

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/010760

発行日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(43) 国際公開日 平成14年2月7日(2002.2.7)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/531

F I

GO 1 N 33/543 5 8 3

GO 1 N 33/543 5 8 7

GO 1 N 33/531 B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

出願番号	特願2002-516636 (P2002-516636)	(71) 出願人	000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区入船二丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/006500	(71) 出願人	390037006 株式会社エスアールエル 東京都立川市曙町二丁目41番19号
(22) 国際出願日	平成13年7月27日(2001.7.27)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(31) 優先権主張番号	特願2000-226805 (P2000-226805)	(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
(32) 優先日	平成12年7月27日(2000.7.27)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		

(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) 【要約】

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ものである。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で、不溶性担体粒子を用いる抗原抗体反応を行う免疫測定方法、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免疫測定用試薬、並びに、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不溶性担体粒子を含む免疫測定用試薬の安定化方法を提供する。

## 【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で不溶性担体粒子を用いる抗原抗体反応を行うことを特徴とする免疫測定方法。

## 【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、 $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$ 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。 10

## 【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、 $0.1 \sim 500 \text{ mmol/L}$ 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 5】

不溶性担体粒子が、測定対象物質と反応する抗体を粒子上に結合したもの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】

不溶性担体粒子が、測定対象物質を粒子上に結合したもの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。 20

## 【請求項 7】

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 ~ 6 のいずれか記載の免疫測定方法。

## 【請求項 8】

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 ~ 7 のいずれか記載の免疫測定方法。

## 【請求項 9】

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ことを特徴とする免疫測定用試薬。 30

## 【請求項 10】

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が水性媒体中に含有されていることを特徴とする請求項 9 記載の免疫測定用試薬。

## 【請求項 11】

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 9 または 10 記載の免疫測定用試薬。

## 【請求項 12】

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 10 または 11 記載の免疫測定用試薬。 40

## 【請求項 13】

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 10 ~ 12 のいずれか記載の免疫測定用試薬。

## 【請求項 14】

不溶性担体粒子が、測定対象物質と反応する抗体を粒子上に結合したものであることを特徴とする請求項 9 ~ 13 のいずれか記載の免疫測定用試薬。

## 【請求項 15】

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 9 ~ 14 のいずれか記載の免疫測定用試薬。

## 【請求項 16】

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 17】

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 16 記載の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 18】

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 16 または 17 記載の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 19】

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 16 ~ 18 のいずれか記載の不溶性担体粒子を含む免疫測定用試薬の安定化方法。

10

【請求項 20】

不溶性担体粒子が、測定対象物質と反応する抗体を粒子上に結合したものであることを特徴とする請求項 16 ~ 19 のいずれか記載の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 21】

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 16 ~ 20 のいずれか記載の不溶性担体粒子を含む免疫測定用試薬の安定化方法。

20

【発明の詳細な説明】

技術分野

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

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。

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。

30

発明の開示

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で不溶性担体粒子を用いる抗原抗体反応を行うことを特徴とする免疫測定方法（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、測定対象物質と反応する抗体を粒子上に結合したもの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、不溶性担体粒子が、測定対象物質を粒子上に結合したもの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）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 ~ 6 のいずれか記載の免疫測定方法（請求項 7）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 ~ 7 のいずれか記載の免疫測定方法（請求項 8）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）、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ことを特徴とする免疫測定用試薬（請求項 9）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

40

50

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が水性媒体中に含有されていることを特徴とする請求項 9 記載の免疫測定用試薬(請求項 10)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 9 または 10 記載の免疫測定用試薬(請求項 11)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 10 または 11 記載の免疫測定用試薬(請求項 12)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 10 ~ 12 のいずれか記載の免疫測定用試薬(請求項 13)や、不溶性担体粒子が、測定対象物質と反応する抗体を粒子上に結合したものであることを特徴とする請求項 9 ~ 13 のいずれか記載の免疫測定用試薬(請求項 14)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 9 ~ 14 のいずれか記載の免疫測定用試薬(請求項 15)や、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 16)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 16 記載の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 17)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 16 または 17 記載の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 18)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 16 ~ 18 のいずれか記載の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 19)や、不溶性担体粒子が、測定対象物質と反応する抗体を粒子上に結合したものであることを特徴とする請求項 16 ~ 19 のいずれか記載の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 20)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 16 ~ 20 のいずれか記載の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 21)に関する。

10

20

発明を実施するための最良の形態

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、 $\text{pH} 7$ 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、 $\text{pH} 7 \sim 12$ で緩衝能を示す緩衝剤が好ましく、 $\text{pH} 8 \sim 11$ 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

30

挙げることができる。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-ロピンソン緩衝剤、セーレンセン緩衝剤等を挙げることができる。

40

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-

50

D - グルカミン緩衝剤等を挙げることができる。

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 } プロパンスルホン酸 緩衝剤、POPSO [ピペラジン - N, N' - ビス (2 - ヒドロキシプロパン - 3 - 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。

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。

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 mmol/L ~ 500 mmol/L の濃度が好ましく、1 mmol/L ~ 100 mmol/L の濃度がより好ましく、5 ~ 50 mmol/L が特に好ましい。

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。

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 ~ 500 mmol/L の濃度が好ましく、0.1 mmol/L ~ 100 mmol/L の濃度がより好ましく、1 ~ 50 mmol/L が特に好ましい。

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有してもよい。

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。

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 ~ 0.8 μm 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。

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 ~ 2 重量% とすることが好ましい。

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、フェリチン、ヘモグロビン A1c (以下、HbA1c と記す) 等の抗原やこれらに対する抗体を挙げることができる。

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)していないものでよい。

10

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ことができる。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。

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。

20

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。

30

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ことができる。

40

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

50

を共存させていてもよい。

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を挙げることができる。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封条件下において、試薬の安定化効果がより高い。

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。

#### 実施例 1

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

##### R 1 試薬

ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH 8.4）	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	

10

##### R 2 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、pH 8.4）

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 1 で製造）	0.1 重量%	

20

#### 実施例 2

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

##### R 1 試薬

ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH 8.4）	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）	0.4 g / L	

##### R 2 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、pH 8.4）

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 1 で製造）	0.1 重量%	

30

#### 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

ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH 8.4）	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	

40

##### R 2 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、pH 8.4）

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）	0.6 g / L	
抗体担持ラテックス（参考例 1 で製造）	0.1 重量%	

#### 比較例 1

50

下記の R 1 試薬および R 2 試薬を調製した。

R 1 試薬

ピシン緩衝剤 (同仁化学社製、pH 8.4)	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

R 2 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、pH 8.4)  
0.68 g / L

トリトン X - 100 (シグマ社製)	0.15 g / L
抗体担持ラテックス (参考例 1 で製造)	0.1 重量%

10

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 7.8)	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)	0.1 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 H b A 1 c マウスモノクローナル抗体 0.025 g (IgG 換算) / L	
抗マウス Ig G ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製) 0.04 g (IgG 換算) / L	

20

実施例 5

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
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 H b A 1 c マウスモノクローナル抗体 0.025 g (IgG 換算) / L	
抗マウス Ig G 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

40

実施例 6

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

50

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%		
R2試薬		
ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH7.0）	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		10
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		
実施例7		
下記のR1試薬およびR2試薬を調製した。		
R1試薬（ラテックス懸濁液）		
ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH8.4）	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
R2試薬		
ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH7.0）	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		
比較例2		30
下記のR1試薬およびR2試薬を調製した。		
R1試薬（ラテックス懸濁液）		
ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH7.8）	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%		
R2試薬		
ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH7.0）	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	40
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		
比較例3		
下記のR1試薬およびR2試薬を調製した。		
R1試薬（ラテックス懸濁液）		
ピシン緩衝剤（同仁化学社製、pH8.4）	3.26 g / L	
アジ化ナトリウム（関東化学社製）	0.1 g / L	50

ラテックス（粒径 0.0775 μm、積水化学社製）

0.033 重量%

R2 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

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。

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。

試験例 1

実施例 1～3 および比較例 1 で調製した各 R1 試薬および各 R2 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 R1 試薬および各 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（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。

血清検体の調製

人血液を採血管（ベノJECT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。

R1 試薬と R2 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 R1 試薬と R2 試薬を用い、フェリチン（スクリプス社製）を、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。

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。

実施例 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

20

30

40

50

第 1 表

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

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 R 1 試薬および R 2 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 R 1 試薬および R 2 試薬を用いた実施例 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。

10

## 試験例 2

実施例 4、5 および比較例 2 並びに実施例 6、7 および比較例 3 で調製した各 R 1 試薬および各 R 2 試薬を用いて検体中の H b A 1 c のヘモグロビンに対する割合（以下、H b A 1 c 濃度とよぶ）を下記の方法で測定した。H b A 1 c 濃度の測定には、R 1 試薬については、調製直後の各 R 1 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、R 2 試薬については、調製直後の各 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を用いた。

20

## 検体の調製

人血液を EDTA 採血管（ベノジェット真空採血管、テルモ社製）で採血後、2 時間放置して沈殿した血球層 10  $\mu$ L 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。

## R 1 試薬と R 2 試薬を用いた H b A 1 c 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 H L C - 7 2 3 G H b V（東ソー社製）による測定で H b A 1 c 値（= H b A 1 c 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。

30

検体中の H b A 1 c 濃度の測定は、R 1 試薬 240  $\mu$ L に上記で調製した検体を 3.2  $\mu$ L 添加し、37 で 5 分間反応させた後、R 2 試薬 80  $\mu$ L 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。

実施例 4、5 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 6、7 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。

第 2 表

R 1 試薬開封後 の日数 (日)	実施例 4	実施例 5	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

40

第 3 表

R 1 試薬開封後 の日数 (日)	実施例 6	実施例 7	比較例 3
0	6. 0	6. 1	6. 1
1 4	6. 4	6. 1	6. 8
2 8	6. 5	6. 1	7. 5

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 4 ~ 7 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。

10

#### 産業上の利用可能性

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。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/06500
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> G01N 33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> G01N 33/53-33/577		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1992-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 05-80051 A (F. Hoffmann La Roche AG), 30 March, 1993 (30.03.93), column 8, lines 19 to 39; column 11, lines 4 to 19 & EP 505454 A1	1-21
A	JP 08-193999 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 30 July, 1996 (30.07.96), column 4, lines 33 to 46; column 6, lines 21 to 47 (Family: none)	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but used to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 October, 2001 (23.10.01)		Date of mailing of the international search report 30 October, 2001 (30.10.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JP01/06500
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. G01N 33/543			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小級資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. G01N 33/53-33/577			
最小級資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1992-1996年			
日本国公開実用新案公報 1971-2001年			
日本国特許実用新案公報 1954-2001年			
日本国実用新案登録公報 1956-2001年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表記	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP 05-80051 A(エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー)30.3月、 1993 (30.03.93)、第8欄第19-39行及び第11欄第4-49行 & EP 506454 A1	1-21	
A	JP 08-193999 A(積水化学工業株式会社)30.7月、1996 (30.07.96) 第4欄第33行-46行及び第6欄第21-47行 (ファミリーなし)	1-21	
<input type="checkbox"/> C欄の底きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を添付。			
* 引用文献のカテゴリー			
「A」特に関連のある文献ではなく、一般技術水準を示すもの		の日の後に公報された文献	
「E」国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日よりしくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (遅延を付す)		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日	23.10.01	国際調査報告の発送日	30.10.01
国際調査機関の名称及びおて先	日本国特許庁 (ISA/JIP) 〒東京都千代田区千代田 1-8-15 東京千代田区千代田三丁目4番3号	特許庁長官 (権限のある職員)	21 9212 松本 隆二
		電話番号	03-3581-1101 内線 3250

---

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2002010760A5</a>	公开(公告)日	2008-09-11
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		
[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		
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 JP4950406B2		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种用于免疫测定的试剂，其包含不溶性载体颗粒，该不溶性载体颗粒可以高精度和可靠地给出待测定的值，并且可以长期保存；使用该试剂的免疫测定；以及保持试剂稳定的方法。本发明提供了一种免疫测定法，其包括使用不溶性载体颗粒在水性介质中进行抗原-抗体反应，所述水性介质包含在中性或碱性区域具有缓冲能力的缓冲剂（基于碳酸盐的缓冲剂除外）和碳酸化合物。释放碳酸氢根离子；一种用于免疫测定的试剂，其包括在中性或碱性区域具有缓冲能力的缓冲剂（基于碳酸盐的缓冲剂除外），释放碳酸氢根离子的碳酸化合物和不溶性载体颗粒；以及用于保持用于包含不溶性载体颗粒的免疫测定试剂的方法稳定的方法，其包括使不溶性载体颗粒在包含缓冲剂的水性介质中共存，所述缓冲剂具有在中性或碱性区域的缓冲能力（除了基于碳酸盐的缓冲液）和释放碳酸氢根离子的碳酸化合物。