	85	62
	5	100	102	98	100	93	94	100	73	50
	6	100	99	106	100	94	92	100	66	48
25℃	4	100	99	98	100	102	103	100	123	159
	5	100	96	102	100	106	108	100	146	166
	6	100	97	95	100	105	109	100	93	82

単位：%

30

【0036】

表3及び表4に示した結果から明らかなように、AFP同様AFP測定試薬でも、抗補体抗体を加えた実施例3及び実施例4では、無添加の比較例2と比べ、AFP測定値の変動が顕著に抑えられていた。

40

【0037】

【発明の効果】

本発明は、上述の構成よりなるので、抗原抗体反応系に抗補体抗体を存在させることにより、検体測定値の経時的な変動が抑制され検体測定値の安定性が飛躍的に向上した。

专利名称(译)	免疫测定法和免疫测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2004325414A	公开(公告)日	2004-11-18
申请号	JP2003124338	申请日	2003-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	平田治		
发明人	平田 治		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.583 G01N33/543.587 G01N33/531.B G01N33/53.R		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测量免疫力的方法和试剂盒，它可以抑制样品测量值的时间变化，并显著提高样品测量值的稳定性。ZSOLUTION：测量免疫力的方法通过检测作为待测对象的抗原或抗体与抗体或抗原之间的凝集程度来测量待测物体，对应于待测物体并使反应系统中存在抗互补抗体。Z

保存 条件	試料No.	実施例 1 (抗C3c抗体)			実施例 2 (抗C4c抗体)			比較例 1		
		0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間	0時間	3時間	6時間
4℃	1	12.5	13.2	12.9	12.0	11.3	10.5	13.0	11.0	9.1
	2	8.5	9.2	8.8	9.0	8.1	7.7	8.1	6.8	5.5
	3	22.2	21.1	22.0	21.6	21.0	21.7	20.8	18.8	13.2
25℃	1	11.8	10.9	12.1	11.8	13.6	14.1	12.8	16.5	20.3
	2	9.1	9.2	8.5	9.5	10.8	11.1	9.9	7.8	6.6
	3	23.0	23.4	22.5	23.8	24.5	25.1	22.7	26.8	33.3

單位：μg/mL