

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-4323

(P2018-4323A)

(43) 公開日 平成30年1月11日(2018.1.11)

|                                |               |             |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b> | GO 1 N 33/531 | B           |
| <b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b> | GO 1 N 33/536 | Z           |

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

|           |                              |          |                     |
|-----------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-127926 (P2016-127926) | (71) 出願人 | 000003300           |
| (22) 出願日  | 平成28年6月28日 (2016. 6. 28)     |          | 東ソー株式会社             |
|           |                              |          | 山口県周南市開成町4560番地     |
|           |                              | (72) 発明者 | 仲田 大輔               |
|           |                              |          | 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ |
|           |                              |          | ー株式会社 東京研究センター内     |

(54) 【発明の名称】 デキストランを共存させた免疫学的測定方法

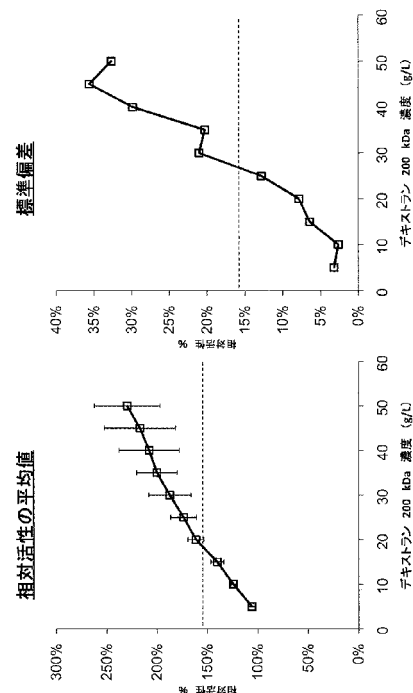
(57) 【要約】

【課題】 抗原抗体反応利用した免疫学的測定法において、測定性能を向上するために抗原抗体反応を向上させる分子を用いた測定方法を提供する。

抗原抗体反応を向上させる分子もしくはそれを用いた測定方法を提供することを提供する。

【解決手段】 試料中の測定対象物質を免疫学的方法によって測定する免疫学的測定方法において、平均分子量60,000ダルトン以上の、好ましくは平均分子量が200,000ダルトン以上のデキストランを、好ましくは15g/L以上25g/L以下、さらに好ましくは15g/L以上20g/L以下の濃度で測定系に共存させて測定する。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中の測定対象物質を免疫学的方法によって測定する免疫学的測定方法において、平均分子量 60,000 ダルトン以上のデキストランを測定系に共存させて測定する前記方法。

## 【請求項 2】

デキストランの平均分子量が 200,000 ダルトン以上である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

共存させるデキストランの濃度が 15 g/L 以上、25 g/L 以下である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

共存させるデキストランの濃度が 15 g/L 以上、20 g/L 以下である、請求項 1 から 3 いずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、デキストランを共存させた免疫学的測定方法に関する。より詳しくは、抗原抗体反応を促進する水溶性高分子の抗原抗体反応液への添加に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

抗原抗体反応を利用した生体分子の測定は、研究分野だけでなく、検査目的の医療機器の一部や、簡易診断キットなどに幅広く利用されている。医療機器での利用は、ELISA 法や EIA 法、ラテックス凝集法、イムノクロマト法など多岐に渡る。これらの手法において、抗原抗体反応を起こす場合は、主として抗原と抗体が含まれる水溶液中であり、それぞれの分子が分散した溶液中で、一定の結合定数をもつ組み合わせでのみ結合する、即ち抗原抗体反応を起こすことで測定の特異性が得られる。即ち、医療機器の性能を上げるためには、抗原抗体反応の反応効率を上昇させることが重要となる。これまでに、より高結合能の抗体の創出や、抗体のアミノ酸配列の改変等により、抗体の結合性を上昇させる試みは数多くなされ、多くの医療機器の高性能化に寄与している。また、抗原抗体反応の効率を上昇させる試みとして、非特異の反応を抑えることで相対的に特異的な抗原抗体反応の精度を上昇させることも重要であり、その意味で抗体の Fab 化などに代表される抗体の非特異結合に寄与する部分の除去や、アミノ酸残基の化学修飾、置換などが行われている。同時に、抗原抗体反応を起こす水溶液についても、その化学的な組成を適切にすることが重要であると考えられており、緩衝液の種類や pH、塩濃度などがそれぞれの抗体抗原反応に合わせて組成が調合される。このような組成の最適化は、通常、生体内の環境を模倣した組成が用いられるが、特に一般化した法則性は無く、目的とする抗体と抗原の組み合わせに合わせて調整がなされる。

## 【0003】

これまでに、抗原抗体反応が起きる場である反応液については、さまざまな分子が利用されてきた。特に抗体を含めて生体由来の分子は親水性の表面を持つため、糖類などの親水性分子が利用されることが多い。

## 【0004】

特許文献 1 には、ラテックス凝集法において非特異結合や担体間の凝集を抑制し、抗原添加時の凝集促進効果の高い免疫測定試薬および免疫測定方法を提供するために、プルランを含有する免疫測定試薬を提示している。しかしながら、プルランと類似した水溶性多糖類であるデキストランには、プルランのような効果は見られなかったことが記載されている。また特許文献 2 には、比濁法などの均一系の免疫測定方法について記載があり、PEG などの非糖類の水溶性高分子が使われることもあるが、これらの高分子の添加によって非特異的な反応も促進することや、粘度の上昇による弊害もあると記載されている。特

許文献 3 には、免疫化学反応において、反応液中にデキストランを共存させ抗原抗体反応を促進させることが記載されているが、デキストランについては、一定範囲の分子量を分画して用いても各種分子量のものを混合して用いてもその効果は変わらないとしている。

#### 【0005】

即ち、体外診断用医薬品のような測定の正確性が求められるような測定試薬の場合には、免疫反応の反応液の組成は、測定精度に与える影響を考慮して決定する必要がある。ラテックス凝集法や比濁法などの均一系免疫測定方法について、反応液への親水性高分子の添加による効果が示されている一方で、ELISA 法などの固相用担体を用いる不均一系の免疫測定方法での親水性高分子の添加による抗原抗体反応の促進効果については不明である。

10

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0006】

【特許文献 1】特許第 3396231 号公報

【特許文献 2】特許第 4512492 号公報

【特許文献 3】特開昭 61-79164 号公報

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

本発明は、抗原抗体反応利用した免疫学的測定法において、測定性能を向上するために抗原抗体反応を向上させる分子を用いた測定方法を提供することを目的とする。

20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、水溶性高分子であるデキストランが、非特異的な反応をほとんど促進することなく抗原抗体反応を促進することを見だし、さらには測定精度にほとんど影響を及ぼさない濃度を見いだしたことにより、本発明を完成するに至った。

即ち本発明は、以下のとおりである。

(1) 試料中の測定対象物質を免疫学的方法によって測定する免疫学的測定方法において、平均分子量 60,000 ダルトン以上のデキストランを測定系に共存させて測定する前記方法。

30

(2) デキストランの平均分子量が 200,000 ダルトン以上である、(1) に記載の方法。

(3) 共存させるデキストランの濃度が 15 g/L 以上、25 g/L 以下である、(1) 又は (2) に記載の方法。

(4) 共存させるデキストランの濃度が 15 g/L 以上、20 g/L 以下である、(1) から (3) いずれかに記載の方法。

#### 【0009】

以下に本発明を更に詳細に説明する。

#### 【0010】

40

本発明において、試料としては特に限定はなく、例えばヒトの体液等があげられ、具体的には血液、血清、血漿、尿、腹水等があげられる。また測定対象物質にも特に限定はなく、例えば抗原、ハプテン、抗体、各種診断マーカー（例えばヒトリボヌクレアーゼ 1）などがあげられる。また免疫学的方法によって測定する免疫学的測定方法とは、抗原抗体反応利用した測定法である。特に限定されるものではないが、ELISA 法や EIA 法、ラテックス凝集法、イムノクロマト法などがあげられ、少なくとも一つの抗原抗体反応が関与する測定法を指す。またサンドイッチ法や競合法等があげられる。本発明では、例えばヒトリボヌクレアーゼ 1 と抗ヒトリボヌクレアーゼ 1 抗体間の反応があげられ、また抗ヒトリボヌクレアーゼ 1 抗体が Mr hRN0614 であることが好ましい。

#### 【0011】

50

本発明ではこのような測定系にデキストランを共存させる。測定系は抗原抗体反応が溶液中で行われることが多いので、その反応液中にデキストランを共存させればよい。本発明において用いられるデキストランは、平均分子量が60,000ダルトン以上である。また平均分子量が200,000ダルトン以上であることが好ましい。デキストランの平均分子量の上限には特に限定はないが、好ましくは約1,000,000である。本発明において測定系中に共存させるデキストラン濃度は特に限定されないが、15～25 g/Lであることが好ましく、15～20 g/Lがさらに好ましい。

【発明の効果】

【0012】

本発明により、抗原抗体反応が促進され、免疫反応に基づく測定において感度の良い測定が可能になる。この効果によって、より少ない量の試料の測定や、より短時間での測定が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】実施例3における測定値の平均と標準偏差を示す図である。

【実施例】

【0014】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により限定されるものではない。

【0015】

以下の実施例においては、免疫測定装置として全自動エンザイムイムノアッセイ装置（AIA-CL2400、東ソー社製）を利用し、免疫測定用試薬は、特開2016-42083号公報に記載の抗RNa se 1抗体を使用した総RNa se 1量測定試薬を以下に示した方法で調製して使用した。測定は、2ステップ法により各測定を行った。

【0016】

RrhRN203抗体固定化磁性微粒子は、JSR社製磁性微粒子（MX200/Carboxyl）の表面に露出するカルボキシル基をEDCで活性化し、活性化されたアミノ基を介して磁性微粒子の乾燥重量1μgに対して4ngのRrhRN203抗体を共有結合させることで調製した。磁性微粒子は抗体を固定化した後に、ブロッキング処理を行った。2つの反応槽を持つ磁力透過性の容器の第1反応槽に乾燥重量相当で50μgの磁性微粒子を懸濁した緩衝液（20mM TrisHCl（pH 7.4）、150mM NaCl, 1%BSA, 5%FBS, 5%マンニトール, 5%スクロース）を入れ、もう一方の第2反応槽には、15ngのアルカリ性フォスファターゼ標識を施したMrhRN0614抗体を含む緩衝液（20mM TrisHCl（pH 7.4）、150mM NaCl, 1%BSA, 5%FBS, 5%スクロース）を加えて、凍結乾燥した。第2反応槽に加える抗体を含む緩衝液には、以下の実施例で必要に応じて水溶性高分子を0.5%～2.5%の範囲で添加した。

【0017】

この試薬と市販の全自動エンザイムイムノアッセイ装置（AIA-CL2400、東ソー社製）を用いて、試料中に含まれるヒトリボヌクレアーゼ1量を測定した。その測定原理は以下の通りである。即ち、第1反応槽に測定サンプル50μLを加え、磁性微粒子を攪拌しながら37℃で5分間反応させた。洗浄液で磁性微粒子を洗浄した後に、溶解液で可溶化したアルカリ性フォスファターゼ標識抗体を含む緩衝液を第2反応槽から50μL分を第1反応槽に移し、更に磁性微粒子を攪拌しながら37℃で3分間反応させた。反応後、B/F分離操作を行い、遊離の標識抗体を分離除去し、アルカリフォスファターゼ活性を測定する化学発光基質を使用して検出した。

【0018】

実施例1 水溶性高分子の分子量に依存した抗原抗体反応促進

アルカリ性フォスファターゼ標識抗体を含む緩衝液に、表1に示した水溶性高分子を25 g/Lの濃度で添加して測定試薬を作製した。また、参照用の試薬として、水溶性高分

10

20

30

40

50

子を添加しない試薬を作製した。

【0019】

【表1】

|     | 試薬   | 水溶性高分子      | 平均分子量<br>(Da) | 試薬メーカー    | 相対値<br>(50ng/mL) | 相対値<br>(0ng/mL) | S/N比   |
|-----|------|-------------|---------------|-----------|------------------|-----------------|--------|
| 比較例 | 参照試薬 | 未添加         |               |           | 94.0 ± 1.2%      | 0.0035%         | 26,900 |
|     | 試薬1  | デキストラン 6K   | 6,000         | シグマアルドリッチ | 100.0 ± 1.2%     | 0.0043%         | 23,300 |
|     | 試薬2  | デキストラン 20K  | 20,000        | シグマアルドリッチ | 115.5 ± 1.8%     | 0.0035%         | 33,000 |
|     | 試薬3  | デキストラン 40K  | 40,000        | 和光純薬      | 122.3 ± 3.4%     | 0.0043%         | 28,400 |
| 実施例 | 試薬4  | デキストラン 60K  | 60,000        | 和光純薬      | 146.4 ± 2.3%     | 0.0046%         | 31,800 |
|     | 試薬5  | デキストラン 150K | 150,000       | 和光純薬      | 145.1 ± 1.8%     | 0.0051%         | 28,600 |
|     | 試薬6  | デキストラン 200K | 200,000       | 和光純薬      | 167.1 ± 5.6%     | 0.0059%         | 28,300 |
| 比較例 | 試薬7  | プルラン        | 750,000       | 和光純薬      | 157.7 ± 3.4%     | 0.0070%         | 22,500 |

10

各試薬を用いて、50 ng/mLのヒトリボヌクレアーゼ1を含む標準品を測定して得られた結果を表1に示す。結果は、3回測定を実施した測定値の平均を、試薬1で50 ng/mLのヒトリボヌクレアーゼ1を含む標準品を測った測定値を100%とした時の相対値として示す。

20

【0020】

以上の結果から、デキストランの平均分子量が大きくなるほど、測定値が増加することが分かる。またプルランの添加はデキストラン200Kと同等の効果を示していることが分かる。特に40%以上の測定値の増加を示した分子は、デキストランの平均分子量が60,000Da、150,000Da、200,000Daのもの、及びプルランであった。また、同じ測定試薬を使用して、ヒトリボヌクレアーゼ1を含まない緩衝液を測定した場合の測定値を、試薬1で50 ng/mLのヒトリボヌクレアーゼ1を含む標準品を測った測定値を100%とした時の相対値として示す。全ての試薬で、水溶性高分子の添加により顕著な非特異反応を引き起こしていないことが分かり、測定性能を示すS/N比は、水溶性高分子を未添加の参照試薬と比べて遜色のない高値となっている。

30

【0021】

実施例2 水溶性高分子の抗原抗体反応促進効果の評価

表1の試薬1と試薬6について、第1反応槽の磁性微粒子懸濁液のみを凍結乾燥して、第2反応槽のアルカリ性フォスファターゼ標識抗体を含む緩衝液は凍結乾燥しなかった試薬を同時に作製して、第2反応槽のアルカリ性フォスファターゼ標識抗体を含む緩衝液を凍結乾燥したものと比較した結果を表2に示す。測定条件は、実施例1と同様である。

【0022】

【表2】

|     | 試薬  | 凍結乾燥   | 非凍結乾燥<br>(非凍結乾燥試薬間の比較) |
|-----|-----|--------|------------------------|
| 比較例 | 試薬1 | 100.0% | 95.3%(100.0%)          |
| 実施例 | 試薬6 | 166.5% | 148.9%(156.3%)         |

40

凍結乾燥の有無で、デキストラン添加の効果は変わらず、分子量が大きいものがより測定値が高いことが明らかとなった。このことは、水溶性高分子が凍結乾燥の際に抗体の安定性を保つことに寄与しているのではなく、水溶性高分子の添加によって抗原抗体反応が促進されていることを示す。

【0023】

50

### 実施例 3 デキストラン添加濃度による抗原抗体反応促進効果の評価

実施例 1 で抗原抗体反応の促進効果が高かった試薬 4, 5, 6 について、デキストラン添加濃度による影響を評価した。実施例 1 に記載の方法で、添加濃度を 5 g/L、15 g/L、25 g/L にした試薬を調整し、同時に作製した基準とする試薬 1 (25 g/L) と比較した結果 (相対値) を表 3 に示す。測定条件は、実施例 1 と同様である。

【0024】

【表 3】

|     | 試薬  | 添加濃度 |       |       |
|-----|-----|------|-------|-------|
|     |     | 5g/L | 15g/L | 25g/L |
| 比較例 | 試薬1 |      |       | 100%  |
| 実施例 | 試薬4 | 109% | 126%  | 147%  |
|     | 試薬5 | 106% | 126%  | 143%  |
|     | 試薬6 | 109% | 140%  | 167%  |

10

20

表 3 の結果は、水溶性高分子の添加による抗原抗体反応の促進効果は、添加する水溶性高分子の濃度に依存して高くなることを示す。表 3 の結果からは、40%以上の測定値の増加を示す条件は、各分子量の水溶性高分子ともに 25 g/L であり、試薬 6 に使用した平均分子量が 200,000 Da のデキストランでは、15 g/L でも 40% の測定値の増加を示した。

【0025】

つぎに、平均分子量が 200,000 Da のデキストランを添加した試薬 6 について、デキストラン添加濃度による免疫測定試薬の測定精度について検討した。測定は、実施例 1 と同様に 50 ng/mL のヒトリボヌクレアーゼ 1 を含む標準品を 1 条件あたり 3 回測定して、各濃度における測定値の平均と標準偏差を図 1 に示した。

30

【0026】

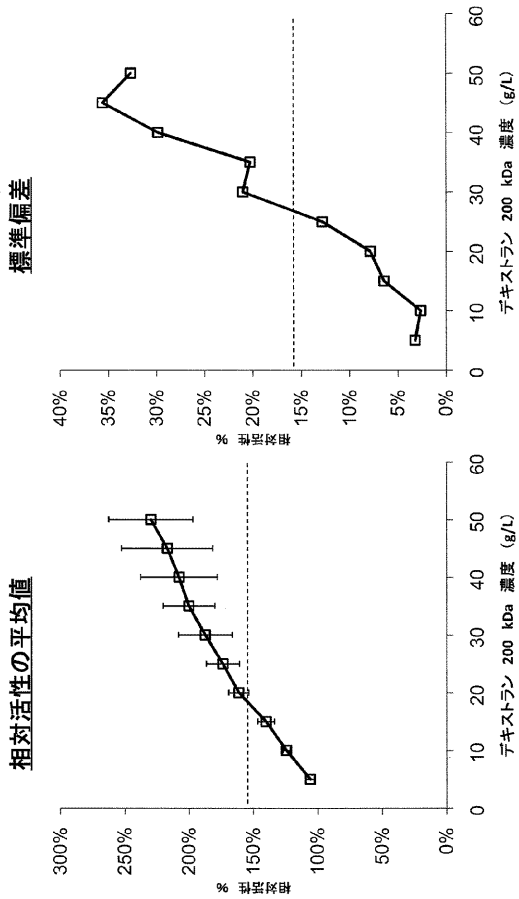
デキストラン添加濃度に依存して測定値が増加していることから、抗原抗体反応の促進効果があることが分かる反面、測定値のばらつきを示す標準偏差も、デキストラン添加濃度に依存して増加することが明らかとなった。高い測定精度が求められる免疫測定試薬は、測定上のばらつきが一定の基準以下である必要があり、基準を 15% とした場合、デキストラン添加濃度が 25 g/L 以下であることが望ましく、更に厳しい 10% とした場合、デキストラン添加濃度が 20 g/L 以下であることが望ましいことが明らかとなった。

【0027】

以上の結果を総合して、免疫測定試薬を高い測定精度に保つ範囲で、抗原抗体反応の促進するデキストラン添加濃度は、15 g/L から 25 g/L の範囲であることが示され、最適な添加濃度は、平均分子量が 200,000 Da のデキストランを 15 g/L から 20 g/L の範囲で添加することであることが明らかとなった。

40

【図 1】



|                |                               |         |            |
|----------------|-------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 葡聚糖共存的免疫学测量方法                 |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2018004323A</a> | 公开(公告)日 | 2018-01-11 |
| 申请号            | JP2016127926                  | 申请日     | 2016-06-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东曹株式会社                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Tosoh公司                       |         |            |
| [标]发明人         | 仲田大輔                          |         |            |
| 发明人            | 仲田 大輔                         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/531 G01N33/536         |         |            |
| FI分类号          | G01N33/531.B G01N33/536.Z     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>     |         |            |

#### 摘要(译)

公开的是利用抗原 - 抗体反应，以提供使用该分子以增强，以提高测量性能的抗原 - 抗体反应的测定方法的免疫测定方法。改善抗原 - 抗体反应的分子，或使用该分子的测量方法。——一种通过免疫学方法测量样品中待测物质的免疫学测量方法，包括测量平均分子量为60,000道尔顿或更高，优选平均分子量为200,000道尔顿或更高的葡聚糖，优选为15g / L以上25g / L的或以下，更优选在该测量系统在测量的浓度为15g / L以上20g / L的共存。发明背景

