

(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 - 296292

(P2001 - 296292A)

(43)公開日 平成13年10月26日(2001.10.26)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/483			G 0 1 N 33/483	C
	33/531		33/531	B
	33/543	583	33/543	583

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 数)

(21)出願番号 特願2001 - 87253(P2001 - 87253)
 (62)分割の表示 特願平8 - 217966の分割
 (22)出願日 平成8年7月30日(1996.7.30)

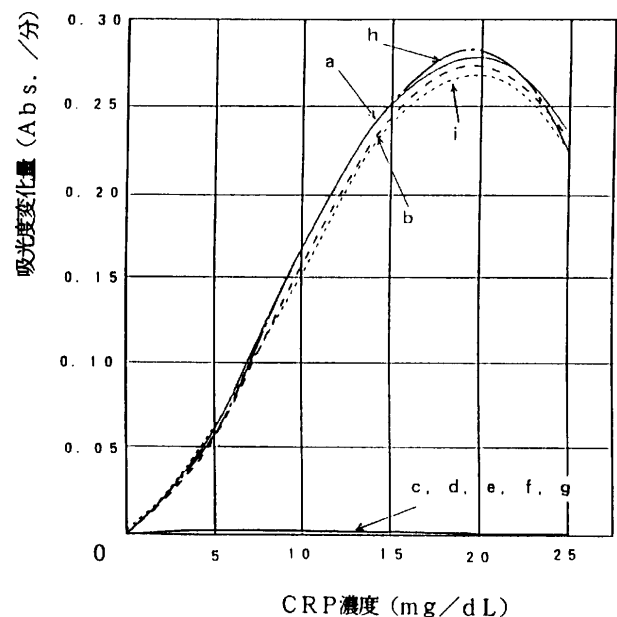
(71)出願人 000155023
 株式会社堀場製作所
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地
 (72)発明者 山尾 泰生
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株
 株式会社堀場製作所内
 (72)発明者 奥 成博
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株
 株式会社堀場製作所内
 (74)代理人 100074273
 弁理士 藤本 英夫

(54)【発明の名称】 免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 遠心分離機などによって血液を前処理しなくても簡便にしかも短時間で測定を行うことができる免疫測定方法を提供すること。

【解決手段】 被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する免疫測定方法において、前記被検体試料として全血Bを用い、この全血を強制的に溶血させるようにしている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する免疫測定方法において、前記被検体試料として全血を用い、この全血を強制的に溶血させるようにしたことを特徴とする免疫測定方法。

【請求項2】 全血を低張液と混合することにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項3】 全血を溶血性サポニン類溶液と混合することにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項4】 全血を凍結融解することにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項5】 全血に超音波振動を与えることにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項6】 抗原または抗体と特異的に反応する抗体または抗原を固定化した不溶性粒子懸濁試薬に溶血性サポニン類を含有させた請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項7】 全血を被検体試料とし、全血中の抗原または抗体と特異的に反応する抗原または抗体を固定化した不溶性粒子懸濁試薬と前記被検体試料中の抗体または抗原とを凝集反応させる工程と、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する工程と、被検体試料のヘマトクリット%を用いて、 $A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット}\%)$ (但し、A:測定された吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量、A':被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量)なる演算を行う工程とを含むことを特徴とする免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、免疫測定方法に関し、より詳しくは、被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対して近赤外光または赤外光を照射し、そのときの吸光度変化または散乱光変化を測定するようにした免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術およびその欠点】前記免疫測定方法として、特公昭58-11575号公報に開示されるものがある。すなわち、この公報の方法は、抗原あるいは抗体を固定化した不溶性担体と体液試料中の抗体あるいは抗

原とを抗原抗体反応させ、その反応混合液に600~2400nmから選ばれた波長の光を照射し、その吸光度の増加を測定するものである。この方法は、その有用性から所謂ラテックス免疫比濁法として、現在では免疫測定的主流となっている。

【0003】ところが、上記測定方法において用いられる測定試料は、水、血清、尿、食塩水などである。また、臨床検査における一般的な採血の注意点としては、溶血を極力避け、できるだけ速やかに血清・血漿分離することである。この理由は、溶血による光学的測定への影響、血球膜を通してのNa、K、Clなどの物質の出入り、血球代謝による移動(解糖による乳酸、ビルビン酸の血清中への移動)の影響、目的成分の血球中と血清中の濃度差による影響などが挙げられる。

【0004】以上のことから、被検者から得られた血液は、遠心分離を行って血清または血漿に分離した試料を使用しなければならなかった。このため、血液を大量に処理できる大または中病院の中央検査室などでは支障はないが、開業医や緊急検査室では、遠心分離機による前処理が行えないことがあり、したがって、上記方法は必ずしも万全のものではない。

【0005】そして、このような一般的な全血の取り扱い環境にあって、免疫検査領域において、血清・血漿分離を行うことなく、全血を直接に測定試料とする精密定量測定方法は存在しなかった。また、血液を溶血せずに測定することは、光学的手段を用いて測定する場合において、赤血球による濁りが大きく、不向きであった。

【0006】この発明は、上述の事柄に留意してなされたもので、その第1の目的は、遠心分離機などによって血液を前処理しなくても簡便にしかも短時間で測定を行うことができる免疫測定方法を提供することであり、第2の目的は、免疫反応に影響しない方法によって血球を故意かつ強制的に溶血させた試料を用いることによって、各種の定量試薬と組み合わせて、精度のよいデータを得ることができる直接に全血を試料とした免疫測定方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】この出願の発明者らは、鋭意研究した結果、前記臨床検査における一般的な採血の注意点としての溶血を極力避け、できるだけ速やかに血清・血漿分離するという固定概念を覆し、意外にも、凝集反応に影響しない方法を用いて故意かつ強制的に全血を溶血させることにより、全血中の抗原あるいは抗体を測定できることを見出した。

【0008】すなわち、第1の目的を達成するため、第1の発明では、被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する免疫測定方法において、前記被

検体試料として全血を用い、この全血を強制的に溶血させるようにしている。

【0009】この場合、全血を強制的に溶血させる手段としては、

全血を低張液と混合する、

血を溶血性サポニン類溶液と混合する、

全血を凍結融解する、

全血に超音波振動を与える、などを採用することができる。

【0010】そして、抗原または抗体と特異的に反応する抗体または抗原を固定化した不溶性粒子懸濁試薬に溶血性サポニン類を含有させてもよい。

【0011】また、第2の目的を達成するため、第2の発明の免疫測定方法は、全血を被検体試料とし、全血中の抗原または抗体と特異的に反応する抗原または抗体を固定化した不溶性粒子懸濁試薬と前記被検体試料中の抗体または抗原とを凝集反応させる工程と、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する工程と、被検体試料のヘマトクリット%を用いて、

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット}\%)$$

(但し、A：測定された吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量、A'：被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量)なる演算を行う工程とを含んだことを特徴としている。

【0012】第1の発明によれば、

全血被検液を遠心分離操作などの前処理を行うこと

なく、直接、全血被検液を用いることにより、測定時間の短縮、測定コストの低減および測定操作の簡略化が図れる。そして、遠心分離操作を行う必要がないということは、遠心分離機や遠心分離容器の費用、被検液の採血容器から遠心分離容器への移替えの手間および遠心分離操作のための時間が不要になるとともに、それだけ、検査要員が血液に接触する機械が少なくて済み、感染への危険性が大幅に低減される。

【0013】抗原抗体反応に影響しない方法で全血中の血球を強制的に溶血させることにより、一般のラテックス免疫比濁法を用いた測定キットと組み合わせることができ、精度のよい測定データを得ることができるとともに、広範囲な応用が可能になる。

【0014】溶血試薬をラテックス試薬に含ませることによって、測定装置の構成を簡単にすることができる、測定時間を短縮することができる。

【0015】そして、第2の発明によれば、ヘマトクリット補正を行うことにより、精度の優れたデータを得ることができる。

20 【0016】

【発明の実施の形態】以下、この発明の詳細を実施例によって詳細に説明する。

【0017】まず、各実施例を説明する前に、検討に用いた試薬を下記表1に示す。なお、この表1における符号a～gは、以下の図5～7における符号と同じである。

【0018】

【表1】

		溶血方法	W/V%濃度	吸光度(800nm)	Δ吸光度/min
溶 血 試 薬 水 溶 液	a	純水(イオン交換水)	/	0.204	0.003
	b	サポニン水溶液	0.5	0.147	0.000
	c	トリトンX-100 (非イオン界面活性剤)	0.5	0.146	0.000
	d	Tween-20 (非イオン界面活性剤)	0.5	0.298	0.055
	e	Brij-35 (非イオン界面活性剤)	0.5	2.312	/
	f	ラウリル硫酸ナトリウム (アニオン界面活性剤)	0.5	0.176	0.000
	g	ベンザルコニウムクロライド (カチオン界面活性剤)	0.5	0.139	0.000
	h	凍結溶血	/	0.163	0.000
i	超音波ノズル溶血	/	0.196	0.001	
j	生理食塩水	/	3.000	/	

【0019】〔実施例1〕：溶血試薬による溶血法
EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLを、図1に示すようなセル長5mmの石英製のセル5に収容し、これに、前記表1に示した溶血試薬水溶液a~gをそれぞれ2.0mL添加し、図2に示すような分光光度計1(例えば日立製作所製：U-3410)を用いて、波長300~1000nmにおける吸収スペクトル(図5参照)、波長800nmにおける溶血反応タイムコース(図6参照)および波長800nmにおけるそれぞれの反応開始後5分目の吸光度と反応開始後4~5分目における1分間当たりの吸光度変化(表1参照)を求め、各種溶血試薬の溶血能力を調べた。

【0020】なお、前記図2において、2は近赤外光または赤外光などの照射光Lを発するハロゲンランプからなる光源、3は集光レンズ、4は回折格子、6は増幅器、7はコンピュータなどの演算・記録装置である。また、5はセル5内に収容された試料としての溶血処理を施した全血である。

【0021】図5に示すように、試薬j(生理食塩水)の未溶血ではその濁りによって全波長での吸光度が2.5以上となり、ラテックス凝集反応を光学的に検出する際に影響を与える結果となった。一方、同図に示すように、試薬a(純水)、試薬b(サポニン水溶液)を用い

ることにより、上記のような濁りはなくなり、ラテックス凝集度合いを検出できることが判った。また、表1および図6から、試薬a(純水)、試薬b(サポニン)、試薬c(トリトンX-100)、試薬f(ラウリル硫酸ナトリウム)および試薬g(ベンザルコニウムクロライド)は、人全血を短期間に溶血する能力があることが判る。

【0022】〔実施例2〕：凍結による溶血法
図3は、全血を溶血させるのに用いる凍結セルホルダー9の一例を示すもので、セル5を挿入保持できるとともに、測光窓10を備えたアルミニウム製のセルブロック11にペルチェ素子(例えばメルコア製)12を接合してなるものである。13はペルチェ素子12に適宜の直流電流を供給するための電源、Lは光源2からの近赤外光または赤外光である。

【0023】EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLを、図3に示すように、凍結セルホルダー9にセットされたセル5内に収容し、ペルチェ素子12に所定の方向の電流を10分間通電して人全血を完全に凍結した。その後、ペルチェ素子12に方向とは逆方向の電流を通電して凍結した人全血を融解し、これに生理食塩水2.0mLを添加して融解希釈した後、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後5分目の吸光度と反応開始後4~5

分目における1分間当たりの吸光度変化(表1参照)を求め、溶血試薬の溶血能力を調べた。表1においてhで示すように、人全血を凍結・融解することによってこれ4溶血できることが判る。

【0024】〔実施例3〕：超音波振動による溶血法
図4は、全血を溶血させるのに用いる超音波ノズル14の一例を示すもので、ステンレス鋼製のノズル15に超音波発振子16を結合したもので、17は発振回路、18は吸引用シリンジである。

【0025】EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLをノズル15内に吸引し、その状態で超音波発振子16を5分間動作させることにより、ノズル15内の人全血Bを溶血した。その後、この溶血した人全血Bを全量セル5に収容し、さらに、これに生理食塩水2.0mLを添加して希釈した後、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後5分目の吸光度と反応開始後4~5分目における1分間当たりの吸光度変化(表1参照)を求め、溶血試薬の溶血能力を調べた。表1において符号iで示すように、人全血に超音波振動を与えることによりこれを溶血できることが判る。

【0026】〔実施例4〕：CRPの測定方法1

1) 抗CRP抗体感作ラテックス液の調整

平均粒径0.2μmのポリスチレンラテックス(例えば日本合成ゴム社製：固形分10%)10mLに、約10mg/mLの抗ヒトCRPウサギ抗体液(pH7.5、100mmol/Lトリス塩酸緩衝液、0.1%アジ化Na)を添加し、30で一昼夜静置した後、3600rpmで遠心分離した沈澱物に0.2W/V%牛血清アルブミン pH8.5、100mmol/Lトリス塩酸緩衝液を添加し、抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液に調整した。

【0027】2) CRP測定方法

EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLをセル1に収容し、これに、表1に示した溶血試薬水溶液a~gを0.5mL添加し、37で3分間インキュベーションした後、上記1)で調整した抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液を1.5mL添加し、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後4~5分目における1分間当た*40

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット}\%) \quad \dots (1)$$

但し、A：実際に測定された吸光度変化量、A'：被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度変化量)なる演算を行って求めた分析値と血清を検体とした分析値との相関試験(n=40)を実施したところ、図9に示すように、実施例6の結果よりもより良好な結果が得られた。

【0033】上述の実施例では、凝集混合液に対する光照射による吸光度変化を測定するようにしているが、これに代えて、散乱光変化を測定するようにしてもよい。50

*りの吸光度変化を求めた。

【0028】別途、血漿を検体とした市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用いて前記検体を検定して検量線を作成した。図3は、前記CRP測定に得られた結果に基づいて作成した検量線を示すもので、純水aおよびサボニン水溶液bなどを用いて全血を強制的に溶血したのものにおいては、図中の符号a, bで示すように、良好な感度の検量線が得られた。しかしながら、各種界面活性剤c~gを用いた場合には、凝集反応が阻害され、図中の符号c~gで示すように、免疫反応には適さないという結果となった。

【0029】〔実施例5〕：凍結法または超音波振動法による溶血試料を用いたCRP測定方法
前記実施例2または実施例3で溶血した後の生理食塩水による希釈操作の代わりに、実施例4で作製した抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液を2.0mL添加し、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後4~5分目における1分間当たりの吸光度変化を求めた。

【0030】別途、血清または血漿を検体とした市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用いて前記検体を検定して検量線を作成した。この場合、図3の符号h, iで示すように、良好な感度の検量線が得られた。

【0031】〔実施例6〕：CRPの測定方法2

前記実施例4で用いた抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液の代わりに、市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用い、溶血試薬として0.5W/V%サボニン水溶液を用いる以外は実施例4と同様の測定方法により、波長800nmにおける反応開始後4~5分目における1分間当たりの吸光度変化を求め、事前に作成した検量線より、全血を検体としたこの発明の分析値と血清を検体とした分析値との相関試験(n=40)を実施したところ、図8に示すように、良好な結果が得られた。

【0032】〔実施例7〕：ヘマトクリット補正

前記実施例6において、この発明による分析値に関して、測定した全血検体を同時に血球カウンタ(例えば堀場製作所製：LC-240A)によって、そのヘマトクリット値を測定し、

【0034】

【発明の効果】この発明は、以上のような形態で実施され、以下のような効果を奏する。

【0035】第1の発明によれば、全血被検液を遠心分離操作などの前処理を行うことなく、直接、全血被検液を用いることができるので、測定時間の短縮、測定コストの低減および測定操作の簡略化が図れる。そして、検査要員が血液に接触する機械が少なく済み、感染への危険性が大幅に低減される。

【0036】そして、第2の発明によれば、ヘマトクリット補正を行うことにより、精度の優れたデータを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明方法で用いるセルの一例を示す斜視図である。

【図2】この発明方法で用いる分光光度計の構成を概略的に示す図である。

【図3】この発明方法で用いる凍結セルホルダーの一例を示す斜視図である。

【図4】この発明方法で用いる用いる超音波ノズルの一例を示す斜視図である。

【図5】各種の溶血試薬水溶液を用いて全血を溶血させ*

*た試料の波長300~1000nmにおける吸収スペクトルを示す図である。

【図6】各種の溶血試薬水溶液を用いて全血を溶血させた試料の波長800nmにおける溶血反応タイムコースを示す図である。

【図7】CRP測定を行ったときに得られた検量線の一例を示す図である。

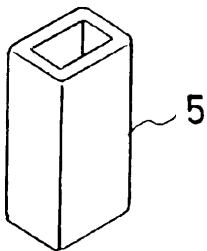
【図8】ヘマトクリット補正を行わないときにおける全血検体と血漿検体との相関関係を示す図である。

10 【図9】ヘマトクリット補正を行ったときにおける全血検体と血漿検体との相関関係を示す図である。

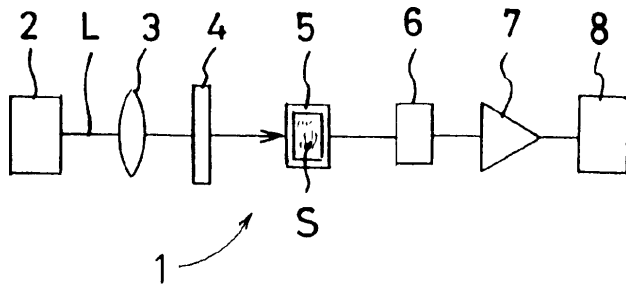
【符号の説明】

B...全血、S...溶血処理を施した全血、L...照射光。

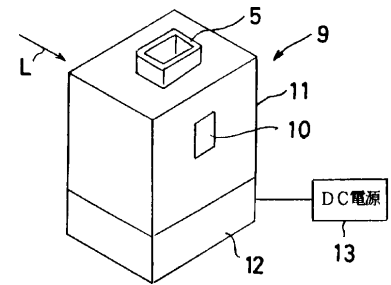
【図1】



【図2】

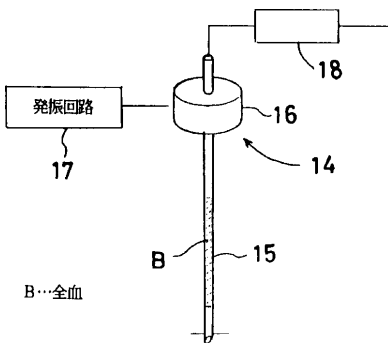


【図3】

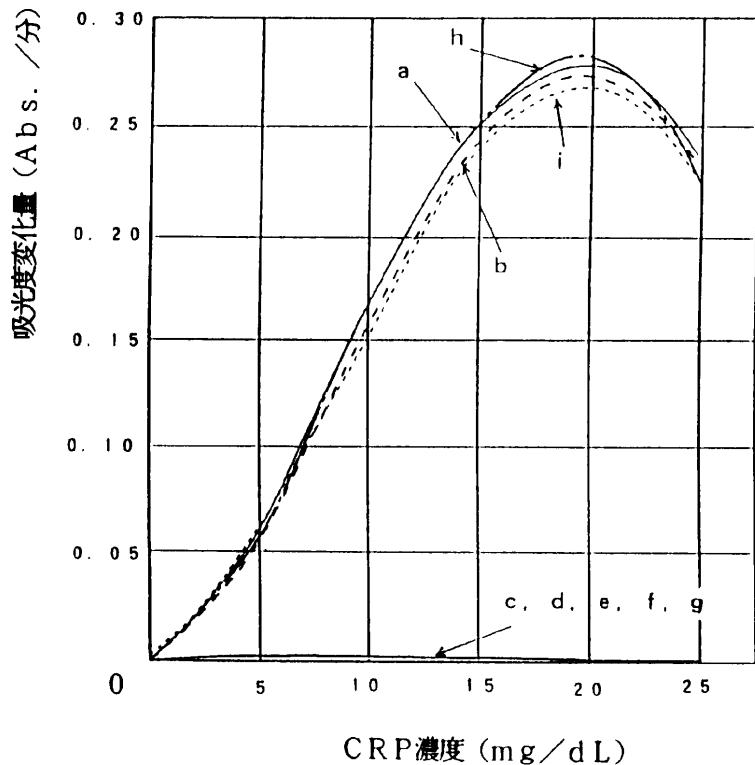


S...溶血処理を施した全血
L...照射光

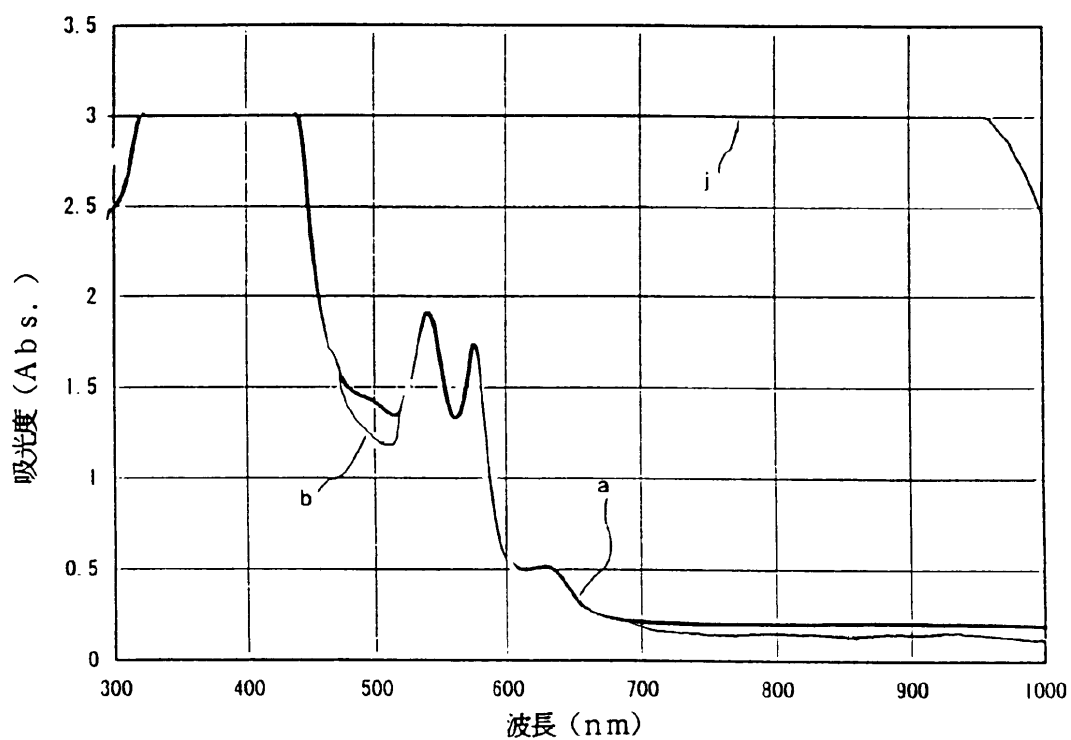
【図4】



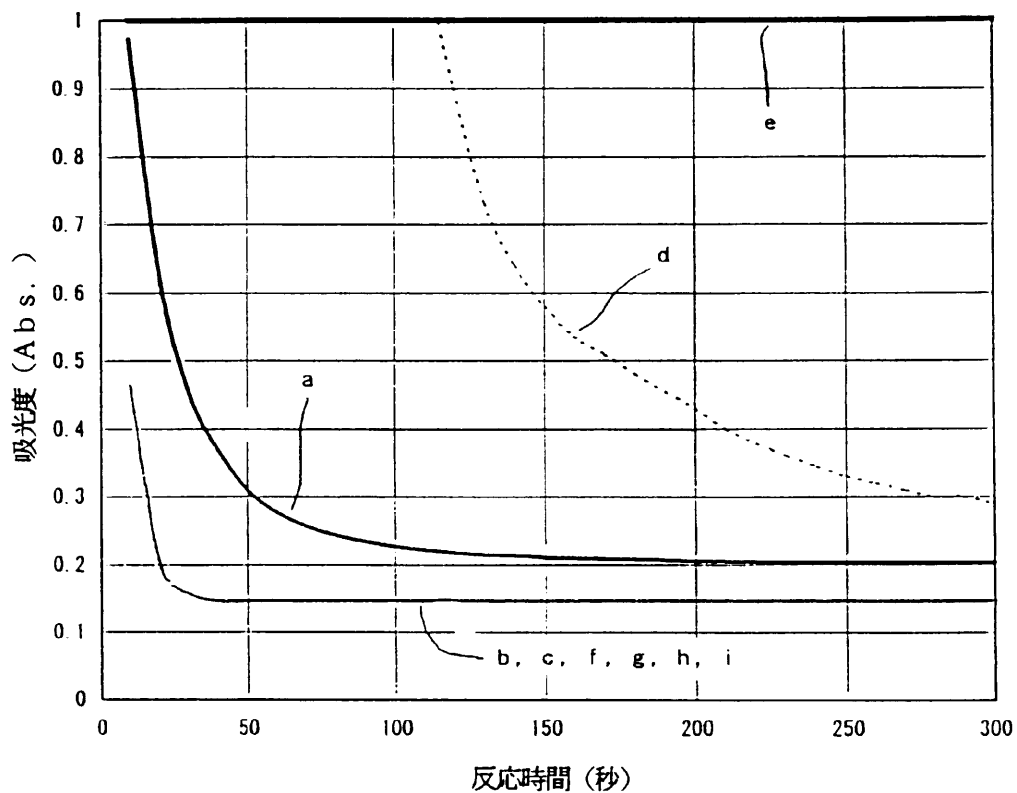
【図7】



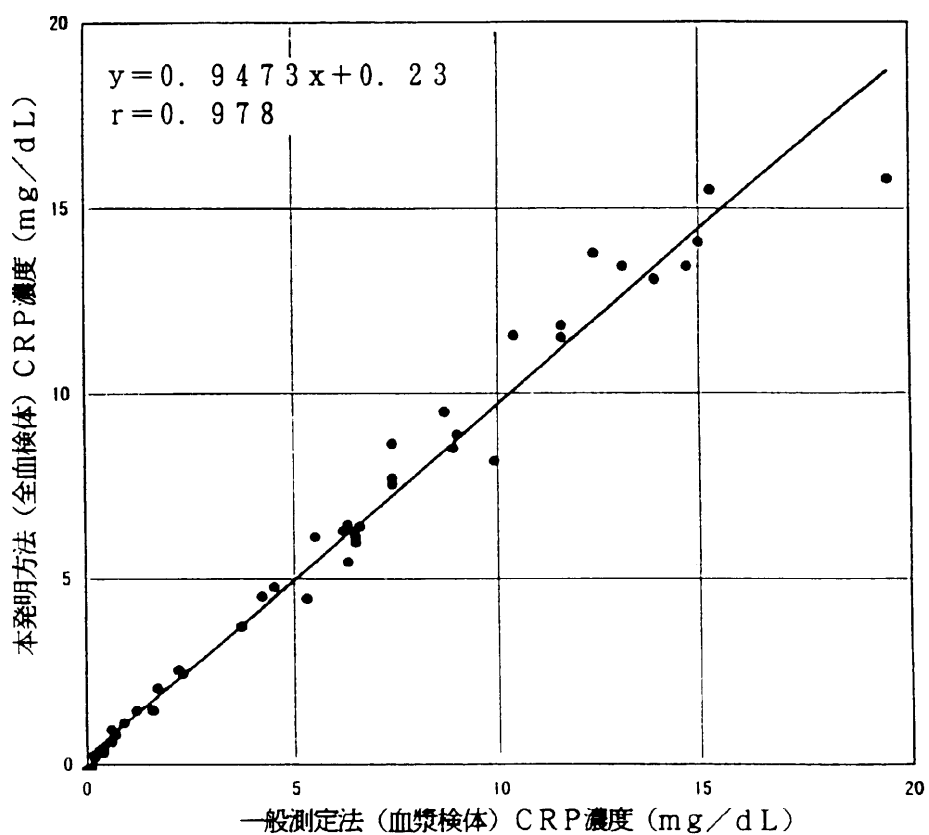
【図5】



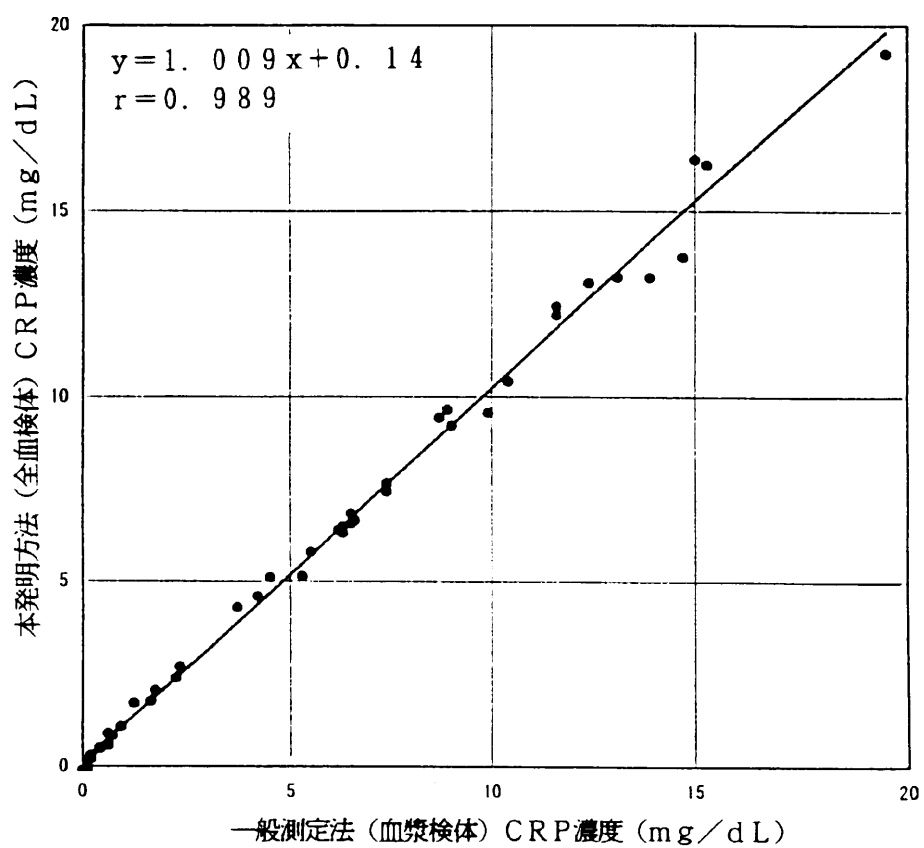
【図6】



【図8】



【図9】



专利名称(译)	免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2001296292A	公开(公告)日	2001-10-26
申请号	JP2001087253	申请日	2001-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
[标]发明人	山尾泰生 奥成博		
发明人	山尾 泰生 奥 成博		
IPC分类号	G01N33/483 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/483.C G01N33/531.B G01N33/543.583 G01N33/543.581.H		
F-TERM分类号	2G045/AA06 2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB18 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/FA25 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/GC10 2G045/GC11		
代理人(译)	藤本秀夫		
其他公开文献	JP3779885B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫测定方法，该方法能够简单，快速地测量血液，而无需使用离心机等对血液进行预处理。 解决方案：让分析物样品中的抗原或与固定了抗原的抗体或不溶性颗粒特异性反应的抗体与分析物样品中的抗原或抗体发生凝集反应，然后用光照射所得的凝集混合物。 在使用全血B作为测试样品来测量吸光度变化或散射光变化的免疫测定方法中，全血被强力溶血。

