

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/080937

発行日 平成27年4月27日 (2015. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成25年6月6日 (2013. 6. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	L
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

出願番号	特願2013-547146 (P2013-547146)	(71) 出願人	000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区晴海一丁目8番10号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2012/080538	(72) 発明者	草野 正芳 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス富士工場内
(22) 国際出願日	平成24年11月27日 (2012.11.27)	(72) 発明者	山本 博子 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2011-258550 (P2011-258550)	(72) 発明者	永井 豪 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内
(32) 優先日	平成23年11月28日 (2011.11.28)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体中の測定対象物の連続的免疫測定法における非特異反応抑制方法

(57) 【要約】

検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機を用いるプラスミノーゲン及びフィブリンを含む複数検体の連続的免疫測定法において、検体中の測定対象物の正確な測定を可能とする、非特異反応抑制方法を提供する。

検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノーゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる、検体中の測定対象物の連続的免疫測定法において、測定対象物と測定対象物に結合する抗体との反応を、カゼイン及び組織プラスミノーゲンアクチベーター存在下に行うことを特徴とする非特異反応抑制方法。

本発明の非特異反応抑制方法は、肝臓癌等の臨床診断に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる、検体中の測定対象物の連続的免疫測定法において、測定対象物と測定対象物に結合する抗体との反応を、カゼイン及び組織プラスミノゲンアクチベーター存在下に行うことを特徴とする非特異反応抑制方法。

【請求項 2】

測定対象物が、PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II) である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる、非特異反応が抑制された検体中の測定対象物の連続的免疫測定法のための試薬であって、測定対象物に結合する抗体、カゼイン及び組織プラスミノゲンアクチベーターを含むことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法に使用するための測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中の測定対象物の連続的免疫測定法における非特異反応抑制方法、および、非特異反応が抑制された測定対象物の連続的免疫測定法のための試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫測定法においてしばしば問題となる非特異反応は、抗原抗体反応において使用される標識化抗体又は標識化競合物質が、測定対象物とは結合せずに、固相に結合すること起因する。この非特異反応を抑制し正確に測定対象物を測定することを目的に、種々のブロッキング剤を用いる免疫学的測定方法が知られており、例えば牛血清アルブミン（非特許文献 1 参照）、カゼイン（特許文献 1、2 参照）等のブロッキング剤を用いる非特異反応抑制方法が報告されている。

【0003】

検体として、フィブリン等のフィブリン様物質を含む血清又は血漿を用いる場合、フィブリン様物質が測定系に混入することにより、測定精度の悪化等、測定に悪影響を及ぼす、という問題がある。例えば、肝細胞癌マーカーである PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II; 以下、PIVKA-II と略記する) の免疫測定法において、フィブリン様物質の測定系への混入は、測定に悪影響を及ぼすことが知られている。PIVKA-II は、肝で合成されるプロトロンビンの前駆体で、正常プロトロンビンで見られる Gla ドメイン部分の γ -カルボキシ化グルタミン酸が見られず、カルシウムイオンと結合できない、凝固活性をもたない異常プロトロンビンと呼ばれ、肝細胞癌患者のみならず、ビタミン K 欠乏症の患者においても上昇することが知られている。そのため、PIVKA-II は、肝細胞癌及びビタミン K 欠乏症の診断に用いられている。

【0004】

フィブリン様物質が測定系に混入することにより、測定に悪影響を及ぼすという問題に対する解決方法としては、フィブリン様物質を溶解する酵素を用いる方法（特許文献 3 参照）、フィブリン様物質および/またはプロトロンビンを共存させて抗原抗体反応を行う方法（特許文献 4 参照）、スキムミルク等の乳蛋白を含有する緩衝液を用いる方法（特許文献 5 参照）、アルブミン、カゼイン等の蛋白質、ポリスチレンスルホン酸、ポリアクリル酸、デキストラン硫酸等のポリマー、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化鉄等の塩類、及び、これらの混合物を用いる方法（特許文献 6 参照）等が知られている。

【0005】

臨床検査の現場では、多数の検体の連続的測定方法がしばしば行われている。連続的測

10

20

30

40

50

定には、自動分析機が用いられることが多く、自動分析機を用いる測定においては、検体採取用のノズルと測定試薬採取用のノズルとが共用される場合がある。検体採取後、ノズルは精製水等により洗浄され、測定試薬を採取するが、検体採取後のノズルの洗浄が不十分な場合には、洗浄しきれなかった微量の検体がノズルを通じて測定試薬と混合され、測定試薬が汚染されてしまう。測定試薬が検体で汚染されてしまうと、検体中の成分と、測定試薬中の成分とが反応してしまい、測定試薬本来の性能が維持されなくなるという問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平1-217266号公報

【特許文献2】特開平5-322891号公報

【特許文献3】特開2000-146954号公報

【特許文献4】特開2000-235029号公報

【特許文献5】特開2000-346841号公報

【特許文献6】特開2010-127827号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】石川榮治他、「酵素免疫測定法」第3版、医学書院

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、複数検体の連続的免疫測定法において、検体中の測定対象物の正確な測定を可能とする、複数検体の連続的免疫測定法における非特異反応抑制方法、および、非特異反応が抑制された測定対象物の連続的免疫測定法のための試薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数検体を用いる、検体中の測定対象物の連続的免疫測定法において、連続測定が進行するにつれ、正確な測定ができなくなる、という課題に直面した。発明者は、本課題を検討した結果、連続測定が進行するにつれ、ノズルを介して検体が測定試薬に混入し、検体中のプラスミノゲンが、測定試薬中のプラスミノゲンアクチベーターと反応して生成するプラスミンにより、カゼインからなるブロッキング剤を分解してしまい、ブロッキング剤の本来の効果が損なわれるため、正確な測定ができなくなることを突き止めた。これに対して、本発明者らは、プラスミノゲンアクチベーターのうち組織プラスミノゲンアクチベーターを用いることにより、連続測定が進行しても、組織プラスミノゲンアクチベーターによりカゼインが分解されることなく、正確な測定が維持されることを見出して、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、以下の[1]～[3]に関する。

【0010】

[1] 検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる、検体中の測定対象物の連続的免疫測定法において、測定対象物と測定対象物に結合する抗体との反応を、カゼイン及び組織プラスミノゲンアクチベーター存在下に行うことを特徴とする非特異反応抑制方法。

[2] 測定対象物が、PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II)である[1]に記載の方法。

[3] 検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる、非特異反応が抑制された

10

20

30

40

50

検体中の測定対象物の連続的免疫測定法のための試薬であって、測定対象物に結合する抗体、カゼイン及び組織プラスミノゲンアクチベーターを含むことを特徴とする、[1] または [2] に記載の方法に使用するための測定試薬。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明により、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる連続的免疫測定法において、検体中の測定対象物の正確な測定を可能とする非特異反応抑制方法、および、測定試薬が提供される。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 1 2 】

【図 1】連続測定により使用された測定試薬の回数が、反応キュベットへの標識化抗体の非特異吸着に与える影響を示す図である。縦軸は発光カウントを、横軸は測定試薬を表し、Aは連続測定前の測定試薬を、Bは60回連続測定した後の測定試薬を、Cは160回連続測定した後の測定試薬を、Dは350回連続測定した後の測定試薬を表す。 は食塩水を、 は血清1を、 囲み点線は血清2を、灰色四角は血清3を表す。

【図 2】連続測定後の抗体溶液にカゼインを添加することによる、反応キュベットへの標識化抗体の非特異吸着抑制を示す図である。縦軸は発光カウントを、横軸は測定試薬を表し、Eは200回連続測定した測定試薬を、Fは200回連続測定した後の検体希釈液にカゼインを添加して調製した1%カゼイン含有検体希釈液を含有する測定試薬を表す。 は食塩水を、 は血清11を、 囲み点線は血清12を表す。

20

【 0 0 1 3 】

【図 3】検体として、肝癌患者由来の血清を含むヒト由来の血清（45検体）を用いた、全自動化学発光免疫測定装置「CL-JACKTM」、及び、プラスミノゲンアクチベーターを含まない実施例 2 の測定試薬による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法と、全自動電気化学発光免疫測定装置「ピコルミTMII」、及び、PIVKA-II測定キット「ピコルミTMPIVKA-II」による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法（対照法）との相関関係を示す。左図は、連続測定開始前の測定試薬を用いる連続測定における相関図を、右図は、45回連続測定を行った後の測定試薬を用いる連続測定における相関図を表す。左図、右図とも、縦軸はプラスミノゲンアクチベーターを含まない実施例 2 の測定試薬による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法により決定されたPIVKA-II濃度(mAU/mL)を表し、横軸は対照法により決定されたPIVKA-II濃度(mAU/mL)を表す。

30

【 0 0 1 4 】

【図 4】検体として、肝癌患者由来の血清を含むヒト由来の血清（45検体）を用いた、全自動化学発光免疫測定装置「CL-JACKTM」、及び、ストレプトキナーゼを含む実施例 2 の測定試薬による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法と、全自動電気化学発光免疫測定装置「ピコルミTMII」、及び、PIVKA-II測定キット「ピコルミTMPIVKA-II」による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法（対照法）との相関関係を示す。左図は、連続測定開始前の測定試薬を用いる連続測定における相関図を、右図は、45回連続測定を行った後の測定試薬を用いる連続測定における相関図を表す。左図、右図とも、縦軸はストレプトキナーゼを含む実施例 2 の測定試薬による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法により決定されたPIVKA-II濃度(mAU/mL)を表し、横軸は対照法により決定されたPIVKA-II濃度(mAU/mL)を表す。

40

【 0 0 1 5 】

【図 5】検体として、肝癌患者由来の血清を含むヒト由来の血清（45検体）を用いた、全自動化学発光免疫測定装置「CL-JACKTM」、及び、組織プラスミノゲンアクチベーターを含む実施例 3 の測定試薬による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法と、全自動電気化学発光免疫測定装置「ピコルミTMII」、及び、PIVKA-II測定キット「ピコルミTMPIVKA-II」による検体中のPIVKA-IIの連続的免

50

疫測定法（対照法）との相関関係を示す。左図は、連続測定開始前の測定試薬を用いる連続測定における相関図を、右図は、45回連続測定を行った後の測定試薬を用いる連続測定における相関図を表す。左図、右図とも、縦軸は組織プラスミノゲンアクチベーターを含む実施例3の測定試薬による検体中のPIVKA-IIの連続的免疫測定法により決定されたPIVKA-II濃度(mAU/mL)を表し、横軸は対照法により決定されたPIVKA-II濃度(mAU/mL)を表す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

（非特異反応抑制方法）

本発明の非特異反応抑制方法は、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により行われる、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体を用いる、検体中の測定対象物の連続的免疫測定法における非特異反応抑制方法であり、プラスミノゲン及びフィブリンを含む検体を後述の測定試薬と反応させ、抗原抗体反応を行う際に、当該抗原抗体反応をカゼイン、及び、組織プラスミノゲンアクチベーターの存在下に行うことを特徴とする。

10

【0017】

（連続的免疫測定法）

本発明における自動分析機による複数検体中の測定対象物の連続的免疫測定法では、免疫測定法が複数検体に対して連続的に行われる。1つの検体に対する測定は、検体と測定試薬との反応工程、検出工程、検出反応後の反応容器の洗浄工程を含み、各工程は、時間、温度、回数等のパラメータにより規定される。例えば、反応工程及び検出工程における反応温度は、通常、0~50℃であり、4~45℃が好ましく、20~40℃が特に好ましい。反応時間は、通常、2.5分間~1時間であり、5~20分間が好ましい。洗浄工程における洗浄時間は、通常、2.5~30分間であり、5~10分間が好ましい。洗浄工程において使用される洗浄液としては、反応後の反応混合物を除去し得る洗浄液であれば特に制限はなく、例えばリン酸緩衝化生理食塩水[0.15 mol/L塩化ナトリウムを含有する10 mmol/Lリン酸緩衝液、pH7.2（以下、PBSと記す）]、界面活性剤を含有するPBS、後述の水性媒体等が挙げられる。当該界面活性剤としては、例えばツイーン(Tween) 20等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

20

【0018】

（自動分析機）

本発明における自動分析機は、連続的免疫測定法に使用され、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機であれば特に制限はなく、例えば磁性粒子を担体として用いる全自動化学発光免疫測定装置「CL-JACKTM」（協和メデックス社製）等が挙げられる。

30

【0019】

（検体）

本発明における検体は、プラスミノゲン及びフィブリンを含む検体であれば特に制限はなく、例えば血漿、血清、全血等が挙げられ、血漿、血清が好ましい。

【0020】

（測定対象物）

本発明における測定対象物は、プラスミノゲン及びフィブリンを含む検体中の測定対象物であって、免疫測定方法により測定できる測定対象物であれば特に制限はなく、例えばPIVKA-II、インターロイキン-2受容体等が挙げられ、PIVKA-IIが好ましい。

40

【0021】

（測定試薬）

本発明における測定試薬は、測定対象物に結合する抗体、カゼイン及び組織プラスミノゲンアクチベーターを含有し、プラスミノゲン及びフィブリンを含む検体中の測定対象物と当該測定対象物に結合する抗体との反応、すなわち、抗原抗体反応に使用され、具

50

体的には以下の測定試薬が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

・測定試薬 1

カゼイン、組織プラスミノゲンアクチベーター、及び、測定対象物に結合する第 1 の抗体が不溶性担体上に固定化された固相、及び、測定対象物に結合する第 2 の抗体に標識が結合した標識化第 2 抗体を含む試薬。

【 0 0 2 3 】

・測定試薬 2

カゼイン、組織プラスミノゲンアクチベーター、及び、測定対象物に結合する第 1 の抗体が不溶性担体上に固定化された固相、及び、競合物質に標識が結合した標識化競合物質を含む試薬。

10

ここで競合物質とは、「測定対象物に結合する抗体」に結合できる物質であって、かつその結合が、該測定対象物と競合的であるような物質を意味する。

【 0 0 2 4 】

・測定試薬 3

カゼイン、組織プラスミノゲンアクチベーター、及び、競合物質が不溶性担体上に固定化された固相、及び、測定対象物及び競合物質の両者に結合する抗体に標識が結合した標識化抗体を含む試薬。

【 0 0 2 5 】

本発明において、測定試薬には、必要に応じて、添加物として、後述の水性媒体、酵素基質（標識が酵素である場合）、金属イオン、糖類、防腐剤、界面活性剤、蛋白質安定化剤等が含まれていてよい。

20

【 0 0 2 6 】

本発明において、測定試薬はキットの形態で保存又は使用されてもよい。キットとしては、例えば第 1 試薬及び第 2 試薬からなる 2 試薬系キット、第 1 ~ 第 3 試薬からなる 3 試薬系キット、第 1 ~ 第 4 試薬からなる 4 試薬系キット等が挙げられる。測定試薬中に酵素基質が含まれる場合には、酵素基質と、標識化抗体又は標識化競合物質とは、別々の試薬に含まれることが好ましい。

【 0 0 2 7 】

キットとしては、例えばストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン化第 1 抗体溶液、及び、酵素標識化第 2 抗体溶液を含むキット、検体希釈液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン化第 1 抗体溶液、及び、酵素標識化第 2 抗体溶液を含むキット等が挙げられる。検体希釈液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン化第 1 抗体溶液、及び、酵素標識化第 2 抗体溶液を含むキットにおいては、組織プラスミノゲンアクチベーターは検体希釈液に含まれることが好ましく、カゼインは、検体希釈液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン化第 1 抗体溶液、及び、酵素標識化第 2 抗体溶液の 1 つまたは複数に含まれることが好ましい。

30

【 0 0 2 8 】

（検体と測定試薬との反応～抗原抗体反応）

・検体と測定試薬 1 との反応

検体中の測定対象物（抗原）と、固相中の第 1 の抗体、及び、標識化第 2 抗体との反応（抗原抗体反応）を、カゼイン、及び、組織プラスミノゲンアクチベーターの存在下に行い、不溶性担体上に、第 1 抗体、測定対象物、及び、標識化第 2 抗体からなる免疫複合体を生成させ、当該免疫複合体中の標識量を測定し、測定された標識量を、予め既知濃度の測定対象物を用いて作成された標識量と測定対象物濃度との関係を表す検量線に照らし合わせるにより、検体中の測定対象物の濃度を決定する。

40

【 0 0 2 9 】

・検体と測定試薬 2 との反応

検体中の測定対象物（抗原）及び標識化競合物質と、固相中の抗体との反応（抗原抗体反応）を、カゼイン、及び、組織プラスミノゲンアクチベーターの存在下に行い、不溶

50

性担体上に、抗体と測定対象物とからなる免疫複合体、及び、抗体と標識化競合物質とからなる免疫複合体を生成させ、抗体と標識化競合物質とからなる免疫複合体中の標識量を測定し、測定された標識量を、予め既知濃度の測定対象物を用いて作成された標識量と測定対象物濃度との関係を表す検量線に照らし合わせることにより、検体中の測定対象物の濃度を決定する。

【0030】

・検体と測定試薬3との反応

検体中の測定対象物（抗原）及び固相中の競合物質と、標識化抗体との反応（抗原抗体反応）を、カゼイン、及び、組織プラスミノゲンアクチベーターの存在下に行い、不溶性担体上に、競合物質と標識化抗体とからなる免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識量を測定し、測定された標識量を、予め既知濃度の測定対象物を用いて作成された標識量と測定対象物濃度との関係を表す検量線に照らし合わせることにより、検体中の測定対象物の濃度を決定する。

10

【0031】

上記のいずれの反応においても、抗原抗体反応により免疫複合体を生成させた後、当該免疫複合体が固定化された不溶性担体から、未反応の反応体を除くための操作を行うことが好ましい。未反応の反応体を除いた後、不溶性担体を洗浄液で洗浄することが好ましい。洗浄液としては、例えば前述の洗浄液等が挙げられる。

【0032】

不溶性担体として磁性粒子を用いる場合、抗原抗体反応後、反応容器の外に磁石を配置して集磁することにより、当該免疫複合体を固定化した磁性粒子を、未反応の反応体と分離することができる。

20

【0033】

本発明において、前処理として、検体を、組織プラスミノゲンアクチベーターを含む検体希釈液と混合したものを予め用意し、検体希釈液で処理された検体を抗原抗体反応に供することもできる。また、検体を、組織プラスミノゲンアクチベーターを含む検体希釈液と混合し、混合液を攪拌または静置した後、抗原抗体反応に供することもできる。混合液を攪拌または静置することにより、検体中のプラスミノゲンが組織プラスミノゲンアクチベーターと反応し、生成したプラスミンにより、検体中のフィブリンが分解されるため、混合液を攪拌または静置することが好ましい。

30

【0034】

磁性粒子としては、免疫測定方法が可能な磁性粒子であれば特に限定はなく、例えばフェライトで被覆したラテックス、フェライトで被覆したポリマー粒子等が挙げられる。また、抗体の結合を容易にするために、ビオチンと結合する性質を有するアビジン、ニュートラアビジン又はストレプトアビジンを表面に固定化した磁性粒子も使用することができる。磁性粒子の粒径は、特に限定されないが、例えば $1\mu\text{m}$ ~ $6\mu\text{m}$ であり、好ましくは $1\mu\text{m}$ ~ $3\mu\text{m}$ である。本発明に用いられる磁性粒子としては、市販の磁性粒子を用いることができる。市販の磁性粒子としては、例えばDynabeads MyOne Streptavidin T1（ダイナル社製）、Dynabeads M280 Streptavidin（ダイナル社製）、Estapor（メルク社製）、Sera-Mag Magnetic Streptavidin Particles（サーモサイエンティフィック社製）、MAGNOTEX-SA（J S R社製）等が挙げられる。

40

【0035】

（抗体）

本発明における、測定対象物に結合する抗体としては、測定対象物に特異的に結合する抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用できる。また、本発明に用いられる抗体としては、抗体断片を包含する。具体的には、抗体をパイン処理により得られるFab、ペプシン処理により得られる $F(ab')_2$ 、ペプシン処理 - 還元処理により得られるFab'等のFc部分を除去した抗体断片等が挙げられる。

【0036】

本発明における、測定対象物に結合する抗体は、測定対象物またはその一部分を抗原と

50

して用いて通常の方法により取得することができるが、市販品を用いることもできる。

【0037】

例えば、測定対象物がPIVKA-IIである場合、第1の抗体と第2の抗体の組み合わせとしては、例えばヒトPIVKA-IIに特異的に結合する抗体とヒトPIVKA-IIに特異的に結合する抗体との組み合わせ、ヒトPIVKA-IIに特異的に結合する抗体とヒトプロトロンビンに結合する抗体との組み合わせ、ヒトプロトロンビンに結合する抗体とヒトPIVKA-IIに特異的に結合する抗体との組み合わせ等が挙げられ、ヒトPIVKA-IIに特異的に結合する抗体とヒトプロトロンビンに結合する抗体との組み合わせが好ましい。

【0038】

ヒトPIVKA-IIに特異的に結合する抗体としては、ヒトPIVKA-IIで免疫した動物から公知の方法により製造することができるが、例えば特開昭60-60557号公報に記載の方法に従い、マウス抗ヒトPIVKA-IIモノクローナル抗体を製造することができる。

【0039】

また、ヒトプロトロンビンに結合する抗体としては、ヒトプロトロンビンにもヒトPIVKA-IIにも結合する抗体であれば特に制限はなく、例えばウサギ抗ヒトプロトロンビンポリクローナル抗体やマウス抗ヒトプロトロンビンモノクローナル抗体等が挙げられ、例えば特開昭60-60557号公報に記載の方法に従い、ウサギ抗ヒトプロトロンビンポリクローナル抗体を製造することができる。また、市販品も用いることができ、例えばウサギ抗ヒトプロトロンビンポリクローナル抗体である「Prothrombin, anti-human」(ASSAYPRO社製)や、マウス抗ヒトプロトロンビンモノクローナル抗体である「Anti-Human Prothrombin - Monoclonal」(Haematologic Technologies Inc.社製)等を用いることができる。

【0040】

測定試薬1を用いるサンドイッチ法による免疫測定法においては、測定対象物に結合する第1の抗体と、測定対象物に結合する第2の抗体とが使用されるが、第1の抗体が認識する測定対象物の部位と、第2の抗体が認識する測定対象物の部位とは同じでも異なってもよく、異なっていることが好ましい。

【0041】

(競合物質)

本発明における競合物質とは、前述したように「測定対象物に結合する抗体」に結合できる物質であって、かつその結合が、該測定対象物と競合的であるような物質を意味し、測定対象物そのものも含まれる。競合物質は、試料中の測定対象物を競合法により測定する際に使用されるものである。したがって、競合法において用いる測定対象物に結合する抗体は、測定対象物、競合物質および標識化競合物質に結合する抗体であり、該測定対象物と結合して免疫複合体を生成するとともに、競合物質とも結合して免疫複合体を生成する。

【0042】

競合物質としては、測定対象物に結合する抗体が認識するエピトープの構造と同じ構造を有している物質が好ましく、さらに、測定対象物に結合する抗体への結合の強さが、該抗体に対する該測定対象物の結合の強さと同程度であるものが好ましく、測定対象物そのものが好ましい。

【0043】

(固相と不溶性担体)

本発明における固相とは、測定対象物に結合する抗体、又は、競合物質を不溶性担体に固定化して調製される。不溶性担体としては、測定対象物に結合する抗体、又は、競合物質を安定に保持できるものであればいかなるものも使用することができる。不溶性担体の好ましい素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、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、ゼラチン、ア

10

20

30

40

50

ガロース、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックス、磁性粒子や金属等が挙げられる。不溶性担体の好ましい形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックス等の微粒子、スティック等が挙げられる。

【0044】

(抗体又は競合物質の不溶性担体への固定化)

本発明において、抗体又は競合物質の不溶性担体への固定化方法としては、不溶性担体上に抗体又は競合物質を安定に固定化し得る方法であれば特に制限はなく、例えば物理学的結合を利用した方法、化学的結合を利用した方法、これらの併用等の方法が挙げられる。物理学的結合としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学的結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。

10

【0045】

抗体または競合物質は、直接、不溶性担体に固定化してもよいし、間接的に不溶性担体に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばアビジンを固定化した不溶性担体に、ビオチン化した抗体または競合物質を添加し、ビオチンとアビジンとの特異的結合を介して、抗体または競合物質を不溶性担体に固定化する方法が挙げられる。また、不溶性担体に、抗体に特異的に結合する抗体または競合物質に特異的に結合する抗体を固定化し、この抗体を介して抗体または競合物質を不溶性担体に固定化することもできる。あるいは、抗体または競合物質は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体に固定化してもよい。

20

【0046】

リンカーとしては、例えば、抗体または測定対象物の官能基と不溶性担体の側鎖の官能基の両者と共有結合できる分子であればいずれでも用いることができる。例えば、抗体または測定対象物が有する官能基と反応することができる第1の反応活性基と、不溶性担体の側鎖の官能基と反応することができる第2の反応活性基を同時に持つ分子が挙げられ、第1の反応活性基と第2の反応活性基が異なる基であることが好ましい。抗体又は競合物質の官能基、及び、不溶性担体はその表面に保持している官能基としては、例えばカルボキシ基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、N-ヒドロキシサクニル基、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける活性な反応性基としては、例えば、アシルアジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル、ペンタフルオロフェニル(PFP)エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基が挙げられる。

30

【0047】

(標識化抗体及び標識化競合物質)

標識化抗体及び標識化競合物質における標識としては酵素、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。

【0048】

酵素としては、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

40

【0049】

蛍光物質としては、例えば、FITC(フルオレッセイン イソチオシアナート)、RITC(ローダミンB-イソチオシアナート)、蛍光を発する蛋白質等が挙げられる。蛍光を発する蛋白質としては、例えばquantum dot(Science, 281, 2016-2018, 1998)、フィコエリスリン等のフィコビリ蛋白質、GFP(Green fluorescent Protein)、RFP(Red fluorescent Protein)、YFP(Yellow fluorescent Protein)、BFP(Blue fluorescent Protein)等が挙げられる。

【0050】

発光物質としては、例えばアクリジニウムおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。

50

【 0 0 5 1 】

抗体又は測定対象物と標識との反応による抗体又は測定対象物の標識化は、抗体又は測定対象物と標識物質それぞれが有する官能基の間で、リンカーを介して、又は、介さず共有結合を生じる反応によって行うことができる。官能基としては、カルボキシル基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、ヒドロキシサクシニルエステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基等が挙げられる。この官能基同士の間で縮合反応により標識化を行うことができる。

【 0 0 5 2 】

リンカーを介さない結合方法としては例えば、EDC等のカルボジイミド化合物を用いる方法等が挙げられる。この場合、NHS又はその誘導体等の活性エステルを使用することもできる。イソチオシアナート基とアミノ基の間の縮合反応は、他の試薬を必要とせず、中性～弱アルカリ性の条件で混合するだけで進行するため、好ましい。

10

【 0 0 5 3 】

リンカーとしては、例えば、標識と抗体又は競合物質とをそれぞれの官能基を介して結合させうる分子等が挙げられる。例えば、抗体のアミノ酸残基と反応することができる第1の官能基と、標識物質の側鎖の官能基と反応することができる第2の官能基とを同一分子内に有する分子等が挙げられ、第1の官能基と第2の官能基とが異なる基であることが好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

(標識量の測定)

免疫複合体の標識の量の測定方法は、標識に応じて適切なものを選ぶことができる。すなわち、標識が発色物質、すなわち、ある波長の光を吸収する物質の場合、分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識が蛍光物質の場合には、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識が発光物質の場合には、発光光度計や発光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。

20

【 0 0 5 5 】

標識が酵素である場合、標識量は、酵素活性を測定することにより測定することができる。例えば酵素の基質を当該酵素と反応させ、生成した物質を測定することにより、標識量を測定することができる。

【 0 0 5 6 】

酵素がペルオキシダーゼである場合には、例えば吸光度法、蛍光法等によりペルオキシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および酸化発色型色原体の組み合わせとを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。

30

【 0 0 5 7 】

ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジジン、*o*-フェニレンジアミン、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン ナトリウム塩(DA-64)、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン ナトリウム塩(DA-67)、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス〔3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル〕アミン(BCMA)等が挙げられる。

40

【 0 0 5 8 】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つ

50

の化合物の組み合わせとしては、カブラーとアニリン類（トリンダー試薬）との組み合わせ、カブラーとフェノール類との組み合わせ等があげられる。カブラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等があげられる。アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、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-(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-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、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,N-ジメチル-3-メチルアニリン、N,N-ビス(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、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、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3,5-ジメトキシアニリン(F-DAOS)等があげられる。フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等が挙げられる。

10

20

【0059】

蛍光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および蛍光物質の組み合わせとを反応させ、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で生成した蛍光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該蛍光物質としては、例えば4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。

【0060】

発光法によるペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および発光物質の組み合わせとを反応させ、発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で生成した発光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該発光物質としては、例えばルミノール化合物、ルシゲニン化合物等が挙げられる。

30

【0061】

酵素がアルカリホスファターゼである場合には、例えば発光法等によりアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。発光法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する方法としては、例えばアルカリホスファターゼとその基質とを反応させ、生成した発光の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。アルカリホスファターゼの基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム塩(AMPPD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]カン]}-4-イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CDP-StarTM)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]}-4-イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CSPDTM)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩(LumigenTM APS-5)等が挙げられる。

40

【0062】

酵素が-D-ガラクトシダーゼである場合には、例えば吸光度法(比色法)、発光法または蛍光法等により-D-ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法(比色法)により-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばo-ニ

50

トロフェル - D - ガラクトピラノシド等が挙げられる。発光法により - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。 - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン - プラス [Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製] またはその類似化合物等があげられる。蛍光法により - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の蛍光度を蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等があげられる。 - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えば 4 - メチルウンベリフェリル - D - ガラクトピラノシド等が挙げられる。

10

【0063】

酵素がルシフェラーゼである場合には、例えば発光法等によりルシフェラーゼ活性を測定することができる。発光法によりルシフェラーゼ活性を測定する方法としては、例えばルシフェラーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。ルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等が挙げられる。

【0064】

(カゼイン)

本発明におけるカゼインとしては、特に制限はないが、ブロッキング剤として使用可能なカゼインが好ましい。本発明におけるカゼインには、ウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ胎児血清(FBS)、ウサギ血清、ウマ血清、ゼラチン、界面活性剤等のブロッキング剤が含まれていてもよい。

20

【0065】

本発明において、カゼインは、組織プラスミノゲンアクチベーターと共に抗原抗体反応時に共存していればよく、固相中の不溶性担体粒子上に担持されていてもよい。

【0066】

(組織プラスミノゲンアクチベーター)

本発明における組織プラスミノゲンアクチベーターは、プラスミノゲンをプラスミンに変換するセリンプロテアーゼ活性を有する組織プラスミノゲンアクチベーターであれば特に制限はない。プラスミノゲンから変換されて生成したプラスミンはフィブリンを溶解する。本発明における組織プラスミノゲンアクチベーターとして、例えば大腸菌により産生されたもの、人又は動物由来の組織から抽出したもの、これら組織由来の組織培養液から抽出したもの、遺伝子工学的的手法により製造されるもの等が挙げられる。

30

【0067】

また、本発明における組織プラスミノゲンアクチベーターには、天然型のみならず改変型も含まれる。改変型の組織プラスミノゲンアクチベーターは例えば、遺伝子工学的手法を利用して天然型組織プラスミノゲンアクチベーターの1または複数のアミノ酸の付加、欠失または置換を行うことによって取得することができる。さらに、本発明において、市販の組織プラスミノゲンアクチベーターも使用することができる。組織プラスミノゲンアクチベーターの市販品としては、例えばTissue Plasminogen Activator, Human, Recombinant (tPA) (ITSI BIOSCIENCES社製)、plasminogen activator, tissue (PLAT) Homo sapiens, Over-expression Lysate (OriGene Technologies, Inc.社製)等が挙げられる。

40

【0068】

(非特異反応抑制効果の評価)

本発明の非特異反応抑制方法による非特異反応抑制効果は、例えば次の工程を含む方法により評価することができる。

(1) 検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機、及び、測定試薬を用いて、プラスミノゲン及びフィブリンを含む複数の検体について、各検体中の測定対象物を免疫測定法により連続的に測定する工程；

50

(2) 自動免疫測定装置を用いる連続的免疫測定法において、正確な測定が可能な既知の連続的免疫測定法(対照法)により、同一の複数検体の各検体中の当該測定対象物を測定する工程;

(3) 工程(1)の測定で得られた測定値と、工程(2)の測定で得られた測定値とを比較する工程。

【0069】

ここで、測定対象物がPIVKA-IIの場合、対照法としては、例えば全自動電気化学発光免疫測定装置「ピコルミ^{T M}II」(エーディア社製)、及び、PIVKA-II測定キット「ピコルミ^{T M}PIVKA-II」(エーディア社製)を用いる方法等が挙げられる。

10

【0070】

上記工程(3)での比較において、工程(1)の測定で得られた測定値と、工程(2)の測定で得られた測定値との相関の相関係数が1に近い程、非特異反応が抑制されていると評価でき、相関係数が1から外れる程、非特異反応が抑制されていないと評価することができる。

【0071】

非特異反応抑制効果は、次の工程を含む方法によっても評価することができる。

(1) 検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機による連続測定に供されていない測定試薬、及び、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機により連続測定が行われた測定試薬を準備する工程;

20

(2) 工程(1)で準備された各測定試薬、及び、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機を用いて、プラスミノーゲン及びフィブリンを含む同一の複数検体について、各検体中の測定対象物を免疫測定法により連続的に測定する工程;

(3) 工程(2)の連続測定により得られた測定値について、連続測定に供されていない測定試薬を用いた場合の測定値と、連続測定が行われた測定試薬を用いた場合の測定値とを比較する工程。

【0072】

上記工程(3)での比較において、工程(1)の測定で得られた測定値と、工程(2)の測定で得られた測定値との相関の相関係数が1に近い程、非特異反応が抑制されていると評価でき、相関係数が1から外れる程、非特異反応が抑制されていないと評価することができる。

30

【0073】

(測定試薬中の添加物)

前述のとおり、本発明において、測定試薬には、必要に応じて、水性媒体、酵素基質(標識が酵素である場合)、金属イオン、糖類、防腐剤、界面活性剤、蛋白質安定化剤等の添加物が含まれていてよい。

【0074】

水性媒体としては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられ、緩衝液が好ましい。緩衝液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH1~11の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、パルピツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、グッド緩衝剤等が挙げられる。

40

【0075】

グッド緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝剤、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝剤、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝剤、2-[N-(2-アセトアミド)アミノ]エタンスルホン酸(ACES)緩衝剤、3-モル

50

ホリノ - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (MOPSO) 緩衝剤、2 - [N , N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エタンスルホン酸 (BES) 緩衝剤、3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS) 緩衝剤、2 - { N - [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アミノ } エタンスルホン酸 (TES) 緩衝剤、N - (2 - ヒドロキシエチル) - N ' - (2 - スルホエチル) ピペラジン (HEPES) 緩衝剤、3 - [N , N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) アミノ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (DIPSO) 緩衝剤、2 - ヒドロキシ - 3 - { [N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アミノ } プロパンスルホン酸 (TAPSO) 緩衝剤、ピペラジン - N , N ' - ビス (2 - ヒドロキシプロパン - 3 - スルホン酸) (POPSO) 緩衝剤、N - (2 - ヒドロキシエチル) - N ' - (2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル) ピペラジン (HEPPSO) 緩衝剤、N - (2 - ヒドロキシエチル) - N ' - (3 - スルホプロピル) ピペラジン (EPPS) 緩衝剤、[N - トリス (ヒドロキシメチル) メチルグリシン] (Tricine) 緩衝剤、[N , N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) グリシン] (Bicine) 緩衝剤、3 - [N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アミノプロパンスルホン酸 (TAPS) 緩衝剤、2 - (N - シクロヘキシルアミノ) エタンスルホン酸 (CHES) 緩衝剤、3 - (N - シクロヘキシルアミノ) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (CAPSO) 緩衝剤、3 - (N - シクロヘキシルアミノ) プロパンスルホン酸 (CAPS) 緩衝剤等が挙げられる。

10

【 0 0 7 6 】

酵素基質としては、例えば前述の酵素基質等が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質 (ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、バイオエース、プロクリン300等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等が挙げられ、例えばトリトンX-100、トリトンX-405、トリトンX-705 (以上、日油社製) 等が挙げられる。蛋白質安定化剤としては、例えばペルオキシダーゼ安定化緩衝液、アルカリホスファターゼ安定化緩衝液等が挙げられる。

20

【 0 0 7 8 】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

30

【 実施例 1 】

【 0 0 7 9 】

(1) 検体

健常人由来の血清 (3検体) を検体として用いた。

【 0 0 8 0 】

(2) 測定試薬

以下の、検体希釈液、ビオチン化抗 P I V K A - I I 抗体溶液、及び、アルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液からなる測定試薬を調製した。

< 検体希釈液 >

M E S (p H 6 . 5)	50 mmol / L	40
アジ化ナトリウム	0.1%	
カゼイン	1%	
ストレプトキナーゼ (- hemolytic Streptococcus 由来 ; SIGMA社製)	150 kU / L	

【 0 0 8 1 】

< ビオチン化抗 P I V K A - I I 抗体溶液 >

第 1 抗体として、特開昭 6 0 - 6 0 5 5 7 号公報の実施例 1 に記載された方法に従い取得したマウス抗ヒト P I V K A - I I モノクローナル抗体を用いて、当該抗体と NHS- ビオチンとを混合し、37 で 1 時間反応させ、反応後の混合物をセファデックス G-25 カラム (GEヘルスサイエンス・ジャパン社製) に供して未反応の NHS- ビオチンを除去し、ビオチ

50

ン化マウス抗ヒト P I V K A - I I モノクローナル抗体を調製した。得られた当該ビオチン化モノクローナル抗体を用いて、以下の組成からなるビオチン化マウス抗ヒト P I V K A - I I モノクローナル抗体溶液を調製した。

M E S (p H 6 . 5)	50 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.1%
ビオチン化マウス抗ヒト P I V K A - I I モノクローナル抗体	3 μg/mL

【 0 0 8 2 】

< アルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液 >

第2抗体として、特開昭60-60557号公報の実施例1に記載された方法に従い取得したウサギ抗ヒトプロトンピンポリクローナル抗体をペプシンで消化した後、G3000S Wカラム（東ソー社製；口径：21.5 mm；長さ：60 cm）を用いたHPLCシステム（日立製作所社製）で分離して得られたF(ab')₂を用いた。得られたF(ab')₂を2-メルカプトエチルアミン塩酸塩（ナカライテスク社製）で還元した後、G3000SWカラム（東ソー社製；口径：21.5 mm；長さ：60 cm）を用いたHPLCシステム（日立製作所社製）でFab'を分離した。得られたFab'とアルカリホスファターゼとを以下の手順により、マレイミド法によって結合させた。

【 0 0 8 3 】

マレイミド化試薬Sulfo-HMCS（同仁化学研究所社製）を用いて、アルカリホスファターゼをマレイミド化し、反応混合物をセファデックスG-25カラム（GEヘルスサイエンス・ジャパン社製）に供して未反応のSulfo-HMCSを除去し、マレイミド化アルカリホスファターゼを得た。

【 0 0 8 4 】

調製したマレイミド化アルカリホスファターゼとFab'とを混合し、アルカリホスファターゼ標識化Fab'を作製した。得られたアルカリホスファターゼ標識化Fab'を用いて、以下の組成からなるアルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液を調製した。

M E S (p H 6 . 5)	50 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.1%
アルカリホスファターゼ標識化ウサギ抗プロトンピンポリクローナル抗体フラグメント	2 μg/mL
塩化ナトリウム	0.1 mol/L

【 0 0 8 5 】

(3) 反応キュベットへのアルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメントの非特異吸着の検討

全自動化学発光免疫測定装置「C L - J A C K ^{T M}」（協和メデックス社製）を用いて、以下の手順に従い、反応キュベットへのアルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメントの非特異吸着を検討した。

- (1) 血清(10 μL)及び検体希釈液(30 μL)を反応キュベットに添加する；
- (2) ビオチン化抗 P I V K A - I I 抗体溶液(30 μL)を反応キュベットに添加し、37 °C で1分間反応させる；
- (3) アルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液(30 μL)を反応キュベットに添加し、37 °C で10分間反応させる；
- (4) 反応キュベット内の反応混合物を除去する；
- (5) 反応キュベット内を、C L アナライザー洗浄液（協和メデックス社製）で洗浄する；
- (6) 発光物質 A P S - 5 を含む発光試薬(100 μL)を反応キュベットに添加し、37 °C で45秒間反応させる；
- (7) 発光量を測定する。

【 0 0 8 6 】

測定試薬として、連続測定に供する前の測定試薬、連続測定を60回行った後の測定試薬、連続測定を160回行った後の測定試薬、連続測定を350回行った後の測定試薬、それぞれの測定試薬を用いて、検体として、(1)の血清検体(3検体)を用いて、上記手順に従い、各検体に対する発光量を測定した。その結果を図1に示す。

【 0 0 8 7 】

図1から明らかな様に、連続測定をより多く行った後の測定試薬を用いた場合に、発光量の上昇が見られた。このことから、連続測定の回数が増えるにつれて、非特異反応が増大していることが分かった。

【 0 0 8 8 】

(4) 非特異反応増大の原因の検討

この非特異反応増大の原因について、以下の方法により検討した。「CL-JACKTM」による連続測定を200回行った後の測定試薬について、測定試薬を構成する試薬の1つである検体希釈液にカゼイン水溶液を添加し、1%カゼイン含有検体希釈液を含有する測定試薬(以下、1%カゼイン含有測定試薬という)を調製した。連続測定を200回行った後の測定試薬、及び、1%カゼイン含有測定試薬のそれぞれの測定試薬を用いて、血清検体(2検体)の各検体に対する発光量を、同様の手順に従って測定した。その結果を図2に示す。

【 0 0 8 9 】

図2から明らかな様に、連続測定を200回行った後の測定試薬を用いた測定では、発光量が上昇し、非特異反応が見られたのに対して、1%カゼイン含有測定試薬を用いた測定では、非特異反応が抑制された。このことから、非特異反応の増大が、検体希釈液中のカゼインの分解に起因することが判明した。

【 実施例 2 】

【 0 0 9 0 】

(1) 検体

肝癌患者由来の血清を含むヒト血清(45検体)を検体として用いた。

【 0 0 9 1 】

(2) 測定試薬

以下の、検体希釈液、磁性粒子懸濁液、ビオチン化抗PIVKA-I抗体溶液、及び、アルカリホスファターゼ標識化抗プロトロンビン抗体フラグメント溶液からなる測定試薬を調製した。

< 検体希釈液 >

MES (pH 6.5)	50 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.1%
カゼイン	1%
ストレプトキナーゼ (-hemolytic Streptococcus 由来 ; SIGMA社製)	0又は150 kU/L

【 0 0 9 2 】

< 磁性粒子懸濁液 >

磁性粒子として、ストレプトアビジンが結合した市販の磁性粒子を用いて、以下の組成からなる磁性粒子懸濁液を調製した。

MES (pH 6.5)	50 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.1%
ストレプトアビジン結合磁性粒子	1 g/L

【 0 0 9 3 】

< ビオチン化抗PIVKA-I抗体溶液 >

第1抗体として、特開昭60-60557号公報の実施例1に記載された方法に従い取得したマウス抗ヒトPIVKA-Iモノクローナル抗体を用いて、当該抗体とNHS-ビオチンとを混合し、37℃で1時間反応させ、反応後の混合物をセファデックスG-25カラム(G

10

20

30

40

50

Eヘルスサイエンス・ジャパン社製) に供して未反応のNHS-ビオチンを除去し、ビオチン化マウス抗ヒトPIVKA-I Iモノクローナル抗体を調製した。得られた当該ビオチン化モノクローナル抗体を用いて、以下の組成からなるビオチン化マウス抗ヒトPIVKA-I Iモノクローナル抗体溶液を調製した。

MES (pH 6.5)	50 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.1%
ビオチン化マウス抗ヒトPIVKA-I Iモノクローナル抗体	3 µg/mL

【0094】

<アルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液>

10

第2抗体として、特開昭60-60557号公報の実施例1に記載された方法に従い取得したウサギ抗ヒトプロトンピンポリクローナル抗体をペプシンで消化した後、G3000SWカラム(東ソー社製; 口径: 21.5 mm; 長さ: 60 cm)を用いたHPLCシステム(日立製作所社製)で分離して得られたF(ab')₂を用いた。得られたF(ab')₂を2-メルカプトエチルアミン塩酸塩(ナカライテスク社製)で還元した後、G3000SWカラム(東ソー社製; 口径: 21.5 mm; 長さ: 60 cm)を用いたHPLCシステム(日立製作所社製)でFab'を分離した。得られたFab'とアルカリホスファターゼとを以下の手順により、マレイミド法によって結合させた。

【0095】

マレイミド化試薬Sulfo-HMCS(同仁化学研究所社製)を用いて、アルカリホスファターゼをマレイミド化し、反応混合物をセファデックスG-25カラム(GEヘルスサイエンス・ジャパン社製)に供して未反応のSulfo-HMCSを除去し、マレイミド化アルカリホスファターゼを得た。

20

【0096】

調製したマレイミド化アルカリホスファターゼとFab'とを混合し、アルカリホスファターゼ標識化Fab'を作製した。得られたアルカリホスファターゼ標識化Fab'を用いて、以下の組成からなるアルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液を調製した。

MES (pH 6.5)	50 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.1%
アルカリホスファターゼ標識化ウサギ抗プロトンピンポリクローナル抗体フラグメント	2 µg/mL
塩化ナトリウム	0.1 mol/L

30

【0097】

(3) 検体中のPIVKA-I Iの連続測定

全自動化学発光免疫測定装置「CL-JACKTM」(協和メデックス社製)を用いて、以下の手順に従い、検体中のPIVKA-I Iの連続測定を行った。

- (1) 血清(10 µL)及び検体希釈液(30 µL)を反応キュベットに添加する;
- (2) ビオチン化抗PIVKA-I I抗体溶液(30 µL)を反応キュベットに添加し、37 °Cで1分間反応させる;
- (3) ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液(30 µL)を反応キュベットに添加し、37 °Cで9分間反応させる;
- (4) アルカリホスファターゼ標識化抗プロトンピン抗体フラグメント溶液(30 µL)を反応キュベットに添加し、37 °Cで10分間反応させる;
- (5) 反応キュベットの外側に磁石を配置して集磁し、反応キュベット内の未反応物を除去すると共に、反応キュベット内の磁性粒子を、CLアナライザー洗浄液(協和メデックス社製)で洗浄する;
- (6) 発光物質APS-5を含む発光試薬(100 µL)を反応キュベットに添加し、37 °Cで45秒間反応させる;

40

50

(7)発光量を測定する；

(8)予め、既知濃度のPIVKA-I Iを含む標準試薬を用いて作成した、PIVKA-I I濃度と発光量との関係を示す検量線を用いて、測定された発光量から、検体中のPIVKA-I I濃度を決定する。

【0098】

検体希釈液として、ストレプトキナーゼを含む希釈液と、含まない希釈液それぞれの希釈液を用いて、肝癌患者由来の血清を含むヒト血清(45検体)について、連続測定を行った。尚、測定試薬としては、連続測定を行う前の測定試薬、及び、連続測定を45回行った後の測定試薬をそれぞれ使用した。また、対照法として、同一検体について、全自動電気化学発光免疫測定装置「ピコルミ^{T M} I I」(エーディア社製)、及び、PIVKA-I I測定キット「ピコルミ^{T M} PIVKA-I I」(エーディア社製)を用いる方法により、「ピコルミ^{T M} PIVKA-I I」の添付文書に記載の手順に従って、連続測定を行った。カゼインを含み、ストレプトキナーゼを含まない検体希釈液を含有する測定試薬を用いた連続測定と対照法との相関を図3に、カゼインとストレプトキナーゼとを含む検体希釈液を含有する測定試薬を用いた連続測定と対照法との相関を図4に示す。

10

【0099】

図3から明らかな様に、カゼインを含み、ストレプトキナーゼを含まない検体希釈液を含有する測定試薬を用いた場合には、測定試薬として、連続測定を行う前の測定溶液を用いた連続測定においては、図3(左)に示す通り、対照法との相関における相関係数が0.762となり、連続測定を45回行った後の測定試薬を用いた連続測定においては、図3(右)

20

【0100】

一方、カゼインとストレプトキナーゼとを含む検体希釈液を含有する測定試薬を用いた場合には、測定試薬として、連続測定を行う前の測定溶液を用いた連続測定においては、図4(左)に示す通り、対照法との相関における相関係数が0.910となり、対照法との間に良好な相関関係が認められたが、連続測定を45回行った後の測定試薬を用いた連続測定においては、図4(右)に示す様に、対照法との相関における相関係数が0.376となり、対照法との相関が非常に悪化した。このことは、検体中のプラスミノゲンが検体希釈液中のストレプトキナーゼと反応して生成したプラスミンが、連続測定が進行するにつれ、検体中のフィブリンのみならず、カゼインをも溶解し、非特異反応が抑制されなくなったことを示している。

30

【実施例3】

【0101】

実施例2の検体希釈液として、ストレプトキナーゼ(150 U/mL)の代わりに、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)(150 U/mL)(ITSI BIOSCIENCES社製)を用いる以外は、実施例2と同様の方法により、連続測定を行った。その結果を図5に示す。

【0102】

測定試薬として、連続測定を行う前の測定試薬を用いた連続測定においては、図5(左)に示す通り、対照法との相関における相関係数が0.968となり、連続測定を45回行った後の測定試薬を用いた連続測定においては、図5(右)に示す通り、対照法との相関における相関係数が0.983となり、いずれの測定試薬を用いた連続測定においても、対照法との間に良好な相関関係が認められた。すなわち、プラスミノゲンアクチベーターとして組織プラスミノゲンアクチベーターを用いた場合には、プラスミノゲンアクチベーターとしてストレプトキナーゼを用いた場合とは異なり、連続測定後の測定試薬を用いた連続測定においても、対照法との良好な相関関係が認められることが判明した。

40

【産業上の利用可能性】

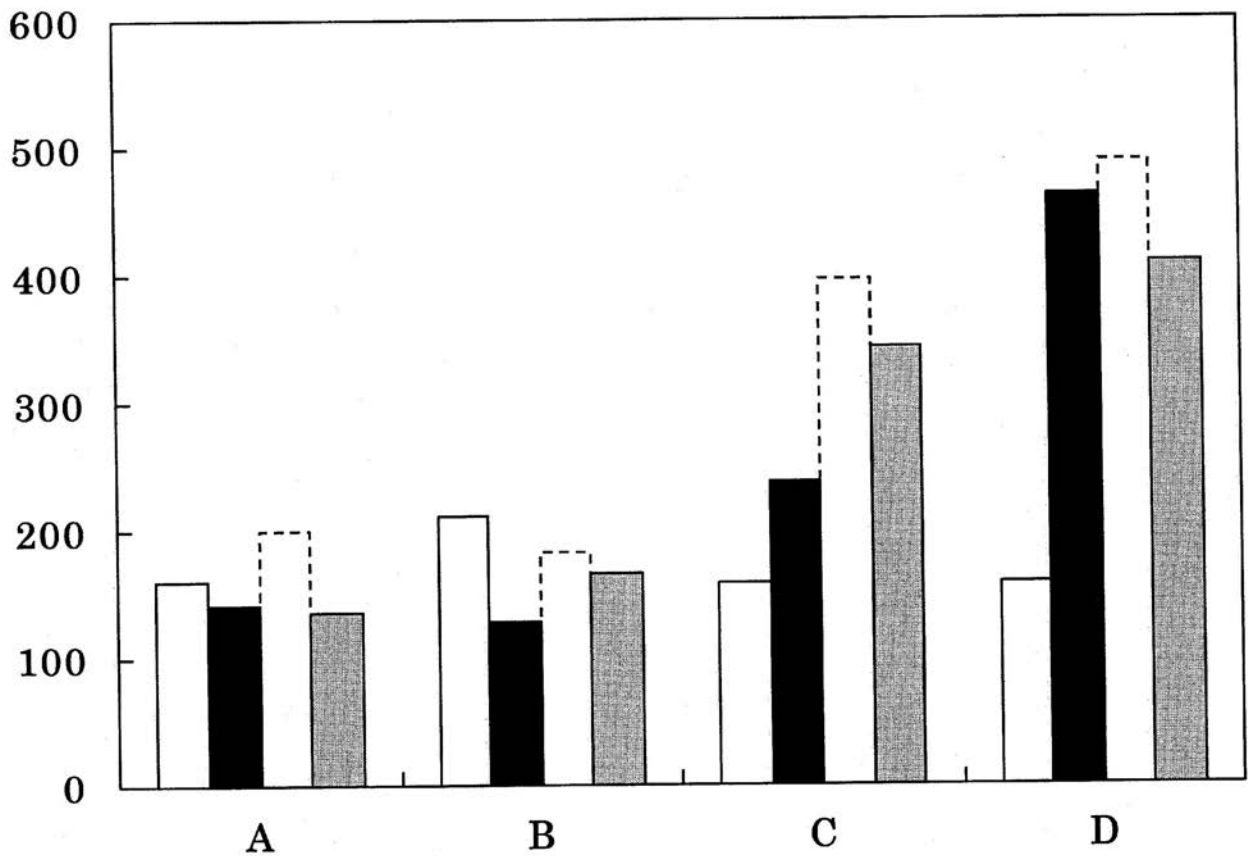
【0103】

本発明により、検体採取ノズルと測定試薬採取ノズルとが共用される自動分析機におい

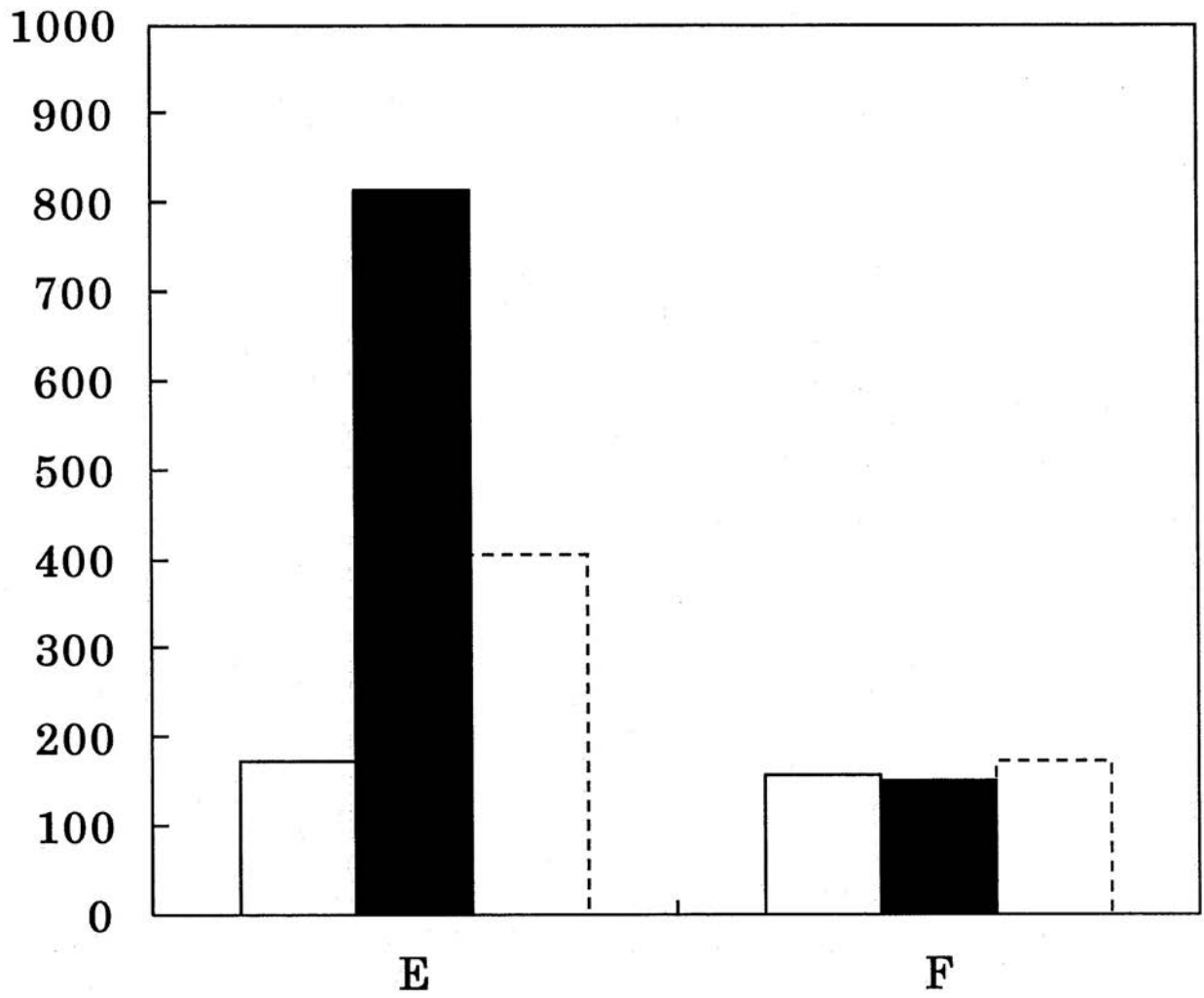
50

て、プラスミノーゲン及びフィブリンを含む複数検体の連続的免疫測定方法において、検体中の測定対象物の正確な測定を可能とする非特異反応抑制方法が提供される。本発明の非特異反応抑制方法は、肝臓癌等の臨床診断に有効である。

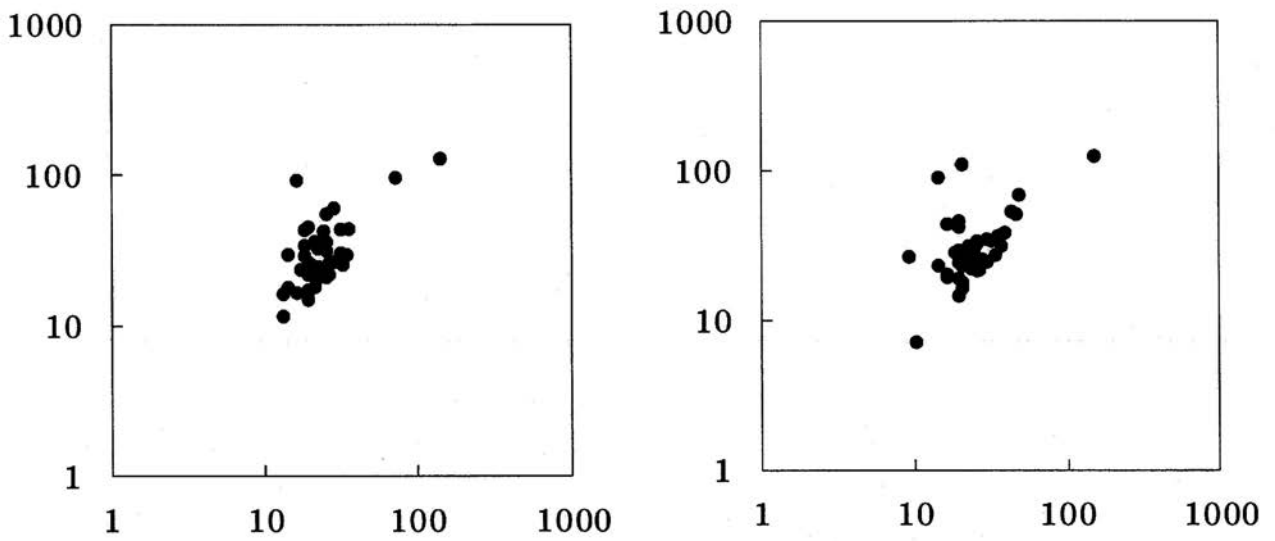
【図1】



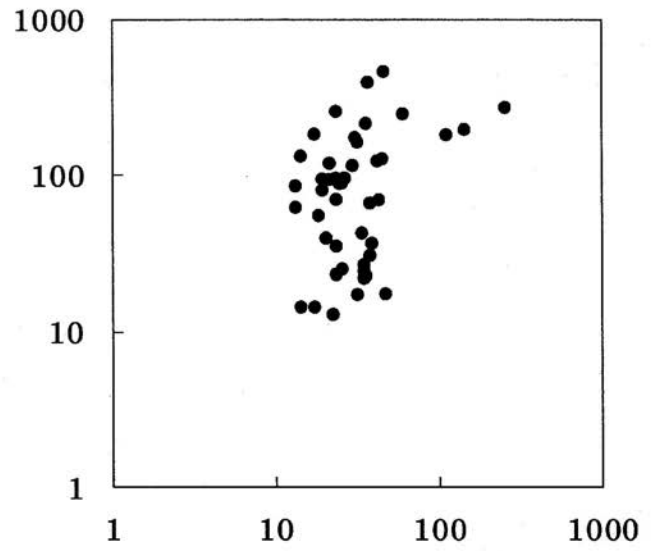
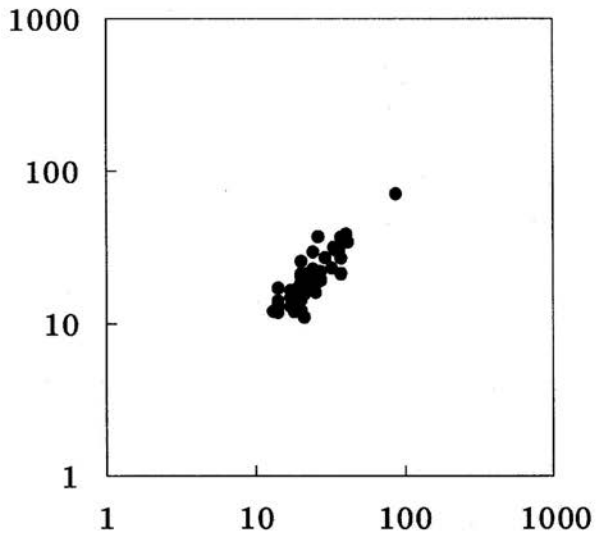
【 図 2 】



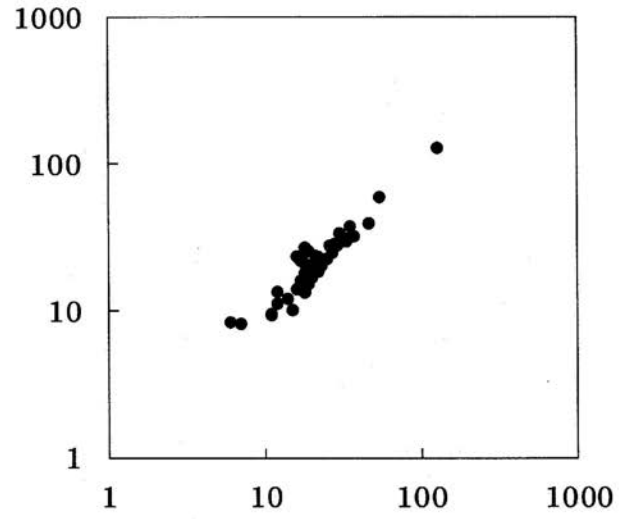
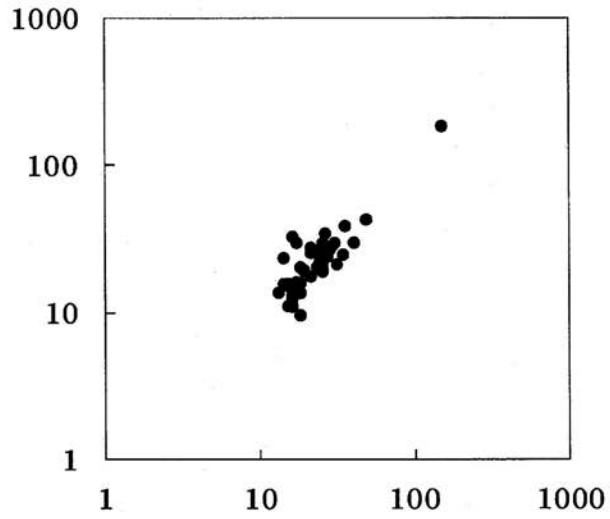
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/080538
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/531(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/531, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-146954 A (Eisai Co., Ltd.), 26 May 2000 (26.05.2000), claims; paragraph [0005]; examples (Family: none)	1-3
Y	JP 01-217266 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 30 August 1989 (30.08.1989), page 2, lower right column, line 1 & US 5017559 A & EP 331327 A2 & DE 68916822 C	1-3
Y	JP 05-322891 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 07 December 1993 (07.12.1993), claim 4 (Family: none)	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 February, 2013 (25.02.13)		Date of mailing of the international search report 05 March, 2013 (05.03.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080538

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 62-52466 A (Boehringer Mannheim GmbH), 07 March 1987 (07.03.1987), claims & US 5068179 A & EP 216194 A2 & DE 3530942 A & AT 78096 T & ES 2000227 A	1-3
A	Microfilm of the specification and drawings annexed to the request of Japanese Utility Model Application No. 069917/1987 (Laid-open No. 181861/1988) (Terumo Corp.), 24 November 1988 (24.11.1988), claims (Family: none)	1-3

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 8 0 5 3 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 2000-146954 A (エーザイ株式会社) 2000.05.26, 特許請求の範囲、【0005】、実施例 (ファミリーなし)	1-3									
Y	JP 01-217266 A (雪印乳業株式会社) 1989.08.30, 第2頁右下欄第1行 & US 5017559 A & EP 331327 A2 & DE 68916822 C	1-3									
Y	JP 05-322891 A (株式会社京都第一科学) 1993.12.07, 請求項4 (ファミリーなし)	1-3									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 25.02.2013		国際調査報告の発送日 05.03.2013									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子	2 J 3906								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 8 0 5 3 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 62-52466 A (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミツト・ベシユレンクテル・ハフツング) 1987.03.07, 特許請求の範囲 & US 5068179 A & EP 216194 A2 & DE 3530942 A & AT 78096 T & ES 2000227 A	1-3
A	日本国実用新案登録出願62-069917号(日本国実用新案登録出願公開63-181861号)の願書に添付した明細書及び図面の内容を撮影したマイクロフィルム(テルモ株式会社)1988.11.24, 実用新案登録請求の範囲(ファミリーなし)	1-3

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 守田 和樹

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	在样品中分析物的连续免疫测定中抑制非特异性反应的方法		
公开(公告)号	JPWO2013080937A1	公开(公告)日	2015-04-27
申请号	JP2013547146	申请日	2012-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
[标]发明人	草野正芳 山本博子 永井豪 守田和樹		
发明人	草野 正芳 山本 博子 永井 豪 守田 和樹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/53 G01N33/82		
FI分类号	G01N33/53.L G01N33/531.B		
优先权	2011258550 2011-11-28 JP		
其他公开文献	JP5902714B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在使用自动分析仪对包含纤溶酶原和纤维蛋白的多个标本进行连续免疫分析的方法中，其中标本收集喷嘴和测量试剂收集喷嘴共用，可以精确地测量标本中的测量目标。提供了一种抑制非特异性反应的方法。在使用包含纤溶酶原和纤维蛋白的多个样品的样品中的测量目标的连续免疫测定中，通过共用样品收集喷嘴和测量试剂收集喷嘴的自动分析仪进行，测量目标一种抑制非特异性反应的方法，其包括在酪蛋白和组织纤溶酶原激活剂的存在下使结合至测量靶标的抗体反应。本发明的抑制非特异性反应的方法对于肝癌等的临床诊断是有效的。

(19) 日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2013/080937
発行日 平成27年4月27日 (2015. 4. 27)		(43) 国際公開日 平成25年6月6日 (2013. 6. 6)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01)	F I G O I N 33/53 G O I N 33/531	L B テーマコード (参考)
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)		
出願番号 特願2013-547146 (P2013-547146)	(71) 出願人 000162478	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/080538	协和メデックス株式会社	
(22) 国際出願日 平成24年11月27日 (2012. 11. 27)	東京都中央区晴海一丁目8番10号	
(31) 優先権主張番号 特願2011-258550 (P2011-258550)	草野 正芳	
(32) 優先日 平成23年11月28日 (2011. 11. 28)	静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス富士工場内	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 山本 博子 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内	
	(72) 発明者 永井 豪 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内	
	(72) 発明者 守田 和樹 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 検体中の測定対象物の連続的免疫測定法における非特異反応抑制方法		