

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4121432号
(P4121432)

(45) 発行日 平成20年7月23日(2008.7.23)

(24) 登録日 平成20年5月9日(2008.5.9)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/531 (2006.01)

GO 1 N 33/531

B

請求項の数 5 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2003-300295 (P2003-300295) (22) 出願日 平成15年8月25日(2003.8.25) (65) 公開番号 特開2004-117341 (P2004-117341A) (43) 公開日 平成16年4月15日(2004.4.15) 審査請求日 平成18年3月14日(2006.3.14) (31) 優先権主張番号 特願2002-260407 (P2002-260407) (32) 優先日 平成14年9月5日(2002.9.5) (33) 優先権主張国 日本国(JP)</p>	<p>(73) 特許権者 000002288 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 審査官 青野 佳子</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定試薬用カゼイン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分子量が90万ダルトンより大きな画分であるカゼイン(a)の含有量(重量%)が、分子量が7万5千~37万5千ダルトンであるカゼイン(A)の重量に基づいて1以下であることを特徴とする免疫測定試薬用カゼイン(A)。

【請求項2】

請求項1に記載のカゼイン(A)を含有してなる免疫測定試薬。

【請求項3】

カゼイン(A)の含有量(g/リットル)が免疫測定試薬の25における容積に基づいて0.01以上30以下である請求項2に記載の免疫測定試薬。

【請求項4】

さらに標識配位子を含有してなる請求項2又は3に記載の免疫測定試薬。

【請求項5】

分子量が90万ダルトンより大きな画分であるカゼイン(a)の含有量(重量%)が分子量が7万5千~37万5千ダルトンであるカゼイン(A)の重量に基づいて1以下である(A)を含有する免疫測定試薬を製造する方法であって、(A)を含有する溶液を20~60で加温処理した後、(a)を吸着除去する工程を含むことを特徴とする免疫測定試薬の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、免疫測定用試薬に関する。より詳しくは非特異反応を低減する免疫測定用試薬に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

免疫測定用試薬においては、非特異的反応を防止するため種々の蛋白質、界面活性剤等を含むことが行われている。特にカゼインは非特異的反応の防止剤として有用であることが報告されている（例えば、特許文献1）。さらに、熱処理したカゼインや分解酵素で処理したカゼインを用いることも行われている（例えば、特許文献2及び3）。

【特許文献1】特開平1 - 2 1 7 2 6 6号公報

【特許文献2】特開平6 - 1 9 4 3 6 6号公報

【特許文献3】特開平2 - 3 6 3 5 3号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 3 】

しかしながら、従来のカゼイン含有免疫測定用試薬では、標識配位子の非特異反応の防止効果が低い場合があった。さらに、経日的に非特異反応の防止効果が低減し、測定感度が著しく低下する場合があった。すなわち、本発明は、標識配位子の非特異反応を防止する効果に優れたカゼイン含有免疫測定用試薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 4 】

本発明者は上記問題を解決するため鋭意検討した結果、特定のカゼインを用いることにより上記目的を達成することを見だし、本発明に到達した。すなわち本発明の免疫測定試薬用カゼイン（A）の特徴は、分子量が90万ダルトンより大きな画分であるカゼイン（a）の含有量（重量%）が、分子量が7万5千～37万5千ダルトンであるカゼイン（A）の重量に基づいて1以下である点を要旨とする。

また、本発明の免疫測定試薬の製造方法の特徴は、分子量が90万ダルトンより大きな画分であるカゼイン（a）の含有量（重量%）が分子量が7万5千～37万5千ダルトンであるカゼイン（A）の重量に基づいて1以下である（A）を含有する免疫測定試薬を製造する方法であって、（A）を含有する溶液を20～60で加温処理した後、（a）を吸着除去する工程を含む点を要旨とする。

【発明の効果】

【 0 0 0 5 】

本発明の免疫測定試薬用カゼイン（A）は、標識配位子の非特異反応（特に酵素標識配位子の非特異反応）を防止する効果が極めて高い。また、経日的に非特異反応の防止効果が低減しにくい。従って、本発明の免疫測定試薬用カゼイン（A）を含有する免疫測定試薬は、高感度かつ安定性の極めて高い臨床検査を可能とする。

また、本発明の免疫測定試薬の製造方法で製造された免疫測定試薬は、カゼイン（a）となり得るカゼイン（a）前駆体が除去されているため、経日的にカゼイン（a）が生成することはない。従って、本発明の製造方法は、標識配位子の非特異反応を防止する効果が極めて高く、また、経日的に非特異反応の防止効果が低減しにくい免疫測定試薬を簡単に製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 6 】

カゼインの分子量は、化学大事典II、共立出版（1989）、409頁によると約7万5千～37万5千ダルトンの範囲（超遠心法）であるが、実際にカゼインを用いて免疫測定用試薬を調製した場合、分子量90万ダルトンより大きな画分であるカゼインが存在する。これは、カゼインの一部に高分子量化したカゼインが含まれていることや免疫測定用試薬中でカゼインの一部が高分子量化すること等が考えられる。また、カゼインは免疫

10

20

30

40

50

測定用試薬中の他の成分と結合して高分子量化すること等も考えられる。これらの高分子量化したカゼインが、本発明における分子量が90万ダルトンより大きな画分であるカゼイン(a)に該当する。そして、このカゼイン(a)の含有量(重量%)が一定量以上になると、標識配位子の非特異反応を防止する効果が低下するばかりでなく、非特異反応が顕著になる場合がある。

【0007】

すなわち、カゼイン(a)の含有量(重量%)は、カゼイン(A)の重量に基づいて、1以下が好ましく、さらに好ましくは0.5以下、特に好ましくは0.1以下である。カゼイン(a)の含有量の定量は従来公知の方法で行うことができ、例えば、ゲルろ過HPLCにより定量分析する場合、ゲルろ過HPLCにより得られたカゼイン(A)由来のピーク面積に対するカゼイン(a)由来のピーク面積の割合を求めることで算出できる。この際、カゼイン(A)及びカゼイン(a)の分子量は適当な分子量マーカー、例えばIgM(分子量90万ダルトン)、IgG(分子量15万ダルトン)、フェリチン(分子量45万ダルトン)及びアルブミン(分子量5万ダルトン)等を同一条件で分析することで、検量線を作成し算出できる。特に、カゼイン(a)は分子量が90万ダルトンより大きな画分であり、分子量90万ダルトンのIgMと比較することで容易に特定できる。また、SDS-PAGEによる電気泳動等でも同様に定量できる。

【0008】

カゼイン(A)の原料としては、哺乳動物の乳汁中に含まれるカゼインを酸添加法等の公知の方法で分離精製したもの等が使用できる。例えば、牛乳から分離精製したカゼインは各種食品・医療・工業的用途に汎用され、本発明においても好適である。カゼインは通常、等電点及び溶解性等の性状の異なる複数の画分、例えば、s-カゼイン、 α -カゼイン及び β -カゼイン等を含んでいるが、本発明においてはこれらを分画してその一部を用いてもよいが、全ての画分を使用してもよい。また、これらのカゼインに水酸化ナトリウムを付加して製造されたカゼインナトリウム等も使用できる。これらのうち、コスト及び試薬調製時の溶解性等の観点から、全ての画分を含むカゼインナトリウムが好ましい。

【0009】

カゼイン(a)が上記の含有量を超えて含まれている場合、(a)を除去することが好ましい。この除去方法としては従来公知の方法を使用して行うことができ、例えば、カゼインを適当な溶媒に溶解した後、ゲルろ過カラム等により(a)を除去する方法等が適用できる。この他、吸着剤(珪藻土等)で(a)を吸着除去する方法等も適用できる。例えば、カゼイン(a)を含む溶液(免疫測定試薬調整後の溶液を含む)1リットルに対し、珪藻土(例えば、商品名セライトNo.545, 和光純薬工業より購入)10g~200gを加え、室温(10~25℃)で5~60分攪拌した後、ろ過又は遠心分離により珪藻土を除くことにより、カゼイン(a)も吸着除去される。

なお、この除去工程は、免疫測定試薬を調製する前、調整中、調整した後のいずれでも(a)を除くこともできるが、カゼイン(a)を除去したカゼインを用いても免疫測定試薬に調整する工程で、カゼイン(a)が生じる場合があるため、カゼイン(a)を除く工程は免疫測定試薬を調製する最終工程で行うことが好ましい。

【0010】

また、カゼインが、カゼイン(a)の含有量が上記の含有量以下であっても、カゼイン(A)の保存中に、免疫測定試薬の調整工程に、又は免疫測定用試薬の保存中に、カゼイン(a)となるカゼイン(a)前駆体が含まれていることが多く、この場合、このカゼイン(a)前駆体をカゼイン(a)に変化させた後、(a)を除くことが好ましい。

カゼイン(a)前駆体をカゼイン(a)に変化させる方法としては、カゼインを含有する溶液(免疫測定試薬調整後の溶液を含む)を一定温度下で一定期間放置する等が適用できる。一定温度()としては、20~60℃が好ましく、さらに好ましくは30~50℃、特に好ましくは35~45℃である。放置期間は、温度により異なり、35~45℃の場合、1~14日が好ましく、さらに好ましくは2~10日、特に好ましくは3~7日である。温度が低くなる程、長く放置することが好ましい。

10

20

30

40

50

このようにカゼイン (a) 前駆体を除いた免疫測定試薬は、経日的にカゼイン (a) の発生は認められない。

【 0 0 1 1 】

本発明のカゼイン (A) は種々の用途の免疫測定試薬に適用でき、例えば、免疫反応用緩衝液等の反応用試薬、抗原又は抗体を含む保存用試薬、担体のブロッキング用試薬、検体の希釈用試薬、及び B / F 分離に使用する洗浄用試薬等に適用できる。これらの試薬は複数の用途を兼ねることも可能である。これらの用途のうち、反応用試薬及び保存用試薬に好ましく適用され、さらに好ましくは反応用試薬と保存用試薬を兼ねる免疫測定試薬、すなわち保存用試薬をそのまま反応用試薬として用いる免疫測定試薬である。

【 0 0 1 2 】

本発明の最も大きな目的は、非特異的反応の防止、特に標識配位子の非特異反応の防止効果の高い免疫測定試薬を提供することにあるが、カゼイン (a) は非特異反応性 (吸着性) が高く、標識配位子と非特異的に結合 (吸着) することで、標識配位子の非特異反応を誘発する。カゼイン (a) を除いたカゼイン (A) は、標識配位子と非特異的に結合 (吸着) せず、標識配位子が非特異的に反応する物資をブロッキングすることで、標識配位子の非特異反応を防止する効果が生じる。従って、特に好ましい用途としては、標識配位子を含む、保存用試薬をそのまま反応用試薬として用いる免疫測定試薬である。

【 0 0 1 3 】

本発明において、標識配位子は配位子と標識物の結合体である。配位子は、測定対象物に選択的に結合する物質、又は測定対象物と同一の免疫反応性を示す物質である。測定対象物に選択的に結合する物質としては、測定対象物が抗原の場合、配位子は、抗原に対する抗体である。測定対象物が抗体の場合、配位子は、抗体が認識する抗原である。測定対象物が糖鎖の場合、配位子は、レクチンである。測定対象物がビオチンの場合、配位子は、アビジンである。測定対象物が遺伝子の場合、配位子は、相補的な遺伝子である。測定対象物及び配位子は、抗原及び抗体の場合と同様に、その一方を配位子として使用できる。また、測定対象物に特異的に結合する配位子と、配位子に特異的に結合する第 2 の配位子を組み合わせて配位子として用いることも可能である。

【 0 0 1 4 】

抗体としては、次の抗原に対する抗体が使用でき、該抗原としては、薬剤、低分子ホルモン、癌マーカー、ウイルス、高分子ホルモン、サイトカイン、各種グロースファクター、並びに前記ウイルスの適当な DNA 及び RNA 等が含まれる。薬剤としては、テオフィリン、フェニトイン及びバルプロ酸等が挙げられる。低分子ホルモンとしては、サイロキシン、エストロゲン及びエストラジオール等が挙げられる。癌マーカーとしては、CEA、AFP 及び CA 19 - 9 等が挙げられる。ウイルスとしては、HIV、HCV 及び HBV 等が挙げられる。高分子ホルモンとしては、甲状腺刺激ホルモン及びインシュリン等が挙げられる。サイトカインとしては、IL - 1、IL - 2 及び IL - 6 等が挙げられる。各種グロースファクターとしては、EGF 及び PDGF 等が挙げられる。これらの抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であってもよく、さらに抗体の分解物である F (a b ') 2、F a b '、F a b であってもよい。

【 0 0 1 5 】

レクチンとしては、コンカナバリン A (コンカナバリン A は、C - 3、C - 4 又は C - 6 位の水酸基が未置換の - D - M a n を 2 残基以上含む糖鎖に特異的に結合する。)、ドリコスマメレクチン (ドリコスマメレクチンは、D - G a l N A c に特異的に結合する。)、ダツラレクチン (ダツラレクチンは、キチンオリゴ糖及び N - アセチルラクトサミンに特異的に結合する。)、デイゴマメレクチン (デイゴマメレクチンは、N - アセチルラクトサミン構造を持つアスパラギン複合型糖鎖に特異的に結合する。)、及びフコースバインディングプロテイン (フコースバインディングプロテインは、G a l などの 2 位に結合した - L - F u c に特異的に結合する。) 等が使用できる。

【 0 0 1 6 】

測定対象物と同一の免疫反応性を示す物質としては、測定物質と同一の物質、同一の免

10

20

30

40

50

疫反応性を保持した測定物質の断片、測定対象物のアナログ等が使用される。

【0017】

標識物としては、アイソト - プ [125I 等]、酵素 [ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ及びガラクトシダーゼ等]、蛍光物質 [ユーロピウム誘導体等]、及び発光物質 [アクリジウム誘導体等] 等の公知のものが使用できる。これらのうち、酵素及び発光物質が好ましく、さらに好ましくは酵素である。

【0018】

配位子と標識物の結合は従来公知の方法、例えば「続生化学実験講座5免疫生化学実験法」(日本生化学会編、東京化学同人、1986年発行) p102~112に記載の方法で実施することができる。標識物がアイソトープの場合、例えばクロラミンTを酸化剤として用いて放射性ヨウ素を配位子のチロシン残基に導入できる。標識物が蛍光物質の場合、例えばフルオレセインイソチオシアネートを緩衝液中で配位子に反応させると、配位子のリシン残基に結合する。標識物が酵素の場合、例えば酵素の持つアミノ基と配位子の持つチオール基をN-スクシンイミジル6-マレイドヘキサノエートなどの二架橋性試薬で結合することができる。標識物が発光物質の場合、例えばアクリジニウム誘導体-I(同人化学研究所社製)を緩衝液中で配位子に反応させると、配位子のアミノ基に発光化合物であるアクリジニウム誘導体を結合できる。

【0019】

本発明における免疫反応試薬の組成は、その使用目的により自由に設定できるが、例えば溶液状試薬の場合、通常、適当な緩衝液にカゼイン(A)及びその他の成分を添加したものが用いられる。この場合、カゼイン(A)の含有量は(g/リットル)は、免疫測定試薬の25における容積に基づいて、0.01以上が好ましく、さらに好ましくは0.1以上、特に好ましくは0.5以上であり、また、30以下が好ましく、さらに好ましくは20以下、特に好ましくは10以下である。緩衝液としては、例えばトリス・塩酸緩衝液、バルビタール緩衝液及びリン酸緩衝液等が挙げられ、試薬の使用目的により適宜選択できるが、通常はpH5~9の緩衝液が用いられる。標識配位子の濃度は種々の値をとりうるが、通常は試薬の単位容積(L)当たり、0.01~100mgの範囲である。

【0020】

その他の成分としては、カゼイン以外の蛋白、塩、界面活性剤等が使用される。カゼイン以外の蛋白としては、例えばアルブミン(牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等)、抗体(正常ウサギIgG、正常マウスIgG等)、ゼラチン等が挙げられる。塩としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、例えばソルピタンラウリン酸モノエステルエチレンオキシド付加物[例えば、ツイーン20及びツイーン40(ICIアメリカ社)]等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。

【0021】

本発明の免疫測定試薬は、試薬性状及び形状等に制限がなく、例えば、溶液状試薬、乾燥試薬(顆粒状及び微粉状等)、反応管や不溶性担体をカゼイン(A)でコーティングした試薬等が挙げられる。これらのうち、溶液状試薬が最も好ましく、カゼイン(A)を適当な緩衝液に溶解した組成等が用いられる。本発明における免疫測定試薬が乾燥試薬の場合、上記溶液状試薬を乾燥したものが用いられる。乾燥する方法としては、例えば凍結乾燥等が挙げられる。凍結乾燥は従来公知の方法が使用でき、例えば溶液状試薬を-20で凍結後、0.5 Torrに減圧し乾燥を開始し、最終的には20、0.1 Torrで水分量が初期溶液試薬の0.1重量%以下まで乾燥する。コーティングした試薬の場合、上記溶液状試薬に反応管、不溶性担体等を接触後、乾燥したものが用いられる。例えば、不溶性担体が試験管であれば、試験管に溶液状試薬を分注後、2~10で24時間放置後、アスピレーターで液を除き、室温(20~30)で風乾することで作成できる。なお、コーティングする場合、不溶性担体の単位表面積(cm²)あたり0.006~0.03mgのカゼイン(A)を含むことが好ましい。

【実施例】

【 0 0 2 2 】

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

< 実施例 1 >

本実施例は、本発明の免疫測定試薬用カゼイン (A) を酵素標識抗体含有免疫測定用試薬に適用した際、非特異的反応が低いことを示す例である。

【 0 0 2 3 】

1 . カゼインの分画

カゼインナトリウム塩 (シグマアルドリッチ製、 s - 、 - 及び - を含む) 5 g をリン酸緩衝液 (0 . 0 2 M , p H 7 . 2) 1 0 0 m L に投入し、攪拌下 9 5 に加熱、溶解した後、孔径 0 . 4 5 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、カゼイン溶液 A とした。次いでこのカゼイン溶液 A 2 0 m L をゲルろ過カラム (フェルマシア製、Superdex 200 prep grade 60/600) で 1 m L / 分の流速 [リン酸緩衝液 (0 . 0 2 M , p H 7 . 2) 使用] で分画した。そして、同一条件でマウス I g M を分画した結果から、マウス I g M 以下の分子量の画分をカゼイン溶液 B として分取した。また、マウス I g M より大きな分子量の画分をカゼイン溶液 C として分取した。また、カゼイン溶液 B を再度同様にゲルろ過カラムで分離しマウス I g M 以下の分子量の画分をカゼイン溶液 D として分取した。

カゼイン溶液 A ~ D をゲルろ過 H P L C (カラム : 昭和電工製 Shodex GS-620HQ) で分析した結果、カゼイン溶液中の 9 0 万ダルトンより大きなカゼイン (a) の全カゼインに対する比 (重量 %) は次の通りであった。

カゼイン溶液 A : 3 . 2 %

カゼイン溶液 B : 0 . 3 %

カゼイン溶液 C : 9 2 . 4 %

カゼイン溶液 D : 0 . 1 %

【 0 0 2 4 】

2 . 試薬の調製

1) 抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体結合ビーズの調製

抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体 (ダコジャパン社製) を p H 9 の 0 . 1 M 炭酸緩衝液に 2 0 μ g / m l の濃度で溶解した。直径 3 . 2 m m のポリスチレンビーズ (イムノケミカル社製) 1 0 0 0 個をこの溶液 2 0 m l に加え、2 ~ 1 0 で 4 8 時間静置させて、ポリスチレンビーズに抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体を物理吸着させた。その後、溶液をアスピレーターで吸引除去し、2 0 m L の 0 . 1 重量 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (p H 7 . 2) でビーズを 2 回洗浄し、抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体結合ビーズを調製した。この抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体結合ビーズを再度 5 0 m L の 0 . 1 重量 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液に浸漬し、浸漬状態で冷蔵 (2 ~ 1 0) 保存した。

【 0 0 2 5 】

2) ペルオキシダーゼ標識抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体の調製

抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体 (ダコジャパン (株) 製) 及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (東洋紡 (株) 製) を使い、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 , V o l . 9 2 (1 9 8 2) 1 4 1 3 - 1 4 2 4] に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体を調製し、冷凍 (- 3 0) 保存した。

【 0 0 2 6 】

3) 免疫測定 (反応) 用緩衝液の作成

牛血清アルブミン (マイルス社製) 1 g 、塩化ナトリウム 0 . 8 5 g 、アジ化ナトリウム 0 . 0 5 g をリン酸緩衝液 (0 . 0 2 M , p H 7 . 2) 1 0 0 m L に溶解し、免疫測定用緩衝液とした。使用まで冷蔵保存した。

【 0 0 2 7 】

4) 酵素標識抗体液の作成

上記で作成したカゼイン溶液 A ~ D 及びペルオキシダーゼ標識抗 2 - マイクログロブリンポリクロノール抗体を用いて次の通り酵素標識抗体液を作成した。すなわち、リン酸緩衝液 (1 M、pH 6.0) 10 mL にカゼインの重量が 0.1 g となるようカゼイン溶液 A ~ D を添加し、さらにペルオキシダーゼ標識抗 2 - マイクログロブリンポリクロノール抗体を蛋白量で 100 μ g 添加した後、アジ化ナトリウム 0.05 g 及び 4 - (メチルチオ)フェノール 0.05 g を加え攪拌溶解後、脱イオン水で 100 mL とし、これを酵素標識抗体液とした。この時、カゼイン溶液 A ~ D を種々に組み合わせて用いることで、分子量 90 万ダルトン (Da) より大きいカゼイン (a) の割合 (重量%) が下表のようになるように標識抗体液を作成し、使用時まで冷蔵保存した。

【0028】

【表 1】

酵素標識抗体液	> 90 万 Da のカゼイン (a) の割合 (%)
1	0.1
2	0.3
3	0.5
4	0.6
5	0.9
6	1.1
7	3.2
8	5.0
9	10.0

【0029】

5) 過酸化水素水の調製

200 μ l の 35 重量% 過酸化水素水を脱イオン水 1 リットルに溶解し、過酸化水素水とした。使用するまで冷蔵保存した。

【0030】

6) 基質液の調製

ルミノール (東京化成製) 0.18 g 及び 4 - (シアノメチルチオ)フェノール 0.1 g を 0.1 M (モル/L)、pH 8.5 のトリス/塩酸緩衝液 1 リットルに溶解した。使用するまで遮光、冷蔵保存した。

【0031】

3. 免疫反応操作

12 x 75 mm 試験管中に、免疫測定用緩衝液 300 μ L、標準 2 - マイクログロブリン溶液 10 μ L (濃度 0, 15, 200 ng/mL) {三洋化成工業(株)製臨床検査薬「グラザイム 2-Microglobulin-EIA TEST」中のものを使用した。} 及び抗 2 - マイクログロブリンポリクロノール抗体結合ビーズ 1 個を加え、37 で、10 分反応させた。反応液をアスピレーターで除去した後、生理食塩水 2 mL を加えてビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水 2 mL を加えて同様に洗浄した。次に、酵素標識抗体液 300 μ L を、洗浄後のビーズに加え 37、10 分反応させた。反応液をアスピレーターで除去し、生理食塩水 2 mL を加えてビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水 2 mL を加えて同様に 2 回洗浄した。洗浄後のビーズについて、酵素活性の測定を行った。

【0032】

4. 酵素活性測定操作

洗浄後のビーズが入った試験管 (12 x 75 mm) をアロカ社製ルミネッセンスリーダー BLR-201 型のサンプルホルダーにセットし、基質液 200 μ L 及び過酸化水素水 200 μ L を加えて化学発光反応を開始した。発光反応開始 40 秒後から 10 秒間の発光量を計測し、酵素活性を示す発光量とした。2 - マイクログロブリンポリクロノール抗体結合ビーズ 1 個を投入し、37 で 10 分間反応させた。生理食塩水 500 マイクロリットルでビーズを 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗 2 - マイクログロブリンポリ

10

20

30

40

50

クローナル抗体溶液 150 マイクロリットルを試験管に分注し、37 で10分反応させた。生理食塩水500 マイクロリットルでビーズを3回洗浄した後、基質液、過酸化水素水の各100 マイクロリットルを試験管に添加し、添加後40秒～45秒の発光量を光電子増倍管を用いたルミノメーター（アロカ社製、BLR-201）で測定した。

【0033】

5. 測定結果

酵素標識抗体液1～9を用いて上述の測定操作にしたがって標準 2 - マイクログロブリン溶液（濃度0, 15, 200 ng/mL）を測定した結果を表2に示した。なお、表2中括弧内の数値はS/N比すなわち発光量を標準0 g/mLの発光量で除した値である。

【0034】

【表2】

酵素標識抗体液	標準β2-マイクログロブリン濃度 (ng/mL)		
	0	15	200
	発光量 (cps)		
1	0.08 (1.0)	14.08 (176.0)	236.7 (2959)
2	0.12 (1.0)	14.13 (117.8)	234.6 (1995)
3	0.15 (1.0)	14.18 (94.5)	235.4 1569
4	0.18 (1.0)	14.21 (78.9)	241.5 (1342)
5	0.24 (1.0)	15.04 (62.7)	235.3 (980)
6	0.31 (1.0)	14.82 (47.8)	237.6 (766)
7	0.83 (1.0)	15.42 (19)	243.5 (293)
8	2.41 (1.0)	16.24 (6.7)	237.8 (99)
9	6.83 (1.0)	20.36 (3.0)	239.9 (35.1)

【0035】

酵素標識抗体液1～5は、酵素標識抗体液6～9より明らかに0 ng/mLの発光量が低く、非特異反応が抑制されていることが判る。特に標準15 ng/mLでのS/N比と比較すると、標識抗体液1～5は、高感度な測定に必要なS/N比50以上を達成している。また、15 ng/mL及び200 ng/mLと0 ng/mLの発光量差はいずれもほぼ等しく、特異反応は同様のレベルであり、酵素標識抗体液1～5が酵素標識抗体液6～9より高感度な測定試薬であるといえる。

【0036】

<実施例2>

本実施例は、本発明の免疫測定用試薬用カゼイン（A）を酵素標識抗体含有免疫測定用試薬に適用した際に、経時的に劣化した場合でも非特異的反応が低いことを示す例である。

【0037】

1. 酵素標識抗体液の劣化処理

実施例1で作成した酵素標識抗体液1～9を25 で10日間放置し、加熱による劣化処理をおこなった。この酵素標識抗体液をそれぞれ1'～9'とした。

【0038】

2. 酵素標識抗体液1'～9'の性能確認

酵素標識抗体液1'～9'について、実施例1と同様に標準 2 - マイクログロブリン溶液（濃度0 ng/mL、15 ng/mL、200 ng/mL）を測定した結果を表3に

10

20

30

40

50

示した。また、劣化処理前の同測定結果及び劣化処理前後の差を併せて表3に示した。

【0039】

【表3】

酵素標識抗体液		標準β2-マイクログロブリン濃度 (ng/mL)		
		0	15	200
		発光量 (cps)		
1'	処理前	0.08	14.08	236.7
	処理後	0.08	13.02	225.6
	差	0.00	-1.06	-11.1
2'	処理前	0.12	14.13	234.6
	処理後	0.13	13.04	224.3
	差	0.01	-1.09	-10.3
3'	処理前	0.18	14.18	241.5
	処理後	0.17	13.10	229.9
	差	-0.01	-1.08	-11.6
4'	処理前	0.18	14.21	241.5
	処理後	0.19	13.06	229.6
	差	0.01	-1.15	-11.9
5'	処理前	0.24	15.04	235.3
	処理後	0.22	13.95	224.5
	差	-0.02	-1.09	-10.8
6'	処理前	0.31	14.82	237.6
	処理後	0.39	13.72	227.9
	差	0.08	-1.10	-9.7
7'	処理前	0.83	15.42	243.5
	処理後	1.24	14.35	232.8
	差	0.41	-0.67	-10.7
8'	処理前	2.41	16.24	237.8
	処理後	3.65	17.09	226.6
	差	1.24	0.85	-11.2
9'	処理前	6.83	20.36	239.9
	処理後	8.69	21.38	228.7
	差	1.86	1.02	-11.2

【0040】

処理前後で0 ng/mLの発光量の差は、酵素標識抗体液1'～5'では殆ど認められないのに対して酵素標識抗体液6'～9'では発光量の増加が認められ、劣化により非特異的反応が増加したことが判る。すなわち、酵素標識抗体液1'～3'は、経日的に非特異反応の防止効果が低減しにくいといえる。

【0041】

<実施例3>

本実施例は非特異的反応が上昇した免疫測定(反応)試薬から高分子カゼインを除くことで非特異的反応が抑制されることを示すものである。

1. 酵素標識抗体液中の高分子カゼインの除去

実施例2で作成した酵素標識抗体液9'を限外ろ過膜(東洋濾紙製、ウルトラフィルターQ0500)を用いて1/50の容量に濃縮した。この溶液を実施例1のカゼインの分画と同様に、ゲルろ過カラム法により、90万ダルトンより大きな分子量部分を除去した。分取した画分を限外ろ過膜でカゼイン濃度0.1重量%となるまで濃縮し、酵素標識抗体液10とした。

【0042】

2. 酵素標識抗体液10の性能確認

酵素標識抗体10について、実施例1と同様に標準β2-マイクログロブリン溶液(濃度0 ng/mL、15 ng/mL、200 ng/mL)を測定した結果を表4に示した。また、酵素標識抗体液9'についての測定値を転記した。

【 0 0 4 3 】

【表 4】

酵素標識抗体液	標準 β 2-マイクログロブリン濃度 (ng/mL)		
	0	15	200
	発光量 (cps)		
9'	8.69	21.38	228.7
10	0.16	11.13	190.6

【 0 0 4 4 】

酵素標識抗体液 9' では高かった 0 ng/mL の発光量が酵素標識抗体液 10 では低下し、高分子カゼインを除去することで非特異反応を低減できることが判る。

10

【 0 0 4 5 】

< 実施例 4 >

本実施例は本発明の免疫測定試薬用カゼイン (A) が長期保存した後でもカゼインの高分子量化が起こらないことを示す例である。

【 0 0 4 6 】

1. 酵素標識抗体液の保存

実施例 1 及び実施例 3 で作成した酵素標識抗体液 1 ~ 9 及び 10 を冷蔵 (2 ~ 10) で 6 ヶ月間保存した。

【 0 0 4 7 】

2. 高分子量カゼインの分析

保存後の酵素標識抗体液を限外ろ過膜 (東洋濾紙製、ウルトラフィルター Q0500) を用いて 1 / 10 の容量に濃縮した後、ゲルろ過 HPLC (カラム: 昭和電工製 Shodex GS-620HQ) で分析し、カゼイン溶液中の 90 万ダルトン (Da) より大きなカゼイン (a) の全カゼインに対する比 (重量%) を求めた。結果を表 5 に示した。

20

【 0 0 4 8 】

【表 5】

酵素標識抗体液	> 90 万 Da のカゼイン (a) の割合 (%) (冷蔵、6 ヶ月保存後)
1	0.2
2	0.3
3	0.6
4	0.6
5	0.9
6	1.5
7	4.1
8	6.9
9	14.3
10	0.4

30

【 0 0 4 9 】

本発明による酵素標識抗体液 1 ~ 5 及び 10 では高分子量化したカゼインの割合は全カゼインに対して 1 重量% 以下であり、作成時の割合をほぼ維持しているが、酵素標識抗体液 6 ~ 9 ではその割合が増加していることが判った。

40

【 0 0 5 0 】

< 実施例 5 >

本実施例は珪藻土によって高分子量カゼインを除去する方法により調製した、インシュリン測定用免疫測定試薬の例である。

【 0 0 5 1 】

1. 試薬の調製

1) 抗インシュリンポリクローナル抗体結合ビーズの調製

50

抗インシュリンポリクローナル抗体（ダコジャパン社製）を用いて実施例 1 記載の方法と同様にして抗インシュリンポリクローナル抗体結合ビーズを調製し、保存した。

【 0 0 5 2 】

2) ペルオキシダーゼ標識抗インシュリンポリクローナル抗体の調製

抗インシュリンポリクローナル抗体（ダコジャパン社製）を用いて実施例 1 記載の方法と同様にペルオキシダーゼ標識抗インシュリンポリクローナル抗体を調製し、冷凍（- 30）保存した。

【 0 0 5 3 】

3) 免疫反応用緩衝液の作成

牛血清アルブミン（マイルス社製）1 g、塩化ナトリウム 0.85 g、アジ化ナトリウム 0.05 g をリン酸緩衝液（0.02 M、pH 7.2）100 mL に溶解し、免疫測定用緩衝液とした。使用まで冷蔵保存した。

【 0 0 5 4 】

4) 酵素標識抗体液の作成

リン酸緩衝液（0.1 M、pH 6.0）100 mL にカゼインナトリウム塩（シグマアルドリッチ製）0.2 g を加え、攪拌下 95 に加熱、溶解した後、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過した。さらにペルオキシダーゼ標識抗インシュリンポリクローナル抗体を蛋白量で 500 μg 添加した後、アジ化ナトリウム 0.05 g 及び 4 - (メチルチオ)フェノール 0.05 g を加え攪拌溶解し、酵素標識抗体液を調製した。

【 0 0 5 5 】

5) 酵素標識抗体液の加温処理及び珪藻土処理

調製した酵素標識抗体液を 40 で 5 日間保存し加温処理した（標識抗体液 1 1）。標識抗体液 1 1 の 100 mL 当たり 20 g の珪藻土（商品名：セライト No. 545，和光純薬工業より購入）を投入し、室温（約 25）で 10 分間攪拌した。攪拌後、プフナー漏斗を用いて、濾紙（東洋濾紙製：5A）でろ過し酵素標識抗体液 1 2 を得た。

【 0 0 5 6 】

2. 酵素標識抗体液中の高分子量カゼインの確認

実施例 1 記載の方法と同様に、酵素標識抗体液 1 1 及び酵素標識抗体液 1 2 をゲルろ過 HPLC（カラム：昭和電工製 Shodex GS-620HQ）で分析した結果、溶液中の 90 万ダルトンより大きなカゼイン（a）の全カゼインに対する比（重量%）は次の通りであった。

酵素標識抗体液 1 1 : 8.4%

酵素標識抗体液 1 2 : 0.6%

【 0 0 5 7 】

3. 測定性能の試験

実施例 1 記載の免疫反応操作及び酵素活性操作法に準じて、上記で作成した試薬を用いて標準インシュリン溶液（濃度 0, 25, 250 μIU/mL）を測定した。なお標準インシュリン溶液は三洋化成工業（株）製臨床検査薬「スフィアライトインシュリン用キャリブレーターセット」中の 0, 250 μIU/mL 及びそれらから希釈調製した 25 μIU/mL である。

【 0 0 5 8 】

4. 測定結果

酵素標識抗体液 1 1 及び 1 2 を用いて標準インシュリン溶液（濃度 0, 25, 250 μIU/mL）を測定した結果を表 6 に示した。なお、表 6 中括弧内の数値は S/N 比すなわち発光量を標準 0 μIU/mL の発光量で除した値である。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

【表 6】

酵素標識抗体液	標準インシュリン濃度(μ IU/mL)		
	0	2.5	20.0
	発光量(cps)		
1.1	1.50 (1.0)	26.81 (17.9)	303.0 (202.0)
1.2	0.26 (1.0)	23.26 (89.46)	289.5 (1113.5)

【0060】

10

酵素標識抗体液 1.2 は、酵素標識抗体液 1.1 より明らかに 0μ IU/mL の発光量が低く、非特異反応が抑制されていることが判る。又、S/N比で比較すると、酵素標識抗体液 1.2 は、酵素標識抗体液 1.1 より高感度な測定が可能であることが明らかである。

【産業上の利用可能性】

【0061】

本発明のカゼイン(A)は種々の用途の免疫測定試薬に適用でき、例えば、免疫反应用緩衝液等の反应用試薬、抗原又は抗体を含む保存用試薬、担体のブロッキング用試薬、検体の希釈用試薬、及びB/F分離に使用する洗浄用試薬等に適用できる。

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平02 - 036353 (JP, A)
特開2002 - 034591 (JP, A)
特開平11 - 248703 (JP, A)
特開平09 - 236602 (JP, A)
特開平06 - 094714 (JP, A)
特表平04 - 503077 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 98
C12P 21/06

专利名称(译)	酪蛋白用于免疫分析试剂		
公开(公告)号	JP4121432B2	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	JP2003300295	申请日	2003-08-25
[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		
当前申请(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		
FI分类号	G01N33/531.B		
审查员(译)	青野良子		
优先权	2002260407 2002-09-05 JP		
其他公开文献	JP2004117341A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供含有酪蛋白的免疫测定试剂，其具有防止标记配体的非特异性反应的优异效果。ZOLUTION：用于免疫测定试剂的酪蛋白，以酪蛋白(A)的重量计，含有不超过1wt.%的酪蛋白(a)，其分子量大于900,000道尔顿，是用过的。以酪蛋白(A)的重量计，含有不超过1重量%的酪蛋白(a)的分子量大于900,000道尔顿的分数的制备免疫测定试剂的方法包括以下步骤：首先在20-60°C加热含有酪蛋白(A)的溶液，然后吸附和除去酪蛋白(a)。Z

酵素標識抗体液	>90万Daのカゼイン(a)の割合 (%)
1	0.1
2	0.3
3	0.5
4	0.6
5	0.9
6	1.1
7	3.2
8	5.0
9	10.0