

(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2002－340896
(P2002－340896A)

(43)公開日 平成14年11月27日(2002.11.27)

(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 33/531			G 0 1 N 33/531	B
33/543	581		33/543	581 J

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L（全 5 数）

(21)出願番号	特願2001－152701(P2001－152701)	(71)出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22)出願日	平成13年5月22日(2001.5.22)	(72)発明者	平田 治 大阪府三島郡島本町百山2－1 積水化学工業株式会社内

(54)【発明の名称】 免疫測定試薬

(57)【要約】

【課題】 高感度で非特異反応が少なく、微量の被測定物質を的確に検出することのできる免疫測定試薬を提供する。

【解決手段】 被測定物質である抗原（又は抗体）と対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体及びエルシナンが含有されてなることを特徴とする免疫測定試薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被測定物質である抗原（又は抗体）と対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体及びエルシナンが含有されてなることを特徴とする免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、不溶性担体を使用した免疫学的な凝集反応に基づいて被測定物質を測定する免疫測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】各種生体成分から特定の被測定物質を検出もしくは定量するため、被測定物質である抗原（又は抗体）に対応する抗体（又は抗原）との免疫学的な凝集反応を光学的に観察するか、又は、目視（肉眼）で観察する方法が行われている。

【0003】又、検出感度をより向上させるために、被測定物質である抗原（又は抗体）に対応する抗体（又は抗原）を不溶性担体に感作させ、被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより、被測定物質を測定する方法が近年広く行われている。このような測定法としては、例えば、ラテックス凝集法や赤血球凝集法等が挙げられる。

【0004】このような測定法に用いられる免疫測定試薬では、抗原抗体反応を促進し検出感度を向上させるために、各種の水溶性添加物を含有させることが行われており、例えば、特開昭58-47256号公報には、抗原又は抗体を担持した不溶性微粒子と、抗体及び／又は抗原とを水溶液中で反応させ、反応混合物に光を照射して反応の進行度を光学的に測定する抗原抗体反応の測定法において、水溶液中にポリエチレングリコールを共存させる方法が開示されている。

【0005】又、例えば、特開平5-180838号公報や特開平6-167493号公報等には、水溶性添加物のなかでも特にプルランに代表されるマルトトリオース類のような水溶性糖重合体を用いることにより、抗原抗体反応以外の非特異的凝集反応の抑制と特異的凝集反応の増大とによる高感度化を図る測定法が開示されている。

【0006】しかし近年、臨床現場からは、早期診断による早期治療を実現する目的から、従来にも増してより微量の被測定物質を検出するために、試薬の反応性を増大することが強く要望されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記要望に鑑み、高感度で非特異反応が少なく、微量の被測定物質を的確に検出することのできる免疫測定試薬を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、従来法の問

題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、被測定物質である抗原（又は抗体）と対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体の免疫学的な凝集反応の度合いを検出することにより被測定物質を測定する免疫測定試薬において、上記免疫測定試薬にエルシナンを含有させることにより、従来のマルトトリオース類よりも飛躍的に高い特異的反応の増大効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】即ち、請求項1に記載の発明による免疫測定試薬は、被測定物質である抗原（又は抗体）と対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体及びエルシナンが含有されてなることを特徴とする。

【0010】本発明で用いられるエルシナンは、例えば特公昭55-27561号公報に開示されているような、エルシノエ（Elsinoe）属に属する微生物を栄養培養して得られる、主な繰り返し単位が〔3〕-Glc-(1→4)-Glc(1→4)-Glc-(1→)（但し、Glcはα-D-グルコピラノース残基を示す）の構造を有しているグルカンである。又、例えばエルシナンのエステル化物やエルシナンのエーテル化物などのエルシナンの各種誘導体も本発明で用いられるエルシナンに包含される。これらのエルシナンは、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。

【0011】上記エルシナンは、特に限定されるものではないが、その分子量が約1万から1000万以上のものが好適に用いられるが、なかでもゲル濾過等により分子量を5万から50万としたものがより好適に用いられる。

【0012】本発明の免疫測定試薬は、被測定物質である抗原（又は抗体）と、これに対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体とを凝集反応させる際に、この凝集反応系（以下、単に「反応系」と略記する）にエルシナンが含有されているように構成される。

【0013】反応系にエルシナンを含有させる方法としては、被測定物質である抗原（又は抗体）と、これに対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体との反応系にエルシナンを含有させ得る方法であれば如何なる方法であっても良く、特に限定されるものではないが、例えば、不溶性担体の懸濁液中にエルシナンを含有させる方法、凝集反応時に使用する緩衝液中にエルシナンを含有させる方法、不溶性担体の懸濁液中及び緩衝液中の双方にエルシナンを含有させる方法、或いは、不溶性担体の懸濁液及び緩衝液以外の構成試薬を更に1種類もしくは2種類以上設け、この構成試薬の少なくとも1種類中にエルシナンを含有させる方法等が挙げられ、いずれの方法が用いられても良い。又、これらの方法は、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。更に、エルシナンは、予め水溶液状として用いられても良いし、固体状のままで用いられても良い。

【0014】本発明の免疫測定試薬において、エルシナ

ンの含有量は、最終的な試薬性能を考慮して適宜設定されれば良く、特に限定されるものではないが、被測定物質である抗原（又は抗体）と、これに対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体との反応系の0.01～10重量%であることが好ましく、より好ましくは0.1～5重量%である。

【0015】本発明で用いられる不溶性担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などのラテックス粒子；不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの有機高分子粒子；シリカ、アルミナなどの無機粒子；金、チタン、鉄、ニッケルなどの金属粉末；赤血球などの生体由来粒子等が挙げられ、好適に用いられるが、なかでもラテックス粒子が特に好適に用いられる。これらの不溶性担体は、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。

【0016】上記不溶性担体の平均粒子径は、検出濃度や測定機器によっても異なり、特に限定されるものではないが、一般的には0.05～5.0 μm の範囲で適宜選択されることが好ましい。

【0017】本発明の免疫測定試薬において、不溶性担体に感作する抗体（又は抗原）としては、生体由来のもの、遺伝子組み換え技術等を用いて得られたもの、或いは、それらの処理物等が用いられ、その具体例としては、特に限定されるものではないが、例えば、変性 γ -グロブリン、リウマチ因子、ストレプトリジンO（SLO）、抗SLO抗体、カルジオライピン、抗カルジオライピン抗体、インスリン、抗インスリン抗体、C反応性蛋白（CRP）、抗CRP抗体、 α -フェトプロテイン（AFP）、抗AFP抗体、癌胎児性抗原（CEA）、抗CEA抗体、HBs抗原、抗HBs抗体、抗トレポネーマ抗体に対する抗原、HCV抗原等の公知の抗体（又は抗原）が挙げられ、好適に用いられる。これらの不溶性担体に感作する抗体（又は抗原）は、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。

【0018】本発明の免疫測定試薬においては、非特異反応を抑制するためや免疫測定試薬自体の安定性を高めるために、特に限定されるものではないが、例えば、アルブミン、カゼイン、ゼラチンなどの蛋白質、これら蛋白質の分解物、アミノ酸、界面活性剤等の1種類もしくは2種類以上を前記不溶性担体に更に担持させても良い。

【0019】抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体の本発明の免疫測定試薬による凝集反応の度合いは、光学的に観察するか、又は、目視（肉眼）で観察することにより、検出される。

【0020】抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体の凝集の度合いを光学的に観察して、検出する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、散乱光強度、吸光度又は透過光強度の増加もしくは減少を測定する方法や、これらの方法を併用する方法等が挙げられる。

【0021】又、抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体の凝集の度合いを目視（肉眼）で観察して、検出する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、被測定物質と上記不溶性担体を含む水溶液を例えばガラス板のような判定板上で混合し、1～5分間揺り動かした後、凝集の有無や程度を判定する方法等が挙げられる。上記凝集の有無や程度の判定は、単なる目視（肉眼）による判定であっても良いし、像を撮影し、画像処理を施すことによる判定であっても良い。

【0022】本発明の免疫測定試薬を用いる抗原抗体反応の条件は、通常条件と同様で良く、反応媒体としては、被測定物質である抗原（又は抗体）の種類に応じた各種緩衝液が用いられる。この緩衝液は、被測定物質を失活させることがなく、且つ、抗原抗体反応を阻害しないようなイオン濃度やpHを有するものであれば良く、その具体例としては、特に限定されるものではないが、例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等の公知の各種緩衝液が挙げられ、好適に用いられる。これらの緩衝液は、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。

【0023】上記抗原抗体反応時には、本発明の課題達成を阻害しない範囲で必要に応じて、例えば感度をより高めるために、特に限定されるものではないが、例えば、ポリエチレングリコール、カルボキシルメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリグリコシルエチルメタクリレート、プルラン等の各種水溶性高分子が添加されても良い。これらの水溶性高分子は、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。

【0024】又、上記抗原抗体反応時には、本発明の課題達成を阻害しない範囲で必要に応じて、例えば特異反応性をより高めたり、免疫測定試薬自体の安定性をより向上させるために、特に限定されるものではないが、例えば、アルブミン、カゼイン、ゼラチンなどの蛋白質やその分解物、塩化コリンなどの第4級アンモニウム塩、EDTA、ポリアニオン、カオトロピックイオン（例えば、 Cl^- 、 I^- 、 SCN^- 等）、アミノ酸、界面活性剤等の各種水溶性添加剤が添加されても良い。これらの水溶性添加剤は、単独で用いられても良いし、2種類以上が併用されても良い。

【0025】上記抗原抗体反応時の反応系のpHは、特に限定されるものではないが、5～10であることが好ましく、より好ましくは6～8である。又、反応温度は、特に限定されるものではないが、0～50℃である

ことが好ましく、より好ましくは20～40℃である。
尚、反応時間は、適宜設定されれば良い。

【0026】

【作用】本発明の免疫測定試薬は、被測定物質である抗原（又は抗体）と対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体及びエルシナンが含有されてなるので、上記エルシナンの働きにより、抗原抗体反応による特異的な凝集反応が促進され、微量の被測定物質でも高感度で検出することができる。

【0027】

【発明の実施の形態】本発明をさらに詳しく説明するため以下に実施例を挙げるが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。尚、以下の実施例及び比較例においては、抗トレポネーマ抗体測定用の免疫測定試薬を作製し、評価した。

【0028】（実施例1）

（1）検体希釈用緩衝液の調製

牛血清アルブミンを1重量%含有するリン酸緩衝液に、特公昭55-27561号公報に記載されている方法で製造したエルシナン1重量%を添加し、溶解して、検体 20

希釈用緩衝液を調製した。

【0029】（2）トレポネーマ・パリダム由来抗原感作ラテックス液の調製

トレポネーマ・パリダム由来抗原を30μg/mlの濃度で0.01Mリン酸緩衝液（pH：7.4）に溶解した溶液0.4mlに、平均粒子径が0.40μmのポリスチレンラテックス（固形分：10重量%、積水化学工業社製）0.1mlを添加し、4℃で60分間攪拌混合した。次に、この溶液に、牛血清アルブミンを1重量%含有する0.1Mリン酸緩衝液（pH：7.4）を0. 30

5ml添加し、4℃で90分間攪拌混合した後、回転数15000rpmで15分間遠心分離した。次いで、得られた沈澱物に、牛血清アルブミンを1重量%含有する0.1Mリン酸緩衝液（pH：7.4）4mlを添加し、ラテックスを再懸濁させて、トレポネーマ・パリダム由来抗原感作ラテックス液を調製した。

【0030】（3）抗トレポネーマ抗体測定用の免疫測定試薬の作製

上記（1）の検体希釈用緩衝液からなる第1試薬と上記（2）のトレポネーマ・パリダム由来抗原感作ラテック 40

ス液からなる第2試薬とから構成される2液型の抗トレポネーマ抗体測定用の免疫測定試薬を作製した。

【0031】（4）抗トレポネーマ抗体標準液の調製
梅毒陽性標準血清（5濃度、積水化学工業社製）を各1mlの精製水で溶解して、抗トレポネーマ抗体標準液を調製した。抗体価は、0、36、120、242、45

6T.U.であった。尚、上記T.U.は、抗トレポネーマ抗体測定試薬（商品名「メディエースTPLA」、積水化学工業社製）で血清を測定した場合の抗トレポネーマ抗体の抗体価を表す単位である。上記トレポネーマ抗体測定試薬「メディエースTPLA」では、上記抗体価が10T.U.以上の場合、陽性と判定される。

【0032】（5）測定用検体の準備

健康人の血清10例及び梅毒患者の血清5例をそれぞれ測定用検体として準備した。

10 【0033】（6）抗トレポネーマ抗体標準液の測定及び抗トレポネーマ抗体検量線の作成

抗トレポネーマ抗体標準液20μlを秤取し、これに上記（1）の検体希釈用緩衝液（第1試薬）210μlを混合し、37℃で一定時間保持した後、上記（2）のトレポネーマ・パリダム由来抗原感作ラテックス液（第2試薬）30μlを添加し、攪拌混合した。次いで、約80秒間から300秒間の波長700nmでの吸光度の変化量を測定し、吸光度変化量（ΔAbs）とした。尚、上記吸光度の変化量の測定は、日立自動分析装置（型式：「7150型」、日立製作所社製）を用いて行った。得られた吸光度変化量（ΔAbs）と抗トレポネーマ抗体標準液の抗体価（T.U.）から、抗トレポネーマ抗体検量線を作成した。

【0034】（7）測定用検体の抗トレポネーマ抗体価の測定

上記（5）で準備した測定用検体を用い、それぞれ上記（6）の場合と同様の操作を行って、吸光度変化量を求めた。次いで、上記（6）で作成した抗トレポネーマ抗体検量線を用いて、それぞれの測定用検体の吸光度変化量からそれぞれの測定用検体の抗トレポネーマ抗体価（T.U.）を求めた。

【0035】（比較例1）検体希釈用緩衝液の調製において、エルシナン1重量%の代わりに、プルラン1重量%を添加したこと以外は実施例1の場合と同様にして、上記（5）で準備した測定用検体の抗トレポネーマ抗体価（T.U.）を求めた。

【0036】（比較例2）検体希釈用緩衝液の調製において、エルシナン1重量%の代わりに、ポリエチレングリコール（分子量：20万）1重量%を添加したこと以外は実施例1の場合と同様にして、上記（5）で準備した測定用検体の抗トレポネーマ抗体価（T.U.）を求めた。

【0037】実施例1、及び、比較例1及び比較例2の結果は表1に示すとおりであった。

【0038】

【表1】

			実施例 1	比較例 1	比較例 2
添加剤（添加量：1 重量％）			エルシナン	ブルラン	ポリエチレングリコール
吸光度変化量 （ $\Delta A b s$ ）	抗体価 （T・U）	0	4 6	2 0	1 2
		3 6	1 4 8 9	8 4 9	3 2 4
		1 2 0	3 8 7 9	2 8 1 9	8 9 9
		2 4 2	5 1 7 7	3 7 7 8	1 5 5 5
		4 5 6	5 8 2 5	4 1 7 1	2 4 5 7
抗トレポネーマ 抗体価 （T・U・）	健康人の血清	No. 1	0（-）	1（-）	1（-）
		2	0（-）	0（-）	2（-）
		3	0（-）	0（-）	0（-）
		4	0（-）	0（-）	0（-）
		5	1（-）	0（-）	0（-）
		6	1（-）	0（-）	0（-）
		7	0（-）	1（-）	0（-）
		8	2（-）	3（-）	2（-）
		9	0（-）	0（-）	3（-）
		1 0	0（-）	0（-）	7（-）
抗トレポネーマ 抗体価 （T・U・）	梅毒患者の血清	No. 1	1 2 4（+）	1 3 5（+）	1 4 0（+）
		2	3 5（+）	3 3（+）	4 0（+）
		3	6 6（+）	6 1（+）	6 9（+）
		4	7 8（+）	9 0（+）	7 9（+）
		5	2 3 5（+）	2 1 2（+）	2 2 2（+）

（注）（ ）内は判定（-：陰性、+：陽性）

【0039】表1から明らかなように、本発明による実施例1の免疫測定試薬は、反応系にブルランを含有させた比較例1の免疫測定試薬及び反応系にポリエチレングリコールを含有させた比較例2の免疫測定試薬に比較して、反応性（吸光度変化量）が大幅に向上していた。又、本発明による実施例1の免疫測定試薬は、反応性（吸光度変化量）が大幅に向上したにもかかわらず、健康人の血清は陰性、梅毒患者の血清は陽性と的確に判定されており、優れた特異反応性を示した。

【0040】

【発明の効果】以上述べたように、本発明の免疫測定試薬は、被測定物質である抗原（又は抗体）と対応する抗体（又は抗原）を感作した不溶性担体及びエルシナンが含有されてなるので、上記エルシナンの働きにより、抗原抗体反応による特異的な凝集反応性を大幅に向上させることができる。即ち、本発明の免疫測定試薬は、高感度で非特異反応が少なく、微量の被測定物質を的確に検出することができるものである。

专利名称(译)	免疫试剂		
公开(公告)号	JP2002340896A	公开(公告)日	2002-11-27
申请号	JP2001152701	申请日	2001-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	平田治		
发明人	平田 治		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.581.J		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种高度灵敏，非特异性反应少并且可以准确地检测痕量被测物质的免疫测定试剂。一种免疫测定试剂，其包含用与作为待测物质的抗原（或抗体）相对应的抗体（或抗原）敏化的不溶性载体和芥子聚糖。

		8			
添加剤（添加量：1重量%		実施例1	比較例1	比較例2	
		エルシナン	ブルラン	ポリエチレングリコール	
吸光度変化量 (ΔA_{550})	抗体価 ($\times 10^{-4}$)	0	4.6	2.0	1.2
	3.6	1.489	8.49	3.24	
	1.20	3.879	2.819	8.99	
	2.42	5.177	3.778	1.555	
	4.56	5.825	4.171	2.457	
抗トレポネーマ 抗体価 ($\times 10^{-4}$)	健康人の血清	No. 1	0 (-)	1 (-)	1 (-)
		2	0 (-)	0 (-)	2 (-)
		3	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		4	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		5	1 (-)	0 (-)	0 (-)
		6	1 (-)	0 (-)	0 (-)
		7	0 (-)	1 (-)	0 (-)
		8	2 (-)	3 (-)	2 (-)
		9	0 (-)	0 (-)	3 (-)
		10	0 (-)	0 (-)	7 (-)
抗トレポネーマ 抗体価 ($\times 10^{-4}$)	梅毒患者の血清	No. 1	1.24 (+)	1.35 (+)	1.40 (+)
		2	3.5 (+)	3.3 (+)	4.0 (+)
		3	6.6 (+)	6.1 (+)	6.9 (+)
		4	7.8 (+)	9.0 (+)	7.9 (+)
		5	2.35 (+)	2.12 (+)	2.22 (+)

(注) () 内は判定 (- : 陰性、+ : 陽性)