

(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2010-216970

(P2010-216970A)

(43) 公開日 平成22年9月30日(2010.9.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2009-63690 (P2009-63690)	(71) 出願人	000002288
(22) 出願日	平成21年3月17日 (2009.3.17)		三洋化成工業株式会社
			京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
		(72) 発明者	園近 誠
			京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 ウイルス抗体の免疫測定法

(57) 【要約】

【課題】 低コストで煩雑な処理が必要でなく、かつ非特異反応の低減効果が高い測定法を提供することである。

【解決手段】 ウイルス由来の抗原に対する抗体を測定する免疫測定法において、ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体、ウイルス由来の抗原に対する抗体を含む検体及び両性界面活性剤を含む緩衝液を混合して免疫反応させる工程を有することを特徴とする免疫測定法であり、両性界面活性剤はベタイン型両性界面活性剤であることが好ましく、ウイルスはC型肝炎ウイルス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】**

ウイルス由来の抗原に対する抗体を測定する免疫測定法において、ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体、ウイルス由来の抗原に対する抗体を含む検体及び両性界面活性剤を含む緩衝液を混合して免疫反応させる工程を有することを特徴とする免疫測定法。

【請求項 2】

両性界面活性剤がベタイン型両性界面活性剤である請求項 1 記載の免疫測定法。

【請求項 3】

免疫反応時の反応液における両性界面活性剤の濃度が 0.5 ~ 60 g/L である請求項 1 又は 2 記載の免疫測定法。

【請求項 4】

ウイルスが C 型肝炎ウイルスである請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ウイルス由来の抗原に対する抗体を測定する免疫測定に関するものである。更に詳しくは、ウイルス由来の抗原に対する抗体を測定する免疫測定において非特異反応を低減した免疫測定法に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

ウイルス由来の抗原に対する抗体の免疫測定法において、非特異反応を低減する方法として、特殊な不溶性担体を使用する方法（例えば、特許文献 1 参照）、ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体に特別なブロッキングを施す方法（例えば、特許文献 2 参照）及び反応液中に非イオン界面活性剤を存在させる方法（例えば、特許文献 3 及び特許文献 4 参照）等が知られている。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0003】**

【特許文献 1】 特開 2008 - 216237 号公報

【特許文献 2】 特開 2006 - 47255 号公報

【特許文献 3】 特開平 8 - 240590 号公報

【特許文献 4】 特開平 6 - 66798 号公報

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

しかしながら特許文献 1 及び 2 に記載の方法では、特別な不溶性担体を用意する等高コストであり、煩雑な処理が必要であるという問題があった。また、非イオン性界面活性剤を用いる特許文献 3 及び 4 に記載の方法は、非特異反応の低減効果が十分でないという問題があった。本発明の目的は、低コストで煩雑な処理が必要でなく、かつ非特異反応の低減効果が高い測定法を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、本発明に到達した。即ち本発明は、ウイルス由来の抗原に対する抗体を測定する免疫測定法において、ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体、ウイルス由来の抗原に対する抗体を含む検体及び両性界面活性剤を含む緩衝液を混合して免疫反応させる工程を有することを特徴とする免疫測定法である。

【発明の効果】**【0006】**

本発明のウイルス由来の抗原に対する抗体を測定する免疫測定法は、検体に起因する非

10

20

30

40

50

特異反応が低減される。従って、本発明の免疫測定法では、信頼性の高い測定結果が得られるという効果がある。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明において、ウイルス由来の抗原に対する抗体（以後、ウイルス抗体と記載する。）は従来公知のものであり、ウイルスの体内への感染により生体内で生じたものである。ウイルス抗体としては、例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原に対する抗体（HBs抗体）、B型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体（HBc抗体）、C型肝炎ウイルス由来の抗原（コア抗原、NS3抗原、NS4抗原及びNS5抗原等）に対する抗体（HCV抗体）、トレポネーマ パリダム由来の抗原に対する抗体（TP抗体）、ヒト免疫不全ウイルス由来の抗原に対する抗体（HIV抗体）、成人T細胞性白血病ウイルス由来の抗原に対する抗体（ATL抗体）、サイトメガロウイルス由来の抗原に対する抗体（CMV抗体）及びパルボB19ウイルス由来の抗原に対する抗体（PB19抗体）等が挙げられる。これらの内、臨床的に測定頻度が高い観点から好ましいのは、HBs抗体、HBc抗体、HCV抗体、TP抗体、HIV抗体であり、更に好ましいのはHBs抗体及びHCV抗体、特に好ましいのはHCV抗体である。

10

【0008】

ウイルス抗体を含む検体は、動物の体液であれば特に限定されないが、ヒトの疾患を判定するという目的の観点から、ヒト由来の血液（全血、血清又は血漿）及び尿が好ましい。これらの内、更に好ましいのはヒト由来の血液（全血、血清又は血漿）であり、特に好ましいのはヒト由来の血液から得た血清又は血漿である。

20

【0009】

本発明において、ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体としては、ウイルス由来の抗原〔例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、C型肝炎ウイルス由来抗原（コア抗原、NS3抗原、NS4抗原、NS5抗原等）、トレポネーマ パリダム由来の抗原、ヒト免疫不全ウイルス由来の抗原、成人T細胞性白血病ウイルス由来の抗原及びサイトメガロウイルス由来の抗原等〕を不溶性担体に結合したものが使用できる。これらの内好ましいのは、C型肝炎ウイルス由来抗原〔コア抗原、NS3抗原、NS4抗原及びNS5抗原等〕である。HCV抗体の測定には、少なくともコア抗原、NS3抗原、NS4抗原及びNS5抗原を結合した不溶性担体を用いることが好ましい。尚、不溶性担体における不溶性とは、1～50のいずれの温度においても、水に対する溶解度が0.01g/水100g以下であることを意味し、担体とは1～50のいずれの温度においても固体（ゲルを含む）であってウイルス由来の抗原と結合できる物質を意味する。

30

【0010】

不溶性担体としては、特開平2-205774号公報に記載の担体等が使用でき、例えば、セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリウレタン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリエステル、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン、エボナイト、ゴム、ガラス、石英、シリコン及びセラミックス等の有機物及び無機物が挙げられる。これらの内、コスト及び非特異反応低減の観点からポリスチレン、ガラス、石英及びシリコンが好ましく、更に好ましいのはポリスチレン及びガラス、特に好ましいのはガラスである。

40

【0011】

不溶性担体の形状は、使用する試薬の構成や測定条件等に合わせて自由に決定でき、真球状や円盤状のビーズ、板状や棒状のスティック、試験管及び不織布やフィルターのストリップ（短冊状の細片）及び微粒子等が挙げられる。これらの内、測定感度、測定時の扱いやすさ等の観点からビーズ及び微粒子が好ましく、更に好ましいのは真球状のビーズである。

【0012】

不溶性担体の大きさは、使用する試薬の構成や測定条件等に合わせて自由に決定できるが、通常は内径4～10mm、深さ10～20mm程度の円柱形反応容器（ビーカー等）

50

に投入できる大きさである（水不溶性担体が試験管の場合を除く。）。真球状ビーズの場合、直径（mm）は1～10が好ましく、更に好ましくは2～8、特に好ましくは3～7である。円盤状ビーズの場合、直径（mm）は1～10が好ましく、更に好ましくは2～8、特に好ましくは3～7であり、厚さは（mm）は0.1～5が好ましく、更に好ましくは0.2～2、特に好ましくは0.3～1である。スティックの場合、長さ（mm）は2～10が好ましく、更に好ましくは3～8、特に好ましくは4～7である。また、スティックの断面積（mm²）は1～25が好ましく、更に好ましくは2～16、特に好ましくは3～9である。尚、断面積とは、長軸方向に対して垂直に切断した際の切断部分の断面積を意味する。試験管の場合、長さ（mm）は5～100が好ましく、更に好ましくは8～80、特に好ましくは10～20である。また、試験管の内径（mm）は、5～20が好ましく、更に好ましくは6～16、特に好ましくは8～12である。ストリップの場合、長さ（mm）は、5～100が好ましく、更に好ましくは10～80、特に好ましくは10～50である。また、ストリップの幅（mm）は、1～20が好ましく、更に好ましくは2～16、特に好ましくは3～10である。厚さは（mm）は0.1～2が好ましく、更に好ましくは0.1～0.5である。不織布やフィルターの平均孔径（μm）は、0.1～10が好ましく、更に好ましくは0.3～5である。微粒子の場合、平均粒子径（μm）は0.01～200が好ましく、更に好ましくは0.1～50、特に好ましくは0.2～10である。平均粒子径は、透過型電子顕微鏡法及び光学顕微鏡による整列測定法等で測定できる。

10

20

【0013】

ウイルス由来の抗原と不溶性担体とを結合する方法としては、化学的に結合する方法及び物理吸着により結合する方法等の従来公知の方法等で行うことができる。

化学的に結合する方法としては、不溶性担体の表面に導入されたアミノ基及び/又はスルフヒドリル基等の官能基と、抗原のアミノ基及び/又はスルフヒドリル基等の官能基とを結合剤（グルタルアルデヒド、サクシンアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロサクシンイミドエステル及びo-フェニレンビスマレイミド等）で架橋する方法（米国特許第4280992号明細書及び同第3652761号明細書等参照）等が挙げられる。

物理吸着により結合する方法としては、不溶性担体がポリスチレンの場合、抗原の0.001～0.04%（W/V）炭酸緩衝水溶液（pH9.0）に水不溶性担体を適当時間浸漬する方法（バイオシム・バイオフィズ・アクタ、251巻、427頁、1971年）等が挙げられる。この方法は、担体がポリスチレン以外の物質、例えばポリプロピレン、シリコン、ガラス及びセルロース等にも適用できる。また、特異的結合物質（例えば、抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖、相補的遺伝子鎖等）を利用して間接的に、抗原と不溶性担体とを結合することもできる。例えば、抗原をビオチンで修飾し、アビジンを結合した不溶性担体と反応することにより、抗原を不溶性担体に結合できる。アビジンとしては、卵白由来アビジン及びストレプトアビジン等が使用でき、ストレプトアビジンが好ましい。これら特異的結合物質の内抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖については、[生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」、東京化学同人社、1989年]に記載のもの、相補的な遺伝子としては公開特許公報平6-186232号に記載の相補的な遺伝子、例えばポリデオキシアデニル酸とポリチミジル酸の組み合わせ等が挙げられる。

30

40

【0014】

両性界面活性剤としては、カルボン酸塩型両性界面活性剤、硫酸エステル塩型両性界面活性剤、スルホン酸塩型両性界面活性剤及びリン酸エステル塩型両性界面活性剤等が挙げられる。

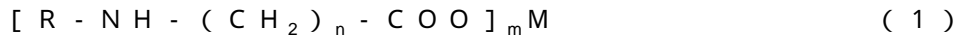
【0015】

カルボン酸塩型両性界面活性剤としては、アミノ酸型両性界面活性剤、ペタイン型両性界面活性剤及びイミダゾリン型両性界面活性剤等が挙げられる。

アミノ酸型両性界面活性剤は、分子内にアミノ基とカルボキシル基を有する両性界面活

50

性剤であり、例えば、一般式(1)で示される化合物等が挙げられる。



[式中、Rは1価の炭化水素基、nは1又は2、mは1又は2、Mは水素イオン、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、アンモニウムカチオン、アミンカチオン又はアルカノールアミンカチオンである。]

【0016】

一般式(1)で表される両面活性剤の具体例としては、例えば、アルキル(炭素数6~40)アミノプロピオン酸型両性界面活性剤(ステアリルアミノプロピオン酸ナトリウム及びラウリルアミノプロピオン酸ナトリウム等)及びアルキル(炭素数4~24)アミノ酢酸型両性界面活性剤(ラウリルアミノ酢酸ナトリウム等)等が挙げられる。

10

【0017】

ベタイン型両性界面活性剤は、分子内に第4級アンモニウム塩型のカチオン部分とカルボン酸型のアニオン部分を有する両性界面活性剤であり、例えば、アルキル(炭素数6~40)ジメチルベタイン(ステアリルジメチルアミノ酢酸ベタイン及びラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン等)、炭素数6~40のアミドベタイン(ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン及びラウリン酸アミドプロピルベタイン等)及びアルキル(炭素数6~40)ジヒドロキシアルキル(炭素数6~40)ベタイン(ラウリルジヒドロキシエチルベタイン等)等が挙げられる。

【0018】

イミダゾリン型両性界面活性剤としては、イミダゾリン環を有するカチオン部分とカルボン酸型のアニオン部分を有する両性界面活性剤であり、例えば、2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等が挙げられる。

20

【0019】

硫酸エステル塩型両性界面活性剤としては、高級アルキル(炭素数8~18)アミンの硫酸エステルナトリウム塩及びヒドロキシエチルイミダゾリン硫酸エステルナトリウム塩等が挙げられる。

スルホン酸塩型両性界面活性剤としては、ペンタデシルスルフォタウリン及びイミダゾリンスルホン酸等が挙げられる。

リン酸エステル塩型両性界面活性剤としては、グリセリン高級脂肪酸(炭素数8~22)エステル化物のリン酸エステルアミン塩等が挙げられる。

30

【0020】

これらの内、コストが安く、非特異反応の低減効果が高い点で好ましいのはカルボン酸塩型両性界面活性剤であり、更に好ましいのはベタイン型両性界面活性剤、特に好ましいのはヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン及びラウリン酸アミドプロピルベタインである。

【0021】

本発明においては、両性界面活性剤を含む緩衝液は、緩衝液に上記両性界面活性剤を溶解したものが使用できる。緩衝液としては、特許2682697号公報、特開2002-250728号公報又は特開2002-365296号公報に記載されたもの等が使用でき、例えば、pH5.0~10.0(好ましくは6.0~9.0)に緩衝作用を有する緩衝液[リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液、グリシン緩衝液及びホウ酸緩衝液等]等が挙げられる。尚、これらの緩衝液中の緩衝剤の濃度(mM)は、緩衝作用及び免疫反応性に影響しないという観点から1~500が好ましく、更に好ましくは5~300、特に好ましくは10~200である。

40

【0022】

更に緩衝液は、免疫反応を妨げない範囲で両性界面活性剤に加えて、タンパク質、非イオン界面活性剤(モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン等)、無機塩(塩化ナトリウム等)及び/又は防腐剤等(アジ化ナトリウム等)を含有することが好ましい。

【0023】

タンパク質としては、牛血清アルブミン、卵白アルブミン、カゼイン(カゼインナトリ

50

ウム等の塩も含む)及び正常動物イムノグロブリン(馬イムノグロブリンG等)等が挙げられる。また、これらは組み合わせて用いることもできる。これらの内好ましいのは、牛血清アルブミン、カゼイン、正常動物イムノグロブリン及びこれらの併用であり、非特異反応低減の観点から更に好ましいのは、カゼインと正常動物イムノグロブリンの併用である。

【0024】

タンパク質、非イオン界面活性剤、無機塩及び/又は防腐剤を含む場合、両性界面活性剤を含む緩衝液の重量に基づいて、タンパク質の含有量は0.1~10重量%、非イオン界面活性剤の含有量は0.02~5重量%、無機塩の含有量は0.01~5重量%、防腐剤の含有量は0.001~0.1重量%であることが好ましい。

10

【0025】

本発明における両性界面活性剤の使用量は、免疫反応時の反応液の容量に対して、好ましくは0.5~60g/L、更に好ましくは5~40g/L、特に好ましくは10~30g/Lとなる量である。免疫反応時の反応液は、ウイルス抗体を含む検体(通常10~100 μ L)と両性界面活性剤を含む緩衝液(通常50~400 μ L)とを混合して得られることから、緩衝液中の両性界面活性剤の濃度は、ウイルス抗体を含む検体と混合した際に、上記濃度範囲となるように調整する必要がある。

【0026】

ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体、ウイルス抗体を含む検体及び両性界面活性剤を含む緩衝液を混合して免疫反応させる際の温度は、通常20~50、好ましくは30~40であり、反応時間は、通常5~60分、好ましくは5~20分である。

20

【0027】

本発明の工程(ウイルス由来の抗原を結合した不溶性担体、ウイルス抗体を含む検体及び両性界面活性剤を含む緩衝液を混合して免疫反応させる工程)は、不溶性担体にウイルス抗体を捕捉する工程である。よって、ウイルス抗体の免疫測定における洗浄工程及び標識抗体(又は抗原)との反応工程等の本発明の工程以外の工程については、従来公知の工程等を適宜組み合わせて用いることができる。

本発明の工程以外の工程の具体例としては、特開2004-264294号公報に記載されているB/F分離工程及び標識体との反応工程等が挙げられる。

30

【実施例】

【0028】

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。

<免疫反应用緩衝液の調製>

以下の通り、免疫反应用緩衝液(M1)~(M15)及び比較用の免疫反应用緩衝液(H1)~(H12)を調製した。尚、調製に使用した界面活性剤の商品名、製造会社及び各商品の主成分の名称は表1に示す通りである。

【0029】

[調製例1]

蒸留水400mLに0.5モルリン酸緩衝液(pH7.05)200mL、カゼインナトリウム10g、馬イムノグロブリンG500mg及びレボン2000を1.1g(30%溶液であるため、界面活性剤としては0.33gとなる)加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が1Lとなるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液(M1)を得た。

40

【0030】

[調製例2~9]

レボン2000の重量を2.23g、22.2g、44.4g、88.9g、133.3g、177.8g、222.2g、266.7g(30%溶液であるため、界面活性剤としては各々0.67g、6.66g、13.32g、26.67g、39.99g、53.34g、66.66g、80.01gとなる)とした以外は調製例1と同様にして、免疫反应用緩衝液(M2)~(M9)を得た。

50

【 0 0 3 1 】

[調製例 1 0]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 、 馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g 及びレボン 2 0 0 0 L を 8 8 . 9 g (3 0 % 溶液であるため、界面活性剤としては 2 6 . 6 7 g となる) 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (M 1 0) を得た。

【 0 0 3 2 】

[調製例 1 1]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 、 馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g 及びレボン L D - 3 6 を 7 4 . 0 7 g (3 6 % 溶液であるため、界面活性剤としては 2 6 . 6 7 g となる) 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (M 1 1) を得た。

10

【 0 0 3 3 】

[調製例 1 2]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 、 馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g 及びレボン 1 0 5 を 7 6 . 2 g (3 5 % 溶液であるため、界面活性剤としては 2 6 . 6 7 g となる) 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (M 1 2) を得た。

20

【 0 0 3 4 】

[調製例 1 3]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 、 馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g 及びレボン 1 0 1 - H を 1 0 6 . 6 8 g (2 5 % 溶液であるため、界面活性剤としては 2 6 . 6 7 g となる) 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (M 1 3) を得た。

【 0 0 3 5 】

[調製例 1 4]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 、 馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g 及びレボン A P L を 9 1 . 9 7 g (2 9 % 溶液であるため、界面活性剤としては 2 6 . 6 7 g となる) 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (M 1 4) を得た。

30

【 0 0 3 6 】

[調製例 1 5]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 、 馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g 、 レボン 2 0 0 0 を 8 8 . 9 g (3 0 % 溶液であるため、界面活性剤としては 2 6 . 6 7 g となる) 及びノニオン N S - 2 7 0 を 0 . 6 7 g 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (M 1 5) を得た。

40

【 0 0 3 7 】

[比較調製例 1]

蒸留水 5 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナトリウム 1 0 g 及び馬イムノグロブリン G 5 0 0 m g を加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して界面活性剤を含有しない免疫反应用緩衝液 (H 1) を得た。

【 0 0 3 8 】

[比較調製例 2]

蒸留水 4 0 0 m L に 0 . 5 モルリン酸緩衝液 (p H 7 . 0 5) 2 0 0 m L 、 カゼインナ

50

トリウム 10 g、馬イムノグロブリン G 500 mg 及びノニオン NS - 270 を 0.67 g 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (H 2) を得た。

【 0 0 3 9 】

[比較調製例 3 ~ 8]

ノニオン NS - 270 の重量を 6.66 g、13.33 g、26.70 g、40.00 g、53.33 g、66.66 g に代えた以外は、比較調製例 2 と同様にして、免疫反应用緩衝液 (H 3) ~ (H 8) を得た。

【 0 0 4 0 】

[比較調製例 9]

蒸留水 400 mL に 0.5 モルリン酸緩衝液 (pH 7.05) 200 mL、カゼインナトリウム 10 g、馬イムノグロブリン G 500 mg 及びノニオン E - 215 を 26.67 g 加えて攪拌溶解した。更に蒸留水を全量が 1 L となるまで加え、均一攪拌して免疫反应用緩衝液 (H 9) を得た。

【 0 0 4 1 】

[比較調製例 10 ~ 12]

ノニオン E - 215 をノニオン S - 40、ツイーン 20 又はニューポール PE - 108 に代えた以外は比較調製例 9 と同様にして、免疫反应用緩衝液 (H 10) ~ (H 12) を得た。

上記で得られた緩衝液中の界面活性剤の濃度を表 1 に示す。

【 0 0 4 2 】

10

20

【表 1】

免疫反応用緩衝液	界面活性剤			緩衝液中の界面活性剤濃度(g/L)
	商品名	製造会社	主成分の名称	
(M1)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	0.33
(M2)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	0.67
(M3)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	6.66
(M4)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	13.32
(M5)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	26.67
(M6)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	39.99
(M7)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	53.34
(M8)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	66.66
(M9)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	80.01
(M10)	レボン2000L	三洋化成工業	ラウリン酸アミドプロピルベタイン	26.67
(M11)	レボンLD-36	三洋化成工業	ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン	26.67
(M12)	レボン105	三洋化成工業	2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルミダゾリニウムベタイン	26.67
(M13)	レボン101-H	三洋化成工業	N-ラウロイル-N'-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルエチレンジアミンナトリウム	26.67
(M14)	レボンAPL	三洋化成工業	β-ラウリルアミノプロピオン酸ナトリウム	26.67
(M15)	レボン2000	三洋化成工業	ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン	26.67
(H1)	-	-	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	0.67
(H2)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	0.67
(H3)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	6.66
(H4)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	13.33
(H5)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	26.70
(H6)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	40.00
(H7)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	53.33
(H8)	ノニオンNS-270	日本油脂	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル	66.66
(H9)	ノニオンE-215	日本油脂	ポリオキシエチレンオレイルエーテル	26.67
(H10)	ノニオンS-40	日本油脂	ポリオキシエチレンモステアレート	26.67
(H11)	ツウイン20	ワコーケミカル	ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート	26.67
(H12)	ニューポールPE-108	三洋化成工業	PLURONIC ポリオキシエチレンオキシプロピレノコポリマー	26.67

10

20

30

40

【0043】

< 非特異検体の選択 >

本発明の効果を判定するためには、非特異反応を示す検体が必要である。非特異検体は次の通り選択した。

[測定方法]

体外診断用医薬品「スフィアライトHCV抗体」[三洋化成工業(株)製]を使用し、添付文書に準じて全自動分析装置スファイライト180(オリンパス製)を用いて測定を

50

実施した。ただし、測定に用いる免疫反应用緩衝液として、界面活性剤を含有しない免疫反应用緩衝液（H1）を用いた。

【0044】

測定の概要は次の通りである。HCV抗原結合ビーズが1個入った反応槽に免疫反应用緩衝液（H1）105 μ L及び検体35 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ C、7分間免疫反応する。B/F分離を行った後、酵素標識抗体液240 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ C、7分間免疫反応する。B/F分離を行った後、基質液70 μ L及び過酸化水素液70 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ C、1分間反応させた後、発光量を計測する。

陰性コントロール及び陽性コントロールを同様に測定して得られた発光量からカットオフ発光量（CO発光量）を求める。検体の発光量とカットオフ発光量からカットオフインデックス（COI）を求める。COI 1未満を陰性、COI 1以上を陽性と判定する。

計算式は次の通りである。

CO発光量 = 陰性コントロール発光量（cps） + 0.25 × 陽性コントロール発光量（cps）

COI = 検体の発光量（cps） / CO発光量

【0045】

[検体の測定結果]

HCV非感染者100名から得た血清を、上記測定法でCOIを求めた結果、検体A、検体B及び検体Cが陽性と判定された。HCV非感染者からの検体であるため、これらの検体は非特異反応によるものと考えられ、非特異検体として選択した。

【0046】

<非特異反応低減の評価>

上記の測定方法における免疫反应用緩衝液（H1）を、免疫反应用緩衝液（M1）～（M15）又は比較用の免疫反应用緩衝液（H2）～（H12）に代えた以外は同様に測定して、（H1）での測定を含めて実施例1～15、比較例1～12とした。

【0047】

[結果]

結果を表2に示す。比較例では、検体A～CのCOIはいずれも1以上で陽性判定であり、非特異反応の低減効果はほとんど認められなかった。実施例1～15では検体A～CのCOIはいずれも1未満となり、陰性判定となった。特に実施例2～10及び実施例15は非特異反応の低減効果に優れ、実施例15はその効果が顕著であった。ただし、実施例8及び9では陽性コントロールの発光量が若干低下しており、免疫反応性がやや抑制されてることが判る。

【0048】

10

20

30

【 表 2 】

	免疫反応用緩衝液	反応液における面活性剤濃度(g/L)	陰性コントロールの発光量(cps)	陽性コントロールの発光量(cps)	CO発光量(cps)	非特異検体の発光量(cps)			非特異検体のCOI			比較例(1)の非特異検体のCOIに対する各非特異検体のCOIの比率(%)			平均
						検体A	検体B	検体C	検体A	検体B	検体C	検体A	検体B	検体C	
実施例1	(M1)	0.25	13,465	256,981	77,710	35,017	26,327	19,875	0.45	0.34	0.26	19%	21%	21%	21%
実施例2	(M2)	0.5	12,561	243,907	73,538	21,063	13,692	13,601	0.29	0.19	0.18	12%	12%	15%	13%
実施例3	(M3)	5.0	9,637	236,792	68,835	17,321	12,061	11,670	0.25	0.18	0.17	11%	11%	14%	12%
実施例4	(M4)	10.0	8,493	233,903	66,969	14,327	10,934	9,942	0.21	0.16	0.15	9%	10%	12%	11%
実施例5	(M5)	20.0	8,237	229,638	65,647	12,812	8,368	9,135	0.20	0.13	0.14	8%	8%	12%	9%
実施例6	(M6)	30.0	7,961	226,617	64,615	13,301	8,264	8,976	0.21	0.13	0.14	9%	8%	12%	9%
実施例7	(M7)	40.0	7,632	210,963	60,373	12,637	8,199	8,867	0.21	0.14	0.15	9%	8%	12%	10%
実施例8	(M8)	50.0	7,514	198,634	57,173	11,632	7,963	8,690	0.20	0.14	0.15	9%	9%	13%	10%
実施例9	(M9)	60.0	7,497	179,301	52,322	10,941	7,689	8,467	0.21	0.15	0.16	9%	9%	13%	11%
実施例10	(M10)	20.0	8,697	211,961	61,687	13,961	8,834	9,907	0.23	0.14	0.16	10%	9%	13%	11%
実施例11	(M11)	20.0	12,481	239,082	72,252	28,634	20,604	16,800	0.40	0.29	0.23	17%	18%	19%	18%
実施例12	(M12)	20.0	12,684	223,426	68,541	31,684	22,640	17,692	0.46	0.33	0.26	20%	20%	22%	21%
実施例13	(M13)	20.0	14,309	245,076	75,578	37,401	23,079	18,622	0.49	0.31	0.25	21%	19%	21%	20%
実施例14	(M14)	20.0	13,006	237,395	72,355	34,900	24,093	16,932	0.48	0.33	0.23	21%	21%	19%	20%
実施例15	(M15)	20.0	7,892	219,637	62,801	9,246	6,348	5,421	0.15	0.10	0.09	6%	6%	7%	7%
比較例1	(H1)	-	15,632	263,456	81,496	188,556	131,468	97,803	2.31	1.61	1.20	100%	100%	100%	100%
比較例2	(H2)	-	12,069	258,901	76,794	186,432	130,942	98,032	2.43	1.71	1.28	105%	106%	106%	106%
比較例3	(H3)	-	9,068	240,606	69,220	171,046	118,063	86,037	2.47	1.71	1.24	107%	106%	104%	105%
比較例4	(H4)	-	8,630	239,423	68,486	162,345	114,261	84,261	2.37	1.67	1.23	102%	103%	103%	103%
比較例5	(H5)	-	7,906	210,654	60,570	156,340	109,614	71,304	2.58	1.81	1.18	112%	112%	98%	107%
比較例6	(H6)	-	6,803	183,720	52,733	142,631	89,643	65,234	2.70	1.70	1.24	117%	105%	103%	108%
比較例7	(H7)	-	6,102	165,602	47,503	137,477	79,567	59,426	2.89	1.68	1.25	125%	104%	104%	111%
比較例8	(H8)	-	5,987	143,475	41,856	124,391	71,328	52,771	2.97	1.70	1.26	128%	106%	105%	113%
比較例9	(H9)	-	11,064	219,776	66,008	144,981	88,211	76,379	2.20	1.34	1.16	95%	83%	96%	91%
比較例10	(H10)	-	8,062	234,697	66,736	134,799	86,421	72,434	2.02	1.29	1.09	87%	80%	90%	86%
比較例11	(H11)	-	6,894	228,406	63,996	124,634	81,632	68,234	1.95	1.28	1.07	84%	79%	89%	84%
比較例12	(H12)	-	25,064	342,065	110,580	198,632	153,072	126,344	1.80	1.38	1.14	78%	86%	95%	86%

【 附 表 上 の 記 述 可 能 性 】

【 0 0 4 9 】

本発明は臨床検査薬、特に免疫反応を利用したウイルスに対する抗体を測定する臨床検査薬に有用である。

专利名称(译)	病毒抗体的免疫测定		
公开(公告)号	JP2010216970A	公开(公告)日	2010-09-30
申请号	JP2009063690	申请日	2009-03-17
[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	國近誠		
发明人	國近 誠		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/576		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.N G01N33/576.Z		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种不需要低成本和复杂加工的测量方法，并且在减少非特异性反应方面非常有效。 解决方案：在用于测量针对源自病毒的抗原的抗体的免疫测定中，混合与来自病毒的抗原结合的不溶性载体，含有针对来自病毒的抗原的抗体的样品和含有两性表面活性剂的缓冲液。两性表面活性剂优选为甜菜碱型两性表面活性剂，病毒优选为丙型肝炎病毒。 [所选图]无

(M3)	丙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	6,66
(M4)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	13,32
(M5)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	26,67
(M6)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	39,99
(M7)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	53,34
(M8)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	66,66
(M9)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	80,01
(M10)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	26,67
(M11)	乙型肝炎ウイルス抗原	三洋化成工業	26,67
(M12)	2-アミノ-1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム	三洋化成工業	26,67
(M13)	2-アミノ-1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム	三洋化成工業	26,67
(M14)	β-アラビノシド	三洋化成工業	26,67
(M15)	β-アラビノシド	三洋化成工業	26,67
(H1)	0	-	0
(H2)	0	-	0,67
(H3)	0	-	6,66
(H4)	0	-	13,33
(H5)	0	-	26,70
(H6)	0	-	40,00
(H7)	0	-	53,33
(H8)	0	-	66,66
(H9)	0	-	80,00