

(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2012-22005  
(P2012-22005A)

(43) 公開日 平成24年2月2日(2012.2.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/72 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/72 A	2 GO 4 5
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 B	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 8 1 J	

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2011-216411 (P2011-216411)	(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
(22) 出願日	平成23年9月30日 (2011.9.30)	(71) 出願人	598080484 株式会社ティエフビー 東京都豊島区西池袋一丁目18番2号
(62) 分割の表示	特願2002-508080 (P2002-508080) の分割	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
原出願日	平成13年6月15日 (2001.6.15)	(72) 発明者	重信 香代子 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2000-198831 (P2000-198831)		
(32) 優先日	平成12年6月30日 (2000.6.30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】凝集反応安定化方法

(57) 【要約】

【課題】ラテックス等の不溶性担体粒子凝集反応に関与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化し、反応液の吸光度を安定化し、精確な測定結果を与えることができる不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬を用いる不溶性担体粒子比濁免疫測定法における凝集反応安定化方法を提供するものである。

【解決手段】ピシン又はトリシンを含む緩衝液に、抗原及び抗体を担持していない不溶性担体粒子を懸濁させて、不溶性担体粒子に抗体又は抗原を担持させ、次いで、上記緩衝液の存在下、抗体又は抗原感作不溶性担体粒子懸濁液を検体と接触させ免疫凝集反応を行い、不溶性担体粒子凝集反応によって発生した濁度を測定して、検体中の抗原又は抗体を定量する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

検体中のヘモグロビン A 1 c の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法において、ピシン又はトリシン緩衝剤を含む緩衝液に、抗原及び抗体を担持していない不溶性担体粒子を懸濁させることを特徴とする、検体中のヘモグロビン A 1 c の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法における凝集反応安定化方法。

**【請求項 2】**

ピシン又はトリシン緩衝剤を、その使用濃度が 5 ~ 200 mmol / L に調整し得るような形態で用いることを特徴とする請求項 1 記載の安定化方法。

**【請求項 3】**

抗原及び抗体を担持していない不溶性担体粒子を、その使用濃度が 0.005 ~ 5 重量 % に調整し得るような形態で用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の安定化方法。

**【請求項 4】**

不溶性担体粒子が、ラテックスであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の安定化方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、ラテックス等の不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用試薬、不溶性担体粒子を用いた比濁免疫測定方法及び不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用キットに関し、より詳細には、吸光度を安定化し、かつ反応に関与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制することができる不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用試薬、不溶性担体粒子を用いた比濁免疫測定方法及び不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用キットに関する。

**【背景技術】****【0002】**

ラテックスは、臨床検査の分野において検体中の抗原又は抗体を測定する免疫測定法に盛んに使用されている。例えば、特開平 10 - 253629 号公報には、pH 4.2 のリン酸クエン酸緩衝液等の pH 4.0 ~ 6.0 の緩衝液中で、抗原又は抗体をポリスチレン系ラテックス粒子に担持させた後、pH 8.0 のトリス緩衝液等の pH 6.5 ~ 9.0 の緩衝液に置換することからなる、高感度を維持しつつ、プロゾーンの発生を抑制し、バラツキが少なく、安定性に優れた免疫測定試薬の製造方法が記載されている。

**【0003】**

また、特開平 9 - 318632 号公報には、検体と、抗原又は抗体を担持したラテックス懸濁液とを混合し、この混合液中に二価アルコールを添加し、抗原抗体反応によるラテックス粒子の凝集によって生じる吸光度の変化量を測定することからなる、測定すべき抗原又は抗体が検体中に高濃度に含まれる場合にあっては、検体を希釈することなく原液のまま測定可能なラテックス比濁免疫測定方法が記載されている。

**【0004】**

また、特開平 7 - 301632 号公報には、表面にカルボキシレート基を有するラテックス粒子と該粒子に共有結合で結合した免疫反応体とを含む担持した微粒子であって、ラテックス粒子が 0.1 ~ 0.6 μm の直径及び 8 ~ 35 平方オングストロームの表面カルボキシレート占有領域を有する、担持した微粒子、及び該微粒子と緩衝液とを含む免疫アッセイ試薬が記載されている。

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0005】**

**【特許文献 1】** 特開平 10 - 253629 号公報

**【特許文献 2】** 特開平 9 - 318632 号公報

**【特許文献 3】** 特開平 7 - 301632 号公報

**【発明の概要】**

10

20

30

40

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

上記のように、ラテックスはラテックス比濁免疫測定法等免疫凝集反応を利用した測定系によく用いられているが、ラテックス懸濁液は、その中に微量に混入する重金属イオンなどによって反応液中に共存する血漿成分と反応し、抗原又は抗体のラテックス担体に対する吸着性を変化させたり、あるいは抗原又は抗体を結合させたラテックスから抗原又は抗体が解離して遊離の抗原又は抗体が発生し、反応時のラテックス凝集の度合いを変化させたりすることによって、感度が不安定化するという問題があった。また、抗原や抗体を結合させていないラテックスの場合では、表面の電荷を担っているカルボキシル基やスルホ基に重金属イオンが結合することによって表面電荷が変化し、感度が不安定化するとい

10

## 【0007】

本発明の課題は、ラテックス等の不溶性担体粒子凝集反応に關与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化し、反応液の吸光度が安定化することにより精確な測定結果を与えることができる不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬や不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット、及び該試薬やキットを用いる不溶性担体粒子比濁免疫測定法を提供することにある。

## 【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究し、ラテックス凝集反応を不安定化する血漿成分、すなわち血漿中に存在する微量の複数価の金属イオンに対して、分子式中に特定の基を有する化合物を含む緩衝剤を用いると、ラテックス表面の荷電状態を安定化し、ラテックスに結合した抗原又は抗体の遊離を防止し、ラテックス凝集反応を安定化して、精確な測定結果を得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

すなわち本発明は、(1)検体中のヘモグロビンA1c(以下、HbA1cと記す)の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法において、ピシン又はトリシン緩衝剤を含む緩衝液に、抗原及び抗体を担持していない不溶性担体粒子を懸濁させることを特徴とする、検体中のHbA1cの不溶性担体粒子比濁免疫測定方法における凝集反応安定化方法に関する。

## 【0010】

また本発明は、(2)ピシン又はトリシン緩衝剤を、その使用濃度が5~200mmol/Lに調整し得るような形態で用いることを特徴とする前記(1)記載の安定化方法や、(3)抗原及び抗体を担持していない不溶性担体粒子を、その使用濃度が0.005~5重量%に調整し得るような形態で用いることを特徴とする前記(1)又は(2)記載の安定化方法や、(4)不溶性担体粒子が、ラテックスであることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の安定化方法に関する。

30

## 【発明を実施するための形態】

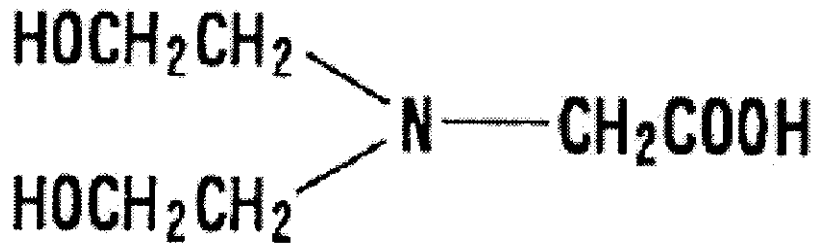
## 【0011】

本発明の検体中のHbA1cの不溶性担体粒子比濁免疫測定方法における凝集反応安定化方法としては、不溶性担体粒子と、以下の[化1]で表されるピシン又は以下の[化2]で表されるトリシンからなる緩衝剤とを用いる不溶性担体粒子比濁免疫測定方法における凝集反応安定化方法であれば特に制限されるものではない。ここで、不溶性担体粒子比濁免疫測定方法とは、不溶性担体粒子を用いる免疫凝集反応によって発生した濁度を測定して、検体中の抗原又は抗体を定量する方法をいう。

40

## 【0012】

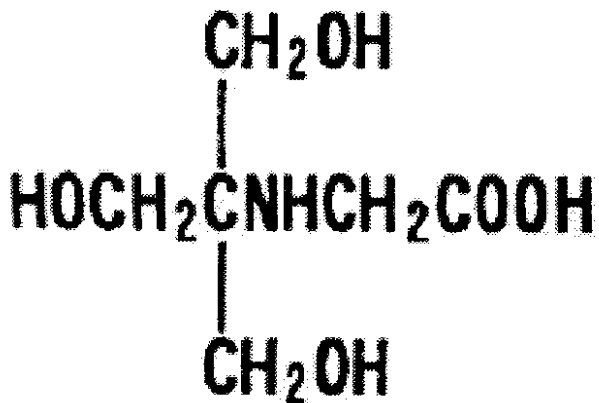
【化1】



10

【0013】

【化2】



20

【0014】

30

上記ピシン又はトリシン緩衝剤は、5～200mmol/L濃度で使用することがラテックス等の不溶性担体粒子凝集反応をより安定化することができるので好ましい。不溶性担体粒子凝集反応における反応時のpHは、反応を安定化する上で非常に重要であり、緩衝成分の濃度が5mmol/L以上では、一定のpHを維持することが容易となり、他方、200mmol/L以下では不溶性担体粒子同士が抗原抗体反応によらない非特異的な凝集を起こすことがない。また、緩衝成分を含有する緩衝液のpHを調節する酸類としては通常塩酸や、硫酸、硝酸の他、酢酸等の有機酸等を使用することができ、アルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化アンモニウムなどを使用することができる。また、本発明における緩衝剤には、上記緩衝成分の他、必要に応じて他の任意成分をも含ませることができる。かかる任意成分としては、検体中の脂質の可溶化に効果のある界面活性剤、特にポリオキシエチレングリコール基を持ったノニオン系界面活性剤やその他カチオン系、アニオン系界面活性剤を例示することができる。

40

【0015】

本発明における不溶性担体粒子としては、上記本発明の緩衝剤と併用した場合に、測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化しうるものであればどのようなものでもよく、例えば、特公昭58-11575号公報等に記載された従来公知の有機高分子物質の微粒子や、無機酸化物の微粒子、あるいは核となるこれらの物質の表面を有機物等で表面処理した微粒子を例示することができ、具体的には、例えば、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、(メタ)アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成樹脂(ラテックス)や、ニトロセルロース、セルロース、メチルセルロース等

50

のセルロース誘導体や、金属、セラミック、ガラス、シリコンラバー等の無機物を挙げる  
ことができる。これらの中でも、特にポリスチレン系の合成高分子、電荷を与える為に成  
分としてアクリル酸系のモノマーやスルホン酸をもつモノマーなどを共重合したポリスチ  
レン系の合成高分子が好ましい。

【0016】

上記のように、本発明においては、上記不溶性担体として、ポリスチレンラテックス等  
のラテックス粒子が特に好ましく用いられる。ポリスチレンラテックス等の表面の疎水性  
が強いラテックスを用いると、タンパク質やペプチドの吸着をスムーズにすることができ  
る。また、乳化剤として界面活性剤を用いないソープフリー重合によって得られるポリス  
チレンラテックス粒子は、表面の負電荷同士の反発に基づき、界面活性剤なしでも安定に  
存在できるので特に好ましく用いることができる。その他、種々の変性ラテックス（例え  
ば、カルボン酸変性ラテックス）、磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス）  
等を必要に応じて用いることもできる。

10

【0017】

定量的にイムノアッセイを行う場合、通常は、不溶性担体粒子の大きさの均一性、表面  
状態の制御、内部構造の選択などが高度の次元で要求されるが、このような試薬向けの良  
好なラテックス等の不溶性担体粒子は、市販品の中から選択して用いることが可能である  
。また、不溶性担体粒子の形状としては、特に制限されるものではないが、例えば、球状  
等を挙げることができ、球状の場合の粒子径としては、例えば0.03~0.8 $\mu\text{m}$ の平均粒  
径、特に0.06~0.2 $\mu\text{m}$ の平均粒径が好ましい。そしてまた、本発明における  
不溶性担体粒子の反応液中の濃度としては、特に制限がないが、例えば、0.001~1  
0重量%、好ましくは0.005~5重量%、より好ましくは0.01~2重量%の濃度  
で使用することが不溶性担体粒子凝集反応をより安定化することができるので好ましい。

20

【0018】

本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬としては、その使用濃度が5~200mm  
ol/Lに調整し得るような形態で含まれているピシン、トリシン等の緩衝剤、その使用  
濃度が0.005~5重量%に調整し得るような形態で含まれているラテックス等の不溶  
性担体粒子、不溶性担体粒子担持用抗原又は抗体、及びその他の任意成分を含有する試薬  
を例示することができる。また、かかる試薬において、抗原又は抗体をあらかじめ担持さ  
せた不溶性担体粒子を使用することもできる。

30

【0019】

本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法としては、抗原又は抗体をピシン、トリシン  
等の緩衝剤の存在下に不溶性担体粒子に、化学結合や物理吸着等により担持させ、次いで  
免疫凝集反応を行わせる方法や、抗原又は抗体を担持させた不溶性担体粒子に、緩衝剤の  
存在下に免疫凝集反応を行わせる方法を挙げることができ、その場合、緩衝剤は緩衝液と  
して、不溶性担体粒子は不溶性担体粒子懸濁液として、使用することができるが、不溶性  
担体粒子は緩衝液に懸濁させた状態で使用してもよい。また、免疫凝集反応時や、抗原又  
は抗体の不溶性担体粒子担持時における、緩衝剤濃度を5~200mmol/L、不溶性  
担体粒子を濃度0.005~2重量%とすることが好ましい。

40

【0020】

また、不溶性担体粒子比濁免疫測定用キットとしては、ピシン、トリシン等の緩衝剤を  
5~200mmol/Lの濃度で含有する緩衝液、ラテックス等の不溶性担体粒子を0.  
005~5重量%の濃度で含有する懸濁液、不溶性担体粒子担持用抗原又は抗体、及びそ  
の他の任意成分を含有する試薬からなるキットを例示することができる。また、かかる測  
定用キットにおいて、抗原又は抗体をあらかじめ担持させた不溶性担体粒子を使用するこ  
ともできる。

【0021】

以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれら  
の例示に限定されるものではない。なお、実施例中の%表記は、特に断りがない場合は重  
量%を示す。

50

## 【実施例 1】

## 【0022】

## [試薬 1 (緩衝液) の調製]

緩衝剤としてのピシン (同仁化学社製) 3.26 g を蒸留水に溶解し、0.1 g のトリトン X-100、17.5 g の塩化ナトリウム、0.01 g のアジ化ナトリウムをそれぞれ添加し、20 で pH を計測しながら 1 mol/L の塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH 8.0 に調整し、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。また、ピシンの代わりに、緩衝剤としてトリシン (同仁化学社製) 3.58 g、TAPSO {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} (同仁化学社製) 5.18 g、POPSO [ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)・2水和物] (同仁化学社製) 7.97 g、TES {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} (同仁化学社製) 4.59 g をそれぞれ蒸留水に溶解し、同様にトリトン X-100、塩化ナトリウム、アジ化ナトリウムを添加し、pH 8.0 に調整した後、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。このようにして、本発明のピシン又はトリシンをそれぞれ 20 mmol/L 含む緩衝液と、比較例として TAPSO、POPSO、TES をそれぞれ 20 mmol/L 含む緩衝液とからなる 5 種類の緩衝液を調製した。

10

## 【0023】

## [試薬 2 (抗体担持ラテックス懸濁液) の調製]

平均粒子径 0.31  $\mu\text{m}$  の 10% ポリスチレンラテックス懸濁液 (協和メデックス社製) 1 容に、1/60 mol/L の PBS 溶液 (pH 7.4 になるように 1 mol/L の塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液で調製したもの) 9 容を添加してラテックスを希釈し、1% ラテックス懸濁液とした。また、抗ヒトフェリチン抗体 (協和メデックス社製) は、蛋白濃度が 50  $\mu\text{g/mL}$  になるように 1/60 mol/L の PBS 溶液で希釈し担持用の抗体液とした。1% ラテックス懸濁液 600  $\mu\text{L}$  を 25 のインキュベーター中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、これに上記抗体液 1200  $\mu\text{L}$  を素早く添加し、25 にて 2 時間攪拌した。その後、10 mmol/L のグリシン緩衝液に BSA (和光純薬社製) が 0.6%、トリトン X-100 (シグマ社製) が 0.015% になるように調製したブロッキング液を 3 mL 添加し、25 にて続けて 2 時間攪拌した。その後、4、15000 rpm にて 1 時間遠心分離した。得られた沈殿にブロッキング液を 4 mL 添加し、同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は 3 回行った。この沈殿にブロッキング液 6 mL を添加し、0.1% の抗体担持ラテックス懸濁液とした。

20

30

## 【0024】

## [検体の調製]

人血液を採血管 (ベノジェクト真空採血管; テルモ社製) で採血後、2 時間放置して得られた上澄み液 (血清) を検体 1 とした。また、人血液を EDTA 採血管 (ベノジェクト真空採血管; テルモ社製) で採血後、2 時間放置して得られた上澄み液 (血清) を検体 2 とし、人血液を採血管 (ベノジェクト真空採血管; テルモ社製) で採血後、2 時間放置して得られた上澄み液 (血清) に、エチレンジアミン四酢酸二カリウム (同仁化学社製) を 1 mg/mL になるように添加したものを検体 3 とした。

40

## 【0025】

## [試薬 1 と試薬 2 を用いた検量線の作成]

フェリチン (スクリプス社製) を生理食塩水に溶解して、10.9、21.9、43.8、87.5、175 ng/mL の各濃度のフェリチン溶液をそれぞれ調製し、これらを 10  $\mu\text{L}$  ずつ 140  $\mu\text{L}$  の試薬 1 に添加し、37、6 分間反応させた後、150  $\mu\text{L}$  の試薬 2 を添加し、37、13 分後に、日立自動分析装置 7170 型を使用して、2 ポイントエンド法 (測光ポイント 21-39)、主波長 750 nm、副波長 800 nm で吸光度変化量を測定することにより検量線を作成した。

## 【0026】

## [試薬 1 と試薬 2 を用いたフェリチン濃度の測定]

50

上記検量線を作成したと同様に、前記検体 1 と検体 2 及び検体 3 の各 10  $\mu$ L を、140  $\mu$ L の試薬 1 にそれぞれ添加し、37  $^{\circ}$ C、6 分間反応させた後、調製直後の 150  $\mu$ L の試薬 2 を添加し、37  $^{\circ}$ C 13 分後に、日立自動分析装置 7170 型を使用して、2 ポイントエンド法（測光ポイント 21 - 39）、主波長 750 nm、副波長 800 nm で吸光度変化量を測定し、上記検量線を用いて各検体中のフェリチン濃度を測定した。結果を表 1 に示す。また、調製直後の試薬 1 に代えて、調製後 1 週間が経過した試薬 1 を用いる他は上記と同様にして測定した結果を表 2 に示す。表 1 及び表 2 から、緩衝剤としてピシンやトリシンを用いた場合、測定感度が安定することがわかる。

【0027】

【表 1】

10

表 1

緩衝液 (調製直後)	フェリチン濃度 (ng/ml)		
	検体 1	検体 2	検体 3
ピシン	40	39	39
トリシン	41	40	41
TAPSO	39	30	38
POPSO	41	23	40
TES	41	31	40

20

【0028】

【表 2】

表 2

緩衝液 (調製 1 週間後)	フェリチン濃度 (ng/ml)		
	検体 1	検体 2	検体 3
ピシン	40	39	39
トリシン	41	40	41
TAPSO	41	37	41
POPSO	38	33	42
TES	42	38	42

30

【実施例 2】

【0029】

[ 試薬 3 (ラテックス懸濁液) の調製 ]

緩衝剤としてのピシン 3.26 g を蒸留水に溶解させ、10% ラテックス (粒径 0.087  $\mu$ m; 積水化学社製) 3.3 mL、及び 0.1 g のアジ化ナトリウムを添加し、20  $^{\circ}$ C で pH を計測しながら 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液又は塩酸を加え、pH を 7.8 に調整し、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。また、ピシンの代わりに、緩衝剤としてトリシン 3.58 g、TAPSO 5.18 g、POPSO 7.97 g、TES 4.59 g をそれぞれ蒸留水に溶解し、同様にラテックス、アジ化ナトリウムを添加し、pH を 7.8 に合わせ、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。このようにして、本発明のピシン又はトリシンをそれぞれ 20 mmol/L 含む緩衝液と、比較例として TAPSO、POPSO、TES をそれぞれ 20 mmol/L 含む緩衝液とからなる 5 種類の緩衝液を調製した。

40

【0030】

[ 試薬 4 (抗体溶液) の調製 ]

抗原として変性ヒト Hb A1c を用いてマウスを免疫し、常法により得られる抗ヒト H

50

b A 1 c マウスモノクローナル抗体を抗体溶液の調製に用いた。ピシン緩衝剤 3.26 g を蒸留水に溶解し、塩化ナトリウムを 15 g 添加し、20 で pH を計測しながら 1 mol/L の塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH を 7.0 に調整し、Tween 20 (和光純薬社製) を 2 g 添加し、アジ化ナトリウムを 0.1 g 添加し、次いで前記抗ヒト変性 H b A 1 c マウスモノクローナル抗体を 0.025 g (I g G 換算)、抗マウス I g G ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製) を 0.04 g (I g G 換算) 添加し、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。また、ピシン緩衝剤の代わりにトリシン緩衝剤 3.58 g、T A P S O 緩衝剤 5.18 g、P O P S O 緩衝剤 7.97 g、T E S 緩衝剤 4.59 g、をそれぞれ蒸留水に溶解し、同様に塩化ナトリウムを添加し、pH を 7.0 に合わせたものに、ピシンの場合と同様に、Tween 20、アジ化ナトリウムを添加し、次いで抗ヒト H b A 1 c マウスモノクローナル抗体、抗マウス I g G ヤギポリクローナル抗体を添加し、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。

10

## 【0031】

## [ 検体の調製 ]

人血液を E D T A 採血管 (ベノジェクト真空採血管; テルモ社製) で採血後、2 時間放置して沈殿した血球層 10  $\mu$  L をとり、蒸留水 1 mL で希釈した検体 4 と、この検体 4 に E D T A 採血管の上澄み液である血漿を 10  $\mu$  L 添加した血漿混入検体 5 を調製した。

## 【0032】

## [ 試薬 3 と試薬 4 を用いた検量線の作成 ]

東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 H L C - 7 2 3 G H b V を用いて測定した H b A 1 c 値が、0.0%、4.2%、7.7%、11.3%、14.8% であった各検体を用いて、日立自動分析装置 7 1 7 0 型を使用して吸光度変化量を測定することにより検量線を作成した。上記吸光度変化量の測定は、240  $\mu$  L の試薬 3 に 4  $\mu$  L の検体を添加し、37 で 5 分間反応させた後、80  $\mu$  L の試薬 4 を添加し、37 で 5 分間反応させた後に主波長 450 nm、副波長 800 nm にて、2 ポイントエンド法 (測光ポイント 16 - 34) で吸光度変化量を測定することにより行った。

20

## 【0033】

## [ 試薬 3 と試薬 4 を用いた H b A 1 c 濃度の測定 ]

上記検量線を作成したと同様に、前記検体 4 と検体 5 の各 4  $\mu$  L を、調製直後の 240  $\mu$  L の試薬 3 にそれぞれ添加し、37 で 5 分間反応させた後、調製 3 日後の 80  $\mu$  L の試薬 4 を添加し、37 で 5 分間反応させた後に、日立自動分析装置 7 1 7 0 型を使用して、2 ポイントエンド法 (測光ポイント 16 - 34)、主波長 450 nm、副波長 800 nm で吸光度変化量を測定し、上記検量線を用いて各検体中の H b A 1 c 濃度を測定した。結果を表 3 に示す。また、調製直後の試薬 3 に代えて、調製後 1 週間が経過した試薬 3 を用いる他は上記と同様にして測定した結果を表 4 に示す。表 3 及び表 4 から、緩衝剤としてピシンやトリシンを用いた場合、測定感度が安定していることがわかる。

30

## 【0034】

【表 3】

表 3

緩衝液 (調製直後)	HbA1c 値 (%)	
	検体 4	検体 5
ピシン	6.1	6.1
トリシン	6.1	6.0
TAPSO	6.1	5.4
POPSO	6.2	3.3
TES	6.1	5.3

10

【0035】

【表 4】

表 4

緩衝液 (調製1週間後)	HbA1c 値 (%)	
	検体 4	検体 5
ピシン	6.1	6.1
トリシン	6.1	6.0
TAPSO	6.2	5.6
POPSO	5.9	3.1
TES	6.3	5.6

20

30

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明によると、不溶性担体粒子凝集反応に關与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化し、反応液の吸光度を安定化し、精確な測定結果を与えることができる。

40

---

フロントページの続き

(72)発明者 小栗 一人

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  
Fターム(参考) 2G045 AA25 BA11 CA26 DA36 DA51 FB03

专利名称(译)	凝集反应稳定化方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012022005A</a>	公开(公告)日	2012-02-02
申请号	JP2011216411	申请日	2011-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社 TFB		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社 株式会社ティエフビー		
[标]发明人	重信香代子 小栗一人		
发明人	重信 香代子 小栗 一人		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/72.A G01N33/531.B G01N33/543.581.J		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA11 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA51 2G045/FB03		
优先权	2000198831 2000-06-30 JP		
其他公开文献	JP5362797B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种在不溶性载体颗粒比浊免疫测定方法中稳定聚集反应的方法，该方法使用用于不溶性载体颗粒比浊免疫测定的试剂，其通过抑制血浆成分的活性来稳定聚集反应，所述血浆成分通过干预不溶性而对测量值产生影响。颗粒（如胶乳）聚集反应，稳定反应溶液的吸收性，并提供准确的测量结果。溶液：不携带抗原和抗体的不溶性载体颗粒悬浮在含有bicine或tricine的缓冲溶液中。抗体或抗原由不溶性载体颗粒携带，然后使抗体或抗原致敏的不溶性载体颗粒悬浮液与样品接触以进行免疫聚集反应。测量由不溶性载体颗粒的聚集反应产生的浊度，以定量测定样品中的抗原或抗体。

