

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 255325

(P2001 - 255325A)

(43)公開日 平成13年9月21日(2001.9.21)

|                         |      |        |                |        |
|-------------------------|------|--------|----------------|--------|
| (51)Int.Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I            | 技術表示箇所 |
| G 0 1 N 33/531          |      |        | G 0 1 N 33/531 | B      |

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 4 数)

(21)出願番号 特願2000 - 62477(P2000 - 62477)

(22)出願日 平成12年3月7日(2000.3.7)

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 江口 聡

神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬株式会  
社研究開発センター内

(72)発明者 白波瀬 泰史

神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬株式会  
社研究開発センター内

(74)代理人 100085486

弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 免疫学的測定法及び試薬

(57)【要約】

【課題】 干渉物質の影響を軽減し得る免疫学的測定法及びそれに使用される試薬を提供する。

【解決手段】 本発明の免疫学的測定法は、還元剤の存在下に免疫学的測定法を行うことからなる。本発明によれば、リウマチ因子のように構成物質同士がジスルフィド結合した構造をもつ干渉物質による非特異反応を、還元剤でジスルフィド結合を切断し干渉物質を分解することにより抑制することができるので、測定精度の向上などを図ることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 干渉物質の影響を軽減し得る免疫学的測定法であって、当該反応を還元剤の存在下に行うことを特徴とする免疫学的測定法。

【請求項2】 干渉物質がリウマチ因子及び/又はクリオグロブリン及び/又はM蛋白質である請求項1に記載の免疫学的測定法。

【請求項3】 還元剤が チオグリセロール、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩、臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンから選ばれる少なくとも1の化合物である請求項1又は2に記載の免疫学的測定法。

【請求項4】 免疫学的測定法に使用される試薬であって、当該試薬が還元剤を含有することを特徴とする免疫学的測定用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は免疫学的測定法及び測定試薬に関する。より詳細には、臨床化学、薬物化学、生化学及び食品化学などの分野で利用され、干渉物質の影響を軽減し得る免疫学的測定法及びそれに用いられる試薬に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】臨床検査などの分野では試料中の測定対象物質の測定法として、従来から測定対象物質と当該対象物質と抗原抗体反応可能な物質との抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法が汎用されている。係る測定法としては、例えば免疫拡散法(SRID法)、免疫比濁法、赤血球凝集法、ラテックス等の担体を用いた方法、RIA法、EIA法などが挙げられる。このような免疫学的測定法では、目的とする抗原抗体反応の他に非特異反応を生じることがあり、それが原因で測定精度及び信頼性に欠けるという問題があった。従来、非特異反応を抑える方法としては、試料検体を加熱処理する方法、デキストラン硫酸、ヘパリン、ポリスチレンスルホン酸、コンドロイチン硫酸等のポリアニオンを反応系に添加する方法が知られている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上記の加熱処理する方法であれば加熱する操作が煩雑であり、さらに検体試料の濃縮・ゼラチン化などの問題があった。またポリアニオンを使用する方法では、非特異反応を抑制するためにはポリアニオンの濃度を高める必要があるので反応液の粘度が高くなり、そのため試薬の分注量が不正確となり正確な測定値が得られない原因ともなっていた。この現象は臨床化学の分野で広く用いられている自動分析装置を用いた測定でも見られる欠点でもある。本発明は、このような従来技術の欠点を解決するためになされたもので、本発明者らが鋭意研究した結果、従来の免疫学的測定法の欠点を改良して非特異反応を抑制でき

る方法を見出して完成したものである。すなわち、本発明は測定精度に優れ、臨床検査の分野などで有用に利用できる免疫学的測定法を提供することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決すべくなされた本発明は、免疫学的測定法において当該反応を還元剤の存在下に行うことからなり、前記の非特異反応を引き起こす干渉物質を構成している構成物質間のジスルフィド結合を還元剤で切断して干渉物質を分解し、非特異反応を抑制することにある。干渉物質としては、係る構成物質がジスルフィド結合したものであれば特に限定されないが、リウマチ因子(以下RFという)、クリオグロブリン、M蛋白質を例示することができる。これらはジスルフィド結合を持っており、このジスルフィド結合を切断することにより干渉物質を分解し、非特異反応を抑えるものである。更に、RFは、IgG型、IgM型の2種類があるが、本発明は特にIgM型に効果がみられる。また、ジスルフィド結合を切断する物質としては、ジスルフィド結合を切断できる物質であれば特に限定されないが、チオグリセロール、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩、臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩及び/又はトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンを用いるのが好ましい。

## 【0005】

【発明の実施の形態】本発明において、免疫学的測定法としては、測定対象物と当該対象物と抗原抗体反応可能な物質との抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法であれば特に限定されないが、例えば、免疫拡散法(SRID法)、免疫比濁法、赤血球凝集法、ラテックス法等の担体を用いた方法、EIA法、RIA法などが挙げられる。本発明の方法における測定対象物としては免疫学的測定法で測定される物質であれば特に限定されるものではないが、種々の物質、例えば、抗原、ハプテン、抗体、ホルモン、薬剤などが挙げられる。より具体的には、例えばCRP(C反応性蛋白質)、 $\alpha$ -フェトプロテイン、CEA(カルシノエンブリオニック抗原)、トランスフェリン、ハプトグロビン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、 $\alpha$ 1-アシドグリコプロテイン、免疫グロブリン類等の血清蛋白質、インスリン、甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン等のホルモン類、HBs抗原等のウイルス抗原、カナマイシン、テオフィリン等の薬剤などが例示できる。これらの物質を含む検体としては、例えば、血清、血漿、尿、髄液、リンパ液などを挙げるができる。

【0006】上記測定対象物質と抗原抗体反応しうる物質(以下、免疫反応物質という)としては、測定対象物が抗原、ハプテン等の場合はその抗体が、測定対象物が抗体の場合にはその抗原が用いられる。免疫反応物質としての抗原及び抗体は慣用の方法にて調製することができる。また、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクロー

ナル抗体のいずれでもよく、更にF(ab)<sub>2</sub>画分、F(ab')<sub>2</sub>画分などであってもよい。また、係る免疫反応物質は、測定法に応じて、標識物質（例えば酵素、放射性物質、蛍光性物質等）、不溶性担体（例えばポリスチレンラテックス、赤血球等）などが結合していてもよい。

【0007】本発明で使用される還元剤は、慣用の還元剤を使用することができ、例えばチオール化合物、チオ尿素誘導体、ホスフィン誘導体などが挙げられる。より具体的には、例えばチオグリセロール、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩、臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンなどが例示でき、これらの還元剤は2種類以上を併用してもよい。また、他の物質と組み合わせ用いてもよい。係る還元剤は、例えばジチオスレイトール(DTT)などの他の還元性物質と比較して安定性がよいことなどから好適に用いられ、特にチオグリセロールが好適に使用される。更に、EDTAなどのキレート剤を用いることにより安定性を向上させてもよい。

【0008】上記の還元剤の使用量は検体中の干渉物質、測定方法などにより適宜設定でき、その量は干渉物質の影響を軽減できる量であればよい。通常、反応系における終濃度として10mmol/L程度以上、好ましくは15~60mmol/L程度、より好ましくは20~50mmol/L程度に調整される。更に、反応系には、必要に応じて、ポリエチレングリコール、デキストラン、ゼラチン、塩化ナトリウムなどの慣用の添加剤を加えてもよい。

【0009】本発明の方法の一例を免疫比濁法において試料中のCRPを測定する例をもって説明すると、まず、適当な緩衝液（例えばHEPES緩衝液のようなグッド緩衝液）に還元剤（好ましくはチオグリセロール）を適当濃度（通常50mM）になるように添加し、更に必要に応じてポリエチレングリコール、塩化ナトリウム、EDTAなどの添加剤を適宜添加した第一試薬を調製する。一方、適当な緩衝液（例えばHEPES緩衝液のようなグッド緩衝液）に抗CRP抗体（例えば、抗ヒトCRPヤギ血清）を添加し、更に必要に応じてポリエチレングリコール、塩化ナトリウム、EDTAなどの添加剤を適宜添加した第二試薬を調製する。そして、CRPを含有する試料（例えば血清等）に第一試薬を添加後、20~40程度（通常37程度）で2~10分

間程度（通常5分間程度）加温する。次いで、適当量の第二試薬を添加し、20~40程度（通常37程度）で2~10分間程度（通常5分間程度）加温した後、波長340nmでの吸光度を測定し、予め作成した検量線に基づきCRP濃度を求めることができる。吸光度の測定は、エンドポイント法、レートアッセイ法のいずれで行ってもよい。

【0010】なお、本発明の方法は上記の方法に限定されるものではなく、使用する免疫学的測定方法に応じて適宜変更して実施することができ、使用する緩衝液、測定条件なども適宜変更することができる。

【0011】本発明は、上記の方法に使用される試薬であって、当該試薬が還元剤を含有することからなる。上記の試薬は、免疫学的測定法の種類に応じて適宜設定することができ、また、複数の構成試薬からなるキットであっても良く、この場合には構成試薬の少なくとも1種が還元剤を含有すればよい。

【0012】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0013】実施例1

1W/V%塩化ナトリウム、1mmol/L EDTA、4W/V%PEG6000、0.1W/V%アジ化ナトリウム及び0~60mmol/Lのチオグリセロールを含むヘルス緩衝液(pH=7.5)を調製し、第一試薬とした。抗ヒトCRPヤギ血清15mlを1W/V%塩化ナトリウム、0.1W/V%アジ化ナトリウムを含むヘルス緩衝液(pH=7.5)で100mlに調製し、第二試薬とした。検体15μL、第一試薬250μL及び第二試薬50μLを混合し、主波長340nm、副波長700nm、エンドポイントアッセイの分析条件で日立7150型自動分析装置を用いて測定を行い、予め作成した検量線からCRP濃度を算出した。検体として500U/mLのRF含む2.00mg/dLのCRP溶液、及び対照としてRFを含まない2.00mg/dLのCRP溶液を調製し、非特異反応回避の検討を行った。その結果を表1に示す。表1に示されるように、チオグリセロールの添加により非特異反応が回避できることが明らかとなった。

【0014】

【表1】

表1<sup>6</sup>

| $\alpha$ -チオグリセロール<br>濃度(mmol/L) | 2.00mg/dL CRP | 2.00mg/dL CRP +<br>500U/mL RF |
|----------------------------------|---------------|-------------------------------|
| 0                                | 2.00          | 2.22                          |
| 12                               | 2.01          | 2.17                          |
| 24                               | 2.00          | 2.09                          |
| 36                               | 2.00          | 2.01                          |
| 48                               | 1.99          | 2.00                          |
| 60                               | 1.99          | 2.00                          |

## 【0015】実施例2

実施例1で作製した試薬で0~60mmol/Lのチオグリセロールの代わりに5mmol/L DTT、50mmol/L  $\alpha$ -チオグリセロール、10mmol/L臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩(AETと略す)及び無添加のものを調製し、RFの影響回避の検討を行った。その他の試薬組成、操作\*

表2

\*法、検体の調製は実施例1と同様に行った。その結果を表2に示す。表2に示すように還元剤の添加によりRFの非特異反応の回避が可能であることが明らかとなった。

## 【0016】

## 【表2】

|                    | 2.00mg/dL CRP | 2.00mg/dL CRP +<br>500U/mL RF |
|--------------------|---------------|-------------------------------|
| 無添加                | 2.00          | 2.22                          |
| DTT                | 2.00          | 2.00                          |
| $\alpha$ -チオグリセロール | 1.99          | 2.00                          |
| AET                | 2.00          | 1.99                          |

## 【0017】実施例3

実施例2で作製した第一試薬を30℃で保存したときの試薬の安定性をRF干渉回避能より検討した。検体は500U/mLのRFを含む2.00mg/dLのCRP溶液を用いた。操作法は実施例1と同様に行った。その結果を図1に示す。図1から明らかなようにDTTと比較して、 $\alpha$ -チオグリセロール、臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩(AET)は30℃で長期間保存してもRFの影響をほとんど受けず安定であることが明らかとなった。

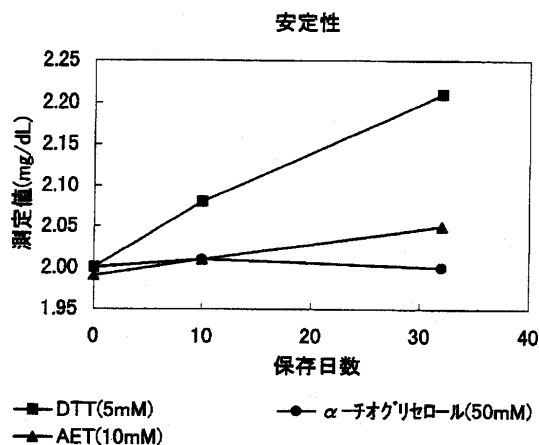
## 【0018】

【発明の効果】本発明においては、試料中のRFのように構成物質同士がジスルフィド結合した構造をもつ干渉物質による非特異反応を、還元剤でジスルフィド結合を切断し干渉物質を分解することにより抑制することができる。特に、反応系の粘度を上昇させないので、自動分析装置を用いた測定に好適に使用することができる。従って、本発明によれば、免疫学的測定法の測定精度・信頼性を著しく向上させることができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】DTT、 $\alpha$ -チオグリセロール又はAETを含有する試薬の保存安定性を示す図である。

【図1】



|             |                               |         |            |
|-------------|-------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 免疫学测定和试剂                      |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2001255325A</a> | 公开(公告)日 | 2001-09-21 |
| 申请号         | JP2000062477                  | 申请日     | 2000-03-07 |
| 申请(专利权)人(译) | 国际试剂有限公司                      |         |            |
| [标]发明人      | 江口 聡<br>白波瀬 泰史                |         |            |
| 发明人         | 江口 聡<br>白波瀬 泰史                |         |            |
| IPC分类号      | G01N33/531                    |         |            |
| FI分类号       | G01N33/531.B                  |         |            |
| 代理人(译)      | 广濑高见                          |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>     |         |            |

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫学测定方法，其能够减少干扰物质及其所用试剂的影响。本发明的免疫测定方法包括在还原剂存在下进行免疫测定方法。根据本发明，可以通过用还原剂裂解二硫键以分解干扰物来抑制由具有诸如类风湿因子的成分具有二硫键的结构干扰物引起的非特异性反应。可以提高测量精度。

表1<sup>D</sup>

| $\alpha$ -チオグリセロール<br>濃度(mmol/L) | 2.00mg/dL CRP | 2.00mg/dL CRP +<br>500U/mL RF |
|----------------------------------|---------------|-------------------------------|
| 0                                | 2.00          | 2.22                          |
| 12                               | 2.01          | 2.17                          |
| 24                               | 2.00          | 2.09                          |
| 36                               | 2.00          | 2.01                          |
| 48                               | 1.99          | 2.00                          |
| 60                               | 1.99          | 2.00                          |