

(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2002 - 5936

(P2002 - 5936A)

(43)公開日 平成14年1月9日(2002.1.9)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/536		G 0 1 N 33/536	C 4 B 0 6 3
33/531		33/531	B
33/569		33/569	F
// C 1 2 Q 1/28		C 1 2 Q 1/28	
( C 1 2 Q 1/28		( C 1 2 Q 1/28	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 15数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 190986(P2000 - 190986)

(22)出願日 平成12年6月26日(2000.6.26)

(71)出願人 000131474

株式会社シノテスト

東京都千代田区神田神保町一丁目56番地

(72)発明者 堀池 剛

静岡県清水市有東坂二丁目358番地13号

(72)発明者 浜岡 章

神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号

株式会社シノテスト相模原事業所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ07 QQ22 QQ79

QR02 QR41 QR50 QR51 QR66

QS33 QX01

(54)【発明の名称】 酵素免疫測定法による測定試薬及び測定方法

## (57)【要約】

【目的】 試料中の測定対象物質の測定を、酵素免疫測定法により行うための試薬又は測定方法において、酵素標識物質による酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることにより、分析機器の腐食や実験廃液の処理等の問題を解消し、更に、退色を起こすことなく酵素反応を完全に停止させることにより、正確性を高めた酵素免疫測定法による試料中の測定対象物質の測定試薬及び測定方法を提供する。

【構成】 試料中の測定対象物質の測定を、酵素免疫測定法により行うための測定試薬及び測定方法において、蛋白質変性剤よりなる酵素標識物質による酵素反応の停止剤を含有、又は存在させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の測定対象物質の測定を、酵素免疫測定法により行うための試薬において、蛋白質変性剤よりなる酵素標識物質による酵素反応の停止剤を含むことを特徴とする、酵素免疫測定法による試料中の測定対象物質の測定試薬。

【請求項 2】 蛋白質変性剤が塩酸グアニジン、尿素又はチオシアン酸塩の少なくとも 1 種類である、請求項 1 記載の測定試薬。

【請求項 3】 標識物質が、ペルオキシダーゼである、請求項 1 又は請求項 2 記載の測定試薬。

【請求項 4】 色原体として、(i) 4 - アミノアンチピリン、及び(ii) フェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の測定試薬。

【請求項 5】 測定対象物質が、夏型過敏性肺炎の原因微生物に対する抗体である、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載の測定試薬。

【請求項 6】 夏型過敏性肺炎の原因微生物が、Trichosporon asahii である、請求項 5 記載の測定試薬。

【請求項 7】 試料中の測定対象物質の測定を、酵素免疫測定法により行う測定方法において、酵素標識物質による酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による試料中の測定対象物質の測定方法。

【請求項 8】 蛋白質変性剤が塩酸グアニジン、尿素又はチオシアン酸塩の少なくとも 1 種類である、請求項 7 記載の測定方法。

【請求項 9】 標識物質が、ペルオキシダーゼである、請求項 7 又は請求項 8 記載の測定方法。

【請求項 10】 色原体として、(i) 4 - アミノアンチピリン、及び(ii) フェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用することを特徴とする、請求項 7 ~ 請求項 9 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 11】 測定対象物質が、夏型過敏性肺炎の原因微生物に対する抗体である、請求項 7 ~ 請求項 10 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 12】 夏型過敏性肺炎の原因微生物が、Trichosporon asahii である、請求項 11 記載の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中の測定対象物質の測定を酵素免疫測定法により行うための測定試薬及び測定方法において、標識物質の酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることを特徴とするものである。本発明は、特に化学、生命科学、臨床検査等の分野

において有用なものである。

## 【0002】

【従来の技術】抗原と抗体、糖とレクチン、ヌクレオチド鎖とそれに相補的なヌクレオチド鎖、リガンドとレセプター等の特異的な親和性を有する物質間の反応を利用した試料中に含まれる微量の測定対象物質の測定試薬及び測定方法には種々のものが知られている。

【0003】中でも、抗原と抗体の間の抗原抗体反応（免疫反応）を利用した免疫学的測定方法は広く実施されている。この免疫学的測定方法のうち、抗原又は抗体に酵素、放射性同位元素、又は蛍光色素のような微量の差を識別できる標識物を結合させて、抗原抗体反応の特異性を利用することにより、試料中の抗原又は抗体の存在を免疫学的に測定しようとする標識物による免疫学的測定方法は、比較的短時間に簡便に実施でき、かつ再現性も良いことから汎用されている。

【0004】この標識物による免疫学的測定方法のうち、標識物として酵素を用いるものを酵素免疫測定法（EIA法；Enzyme Immunoassay）という。このEIAは、抗原又は抗体の一方を酵素で標識し、抗原抗体反応の結果を酵素反応に変換して発色させ、抗原又は抗体を定性的又は定量的に測定しようというものである。また、EIA法のうち固相を利用したものをELISA法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）と呼ぶ。これら酵素免疫測定法は、放射性同位元素を標識物質として使用する放射免疫測定法と同等の感度を持ち、放射能汚染の危険性もないため、広く利用されている。

【0005】この酵素免疫測定法では、光学的方法を利用して酵素標識物質の酵素活性を測定する方法が一般的に良く知られている。この光学的方法では標識物質である酵素の触媒活性によって色原体から色素等を生成させ、この生成した色素等の量を測定することにより酵素活性を決定することができる。また、酵素免疫測定法においては、酵素標識物質による酵素反応を停止させた後に、吸光度の測定を行うのが一般的である。

【0006】この酵素反応を停止させるためには、硫酸や塩酸のような強酸、又は水酸化ナトリウムのような強アルカリ液のような物質が一般的に用いられている。

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これら一般的に用いられている酵素反応の停止剤は、分析機器を腐食するおそれもあり、また実験廃液の処理等の問題もあることから、取り扱いには充分注意する必要がある。更に、標識物質としてペルオキシダーゼを用いる場合に、色原体として、4 - アミノアンチピリン、及びフェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用する場合においては、酵素反応の停止剤として硫酸等の強酸を用いると酵素反応の停止後に退色が起こり、測定不能となってしまう。

【0007】本発明は、上記課題に鑑みてなされたもの

であり、酵素標識物質による酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることにより、分析機器の腐食や実験廃液の処理等の問題を解消し、更に、退色を起こすことなく酵素反応を完全に停止させることにより、正確性を高めた酵素免疫測定法による試料中の測定対象物質の測定試薬及び測定方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料中の測定対象物質の測定を、酵素免疫測定法により行うための試薬において、蛋白質変性剤よりなる酵素標識物質による酵素反応の停止剤を含むことを特徴とする、酵素免疫測定法による試料中の測定対象物質の測定試薬である。

【0009】本発明の測定試薬においては、蛋白質変性剤が塩酸グアニジン、尿素又はチオシアン酸塩の少なくとも1種類であることが好適である。

【0010】また、本発明の測定試薬においては、標識物質が、ペルオキシダーゼであることが好適である。

【0011】そして、本発明の測定試薬においては、色原体として、(i) 4 - アミノアンチピリン、及び (ii) フェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用することが好適である。

【0012】更に、本発明の測定試薬においては、測定対象物質が、夏型過敏性肺炎の原因微生物に対する抗体であることが好適である。

【0013】また、本発明の測定試薬においては、夏型過敏性肺炎の原因微生物が、*Trichosporon asahii* であることが好適である。

【0014】また、本発明は、試料中の測定対象物質の測定を、酵素免疫測定法により行う測定方法において、酵素標識物質による酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による試料中の測定対象物質の測定方法である。

【0015】本発明の測定方法においては、蛋白質変性剤が塩酸グアニジン、尿素又はチオシアン酸塩の少なくとも1種類であることが好適である。

【0016】そして、本発明の測定方法においては、標識物質が、ペルオキシダーゼであることが好適である。

【0017】更に、本発明の測定方法においては、色原体として、(i) 4 - アミノアンチピリン、及び (ii) フェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用することが好適である。

【0018】また、本発明の測定方法においては、測定対象物質が、夏型過敏性肺炎の原因微生物に対する抗体であることが好適である。

【0019】更に、本発明の測定方法においては、夏型過敏性肺炎の原因微生物が、*Trichosporon asahii* であることが好適である。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明による試料中の測定対象物質の測定試薬及び測定方法は、酵素免疫測定法により測

定対象物質の測定を行う測定試薬及び測定方法において、酵素標識物質による酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることにより、正確な測定が行えるものである。

【0021】本発明の測定試薬及び測定方法では、酵素標識物質による酵素反応の停止剤を、従来用いられていた硫酸や塩酸等から塩酸グアニジン又は尿素等の蛋白質変性剤に変えることにより、試料中の測定対象物質を正確に測定することができるものである。特に、酵素反応停止後の退色を防止し、正確な測定が行えるものである。

【0022】本発明の測定試薬及び測定方法において、試料中の測定対象物質の測定を行う際の手順は、公知の酵素免疫測定法の手順に準じて行えばよい。

【0023】この操作の手順であるが、測定対象物質が抗体であり、サンドイッチ法により測定を行う場合を例に取り、以下説明を行う。

【0024】『「測定対象物質である抗体と結合することができる物質」(例えば、測定対象物質である抗体にとっての抗原、又はこの抗原の抗原決定基を有する物質等)』を担体に固定化させたものを調製する。

【0025】次に、この担体の「測定対象物質である抗体と結合することができる物質」を固定化した部分に一定量の試料を添加して一定時間接触させる。

【0026】これにより、試料中に測定対象物質が存在する場合には、「測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質 - 担体」の結合を形成させる。

【0027】この添加・接触と同時に、若しくは一定時間のうちに、又は洗浄の後に、「測定対象物質である抗体と結合することができる物質」であって前記の「測定対象物質である抗体と結合することができる物質」と同一又は異なる物質(例えば、抗体、又は抗原等)に酵素標識物質を結合させたもの(「酵素標識結合物質」)の一定量を、この担体の「測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質」を固定化した部分に添加して一定時間接触させる。

【0028】この操作により、試料中に測定対象物質である抗体が存在する場合には、「酵素標識結合物質 - 測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質 - 担体」の結合を形成させる。

【0029】その後、担体に結合していない未結合の「酵素標識結合物質」を洗浄分離する。(B/F分離)

【0030】次に、この担体の「酵素標識結合物質 - 測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質 - 担体」の部分に色原体を添加し、酵素標識(結合)物質による酵素反応によってこの色原体から色素を生成させる。

【0031】その後、この担体に蛋白質変性剤より

なる酵素標識（結合）物質による酵素反応の停止剤の一定量を添加して、酵素反応を停止させる。

【0032】そして、この生成した色素の量（濃度）を測定することにより、「酵素標識結合物質 - 測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質 - 担体」の結合により担体に結合した酵素標識結合物質の酵素活性の測定を行い、これにより試料中の測定対象物質の測定を行う。

【0033】この測定においては、担体と酵素標識結合物質が試料中の測定対象物質等を介して、「酵素標識結合物質 - 測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質 - 担体」と結合するので、担体に間接的に結合した酵素標識結合物質の量を測定することにより試料中に含まれていた測定対象物質の有無、又は量を測定することができるものである。

【0034】「酵素標識結合物質 - 測定対象物質 - 測定対象物質である抗体と結合することができる物質 - 担体」の結合により担体に結合した酵素標識結合物質の酵素活性の測定については、例えば、標識物質としてペルオキシダーゼを用い、色原体として、(i) 4 - アミノアンチピリン、及び(ii) フェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用する場合には、過酸化水素を存在させて反応させ、色原体よりロイコ型色素を生成させて、その生成したロイコ型色素の量を吸光度を測るなどの光学的方法等により測定を行えばよい。

【0035】本発明の測定方法及び測定試薬において用いられる酵素反応の停止剤は、蛋白質変性剤よりなるものである。また、本発明の測定方法及び測定試薬においては、蛋白質変性剤のみを酵素反応の停止剤として使用しても良いし、蛋白質変性剤と副成分を組み合わせたものを酵素反応の停止剤として使用してもよい。

【0036】なお、本発明の測定方法及び測定試薬において反応停止剤として用いられる蛋白質変性剤としては、例えば、塩酸グアニジン、尿素又はチオシアン酸塩等を用いることが好ましい。ここで、反応停止剤として塩酸グアニジンを用いる場合は、最終濃度で 2 M 以上、好ましくは 4 M 以上の濃度となるように添加することにより、酵素反応を確実に停止させることができる。また、反応停止剤として尿素を用いる場合は、最終濃度で 2 M 以上、好ましくは 4 M 以上の濃度となるように添加することにより、酵素反応を確実に停止させることができる。また、蛋白質変性剤は、1 種類のみを使用しても 2 種類以上を組み合わせ使用してもよい。

【0037】本発明の測定方法及び測定試薬において用いられる標識物質としては、例えば、ペルオキシダー

ゼ、アルカリホスファターゼ、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等を挙げることができる。

【0038】なお、本発明の測定方法及び測定試薬においては、標識物質としてペルオキシダーゼを用いることが好ましい。ここで、ペルオキシダーゼとしては、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、西洋ワサビなどの植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したものを等を用いることができる。また、ペルオキシダーゼの使用濃度は、160 ~ 640 purpurogallin mU / ml の濃度範囲で用いることが好ましい。

【0039】本発明の測定方法及び測定試薬において用いられる色原体としては、例えば、4 - アミノアンチピリン及びフェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体の組み合わせ、3 - メチル - 2 - ベンゾチアゾリンヒドラゾン及びアニリン誘導体の組み合わせ、2, 2' - アジノビス(3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸)、トリフェニルメタン系ロイコ色素、ジフェニルアミン誘導体、ベンジジン誘導体、トリアリルイミダゾール誘導体、ロイコメチレンブルー誘導体又は - フェニレンジアミン誘導体等を挙げることができる。

【0040】ここでフェノールの誘導体としては、例えば、4 - クロロフェノール、2, 4 - ジクロロフェノール、2, 4 - ジブロモフェノール、若しくは 2, 4, 6 - トリクロロフェノール、又はこれらの塩等を挙げることができる。

【0041】また、アニリン誘導体としては、例えば、N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン(HDAOS)、N - スルホプロピル - 3, 5 - ジメトキシアニリン(HDAPS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシアニリン(DAOS)、N - エチル - N - スルホプロピル - 3, 5 - ジメトキシアニリン(DAPS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメトキシ - 4 - フルオロアニリン(FDAOS)、N - エチル - N - スルホプロピル - 3, 5 - ジメトキシ - 4 - フルオロアニリン(FDAPS)、N - (2 - カルボキエチル) - N - エチル - 3, 5 - ジメトキシアニリン(CEDB)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3 - メトキシアニリン(ADOS)、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) - 3 - メトキシアニリン(ADPS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) アニリン(ALOS)、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) アニリン(ALPS)、N - (3 - スルホプロピル) アニリン(HALPS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメチルアニリン(MAOS)、N - エチル - N - (3 - スルホプロピル) - 3, 5 - ジメチルアニリン(MAPS)、N - エチル - N - (2 - ヒドロ

キシ - 3 - スルホプロピル) - 3 - メトキシアニリン (TOOS)、N - (2 - カルボキシエチル) - N - エチル - 3 - メチルアニリン (CEMB)、若しくは N - (2 - カルボキシエチル) - N - エチル - 3 - メトキシアニリン (CEMO)、又はこれらの塩等を挙げることができる。

【0042】また、トリフェニルメタン系ロイコ色素としては、例えば、ロイコマラカイトグリーン、ビス(p - ジエチルアミノフェニル) - 2 - スルホニルメタン又はビス(p - ジエチルアミノフェニル) - 3, 4 - ジスルホプロポキシフェニルメタン・ジナトリウム塩等を挙げることができる。

【0043】更に、ジフェニルアミン誘導体としては、例えば、ビス[4 - ジ(2 - プトキシエチル)アミノ - 2 - メチルフェニル]アミン又はN, N - ビス(4 - )ジエチルアミノ - 2 - メチルフェニル) - N' - p - トルエンスルホニル尿素等を挙げることができる。

【0044】また、ロイコメチレンブルー誘導体としては、例えば、10 - (カルボキシメチルアミノカルボニル) - 3, 7 - ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン・ナトリウム塩又は10 - [3 - (メトキシカルボニルアミノメチル)フェニルメチルアミノカルボニル] - 3, 7 - ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン等を挙げることができる。

【0045】更に、ベンジジン誘導体としては、例えば、ベンジジン、 - トリジン、 - ジアニジジン、3, 3' - ジアミノベンジジン又は3, 3', 5, 5' - テトラアミノベンジジン等を挙げることができる。

【0046】また、トリアリルイミダゾール誘導体としては、例えば、2 - (4 - カルボキシフェニル) - 3 - N - メチルカルバモイル - 4, 5 - ビス(4 - ジエチルアミノフェニル)イミダゾール又は2 - (3 - メトキシ - 4 - ジエチルアミノフェニル) - 3 - N - メチルカルバモイル - 4, 5 - ビス(2 - メチル - 4 - ジエチルアミノフェニル)イミダゾール等を挙げることができる。

【0047】また、本発明の測定方法及び測定試薬においては、色原体として、(i) 4 - アミノアンチピリン、及び(ii)フェノール若しくはその誘導体又はアニリン誘導体のいずれか一方を使用することが好ましい。

【0048】また、色原体の使用濃度については、4 - アミノアンチピリンは0.1 ~ 10 mMの濃度範囲で使用することが好ましく、またフェノール若しくはその誘導体、又はアニリン誘導体は、6 ~ 300 mMの濃度範囲で使用することが好ましい。

【0049】本発明の測定方法及び測定試薬は、例えば、サンドイッチ法、又は競合法等の手法により行うことができる。

【0050】また、本発明の測定方法及び測定試薬は、例えば、1ステップ法、又は2ステップ法等の手法によ

り行うことができる。

【0051】また、本発明の測定方法及び測定試薬においては、担体として磁性体よりなる物質又は磁性体を含む物質を用い、これに磁力を作用させて、B/F分離を磁気的に行うこともできる。

【0052】本発明の測定方法及び測定試薬において、担体としては、抗原又は抗体等を固定化することができる担体であれば、その種類、材質、形状等を特に限定することなく使用することができる。

【0053】これは、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、又は蛍光免疫測定法などの標識物質を用いた免疫測定法等において、一般的に測定に用いられている担体については、問題なく用いることができる。

【0054】例えば、ポリスチレン、ポリカーボネイト、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子、マイクロカプセル、ビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック又は試験片等の担体を用いることができる。

【0055】また、前記の担体を強磁性体で被覆又は担体成型時に強磁性体含有させて調製した磁性担体等を用いることもできる。

【0056】酵素標識物質を、抗原又は抗体等に結合させる方法は、化学的結合法等の公知の方法を用いることができる。

【0057】この化学的結合法により行う場合には、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」、臨床病理刊行会、1983年、日本生化学会編「新化学実験講座1 タンパク質IV」、東京化学同人、1991年等に記載の公知の方法に従い、酵素標識物質と、抗原又は抗体等を、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、酵素標識物質と、抗原又は抗体等のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、SH基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより結合を行うことができる。

【0058】担体に、抗原又は抗体等を固定化させる方法は、物理的吸着法又は化学的結合法等の公知の方法を用いることができる。

【0059】物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、緩衝液等に溶解した抗原若しくは抗体等を、担体の固定化したい部分に添加し接触させたり、又は、抗原若しくは抗体等と担体を、緩衝液等の溶液中で混合し接触させること等により行うことができる。

【0060】例えば、緩衝液等に溶解した抗原若しくは

抗体等を、担体の固定化したい部分に添加し接触させ、又は、抗原若しくは抗体等と担体を、緩衝液等の溶液中で混合し接触させ、これを約2～約40で約10分～約1日間行う。

【0061】また、化学的結合法により行う場合には、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」、臨床病理刊行会、1983年、日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」、東京化学同人、1991年等に記載の公知の方法に従い、担体又は担体の固定化したい部分と、抗原又は抗体等を、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、担体、担体の固定化したい部分、又は抗原若しくは抗体等のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、SH基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより固定化を行うことができる。

【0062】更に、非特異的反応を抑制するために処理を行う必要があれば、抗原又は抗体等を固定化させた担体のこの固定化した部分を、BSA、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミン若しくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、ブロッキング処理(マスキング処理)を行ってもよい。

【0063】酵素標識物質を結合させた抗原若しくは抗体、又は測定対象物質等を溶解させる溶液、あるいは試料の希釈液については、各種水系溶媒を用いることができる。

【0064】例えば、精製水、生理食塩水又はトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液、リン酸緩衝液若しくはリン酸緩衝生理食塩水などの各種緩衝液等の水系溶媒を用いることができる。なお、この緩衝液のpHについては、pH3～12の範囲内にあることが好ましい。

【0065】この緩衝液としては、例えば、MES、Bis-Tris、Bis-Trisプロパン、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、MOPS、BES、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPISO、HEPES、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、リン酸、リン酸塩、ホウ酸、ホウ酸塩、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、又はトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン[Tris]などの緩衝剤の水溶液等を挙げることができる。

【0066】また、酵素標識物質を結合させた抗原若しくは抗体、又は測定対象物質等を溶解させる溶液、あるいは試料の希釈液には、BSA、ヒト血清アルブミン、カゼイン若しくはその塩などのタンパク質、塩化ナトリウムなどの各種塩類、各種糖類、脱脂粉乳、正常ウサギ血清などの各種動物血清、免疫動物の体液若しくはその

成分、遺伝子組み替え体宿主生物に由来する成分、アジ化ナトリウムなどの各種防腐剤又は非イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤若しくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等を適宜添加して用いることができる。

【0067】そして、これらを添加する際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001～10%(W/V)が好ましく、特に0.01～5%(W/V)が好ましい。

【0068】なお、この各種界面活性剤としては、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、デカグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステロール、フィトスタノール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、硬化ヒマシ油若しくはポリオキシエチレンラノリンなどの非イオン性界面活性剤、酢酸ベタインなどの両性界面活性剤又はポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩若しくはポリオキシエチレンアルキルエーテル酢酸塩などの陰イオン性界面活性剤等を挙げることができる。

【0069】本発明の測定試薬及び測定方法における測定対象物質としては、タンパク質、糖質、脂質、核酸のような有機物質、無機物質等の生体関連物質であればいずれのものでもよい。具体的には、夏型過敏性肺炎の原因微生物に対する抗体、大腸菌O157抗原、抗トレポネマ・パリダム(TP)抗体、抗マイコプラズマ抗体、抗ストレプトリジンO抗体(ASO)等の細菌関連の抗原又は抗体；HBs抗原、抗HBs抗体、HBe抗原、抗HBe抗体、抗HBc抗体、抗HCV抗体、抗HIV抗体、抗ATLV抗体等のウイルス関連の抗原又は抗体；免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンM(IgM)、若しくは免疫グロブリンE(IgE)等の免疫グロブリン；C反応性タンパク質(CRP)、1-酸性糖タンパク質、ハプトグロビン、補体C3、補体C4、リウマトイド因子等の炎症マーカー；フェトプロテイン、CEA、CA19-9等の腫瘍マーカー；ヒト胎盤絨毛性ゴナドトロピン等のホルモン；アレルゲン、アレルゲン特異IgE抗体等のアレルギー関連の抗原又は抗体；抗トロンビンIIII(ATIIII)等の血液凝固系関連物質；フィブリン分解物質(FDP)、Dダイマー等の線溶系関連物質；ABO式血液型抗体、不規則抗体等の血液型関連の抗原又は抗体；ウイルスのDNA又はRNA；細菌のDNA又はRNA；ヒト等の動物若しくは植物のDNA又はRNA；リポタンパク質(a)、フェリチン等の他の疾病に関連した物質；薬物；金属；毒物又は劇物等

を例示することができる。

【0070】また、本発明の測定試薬及び測定方法においては、測定対象物質が夏型過敏性肺炎の原因微生物に対する抗体であることが好ましい。特に、本発明の測定試薬及び測定方法においては、測定対象物質が、夏型過敏性肺炎の原因微生物である「*Trichosporon asahii*」に対す抗体であることが好ましい。

【0071】本発明において、試料としては、前記の測定対象物質が存在する可能性があり、かつその測定対象物質の存在の有無の確認又は場合によっては定量を行おうとする液状のものをいう。

【0072】例えば、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、精液、髄液、唾液、汗、涙、腹水、羊水等の体液；ヒト若しくは動物の脳等の臓器、毛髪、皮膚、爪、筋肉、又は神経組織等の抽出液；ヒト又は動物の糞便の抽出液又は懸濁液；細胞或いは菌体の抽出液；植物の抽出液；穀物、野菜、果物、魚介類、肉類又は加工食品等の食品、水、茶、コーヒー、牛乳、又は果汁等の飲料、そして、飲料水、河川水、湖沼水、海水、又は土壤の懸濁液等の環境分析用試料等が挙げられる。

【0073】

【比較例】

【0074】酵素反応の停止剤として従来より使用されている硫酸を用い、ヒト血清試料中のIgGを測定した場合の酵素反応の停止効果を確認した。

【0075】(1) 試薬の調製

リン酸等張化緩衝液の調製

精製水約80mlに、リン酸水素二ナトリウム・十二水の0.29g、リン酸二水素カリウムの0.02g、塩化ナトリウムの0.8g、及び塩化カリウムの0.02gを加えて溶解し、精製水で全量100mlとして、リン酸等張化緩衝液を調製した。

【0076】ブロッキング液の調製精製水約80mlに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.605

g、塩化ナトリウムの0.88gを加えて溶解した後、塩酸を加えてpH8.3に調整した。更に、カゼインナトリウムの0.5g、アジ化ナトリウムの0.2gを加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0077】洗浄液の調製

精製水の約80mlに、リン酸水素二ナトリウム・十二水の0.29g、リン酸二水素カリウムの0.02g、塩化ナトリウムの0.8g、塩化カリウムの0.02g、Tween20(界面活性剤)の0.05gを加えて溶解し、精製水で全量100mlとした。

【0078】POD標識抗体希釈液

精製水の約80mlに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.605g、塩化ナトリウムの0.88g、ラクトース・一水和物の1.0gを加えて溶解し、塩酸を加えてpH8.0に調整した。更に、カゼインナ

トリウムの0.5g、硫酸ゲンタマイシンの0.01gを加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0079】(2) 酵素反応の停止効果検討のための測定

IgG濃度が1,000mg/dlのヒト血清を、リン酸等張化緩衝液で希釈し、IgG濃度が各々100ng/ml、1000ng/mlになるように調製した。また、試薬ブランク用の試料として、精製水を使用した。これらをマイクロプレートのウェルに各100μlずつ分注し、その後4で一晩放置して、ヒトIgGを各ウェルの内壁に固定化させた。

【0080】次に、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。その後、各ウェルにブロッキング液を200μlずつ分注して、各ウェルのブロッキングを行った。そして、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。以上の操作により調製したものを、ヒトIgG結合マイクロプレートとした。

【0081】(2) 酵素反応の停止効果検討のための測定

上記のヒトIgG結合マイクロプレートの各ウェルに、POD標識抗体希釈液で2,000倍に希釈したPOD標識抗ヒトIgG抗体溶液(Sigma社製；A0170、Fc specific)を各ウェルに100μlずつ添加し、37で1時間反応させた。次いで、各ウェルを洗浄液にて洗浄した。

【0082】この後、色原体液〔1mM 4-アミノアンチピリン、20mM フェノール、及び0.006% 過酸化水素を含む0.1M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.0)〕を各ウェルに添加し、37で1時間反応させた。

【0083】この反応の後、酵素反応の停止剤として4Nの硫酸水溶液を、各ウェルに添加した。また、4Nの硫酸水溶液の代わりに精製水を添加したものを対照とした。なお、前記の色原体液及び酵素反応の停止剤である4Nの硫酸水溶液又は精製水の各々の添加量は、以下の通りとした。

a) 硫酸最終濃度0.8M：色原体液150μlに対して、4Nの硫酸水溶液100μl

b) 対照：色原体液150μlに対して、精製水100μl

その後、マイクロプレートリーダー(バイオラッド社製；3550型)を用いて4Nの硫酸水溶液又は精製水の添加直後、10分後、20分後、30分後、40分後、50分後、及び60分後の各ウェルの吸光度(主波長490nm、副波長655nm)を測定した。

【0084】(3) 酵素反応の停止結果

精製水試料(試薬ブランク)の吸光度、及びヒトIgG試料(2種類)については、試薬ブランクの吸光度を差し引いた後の吸光度を表1に示した。

【0085】

\* \* 【表1】

a) 4N硫酸

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.014	0.011	0.009	0.004	0.008	0.011	0.003
	試料(100ng/ml)	0.008	0.006	0.006	0.005	0.005	0.004	0.005
	試料(1000ng/ml)	0.004	0.011	0.007	0.008	0.007	0.000	0.007

b) 対照(精製水)

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.003	0.005	0.004	0.006	0.005	0.011	0.005
	試料(100ng/ml)	0.571 (100%)	0.595 (104.2%)	0.621 (108.8%)	0.634 (111.0%)	0.654 (114.5%)	0.672 (117.7%)	0.688 (120.5%)
	試料(1000ng/ml)	0.787 (100%)	0.821 (104.3%)	0.858 (109.0%)	0.887 (112.7%)	0.912 (115.9%)	0.934 (118.7%)	0.963 (122.4%)

【0086】ヒトIgG試料(2種類)及び精製水試料(試薬ブランク)の測定結果を示した表1において、精製水を添加したものに比べ、硫酸水溶液を添加したものは、すぐに退色が起こり測定不能となってしまうことが分かる。また、硫酸水溶液の代わりに精製水を添加したもの(対照)においては、退色は起こっていないが、時間を追うごとに吸光度が上昇しており、酵素反応が進行してしまっていることが分かる。

【0087】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0088】〔実施例1〕

【0089】本発明による酵素反応の停止剤として塩酸グアニジンを用い、ヒト血清試料中のIgGを測定した場合の酵素反応の停止効果を確かめた。

【0090】(1) 試薬の調製

リン酸等張化緩衝液の調製

精製水約80mlに、リン酸水素二ナトリウム・十二水の0.29g、リン酸二水素カリウムの0.02g、塩化ナトリウムの0.8g、及び塩化カリウムの0.02gを加えて溶解し、精製水で全量100mlとして、リン酸等張化緩衝液を調製した。

【0091】 ブロッキング液の調製

精製水約80mlに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.605g、塩化ナトリウムの0.88gを加えて溶解した後、塩酸を加えてpH8.3に調整した。更に、カゼインナトリウムの0.5g、アジ化ナトリウムの0.2gを加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0092】 洗浄液の調製

精製水の約80mlに、リン酸水素二ナトリウム・十二水の0.29g、リン酸二水素カリウムの0.02g、

塩化ナトリウムの0.8g、塩化カリウムの0.02g、Tween20(界面活性剤)の0.05gを加えて溶解し、精製水で全量100mlとした。

【0093】 POD標識抗体希釈液

精製水の約80mlに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.605g、塩化ナトリウムの0.88g、ラクトース・一水和物の1.0gを加えて溶解し、塩酸を加えてpH8.0に調整した。更に、カゼインナトリウムの0.5g、硫酸ゲンタマイシンの0.01gを加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0094】(2) 酵素反応の停止効果検討のための測定

IgG濃度が1,000mg/dlのヒト血清を、リン酸等張化緩衝液で希釈し、IgG濃度が各々100ng/ml、1000ng/mlになるように調製した。また、試薬ブランク用の試料として、精製水を使用した。これらをマイクロプレートのウェルに各100μlずつ分注し、その後4で一晩放置して、ヒトIgGを各ウェルの内壁に固定化させた。

【0095】次に、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。その後、各ウェルにブロッキング液を200μlずつ分注して、各ウェルのブロッキングを行った。そして、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。以上の操作により調製したものを、ヒトIgG結合マイクロプレートとした。

【0096】上記のヒトIgG結合マイクロプレートの各ウェルに、POD標識抗体希釈液で5,000倍に希釈したPOD標識抗ヒトIgG抗体溶液(Sigma社製;A0170、Fc specific)を100μlずつ添加し、37で1時間反応させた。次いで、各ウェルを洗浄液にて洗浄した。

【0097】この後、色原体液〔1mM 4 - アミノア  
ンチピリン、20mM フェノール、及び0.006%  
過酸化水素を含む0.1M トリス(ヒドロキシメチ  
ル)アミノメタン - 塩酸緩衝液(pH8.0)〕を各ウ  
ェルに添加し、37℃で1時間反応させた。

【0098】この反応の後、本発明での酵素反応の停止  
剤である塩酸グアニジン水溶液を、最終濃度で2M、4  
M、5.3Mとなるように各ウェルに添加した。また、  
塩酸グアニジン水溶液の代わりに精製水を添加したもの  
を対照とした。なお、前記の色原体液及び酵素反応の停  
止剤である塩酸グアニジン水溶液又は精製水の各々の添  
加量は、塩酸グアニジンの最終濃度に応じて以下の通り  
とした。

a) 塩酸グアニジン最終濃度2M：色原体液150μl  
に対して、4Mの塩酸グアニジン水溶液150μl

b) 塩酸グアニジン最終濃度4M：色原体液150μl  
に対して、8Mの塩酸グアニジン水溶液150μl

a) 2M塩酸グアニジン

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸 光 度  (Abs.)	試薬ブランク	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.004
	試料(100ng/ml)	0.574 (100%)	0.582 (101.4%)	0.592 (103.1%)	0.606 (105.6%)	0.604 (105.2%)	0.608 (105.9%)	0.816 (108.0%)
	試料(1000ng/ml)	0.834 (100%)	0.854 (102.4%)	0.858 (102.9%)	0.878 (105.3%)	0.876 (105.0%)	0.890 (106.7%)	0.889 (106.6%)

b) 4M塩酸グアニジン

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸 光 度  (Abs.)	試薬ブランク	0.009	0.001	0.003	0.006	0.010	0.006	0.005
	試料(100ng/ml)	0.576 (100%)	0.585 (101.6%)	0.585 (101.6%)	0.585 (101.6%)	0.587 (101.9%)	0.589 (102.3%)	0.586 (101.7%)
	試料(1000ng/ml)	0.919 (100%)	0.930 (101.2%)	0.936 (101.8%)	0.929 (101.1%)	0.939 (102.2%)	0.939 (102.2%)	0.942 (102.5%)

\* c) 塩酸グアニジン最終濃度5.3M：色原体液100  
μlに対して、8Mの塩酸グアニジン水溶液200μl  
d) 対照：色原体液150μlに対して、精製水150  
μl

その後、マイクロプレートリーダー(バイオラッド社  
製; 3550型)を用いて各濃度の塩酸グアニジン水溶  
液又は精製水の添加直後、10分後、20分後、30分  
後、40分後、50分後、及び60分後の各ウェルの吸  
光度(主波長490nm、副波長655nm)を測定し  
た。

【0099】(3) 酵素反応の停止効果  
精製水試料(試薬ブランク)の吸光度、及びヒトIgG  
試料(2種類)については、試薬ブランクの吸光度を差  
し引いた後の吸光度の測定結果を表2及び表3に示し  
た。

【0100】

【表2】

【0101】

【表3】

## c) 5. 3M塩酸グアニジン

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.001	0.007	0.010	0.010	0.008	0.015	0.013
	試料(100ng/ml)	0.647 (100%)	0.641 (99.1%)	0.647 (100%)	0.643 (99.4%)	0.645 (99.7%)	0.645 (99.7%)	0.647 (100%)
	試料(1000ng/ml)	0.992 (100%)	0.987 (99.5%)	0.985 (99.3%)	0.995 (100.3%)	0.999 (99.7%)	0.987 (99.5%)	0.987 (99.5%)

## d) 対照(精製水)

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.003	0.005	0.004	0.008	0.005	0.011	0.005
	試料(100ng/ml)	0.571 (100%)	0.595 (104.2%)	0.621 (108.8%)	0.634 (111.0%)	0.654 (114.5%)	0.672 (117.7%)	0.688 (120.5%)
	試料(1000ng/ml)	0.787 (100%)	0.821 (104.3%)	0.858 (109.0%)	0.887 (112.7%)	0.912 (115.9%)	0.934 (118.7%)	0.963 (122.4%)

【0102】ヒトIgG試料(2種類)及び精製水試料(試薬ブランク)の測定結果を示した表2及び表3において、酵素反応の停止剤として塩酸グアニジン水溶液を添加した場合、塩酸グアニジンの最終濃度が2M、4M、5.3Mのいずれにおいても、停止剤添加後60分を経過しても吸光度が変化していないか又はごくわずかに変化しておらず、酵素反応の進行を停止できていることが分かる。特に、塩酸グアニジンの最終濃度が4M以上の場合は、効果が顕著である。つまり、停止剤添加後時間が経ってから吸光度を測定しても、測定対象物質を正確に測定できていることが分かる。これに対して、塩酸グアニジンの代わりに精製水を添加したもの(対照)においては、時間を追うごとに吸光度が上昇しており、酵素反応が進行してしまっていることが分かる。

【0103】また、酵素反応の停止剤として塩酸グアニジン水溶液を添加した場合、試料が水である試薬ブランクの吸光度は小さく、また、この吸光度も長時間安定であり、測定対象物質の正確な測定に適していることが分かる。

【0104】このことにより、本発明による測定は、酵素反応の停止剤として塩酸グアニジンを用いることにより、酵素反応の進行を完全に停止することができ、かつ酵素反応停止後の退色を防止し、正確な測定が行えるものであることが分かる。

## 【0105】〔実施例2〕

【0106】本発明による酵素反応の停止剤として尿素を用い、ヒト血清試料中のIgGを測定した場合の酵素反応の停止効果を確かめた。

## 【0107】(1) 試薬の調製

【0108】前記実施例1と同じ試薬成分、濃度で試薬の調製を行った。

【0109】(2) 酵素反応の停止効果検討のための測定

IgG濃度が1,000mg/dlのヒト血清を、リン酸等張化緩衝液で希釈し、IgG濃度が各々100ng/ml、1000ng/mlになるように調製した。また、試薬ブランク用の試料として、精製水を使用した。これらをマイクロプレートのウェルに各100μlずつ分注し、その後4で一晩放置して、ヒトIgGを各ウェルの内壁に固定化させた。

【0110】次に、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。その後、各ウェルにブロッキング液を200μlずつ分注して、各ウェルのブロッキングを行った。そして、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。以上の操作により調製したものを、ヒトIgG結合マイクロプレートとした。

【0111】上記のヒトIgG結合マイクロプレートの各ウェルに、POD標識抗体希釈液で5,000倍に希釈したPOD標識抗ヒトIgG抗体溶液(Sigma社製;A0170、Fc specific)を100μlずつ添加し、37で1時間反応させた。次いで、各ウェルを洗浄液にて洗浄した。

【0112】この後、色原体液〔1mM 4-アミノアンチピリン、20mM フェノール、及び0.006% 過酸化水素を含む0.1M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.0)〕を各ウェルに添加し、37で1時間反応させた。

【0113】この反応の後、本発明での酵素反応の停止剤である尿素水溶液を、最終濃度で2M、4M、5.3Mとなるように各ウェルに添加した。また、尿素水溶液の代わりに精製水を添加したものを対照とした。なお、前記の色原体液及び酵素反応の停止剤である尿素水溶液又は精製水の各々の添加量は、尿素の最終濃度に応じて以下の通りとした。

a) 尿素水溶液最終濃度2M:色原体液150μlに対

して、4 Mの尿素水溶液150 μl  
 b) 尿素水溶液最終濃度4 M：色原体液150 μlに対して、8 Mの尿素水溶液150 μl  
 c) 尿素水溶液最終濃度5.3 M：色原体液100 μlに対して、8 Mの尿素水溶液200 μl  
 d) 対照：色原体液150 μlに対して、精製水150 μl  
 その後、マイクロプレートリーダー（バイオラッド社製；3550型）を用いて各濃度の尿素水溶液又は精製水の添加直後、10分後、20分後、30分後、40分\*10

\*後、50分後、及び60分後の各ウェルの吸光度（主波長490 nm、副波長655 nm）を測定した。

【0114】(3) 酵素反応の停止効果

精製水試料（試薬ブランク）の吸光度、及びヒトIgG試料（2種類）については、試薬ブランクの吸光度を差し引いた後の吸光度の測定結果を表4及び表5に示した。

【0115】

【表4】

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.000	0.002	0.007	0.006	0.000	0.003	0.002
	試料(100ng/ml)	0.643 (100%)	0.650 (101.1%)	0.654 (101.7%)	0.659 (102.5%)	0.664 (103.3%)	0.671 (104.4%)	0.675 (105.0%)
	試料(1000ng/ml)	1.002 (100%)	1.010 (100.8%)	1.016 (101.4%)	1.028 (102.6%)	1.036 (103.4%)	1.051 (104.9%)	1.059 (105.7%)

b) 4M尿素

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.000	0.009	0.002	0.000	0.007	0.007	0.008
	試料(100ng/ml)	0.642 (100%)	0.635 (98.9%)	0.644 (100.3%)	0.645 (100.5%)	0.649 (101.1%)	0.644 (100.3%)	0.650 (101.2%)
	試料(1000ng/ml)	1.026 (100%)	1.019 (99.3%)	1.029 (100.3%)	1.032 (100.6%)	1.036 (101.0%)	1.038 (101.2%)	1.038 (101.2%)

【0116】

\* \* 【表5】

c) 5.3M尿素

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.006	0.000	0.001	0.005	0.005	0.003	0.003
	試料(100ng/ml)	0.688 (100%)	0.693 (100.7%)	0.691 (100.4%)	0.692 (100.6%)	0.689 (100.1%)	0.693 (100.7%)	0.692 (100.6%)
	試料(1000ng/ml)	1.149 (100%)	1.159 (100.9%)	1.163 (101.2%)	1.164 (101.3%)	1.167 (101.6%)	1.165 (101.4%)	1.166 (101.5%)

d) 対照(精製水)

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.003	0.000	0.000	0.002	0.006	0.003	0.002
	試料(100ng/ml)	0.568 (100%)	0.582 (102.5%)	0.593 (104.4%)	0.611 (107.6%)	0.624 (109.9%)	0.637 (112.1%)	0.650 (114.4%)
	試料(1000ng/ml)	0.956 (100%)	0.981 (102.6%)	1.009 (105.5%)	1.036 (108.4%)	1.065 (111.4%)	1.082 (113.2%)	1.104 (115.5%)

【0117】ヒトIgG試料（2種類）及び精製水試料（試薬ブランク）の測定結果を示した表4及び表5において、酵素反応の停止剤として尿素水溶液を添加したもののについては、尿素水溶液の最終濃度が2 M、4 M、5.3 Mのいずれにおいても、停止剤添加後60分を経

過しても吸光度が変化していないか又はごくわずかしが変化しておらず、酵素反応の進行を停止できていることが分かる。特に、尿素水溶液の最終濃度が4 M以上の場合は効果が顕著である。つまり、停止剤添加後時間が経ってから吸光度を測定しても、測定対象物質を正確に測

定できていることが分かる。これに対して、尿素水溶液の代わりに精製水を添加したもの(対照)においては、時間を追うごとに吸光度が上昇しており、酵素反応が進行してしまっていることが分かる。

【0118】また、酵素反応の停止剤として尿素水溶液を添加した場合、試料が水である試薬ブランクの吸光度は小さく、また、この吸光度も長時間安定であり、測定対象物質の正確な測定に適していることが分かる。

【0119】このことにより、本発明による測定は、酵素反応の停止剤として尿素を用いることにより、酵素反応の進行を完全に停止することができ、かつ酵素反応停止後の退色を防止し、正確な測定が行えるものであることが分かる。

【0120】〔実施例3〕

【0121】本発明による酵素反応の停止剤としてチオシアン酸塩を用い、マウスモノクローナル抗体(IgG)を測定した場合の酵素反応の停止効果を確認した。

【0122】(1)測定試薬の調製

リン酸等張化緩衝液の調製

精製水約80mlに、リン酸水素二ナトリウム・十二水の0.29g、リン酸二水素カリウムの0.02g、塩化ナトリウムの0.8g、及び塩化カリウムの0.02gを加えて溶解し、精製水で全量100mlとして、リン酸等張化緩衝液を調製した。

【0123】ブロッキング液の調製

精製水約80mlに、10mMのリン酸一カリウム・ホウ砂緩衝液、塩化ナトリウムの0.88gを加えて溶解した後、塩酸を加えてpH8.3に調整した。更に、カゼインナトリウムの0.5g、アジ化ナトリウムの0.2gを加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0124】試料希釈液の調製

精製水約80mlに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.605g、塩化ナトリウムの11.68gを加えて溶解し、塩酸を加えてpH8.0に調整した。更に、カゼインナトリウムの0.5g、アジ化ナトリウムの0.2gを加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0125】洗浄液の調製

精製水約80mlに、リン酸水素二ナトリウム・十二水の0.29g、リン酸二水素カリウムの0.02g、塩化ナトリウムの0.8g、塩化カリウムの0.02g、Tween20(界面活性剤)の0.05gを加えて溶解し、精製水で全量100mlとした。

【0126】POD標識抗体希釈液

精製水約80mlに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.605g、塩化ナトリウムの0.88g、ラクトース・一水和物の1.0gを加えて溶解し、塩酸を加えてpH8.0に調整した。更に、カゼインナトリウムの0.5g、硫酸ゲンタマイシンの0.01g

を加えて溶解した後、精製水で全量100mlとした。

【0127】ウサギ抗マウスIgG抗体結合マイクロプレートの調製

【0128】精製ウサギ抗マウスIgG抗体(Cappel, ICN, 55480F, 1.0mg/ml)を、1μg/mlとなるようにリン酸等張化緩衝液に加えた。これをマイクロプレートのウェルに各100μlずつ分注し、その後4で一晩放置して、ウサギ抗マウスIgG抗体を各ウェルの内壁に固定化させた。

【0129】次に、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。その後、各ウェルにブロッキング液を200μlずつ分注して、各ウェルのブロッキングを行った。そして、このマイクロプレートのウェル内の液を除き、洗浄液で2回洗浄を行った。以上の操作により調製したものを、ウサギ抗マウスIgG抗体結合マイクロプレートとした。

【0130】(2)試料の調製

IgG濃度が1.6mg/mlの精製マウスIgGモノクローナル抗体原液に、試料希釈液を添加して、IgG濃度が各々100ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、又は3200ng/mlになるように調製した。また、試薬ブランク用の試料として精製水を使用した。

【0131】(3)測定

マウスIgGモノクローナル抗体試料(4種類)及び精製水試料(試薬ブランク)の各々の100μlを、ウサギ抗マウスIgG抗体結合マイクロプレートのウェルの各々に添加し、37で2時間反応させた。

【0132】その後、これらのウェルを洗浄液にて洗浄した後、POD標識抗体希釈液で1,000倍に希釈したPOD標識抗マウスIgG抗体溶液(DAKO社製; P-0161)を各ウェルに100μlずつ添加し、37で1時間反応させた。次いで、各ウェルを洗浄液にて洗浄した。

【0133】この後、色原体液〔1mM 4-アミノアンチピリン、20mM フェノール、及び0.006% 過酸化水素を含む0.1M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.0)〕を各ウェルに添加し、37で1時間反応させた。

【0134】この反応の後、本発明での酵素反応の停止剤であるチオシアン酸ナトリウム水溶液を、最終濃度で2M、4M、5.3Mとなるように各ウェルに添加した。また、チオシアン酸ナトリウム水溶液の代わりに精製水を添加したものを対照とした。なお、前記の色原体液及び酵素反応の停止剤であるチオシアン酸ナトリウム水溶液又は精製水の各々の添加量は、チオシアン酸ナトリウムの最終濃度に応じて以下の通りとした。

a)チオシアン酸ナトリウム水溶液最終濃度2M:色原体液150μlに対して、4Mのチオシアン酸ナトリウム水溶液150μl

b) チオシアン酸ナトリウム水溶液最終濃度4M：色原体液150 $\mu$ lに対して、8Mのチオシアン酸ナトリウム水溶液150 $\mu$ l

c) チオシアン酸ナトリウム水溶液最終濃度5.3M：色原体液100 $\mu$ lに対して、8Mのチオシアン酸ナトリウム水溶液200 $\mu$ l

その後、マイクロプレートリーダー（バイオラッド社製；3550型）を用いて各濃度のチオシアン酸ナトリウム水溶液又は精製水の添加直後、10分後、20分後、30分後、40分後、50分後、及び60分後の各\*10

a) 2Mチオシアン酸ナトリウム

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.055	0.074	0.082	0.098	0.096	0.101	0.107
	試料(100ng/ml)	0.782 (100%)	0.788 (100.5%)	0.769 (100.9%)	0.748 (98.2%)	0.754 (99.0%)	0.752 (98.7%)	0.744 (97.6%)
	試料(200ng/ml)	1.070 (100%)	1.057 (98.8%)	1.062 (99.3%)	1.053 (98.4%)	1.059 (99.0%)	1.049 (98.0%)	1.042 (97.4%)
	試料(400ng/ml)	1.190 (100%)	1.182 (99.3%)	1.180 (99.2%)	1.172 (98.5%)	1.170 (98.3%)	1.167 (98.1%)	1.161 (97.6%)
	試料(3200ng/ml)	1.408 (100%)	1.457 (103.5%)	1.458 (103.4%)	1.447 (102.8%)	1.450 (103.0%)	1.442 (102.4%)	1.434 (101.8%)

\*ウェルの吸光度（主波長490nm、副波長655nm）を測定した。

【0135】(3) 酵素反応の停止効果

精製水試料（試薬ブランク）の吸光度、及びマウスIgGモノクローナル抗体試料（4種類）については、試薬ブランクの吸光度を差し引いた後の吸光度の測定結果を表6及び表7に示した。

【0136】

【表6】

b) 4Mチオシアン酸ナトリウム

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.052	0.068	0.072	0.083	0.085	0.092	0.097
	試料(100ng/ml)	0.720 (100%)	0.712 (98.9%)	0.710 (98.8%)	0.691 (96.0%)	0.694 (96.4%)	0.694 (96.4%)	0.694 (96.4%)
	試料(200ng/ml)	0.999 (100%)	0.985 (98.6%)	0.984 (98.5%)	0.971 (97.2%)	0.968 (96.9%)	0.959 (96.0%)	0.958 (95.9%)
	試料(400ng/ml)	1.163 (100%)	1.148 (98.7%)	1.134 (97.5%)	1.124 (96.6%)	1.120 (96.3%)	1.113 (95.7%)	1.114 (95.8%)
	試料(3200ng/ml)	1.346 (100%)	1.328 (98.7%)	1.320 (98.1%)	1.303 (96.8%)	1.299 (96.5%)	1.294 (96.1%)	1.290 (95.8%)

【0137】

【表7】

## c) 5. 3Mチオシアン酸ナトリウム

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.045	0.053	0.056	0.065	0.067	0.076	0.081
	試料(100ng/ml)	0.733 (100%)	0.727 (99.2%)	0.727 (99.2%)	0.710 (96.9%)	0.712 (97.1%)	0.708 (96.5%)	0.706 (96.3%)
	試料(200ng/ml)	1.055 (100%)	1.038 (98.4%)	1.040 (98.6%)	1.026 (97.3%)	1.026 (97.3%)	1.013 (96.0%)	1.008 (95.5%)
	試料(400ng/ml)	1.217 (100%)	1.207 (99.2%)	1.193 (98.0%)	1.187 (97.5%)	1.185 (97.4%)	1.175 (96.5%)	1.170 (96.1%)
	試料(3200ng/ml)	1.353 (100%)	1.336 (98.7%)	1.329 (98.2%)	1.315 (97.2%)	1.310 (96.8%)	1.305 (96.5%)	1.298 (95.9%)

## d) 対照(精製水)

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.053	0.050	0.049	0.061	0.055	0.060	0.061
	試料(100ng/ml)	0.838 (100%)	0.865 (103.2%)	0.891 (106.3%)	0.889 (106.1%)	0.918 (109.5%)	0.934 (111.5%)	0.948 (113.1%)
	試料(200ng/ml)	1.183 (100%)	1.212 (102.5%)	1.250 (105.7%)	1.289 (107.3%)	1.305 (110.3%)	1.324 (111.9%)	1.350 (114.1%)
	試料(400ng/ml)	1.363 (100%)	1.402 (102.9%)	1.441 (105.7%)	1.465 (107.5%)	1.505 (110.4%)	1.536 (112.8%)	1.589 (115.1%)
	試料(3200ng/ml)	1.570 (100%)	1.621 (103.2%)	1.667 (106.2%)	1.890 (107.6%)	1.741 (110.9%)	1.777 (113.2%)	1.815 (115.6%)

【0138】マウスIgGモノクローナル抗体試料(4種類)及び精製水試料(試薬ブランク)の測定結果を示した表6及び表7において、酵素反応の停止剤としてチオシアン酸ナトリウム水溶液を添加したものについては、チオシアン酸ナトリウム水溶液の最終濃度が2M、4M、5.3Mのいずれにおいても、停止剤添加後60分を経過しても吸光度が変化していないか又はごくわずかしき変化しておらず、酵素反応の進行を停止できていることが分かる。特に、チオシアン酸ナトリウムの最終濃度が4M以上の場合は、効果が顕著である。つまり、10

停止剤添加後時間が経ってから吸光度を測定しても、測定対象物質を正確に測定できていることが分かる。これに対して、チオシアン酸ナトリウム水溶液の代わりに精製水を添加したもの(対照)においては、時間を追うごとに吸光度が上昇しており、酵素反応が進行してしまっていることが分かる。

【0139】また、酵素反応の停止剤としてチオシアン酸ナトリウム水溶液を添加した場合、試料が水である試薬ブランクの吸光度の値及びその変化は小さいものであり、測定対象物質の正確な測定に適していることが分かる。

【0140】このことにより、本発明による測定は、酵素反応の停止剤としてチオシアン酸ナトリウム水溶液を用いることにより、酵素反応の進行を完全に停止することができ、かつ酵素反応停止後の退色を防止し、正確な測定が行えるものであることが分かる。

【0141】以上のことより、本発明の測定試薬及び測定方法は、酵素反応停止後の退色を防止し、正確な測定が行える測定試薬及び測定方法であることが確かめられた。そして、それ故、疾病の診断を正確に行うことができる測定試薬及び測定方法であることが確認できた。

【発明の効果】本発明の測定試薬及び測定方法では、酵素標識物質による酵素反応の停止剤を、従来用いられていた硫酸や塩酸等から塩酸グアニジン、尿素又はチオシアン酸塩等の蛋白質変性剤に変えることにより、試料中の測定対象物質を正確に測定することができるものである。特に、酵素反応の進行を完全に停止することができ、かつ酵素反応停止後の退色を防止し、正確な測定が行えるものである。更に本発明の測定試薬及び測定方法では、酵素標識物質による酵素反応の停止剤として蛋白質変性剤を用いることにより、分析機器の腐食や実験廃液の処理等の問題を解消することができるものである。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
C 1 2 R 1:645)

識別記号

F I  
C 1 2 R 1:645)

テ-マコ-ド(参考)

专利名称(译)	通过酶免疫测定和测量方法测量试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002005936A</a>	公开(公告)日	2002-01-09
申请号	JP2000190986	申请日	2000-06-26
申请(专利权)人(译)	株式会社シノテスト		
[标]发明人	堀池剛 浜岡章		
发明人	堀池 剛 浜岡 章		
IPC分类号	G01N33/536 C12Q1/28 C12R1/645 G01N33/531 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/536.C G01N33/531.B G01N33/569.F C12Q1/28 C12R1/645		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ07 4B063/QQ22 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR41 4B063/QR50 4B063/QR51 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX01		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[目的] 在通过酶免疫测定法测定试样中的被测定物质的试剂或测定方法中，通过使用蛋白质变性剂作为由酶标记物质引起的酶反应的终止剂，可以防止分析仪器的腐蚀。解决了实验废液的处理以及通过完全停止酶反应而不会引起变色的问题，从而提高了通过酶免疫测定法测定样品中目标物质的试剂和测定方法 提供。[组成]在用于通过酶免疫测定法测量样品中的待测目标物质的测量试剂和测量方法中，包含或存在由蛋白质变性剂组成的酶反应终止剂。

a)4N吸光度

		時間(分)						
		0	10	20	30	40	50	60
吸光度 (Abs.)	試薬ブランク	0.014	0.011	0.009	0.004	0.008	0.011	0.003
	試料(100ng/ml)	0.008	0.006	0.006	0.005	0.005	0.004	0.005
	試料(1000ng/ml)	0.004	0.011	0.007	0.008	0.007	0.000	0.007