

(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2004-117039

(P2004-117039A)

(43) 公開日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/531

F I

G 0 1 N 33/531

テーマコード (参考)

B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2002-277471 (P2002-277471)	(71) 出願人	390014960 シスメックス株式会社 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(22) 出願日	平成14年9月24日 (2002.9.24)	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
		(72) 発明者	山口 温輝 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	永井 慎也 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	宮地 峰輝 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫分析方法

(57) 【要約】

【課題】免疫学的測定方法においてカットオフインデックス値（C O I 値）により分析する場合に、陰性検体は0値を示すような分析方法を提供する。

【解決手段】C O I 値を、被検検体の反応量から陰性コントロールの反応量を引いた値を、カットオフコントロールの反応量から陰性コントロールの反応量を引いた値で除して計算して得た値とすると、測定に使用する陰性コントロールに増感剤、例えばデキストランを添加して該コントロールの測定値を増加させることにより、被検検体の被測定対象物が陰性の場合にはC O I 値を0とすることができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被測定物質に特異的に結合する蛋白質を不溶性担体に固定し、被測定物質を測定する免疫測定法において、陰性コントロール溶液に増感剤を添加して測定した値をもとにカットオフインデックス値（COI値）を算出することを特徴とする免疫分析方法。

**【請求項 2】**

増感剤がデキストランもしくはその誘導体である請求項 1 に記載の免疫分析方法。

**【請求項 3】**

増感剤を陰性コントロール溶液に対し、1～4 w/v % 添加することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の免疫分析方法。

**【請求項 4】**

請求項 1～3 のいずれか 1 に記載の分析方法に使用する増感剤を添加した陰性コントロール試薬または該増感剤を添加した陰性コントロール試薬を含む免疫測定試薬キット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、不溶性担体を用い免疫凝集反応により被測定物質を測定するための免疫測定法における免疫分析方法に関し、より詳細には、陰性検体のカットオフインデックス値が 0 と算出されるように調整された免疫分析方法およびその試薬に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

体液中の微量成分などの測定法の 1 つとして、被測定物質である抗原または抗体に対応した抗体または抗原を不溶性担体に固定させ、被測定物質と抗体または抗原との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の程度を検出することにより、被測定物質を測定する免疫測定法が広く用いられている。このような免疫測定法としては、ラテックス凝集反応を利用したものや赤血球凝集反応を利用したものなどが知られている。

**【0003】**

凝集の程度を検出する方法としては、肉眼で判定する方法と、反応液に光を照射し散乱光あるいは透過光を測定する方法とが用いられている。後者の方法、すなわち光学測定法は、検体中の抗原または抗体の定量に用いられている。

**【0004】**

定性試験においては、判定は検体の反応量がある一定の値を超える場合に陽性、下回る場合を陰性とするのが一般的である。陽性および陰性を判断する指標として、ある一定の測定値を示すカットオフコントロールを設けると、陽性および陰性の判定が容易となる。例えば、検体の反応量から陰性コントロールの反応量を引いた値を、カットオフコントロールの反応量から陰性コントロールの反応量を引いた値で除して計算して得た値をカットオフインデックス値（以下「COI値」という場合もある。）とすると、その値が 1.0 以下であれば測定検体は被測定物質が陰性であると判断できる（特開平 2001-33451 号公報）。

**【0005】**

しかしながら、例えば COI 値が 0.8 の場合には陰性と判断できるにもかかわらず、数値が示されているために少しでも被検物質が存在していると勘違いし、被験者等は不安感をもつ場合も生じうる。このような不安感を排除するため、当該技術分野の専門家ではない一般の被験者等が明らかに陰性と判断できるように陰性の検体の測定値は、0 と算出できるような免疫測定法における分析方法が求められる。

**【0006】****【特許文献】**

特開平 2001-33451 号公報

**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、免疫学的測定方法において COI 値により分析する場合に、陰性検体は

10

20

30

40

50

0 値を示すような分析方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、測定に使用する陰性コントロールに増感剤を添加して該コントロールの測定値を増加させれば、検体中の被測定対象物が陰性の場合にはCOI値は0を示すことができることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、

1. 被測定物質に特異的に結合する蛋白質を不溶性担体に固定し、被測定物質を測定する免疫測定法において、陰性コントロール溶液に増感剤を添加して測定した値をもとにカットオフインデックス値(COI値)を算出することを特徴とする免疫分析方法、
2. 増感剤がデキストランもしくはその誘導体である請求項1に記載の免疫分析方法、
3. 増感剤を陰性コントロール溶液に対し、1～4w/v%添加することを特徴とする前項1または2に記載の免疫分析方法、
4. 前項1～3のいずれか1に記載の分析方法に使用する増感剤を添加した陰性コントロール試薬または該増感剤を添加した陰性コントロール試薬を含む免疫測定試薬キット、からなる。

10

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明において、被測定物質に特異的に結合する蛋白質とは、被検物質に対して生物学的または物理学的に結合能力を有する蛋白質であれば良く、特に限定されないが、例えば被検物質が抗原である場合にはその抗体、被検物質が抗原である場合にはその抗体のように免疫学的親和性に基づき結合する対の蛋白質が挙げられる。

20

【0010】

本発明により測定される測定対象物質は、一般に抗原抗体反応を利用して測定され得る生理活性物質である限り特に限定されず、例えば、蛋白質、脂質などが挙げられ、より詳細には、各種抗原、抗体、レセプターまたは酵素などが挙げられる。さらに具体的には、各種ウイルス(HTLV-1, HIV, HCV, HBs, HBe)抗原または抗体、CRP、ヒトフィブリノーゲン、FDP、リウマチ因子、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、抗ストレプトリジンO抗体、梅毒トレポネーマ抗体、梅毒脂質抗原に対する抗体、抗体などが例示される。

30

【0011】

本発明の不溶性担体としては、抗体または抗原を担持し得る適宜の不溶性担体を用いることができる。このような不溶性担体の例としては、有機高分子粉末、無機物質粉末、微生物、血球及び細胞膜片などが挙げられる。有機高分子粉末としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどが例示でき、好ましくはラテックス懸濁液がよい。ラテックスとしては、例えばポリスチレン、ポリスチレン-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、アクリルニトリル-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、ポリ酢酸ビニルアクリレート等が挙げられる。用いるラテックスの平均粒径は、測定対象物の検出濃度あるいは測定機器によって0.05～1.0 $\mu$ mのものが適宜選択される。無機物質粉末としては、シリカ、アルミナ、あるいは金、チタン、鉄、ニッケル等の金属片などが例示される。

40

【0012】

本発明の分析方法は、例えばラテックス凝集反応や血液凝集反応などの従来より公知の各種凝集法を用いることができる。

【0013】

次に、本発明に係る免疫測定法の詳細を説明する。ある被検物質が免疫学的に陽性または陰性であるかは、予めカットオフコントロールにより判断の指標を決定しておき、検体、カットオフコントロールおよび陰性コントロールを各々測定して得た値から判断することができる。そのためのカットオフインデックスは、例えば次の式1に基づいて計算するこ

50

とができる。つまり、COI値が1以上であれば陽性、1未満であれば陰性と判断する。例えば、検体については3%、カットオフコントロールでは1.5%、陰性コントロールでは0.5%の各測定値を示す場合は、次式に代入して計算すると、COI値は2.5であり、この検体では被検物質が陽性と判断される。一方、検体では0.7%、カットオフコントロールでは1.5%、陰性コントロールでは0.5%の各測定値を示す場合は、COI値は0.2と算出されるから陰性と判断される。しかし、この0.2の数値により、わずかに被検物質が存在するような錯覚が生じる場合がある。

【0014】

【式1】

$$\text{カットオフインデックス (COI)} = \frac{\text{被検試料の反応量} - \text{陰性コントロールの反応量}}{\text{カットオフコントロールの反応量} - \text{陰性コントロールの反応量}}$$

10

【0015】

ラテックス凝集反応や血液凝集反応などの各種凝集法は、凝集促進作用を有する物質、具体的にはポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン等の合成高分子物質、デキストラン、デキストラン硫酸等の多糖類等を増感剤として検体希釈用緩衝液等に添加し、測定系全体の凝集度を高めることで測定感度を上昇させることができる。本発明では、さらに陰性コントロールに増感剤を添加することで、該コントロールの測定値を上昇させること

20

【0016】

陰性コントロールの測定値を高く設定することができれば、本来陰性の検体のCOI値を0にすることができる。具体的には、カットオフコントロールの測定値1.5%で検体では0.7%の場合には、陰性コントロールの測定値が0.8%であれば、COI値は0と算出され、陰性と判断できる。陰性コントロールの測定値を高く設定するために、上記ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン等の合成高分子物質、デキストラン、デキストラン硫酸等の多糖類等を増感剤として添加することができる。例えば添加するデキストランの分子量は10,000~2,000,000のものを使用することができる。

30

【0017】

添加する増感剤の量は、特に限定されないが、例えば陰性プール血清の測定値よりやや高い測定値になるように増感剤の添加量を適宜選択することができる。具体的には、デキストラン(分子量2,000,000)の場合には陰性コントロール溶液に対して、1.0~4.0w/v%、好ましくは3.0~4.0w/v%の範囲から適切な数値を選択することができる。

【0018】

測定方法は、公知の方法に従い、用いられる不溶性担体の大きさもしくは濃度、反応時間を設定することにより、散乱光強度、吸光度または透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行うことができ、これらの方法を2種以上併用してもよい。

【0019】

本発明は、上記分析方法に使用する試薬、具体的には増感剤を陰性コントロールに添加した試薬あるいは該陰性コントロールを含む免疫測定用試薬キットにも及ぶ。

40

【0020】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0021】

(実施例1) 陰性コントロールへのデキストランの添加

本実施例では、HTLV-1の測定に使用する陰性コントロール(5w/v%ウシ血清アルブミン溶液)に、各々0、1、2、3、4w/v%となるようにデキストラン(分子量

50

2, 000, 000) を添加し、デキストラン添加陰性コントロール検体とし、デキストランの添加によるCOIに及ぼす効果を調べた。

【0022】

ラテックス粒子懸濁液1mL(5mgのラテックス担体を含む)について、各種HTLV-1抗原(p19を3μg、gp46を4μgおよびp21を2μg)を感作した。

【0023】

各濃度のデキストランを添加した陰性コントロール検体および抗HTLV-1抗体陰性プール血清について、各種HTLV-1抗原感作ラテックス粒子を用い、シスメックス社製測定装置(PAMIA-50)によりSysmex Journal Vol. 20 No. 1, p77-86(1997)に記載の方法に従い測定を行った。反応プレートのウェルに、ラテックス凝集反作用緩衝液を80μl、検体を10μlおよび上記調製したラテックス粒子を含む溶液を10μlを添加し、45℃で反応させた。反応を開始して約15分後に19μlの反応混合物を装置のチャンバ内の950μlのシース液に加えて51倍に希釈した。希釈により凝集反応を停止させ、その後、PAMIA-50装置により凝集度を求めた。

10

【0024】

その結果、図1に示すように陰性コントロールはデキストランの添加濃度に応じて凝集度の増加が確認された。本実施例では、デキストラン濃度が2w/v%の場合に陰性プール血清よりやや高い値を示した。

【0025】

実施例1により得られた陰性コントロール測定値に基づき、HTLV-1抗原陽性検体および陰性検体について、各々COI値を換算して求めた。HTLV-1抗原陽性検体の凝集率を3%、陰性検体の凝集率を0.7%、カットオフコントロールの値を1.5%としてシミュレーションにより換算した。陰性検体の値が陰性コントロールより低い実測値の場合は、COI値は0と算出した。その結果を表1に示した。デキストランを陰性コントロールに添加することにより、陰性検体および陽性検体のCOI値の違いがより明確に示された。

20

【0026】

【表1】

陰性コントロール デキストラン添加量 (%)	陰性コントロール (凝集率(%))	陰性試料 COI 値	陽性試料 COI 値
0	0.49	0.208	2.485
1	0.58	0.13	2.547
2	0.72	0	2.923
3	0.9	0	3.5
4	1.25	0	7

30

40

【0027】

【発明の効果】

以上説明したように本発明の免疫分析方法、つまり、陰性コントロールに増感剤を添加して陰性コントロールの測定値を増加させてカットオフインデックス(COI)値を算出することにより、陰性検体についてはCOI値が0を示し、信頼性の高い検査結果を提供す

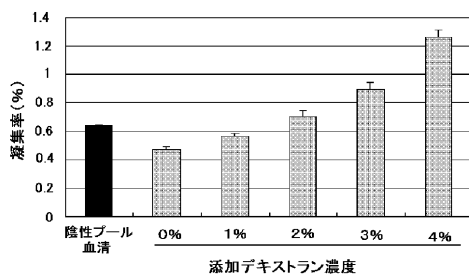
50

ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】各濃度のデキストランを添加したときの陰性コントロールの測定結果を示す図である。(実施例 1)

【図 1】



专利名称(译)	免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004117039A</a>	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002277471	申请日	2002-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	山口温輝 永井慎也 宮地峰輝		
发明人	山口 温輝 永井 慎也 宮地 峰輝		
IPC分类号	G01N33/531		
FI分类号	G01N33/531.B		
代理人(译)	庄司隆		
其他公开文献	JP2004117039A5 JP3968287B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

解决的问题：提供一种分析方法，其中在免疫学测量方法中，当通过截止指数值（COI值）进行分析时，阴性样品显示0值。解决方案：COI值的计算方法是：将测试样品的反应量减去阴性对照反应量所得的值除以截止控制反应量减去阴性对照反应量所得的值。当对照样品的测量值为阴性时，将敏化剂（例如葡聚糖）添加到用于测量的阴性对照中，以增加对照的测量值。可以是0。

【表 1】

陰性コントロール デキストラン添加量 (%)	陰性コントロール (凝集率(%))	陰性試料 COI 値	陽性試料 COI 値
0	0.49	0.208	2.485
1	0.58	0.13	2.547
2	0.72	0	2.923
3	0.9	0	3.5
4	1.25	0	7