

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4950406号  
(P4950406)

(45) 発行日 平成24年6月13日(2012.6.13)

(24) 登録日 平成24年3月16日(2012.3.16)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 8 3  
**GO 1 N 33/531 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 8 7  
 GO 1 N 33/531 B

請求項の数 19 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2002-516636 (P2002-516636)	(73) 特許権者	000162478
(86) (22) 出願日	平成13年7月27日(2001.7.27)		協和メデックス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2001/006500		東京都中央区晴海一丁目8番10号
(87) 国際公開番号	W02002/010760	(73) 特許権者	598080484
(87) 国際公開日	平成14年2月7日(2002.2.7)		株式会社ティエフビー
審査請求日	平成20年7月25日(2008.7.25)		東京都豊島区西池袋一丁目18番2号
(31) 優先権主張番号	特願2000-226805 (P2000-226805)	(74) 代理人	100107984
(32) 優先日	平成12年7月27日(2000.7.27)		弁理士 廣田 雅紀
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	重信 香代子
			日本国静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600番1 協和メデックス株式会社 協 和メデックス研究所内
		審査官	草川 貴史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不溶性担体粒子を用いる免疫測定方法およびその試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し炭酸系緩衝剤を除く）と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に保存した、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を検体と反応させた後、測定対象物質と当該測定対象物質と反応する抗体との抗原抗体反応を行うことを特徴とする測定対象物質の免疫測定方法。

【請求項2】

炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物が、アルカリ金属化合物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】

炭酸水素イオン濃度が、0.05～500mmol/Lであることを特徴とする請求項1または2記載の免疫測定方法。

【請求項4】

中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度が、0.1～500mmol/Lであることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の免疫測定方法。

【請求項5】

不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の免疫測定方法。

【請求項6】

免疫測定方法が比濁免疫測定法であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の免疫測定方法。

【請求項 7】

測定対象物質がヘモグロビン A 1 c であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の免疫測定方法。

【請求項 8】

中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し炭酸系緩衝剤を除く）と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に保存した、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を含有し、当該不溶性担体粒子と検体とを反応させた後、測定対象物質と当該測定対象物質と反応する抗体との抗原抗体反応を行うことを特徴とする測定対象物質の免疫測定用試薬。

10

【請求項 9】

炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物が、アルカリ金属化合物であることを特徴とする請求項 8 記載の免疫測定用試薬。

【請求項 10】

炭酸水素イオン濃度が、 $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項 8 または 9 記載の免疫測定用試薬。

【請求項 11】

中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度が、 $0.1 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項 8 ~ 10 のいずれか記載の免疫測定用試薬。

20

【請求項 12】

不溶性担体粒子が、ラテックスであることを特徴とする請求項 8 ~ 11 のいずれか記載の免疫測定用試薬。

【請求項 13】

測定対象物質がヘモグロビン A 1 c であることを特徴とする請求項 8 ~ 12 のいずれか記載の免疫測定用試薬。

【請求項 14】

測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を検体と反応させた後、測定対象物質と当該測定対象物質と反応する抗体との抗原抗体反応を行う測定対象物質の免疫測定において、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し炭酸系緩衝剤を除く）と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に保存することを特徴とする不溶性担体粒子を含む免疫測定用試薬の安定化方法。

30

【請求項 15】

炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物が、アルカリ金属化合物であることを特徴とする請求項 14 記載の安定化方法。

【請求項 16】

炭酸水素イオン濃度が、 $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項 14 または 15 記載の安定化方法。

40

【請求項 17】

中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度が、 $0.1 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項 14 ~ 16 のいずれか記載の安定化方法。

【請求項 18】

不溶性担体粒子が、ラテックスであることを特徴とする請求項 14 ~ 17 のいずれか記載の安定化方法。

【請求項 19】

測定対象物質がヘモグロビン A 1 c であることを特徴とする請求項 14 ~ 18 のいずれか記載の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、不溶性担体粒子を用いる免疫測定方法、不溶性担体粒子を含有する免疫測定用試薬、および、不溶性担体粒子を含有する免疫測定用試薬の安定化方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

不溶性担体粒子は、臨床検査の分野において検体中の抗原または抗体を測定する免疫測定法において盛んに使用されている。しかし、長期間保存した不溶性担体粒子を含有する免疫測定用試薬を使用した場合、測定値が安定しないという問題点がある。この結果、常に同一感度の検量線を描くことができず、測定誤差の原因となっている。

10

## 【0003】

本発明の目的は、測定値の正確性および信頼性が高い長期間保存できる不溶性担体粒子を含有する免疫測定用試薬、その試薬を用いる免疫測定方法、および、その試薬の安定化方法を提供することにある。

## 【発明の開示】

## 【0004】

本発明は中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し炭酸系緩衝剤を除く）と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に保存した、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を検体と反応させた後、測定対象物質と当該測定対象物質と反応する抗体との抗原抗体反応を行うことを特徴とする測定対象物質の免疫測定方法（請求項1）や、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物が、アルカリ金属化合物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2）や、炭酸水素イオン濃度が、 $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項1または2記載の免疫測定方法（請求項3）や、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度が、 $0.1 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の免疫測定方法（請求項4）や、不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の免疫測定方法（請求項5）や、免疫測定方法が比濁免疫測定法であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の免疫測定方法（請求項6）や、測定対象物質がヘモグロビンA1cであることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の免疫測定方法（請求項7）や、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し炭酸系緩衝剤を除く）と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に保存した、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を含有し、当該不溶性担体粒子と検体とを反応させた後、測定対象物質と当該測定対象物質と反応する抗体との抗原抗体反応を行うことを特徴とする測定対象物質の免疫測定用試薬（請求項8）や、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物が、アルカリ金属化合物であることを特徴とする請求項8記載の免疫測定用試薬（請求項9）や、炭酸水素イオン濃度が、 $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項8または9記載の免疫測定用試薬（請求項10）や、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度が、 $0.1 \sim 500 \text{ mmol/L}$ であることを特徴とする請求項8～10のいずれか記載の免疫測定用試薬（請求項11）や、不溶性担体粒子が、ラテックスであることを特徴とする請求項8～11のいずれか記載の免疫測定用試薬（請求項12）や、測定対象物質がヘモグロビンA1cであることを特徴とする請求項8～12のいずれか記載の免疫測定用試薬（請求項13）や、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を検体と反応させた後、測定対象物質と当該測定対象物質と反応する抗体との抗原抗体反応を行う測定対象物質の免疫測定において、測定対象物質、ならびに、測定対象物質と反応する抗体のいずれをも結合していない不溶性担体粒子を、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し炭酸系緩衝剤を除く）と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に保存することを特徴とする不溶性担体粒子を含む免疫測定用試薬の安定化方法（請求項14）や、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物

20

30

40

50

が、アルカリ金属化合物であることを特徴とする請求項14記載の安定化方法（請求項15）や、炭酸水素イオン濃度が、0.05～500 mmol/Lであることを特徴とする請求項14または15記載の安定化方法（請求項16）や、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度が、0.1～500 mmol/Lであることを特徴とする請求項14～16のいずれか記載の安定化方法（請求項17）や、不溶性担体粒子が、ラテックスであることを特徴とする請求項14～17のいずれか記載の安定化方法（請求項18）や、測定対象物質がヘモグロビンA1cであることを特徴とする請求項14～18のいずれか記載の安定化方法（請求項19）に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明における中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤（但し、炭酸系緩衝剤を除く）としては、pH7以上で緩衝能を示す緩衝剤であれば特に制限されないが、pH7～12で緩衝能を示す緩衝剤が好ましく、pH8～11で緩衝能を示す緩衝剤が特に好ましい。具体的には、例えば、有機アミン系緩衝剤、グッド緩衝剤、生化学用緩衝剤等を挙げることができる。

【0006】

上記生化学用緩衝剤としては、イミダゾール緩衝剤、リン酸一ナトリウム-リン酸二ナトリウム緩衝剤、クエン酸-第二リン酸ナトリウム緩衝剤、塩酸-ペロナルナトリウム-酢酸ナトリウム緩衝剤、第一リン酸カリウム-第二リン酸ナトリウム緩衝剤、第一リン酸カリウム-ホウ砂緩衝剤、第一リン酸カリウム-水酸化ナトリウム緩衝剤、塩酸-コリジン緩衝剤、塩酸-ペロナルナトリウム緩衝剤、塩酸-トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝剤、塩酸-ホウ砂緩衝剤、ホウ酸-炭酸ナトリウム緩衝剤、ホウ酸-ホウ砂緩衝剤、塩酸-アミノメチルプロパンジオール緩衝剤、塩化アンモニウム-アンモニア緩衝剤、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝剤、ホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝剤、塩酸-ジメチルグリシンナトリウム緩衝剤、ホウ砂-水酸化ナトリウム緩衝剤、ホウ砂-炭酸ナトリウム緩衝剤、グリシン-塩化ナトリウム-塩酸緩衝剤、第二クエン酸ナトリウム-塩酸緩衝剤、第二クエン酸ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝剤、ホウ砂-塩化ナトリウム緩衝剤、ペロナルナトリウム-酢酸ナトリウム-塩酸緩衝剤、ホウ酸-塩化カリウム-水酸化ナトリウム緩衝剤、トリス-マレイン酸塩緩衝剤、マレイン酸塩緩衝剤、ペロナル-酢酸塩緩衝剤、ペロナル緩衝剤、ミカエリス緩衝剤、クラーク-ルプス緩衝剤、アトキンス-パンチン緩衝剤、パリティッシュ緩衝剤、コルトホフ緩衝剤、マックイルベイン緩衝剤、ハスチング-センドロイ緩衝剤、プリトン-ロビンソン緩衝剤、セーレンセン緩衝剤等を挙げることができる。

【0007】

上記有機アミン系緩衝剤としては、例えば、ジエタノールアミン緩衝剤、2-エチルアミノエタノール緩衝剤、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝剤、N-メチル-D-グルカミン緩衝剤等を挙げることができる。

【0008】

上記グッド緩衝剤としては、例えば、MES（2-モルホリノエタンスルホン酸）緩衝剤、ビス-トリス〔ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン〕緩衝剤、ADA〔N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸〕緩衝剤、PIPES〔ピペラジン-N,N'-ビス（2-エタンスルホン酸）〕緩衝剤、ACES〔2-〔N-（2-アセトアミド）アミノ〕エタンスルホン酸〕緩衝剤、MOPSO（3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）緩衝剤、BES〔2-〔N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ〕エタンスルホン酸〕緩衝剤、MOPS（3-モルホリノプロパンスルホン酸）緩衝剤、TES 2-〔N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕アミノ〕エタンスルホン酸 緩衝剤、HEPES〔N-（2-ヒドロキシエチル）-N'-（2-スルホエチル）ピペラジン〕緩衝剤、DIPSO〔3-〔N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸〕緩衝剤、TAPSO 2-ヒドロキシ-3-〔〔N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕アミノ〕プロパンスルホン

10

20

30

40

50

酸 緩衝剤、POPSO [ピペラジン - N, N' - ビス (2 - ヒドロキシ - 3 - プロパンスルホン酸)] 緩衝剤、HEPPSO [N - (2 - ヒドロキシエチル) - N' - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) ピペラジン] 緩衝剤、EPPS [N - (2 - ヒドロキシエチル) - N' - (3 - スルホプロピル) ピペラジン] 緩衝剤、トリシン {N - [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] グリシン} 緩衝剤、ピシン [N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) グリシン] 緩衝剤、TAPS {3 - [N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アミノプロパンスルホン酸} 緩衝剤、CHES [2 - (N - シクロヘキシルアミノ) エタンスルホン酸] 緩衝剤、CAPSO [3 - (N - シクロヘキシルアミノ) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸] 緩衝剤、CAPS [3 - (N - シクロヘキシルアミノ) プロパンスルホン酸] 緩衝剤等を挙げることができる。

10

## 【0009】

なお、本発明における中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤は、炭酸系緩衝剤以外の緩衝剤であり、ここで炭酸系緩衝剤とは炭酸塩に基づく緩衝剤を意味し、かかる炭酸系緩衝剤としては、例えば炭酸ナトリウム - 炭酸水素ナトリウム系緩衝剤、炭酸カリウム - 炭酸水素カリウム系緩衝剤等を挙げることができる。

## 【0010】

また、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤の濃度は、特に制限されないが、 $0.1 \text{ mmol/L} \sim 500 \text{ mmol/L}$  の濃度が好ましく、 $1 \text{ mmol/L} \sim 100 \text{ mmol/L}$  の濃度がより好ましく、 $5 \sim 50 \text{ mmol/L}$  が特に好ましい。

## 【0011】

本発明における炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物としては、炭酸水素イオンを放出する化合物であれば特に制限されないが、アルカリ金属化合物やアルカリ土類金属化合物等を挙げることができ、例えば、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素マグネシウム、炭酸水素カルシウム等をより具体的に挙げることができ、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ金属化合物が特に好ましく用いられる。

20

## 【0012】

また、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物の濃度は、特に制限されないが、 $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$  の濃度が好ましく、 $0.1 \text{ mmol/L} \sim 100 \text{ mmol/L}$  の濃度がより好ましく、 $1 \sim 50 \text{ mmol/L}$  が特に好ましい。

## 【0013】

本発明における水性媒体としては、水、具体的には精製水を挙げることができ、必要に応じて、酵素、補酵素、塩化ナトリウム等の可溶性塩類、トリトン X - 100、ツイーン 20 等の界面活性剤、安定化剤およびアジ化ナトリウム等の防腐剤等を含ってもよい。

30

## 【0014】

本発明における不溶性担体粒子としては、特に制限されないが、例えば、有機高分子物質の微粒子や無機酸化物の微粒子、あるいはこれら有機高分子物質や無機酸化物の表面を有機物質等で表面処理した微粒子を挙げることができる。不溶性担体の材質は特に制限されるものではないが、反応液中に均一に懸濁することができるものが好ましい。

## 【0015】

また、不溶性担体粒子の粒子径としては、特に制限されないが、 $0.04 \sim 0.8 \mu\text{m}$  のものが好ましい。より好ましい不溶性担体粒子としては、例えば、ポリスチレンラテックス等のラテックスを挙げることができる。ラテックスの材質としては、ポリスチレンラテックス等のスチレン系ラテックス、アクリル酸系ラテックス等を挙げることができる。また、電荷を与える為に、成分としてアクリル酸系のモノマーやスルホン酸をもつモノマー等を共重合したポリスチレンラテックスも好ましく用いることができる。

40

## 【0016】

不溶性担体粒子の反応液中の濃度または試薬中の濃度は特に制限されないが、溶液中  $0.005 \sim 2$  重量% とすることが好ましい。

## 【0017】

本発明の免疫測定方法における測定対象物質としては特に制限されないが、例えば、フ

50

エリチン、ヘモグロビン A 1 c (以下、H b A 1 c と記す) 等の抗原やこれらに対する抗体を挙げる事ができる。

【0018】

本発明において、不溶性担体粒子を用いる抗原抗体反応とは、不溶性担体粒子を固相として用いる抗原抗体反応をいい、固相として用いる不溶性担体粒子は、測定対象物質または測定対象物質と反応する抗体があらかじめ結合(担持)したものでもよいが、測定対象物質または測定対象物質と反応する抗体を実質的に結合(担持)していないものでもよい。本発明の水性媒体中で不溶性担体粒子を用いる抗原抗体反応を利用する免疫測定方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、比濁免疫測定方法を挙げる事ができる。

【0019】

本発明の免疫測定方法は、1) 中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に前述の不溶性担体粒子を添加し懸濁させる工程、2) 不溶性担体粒子を含有する懸濁液と測定対象物質を含むサンプルとを反応させる工程、3) 該反応により生成する不溶性担体粒子の凝集を測定する工程を含む。

【0020】

不溶性担体粒子として、測定対象物質または測定対象物質に対する抗体を実質的に結合(担持)していない状態のものを用いる場合は、該不溶性担体粒子を含有する懸濁液と測定対象物質を含むサンプルとを反応させる工程の後に、測定対象物質と反応する抗体を含む試薬を添加する工程が行われる。

【0021】

本発明の免疫測定試薬としては、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物及び不溶性担体粒子を含有するものであれば特に制限されないが、これらの中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物及び不溶性担体粒子は、水性媒体中に含有されていてもよい。かかる中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物、不溶性担体粒子及び水性媒体としては、それぞれ前述したと同じものを使用することができる。本発明の試薬には、必要に応じて、抗体、抗原、酵素、補酵素、塩化ナトリウム等の可溶性塩類、トリトン X - 100、ツイーン 20 等の界面活性剤、安定化剤およびアジ化ナトリウム等の防腐剤等を含有させてもよい。

【0022】

本発明の免疫測定試薬は、キットの形態で保存、使用されてもよい。キットの形態としては、2 試薬系キットや 3 試薬系キットがあげられる。2 試薬系キットとしては、例えば、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、及び、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物を水性媒体中に含有する第 1 試薬と、測定対象物質と反応する抗体を結合した不溶性担体粒子、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、及び、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物を水性媒体中に含有する第 2 試薬とからなるキットや、測定対象物質または測定対象物質に対する抗体を実質的に結合(担持)していない状態の不溶性担体粒子、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、及び、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物を水性媒体中に含有する第 1 試薬と、該測定対象物質と反応する抗体を水性媒体中に含有する第 2 試薬とからなるキットを挙げる事ができる。

【0023】

本発明の不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬の安定化方法としては、不溶性担体粒子を、中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)と炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物とを含有する水性媒体中に含有させる方法であれば特に制限されるものではなく、かかる中性またはアルカリ性領域に緩衝能を有する緩衝剤(但し炭酸系緩衝剤を除く)、炭酸水素イオンを放出する炭酸化合物、不溶性担体粒子及び水性媒体としては、それぞれ前述したと同じものを使用することができる。水性媒体に

10

20

30

40

50

は、必要に応じて抗体、抗原、酵素、補酵素、塩化ナトリウム等の可溶性塩類、トリトン X - 100、ツイーン20等の界面活性剤、安定化剤およびアジ化ナトリウム等の防腐剤等を共存させていてもよい。

【0024】

また、本発明の免疫測定試薬の保存条件としては特に制限されないが、例えば、0～30、好ましくは0～5を上げることができる。本発明の不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬の安定化方法によれば、従来試薬の不安定化を招きやすいと考えられている非密閉条件下において、試薬の安定化効果がより高い。

【0025】

以下に具体的な実施例をあげて本発明を説明するが、該実施例は本発明を限定するものではない。 10

【0026】

[例1]

下記のR1試薬およびR2試薬を調製した。

R1試薬

ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH8.4）	3.26 g / L	
トリトンX - 100（シグマ社製）	0.1 g / L	
塩化ナトリウム（和光純薬社製）	17.5 g / L	
アジ化ナトリウム（関東化学社製）	0.01 g / L	
炭酸水素ナトリウム（関東化学社製）	0.2 g / L	20

R2試薬（抗体感作ラテックス懸濁液）

イミダゾール緩衝剤（半井化学薬品社製、pH8.4）	0.68 g / L	
トリトンX - 100（シグマ社製）	0.15 g / L	
炭酸水素ナトリウム（関東化学社製）	0.2 g / L	
抗体担持ラテックス（参考例で製造）	0.1重量%	

【0027】

[例2]

下記のR1試薬およびR2試薬を調製した。

R1試薬

ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH8.4）	3.26 g / L	30
トリトンX - 100（シグマ社製）	0.1 g / L	
塩化ナトリウム（和光純薬社製）	17.5 g / L	
アジ化ナトリウム（関東化学社製）	0.01 g / L	
炭酸水素ナトリウム（関東化学社製）	0.4 g / L	

R2試薬（抗体感作ラテックス懸濁液）

イミダゾール緩衝剤（半井化学薬品社製、pH8.4）	0.68 g / L	
トリトンX - 100（シグマ社製）	0.15 g / L	
炭酸水素ナトリウム（関東化学社製）	0.4 g / L	
抗体担持ラテックス（参考例で製造）	0.1重量%	

【0028】 40

[例3]

下記のR1試薬およびR2試薬を調製した。

R1試薬

ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH8.4）	3.26 g / L	
トリトンX - 100（シグマ社製）	0.1 g / L	
塩化ナトリウム（和光純薬社製）	17.5 g / L	
アジ化ナトリウム（関東化学社製）	0.01 g / L	
炭酸水素ナトリウム（関東化学社製）	0.6 g / L	

R2試薬（抗体感作ラテックス懸濁液）

イミダゾール緩衝剤（半井化学薬品社製、pH8.4）	0.68 g / L	50
---------------------------	------------	----



## [ 実施例 3 ]

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

## R 1 試薬 (ラテックス懸濁液)

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 8.4)	3.26 g / L
アジ化ナトリウム (関東化学社製)	0.1 g / L
炭酸水素ナトリウム (関東化学社製)	0.2 g / L
ラテックス (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)	0.033 重量%

## R 2 試薬

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0)	3.26 g / L
塩化ナトリウム (和光純薬社製)	15.0 g / L
ツイーン 20 (和光純薬社製)	2.0 g / L
アジ化ナトリウム (関東化学社製)	0.1 g / L
抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体	0.025 g (IgG換算) / L
抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)	0.04 g (IgG換算) / L

10

## 【 0 0 3 3 】

## [ 実施例 4 ]

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

## R 1 試薬 (ラテックス懸濁液)

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 8.4)	3.26 g / L
アジ化ナトリウム (関東化学社製)	0.1 g / L
炭酸水素ナトリウム (関東化学社製)	0.3 g / L
ラテックス (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)	0.033 重量%

20

## R 2 試薬

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0)	3.26 g / L
塩化ナトリウム (和光純薬社製)	15.0 g / L
ツイーン 20 (和光純薬社製)	2.0 g / L
アジ化ナトリウム (関東化学社製)	0.1 g / L
抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体	0.025 g (IgG換算) / L
抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)	0.04 g (IgG換算) / L

30

## 【 0 0 3 4 】

## [ 比較例 2 ]

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

## R 1 試薬 (ラテックス懸濁液)

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8)	3.26 g / L
アジ化ナトリウム (関東化学社製)	0.1 g / L
ラテックス (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)	0.033 重量%

40

## R 2 試薬

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0)	3.26 g / L
塩化ナトリウム (和光純薬社製)	15.0 g / L
ツイーン 20 (和光純薬社製)	2.0 g / L
アジ化ナトリウム (関東化学社製)	0.1 g / L
抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体	0.025 g (IgG換算) / L
抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)	0.04 g (IgG換算) / L

## 【 0 0 3 5 】

50

## [ 比較例 3 ]

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

## R 1 試薬 (ラテックス懸濁液)

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 8.4) 3.26 g / L  
 アジ化ナトリウム (関東化学社製) 0.1 g / L  
 ラテックス (粒径 0.0775 μm、積水化学社製) 0.033 重量%

## R 2 試薬

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 3.26 g / L  
 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15.0 g / L  
 ツイーン 20 (和光純薬社製) 2.0 g / L  
 アジ化ナトリウム (関東化学社製) 0.1 g / L

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

0.025 g (IgG換算) / L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.04 g (IgG換算) / L

10

## 【 0036 】

## [ 参考例 (抗体担持ラテックスの調製) ]

平均粒子系 0.31 μm の 10% ポリスチレンラテックス液 (JSR社製) 1容に 1 / 60 mol / L の PBS 溶液 (pH 7.4 になるように 1 mol / L の塩酸または水酸化ナトリウム水溶液で調製したもの) 9容を添加してラテックスを希釈し、1% ラテックス液とした。抗ヒトフェリチン抗体 (ポリクローナル抗体、協和メデックス社製) は、蛋白濃度が 50 μg / mL になるように 1 / 60 mol / L の PBS 溶液で希釈し感作用の抗体液とした。1% ラテックス液 600 μL を 25 のインキュベーター中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、これに抗体液 1200 μL を素早く添加し、25 にて 2 時間攪拌した。その後、下記のブロッキング液 1 を 3 mL 添加し、25 にて続けて 2 時間攪拌した。その後、4、15,000 rpm にて 1 時間遠心分離した。得られた沈殿にブロッキング液 1 を 4 mL 添加し、同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄を 3 回行った後沈殿を抗体担持ラテックスとして用いた。

20

## 【 0037 】

## ブロッキング液 1

イミダゾール緩衝剤 0.68 g に BSA (牛血清アルブミン) 6 g、トリトン X-100 (シグマ社製) 0.15 g 添加し、20 で pH を計測しながら 1 mol / L の塩酸または水酸化ナトリウム溶液を加え、pH 7.4 に合わせ、精製水で全量を 1,000 mL とし、ブロッキング液 1 を調製した。

30

## 【 0038 】

## [ 試験例 1 ]

例 1 ~ 3 および比較例 1 で調製した各 R 1 試薬および各 R 2 試薬を用いて、血清検体中のフェリチン濃度を下記の方法で測定した。フェリチン濃度の測定には、調製直後の各 R 1 試薬および各 R 2 試薬を自動分析機用容器に入れ、3 日間密封し 4 で保存後に開封した直後の試薬 (開封直後とする)、開封した状態で 4 で 14 日間保存した試薬 (開封保存 14 日間とする)、および開封した状態で 4 で 28 日間保存した試薬 (開封保存 28 日間とする) をそれぞれ用いた。

40

## 【 0039 】

## 血清検体の調製

人血液を採血管 (ベノジェクト真空採血管、テルモ社製) で採血後、2 時間放置して得られた上澄み液を血清検体とし、これを使用するまで凍結保存 (-20) し、定量直前に融解して使用した。

## 【 0040 】

## R 1 試薬と R 2 試薬を用いたフェリチン濃度の測定

検量線は、開封直後の R 1 試薬と R 2 試薬を用い、フェリチン (スクリプス社製) を、

50

10.9、21.9、43.8、87.5、175 ng/mL に調製した標準液を用いて作成した。

【0041】

血清中のフェリチンの測定は、R1試薬140 μL に血清検体を10 μL 添加し、37 で6分間反応させた後、R2試薬150 μL を添加し、37 で13分間反応させた後に主波長750 nm、副波長800 nmにおける吸光度変化量を、2ポイントエンド法（測光ポイント21-39）により測定した。尚、測定機種として、日立自動分析装置7170型を使用した。

【0042】

例1～3及び比較例1で製造した試薬を用いて、フェリチン濃度（ng/mL）を測定した結果を第1表に示す。

10

【0043】

【表1】

第1表

試薬開封後の日数(日)	例1	例2	例3	比較例1
0	61	62	62	62
14	66	62	60	74
28	69	62	57	83

20

【0044】

第1表に示すように、炭酸水素ナトリウムを添加していないR1試薬およびR2試薬を用いた比較例1の場合は、試薬開封後の日数が経過するにつれ、フェリチンの測定値は大きく変動するが、炭酸水素ナトリウムを添加したR1試薬およびR2試薬を用いた例1～3の場合には、試薬開封後の日数が経過しても、フェリチンの測定値に大きな変化は認められないことがわかる。

【0045】

[試験例2]

実施例1、2および比較例2並びに実施例3、4および比較例3で調製した各R1試薬および各R2試薬を用いて検体中のHbA1cのヘモグロビンに対する割合（以下、HbA1c濃度とよぶ）を下記の方法で測定した。HbA1c濃度の測定には、R1試薬については、調製直後の各R1試薬を自動分析機用容器に入れ、3日間密封し4 で保存後に開封した直後の試薬（開封直後とする）、開封した状態で4 で14日間保存した試薬（開封保存14日間とする）および開封した状態で4 で28日間保存した試薬（開封保存28日間とする）を用い、また、R2試薬については、調製直後の各R2試薬を自動分析機用容器に入れ、3日間密封し4 で保存後に開封した直後の試薬を用いた。

30

【0046】

検体の調製

人血液をEDTA採血管（ベノジェクト真空採血管、テルモ社製）で採血後、2時間放置して沈殿した血球層10 μLをとり、精製水1 mLで希釈した。これを-20 で凍結保存し使用直前に融解したものを検体として用いた。

40

【0047】

R1試薬とR2試薬を用いたHbA1c濃度の測定

検量線は、開封直後の試薬を用いて、自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723GHbV（東ソー社製）による測定でHbA1c値（=HbA1c濃度）が、0.0%、4.2%、7.7%、11.3%、14.8%であった標準検体を用いて作成した。

【0048】

検体中のHbA1c濃度の測定は、R1試薬240 μL に上記で調製した検体を3.2 μL 添加し、37 で5分間反応させた後、R2試薬80 μL を添加し、37 で5分反応させた後に、主波長450 nm、副波長800 nmにおける吸光度変化量を2ポイント

50

エンド法（測光ポイント 16 - 34）により測定した。尚、測定機種として、日立自動分析装置 7170 型を使用した。

【0049】

実施例 1、2 および比較例 2 で製造した試薬を用いて H b A 1 c 濃度（%）を測定した結果を第 2 表に、実施例 3、4 および比較例 3 で製造した試薬を用いて H b A 1 c 濃度（%）を測定した結果を第 3 表にそれぞれ示す。

【0050】

【表 2】

第 2 表

R 1 試薬開封後 の日数（日）	実施例 1	実施例 2	比較例 2
0	6.0	6.1	6.0
14	6.0	6.0	6.4
28	6.1	5.8	6.8

10

【0051】

【表 3】

第 3 表

R 1 試薬開封後 の日数（日）	実施例 3	実施例 4	比較例 3
0	6.0	6.1	6.1
14	6.4	6.1	6.8
28	6.5	6.1	7.5

20

30

【0052】

第 2 表および第 3 表に示すように、炭酸水素ナトリウムを添加していない R 1 試薬を用いた比較例 2、3 の場合は、R 1 試薬開封後の日数が経過するにつれ、H b A 1 c の測定値は大きく変動するが、炭酸水素ナトリウムを添加した R 1 試薬を用いた実施例 1 ~ 4 の場合は、R 1 試薬開封後の日数が経過しても、H b A 1 c の測定値に大きな変化は認められないことがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0053】

本発明によると、不溶性担体粒子の非特異的凝集が抑制されるので、特異的な定量が可能となり、測定値の正確性および信頼性が高い免疫測定方法を提供することができる。また本発明により、長期間保存しても非特異的凝集が抑制された免疫測定試薬を提供することができる。さらに、本発明により不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬の長期保存安定方法を提供することができる。

40

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平06-205695(JP,A)  
特開平10-010127(JP,A)  
特開平06-167495(JP,A)  
特開平06-066795(JP,A)  
特開平08-062218(JP,A)  
特開昭55-087047(JP,A)  
特開平05-080051(JP,A)  
特開平08-193999(JP,A)  
国際公開第98/036277(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	使用不溶性载体颗粒和试剂的免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4950406B2</a>	公开(公告)日	2012-06-13
申请号	JP2002516636	申请日	2001-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社 SRL股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社 株式会社エスアールエル		
当前申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社 株式会社ティエフビー		
[标]发明人	重信香代子		
发明人	重信 香代子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54313		
FI分类号	G01N33/543.583 G01N33/543.587 G01N33/531.B		
优先权	2000226805 2000-07-27 JP		
其他公开文献	JPWO2002010760A1 JPWO2002010760A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

含有不溶性载体颗粒，可以是高的长期存储的精度和测量的可靠性，使用试剂的免疫测定方法，并旨在提供稳定试剂的方法免疫测定试剂。使用不溶性载体颗粒在含有缓冲容量在中性或碱性区域（但不包括碳酸盐缓冲液）的缓冲液和释放碳酸氢根离子的碳酸盐化合物的水性介质中进行抗原 - 抗体反应的免疫测量方法，缓冲容量在中性或碱性区域（碳酸盐缓冲液除外），含有碳酸盐化合物释放碳酸氢根离子和不溶性载体颗粒的免疫测定试剂，以及不溶性载体颗粒用于包含不溶性载体颗粒的免疫测定，其包含在含有在中性或碱性区域具有缓冲能力的缓冲液的水性介质中（碳酸盐缓冲液除外）和释放碳酸氢根离子的碳酸盐化合物提供一种稳定试剂的方法。

第1表

試薬開封後 の日数(日)	例1	例2	例3	比較例1
0	61	62	62	62
14	66	62	60	74
28	69	62	57	83