

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6457933号
(P6457933)

(45) 発行日 平成31年1月23日(2019.1.23)

(24) 登録日 平成30年12月28日(2018.12.28)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 3
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B
	GO 1 N 33/543 5 8 1 J

請求項の数 3 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2015-508826 (P2015-508826)	(73) 特許権者	390037327
(86) (22) 出願日	平成26年3月31日 (2014. 3. 31)		積水メディカル株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/059548		東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(87) 国際公開番号	W02014/157723	(74) 代理人	110000774
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)		特許業務法人 もえぎ特許事務所
審査請求日	平成29年3月29日 (2017. 3. 29)	(72) 発明者	近藤 純一
(31) 優先権主張番号	特願2013-74793 (P2013-74793)		東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積水メディカル株式会社内
(32) 優先日	平成25年3月29日 (2013. 3. 29)	(72) 発明者	新山 加菜美
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積水メディカル株式会社内
		(72) 発明者	山本 光章
			東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積水メディカル株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

HEPES、MES及びTrisからなる群より選ばれるpH緩衝作用を有するアミン化合物を2種類以上含有する緩衝液中で、抗インスリン抗体を担持した粒子による免疫反応を行うことを特徴とするインスリンの測定方法。

【請求項2】

緩衝液のpHが7.3~7.8である、請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】

HEPES、MES及びTrisからなる群より選ばれるpH緩衝作用を有するアミン化合物を2種類以上含有する緩衝液中で、抗インスリン抗体を担持した粒子による免疫反応を行うことを特徴とする、インスリンの粒子凝集免疫測定方法における血液試料由来の非特異反応の抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液試料測定の際の非特異反応が抑制されたヒトインスリンのラテックス凝集免疫測定方法及び測定試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトインスリンは分子量5807のペプチドで、糖尿病の診断・治療上、重要な分子マ

ーカーの一つである。ヒト血液試料中のインスリンの免疫学的測定は、その濃度の問題から、長らく競合法RIAあるいは化学発光免疫測定法が主流であったが、近年のラテックス凝集免疫測定方法(LTIA)の高感度化に伴い、生化学自動分析装置に適用可能なLTIA用試薬が報告され、一部は市販されるに至っている。

非特許文献1の方法は、抗インスリン抗体を担持したラテックス粒子を用いたサンドイッチLTIA法であるが、サンドイッチLTIAによるペプチドの測定は実用化された例が少ないため、なお課題が存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

10

【特許文献1】国際公開第2011/010673号パンフレット

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】関東化学株式会社 サイアス INSULIN II 添付文書(2010年2月作成)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者らは非特許文献1に記載された方法での測定値が、従来のヘテロジニアス化学発光酵素免疫測定方法(従来法)での測定値と乖離する検体を選抜し、その検体を用いてサンドイッチLTIA法での非特異反応の抑制方法について検討したところ、特定のpH緩衝剤を2種類以上緩衝液中に含有させた状態でLTIA法での免疫反応を行うと、従来法の測定値との乖離度合を縮小できることを見出し本発明を完成させるに至った。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

すなわち本発明は、以下に関するものである。

[1] pH緩衝作用を有するアミン化合物を2種類以上含有する緩衝液中で、抗インスリン抗体を担持した粒子による免疫反応を行うことを特徴とするインスリンの測定方法。

[2] pH緩衝作用を有するアミン化合物がHEPES、MES及びTrisからなる群より選ばれるものである、[1]に記載の測定方法。

30

[3] 緩衝液のpHが7.3~7.8である、[1]又は[2]に記載の測定方法。

[4] pH緩衝作用を有するアミン化合物を2種類以上含有する緩衝液中で、抗インスリン抗体を担持した粒子による免疫反応を行うことを特徴とする、インスリンの粒子凝集免疫測定方法における血液試料由来の非特異反応の抑制方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明の測定方法によれば血液試料測定の際の非特異反応を抑制してヒトインスリンのラテックス凝集免疫測定を行うことができる。免疫測定方法に使用されるpH緩衝剤は、抗原抗体反応時のpHの至適化を目的として処方されており、pH緩衝域を拡大するためや、主たるpH緩衝剤と組み合わせてpHを調整するために2種類のpH緩衝剤を使用することはこれまでも行われてきたが、特定の2種類以上のpH緩衝剤を緩衝液中に含有させると、非特異反応が抑制されることは予想できず、全く意外なことである。

40

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】従来のLTIA法の測定結果と本発明方法の測定結果の相関図である。上段：化学発光酵素免疫測定方法(ルミパルスプレスト(登録商標)インスリン、富士レビオ社)と従来のLTIA法(サイアスINSULIN II、関東化学社)、下段：化学発光酵素免疫測定方法(ルミパルスプレスト(登録商標)インスリン、富士レビオ社)と本発明方法。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 0 9 】

本発明方法の測定対象となる血液試料は全血、血清、血漿である。

本発明方法におけるpH緩衝作用を有するアミン化合物を2種類以上含有する緩衝液は、H E P E S (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid)、M E S (2-Morpholinoethanesulfonic acid)及びT r i s (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)からなる群より選ぶことができる。該緩衝液(pH緩衝作用を有するアミン化合物2種類以上含有させた場合の該pH緩衝作用を有するアミン化合物2種類以上の合計濃度)の好適な濃度範囲は100mM~1000mM、好ましくは200mM~800mM、より好ましくは400mM~800mMであり、該緩衝液の好適なpHは7.3~7.8である。

10

本発明方法に使用可能な抗インスリン抗体を担持したラテックス粒子は、特許文献1ほか、当業者に公知の方法により得ることができる。

【 0 0 1 0 】

本発明を実施するための試薬の形態は、通常使用されるラテックス凝集免疫測定試薬の形態を取ることができる。例えば、本発明の緩衝液を第一試薬とし、抗インスリン抗体を担持したラテックス粒子を含有する溶液を第二試薬とする形態や、本発明の緩衝液に抗インスリン抗体を担持したラテックス粒子を含有させた一試薬形態を挙げることができる。

また、本発明を実施するための試薬には、ラテックス凝集免疫測定試薬に含有させることが公知の各成分、例えば、カルシウムやマグネシウムなどの金属イオン、イオン性、非イオン性、両性などの界面活性剤、E D T Aなどのキレーター、デキストラン硫酸などの多糖や高分子化合物、アルブミンなどのタンパク質、H e t e r o B l o c k (Omega Biologicals, Inc.)、ブロックエース(D Sファルマ社)、B P F (東洋紡社)などの市販のブロッキング剤、抗I g M抗体などと含有させることができる。

20

【 0 0 1 1 】

本発明方法の具体的な手順として、日立7170型自動分析装置などの分析装置を使用し、血液試料を主にpH緩衝液からなる第一試薬に添加しインキュベートした後、そこに抗インスリン抗体を担持したラテックス粒子を含有する第二試薬を添加し、主波長570nm、副波長800nm等の適当な波長での吸光度を測定し、インスリン濃度を求めることにより行うことができる。

なお、前述の本発明方法におけるpH緩衝作用を有するアミン化合物の濃度は、第一試薬と第二試薬の容量混合比が3:1の場合で記載している。

30

【実施例】

【 0 0 1 2 】

次に実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】

[実施例1]

1. 測定操作

218例の患者血清を化学発光酵素免疫測定方法(ルミパルスプレスト(登録商標)インスリン、富士レビオ社)、従来のL T I A法(サイアスI N S U L I N II、関東化学社)、本発明方法で測定した。

40

本発明方法は、特許文献1に記載の抗インスリンモノクローナル抗体感作ラテックスを使用して以下の第一試薬、第二試薬を調製して行った。

【 0 0 1 4 】

第一試薬

600mM M E S

200mM T r i s

200mM N a C l

50µg/mL H e t e r o B l o c k (Omega Biologicals, Inc.)

200µg/mL 抗I g M抗体

pH7.5

50

第二試薬

7.5 mM Tris
 66221 抗体感作ラテックス
 66226 抗体感作ラテックス
 pH 8.0

【0015】

日立7170型自動分析装置を用い、血清10 μ Lを第一試薬150 μ Lに添加し5分、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、そこに第二試薬50 μ Lを添加し、測光ポイント19-34のタイミングで主波長570nm、副波長800nmでの吸光度を測定し、インスリン濃度を求めた。

10

【0016】

2. 測定結果

化学発光酵素免疫測定法の測定値を100とした場合、従来のL T I A法では81例の血清で $\pm 30\%$ を超える値を示した。一方、本発明方法では、 $\pm 30\%$ を超える値を示す血清は認められなかった。化学発光酵素免疫測定法の測定値をX、従来のL T I A法の測定値又は本発明方法の測定値をYとし、相関関係を確認した。結果を図1に示す。本発明方法では、従来のL T I A法で認められた化学発光酵素免疫測定法の測定との乖離が収束していることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0017】

本発明によれば、ヒトインスリンのラテックス凝集免疫測定方法における血液試料測定の際の非特異反応を抑制することが可能となった。本発明では、通常pH緩衝剤として使用されるアミン化合物を選択して使用することにより該効果を得ることができるため、試薬処方設計に不要な制限が付加されることがなく、工業的に非常に有用である。

20

【受託番号】

【0018】

(1) FERM BP - 11233
 (2) FERM BP - 11234

【0019】

[寄託生物材料への言及]

(1) 66221抗体を産生するハイブリドーマ66221

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成21年4月8日(2009年4月8日)(原寄託日)

平成22年2月17日(2010年2月17日)(原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERM BP - 11233

40

(2) 66226抗体を産生するハイブリドーマ66226

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成21年4月8日(2009年4月8日)(原寄託日)

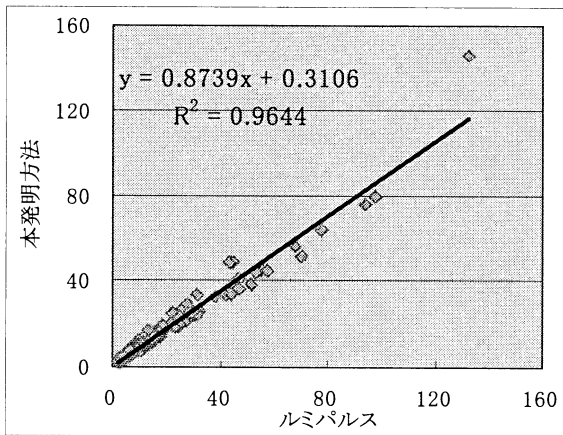
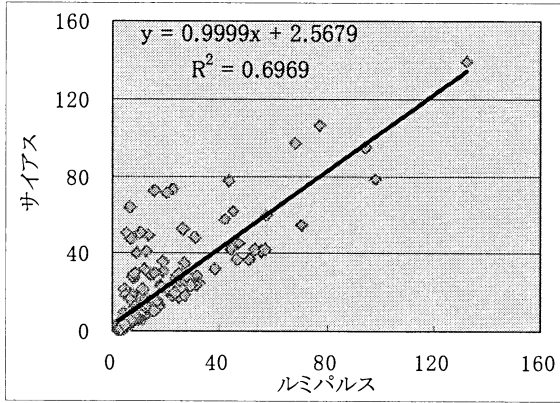
平成22年2月17日(2010年2月17日)(原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERM BP - 11234

50

【図1】



フロントページの続き

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2001-235465(JP,A)
特開2005-351643(JP,A)
特開2007-121204(JP,A)
特開2000-292424(JP,A)
国際公開第2011/010673(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	胰岛素测量方法		
公开(公告)号	JP6457933B2	公开(公告)日	2019-01-23
申请号	JP2015508826	申请日	2014-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	近藤純一 新山加菜美 山本光章		
发明人	近藤 純一 新山 加菜美 山本 光章		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/74 G01N2333/62		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/543.583 G01N33/531.B G01N33/543.581.J		
优先权	2013074793 2013-03-29 JP		
其他公开文献	JPWO2014157723A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种用于人胰岛素的胶乳凝集免疫测定方法和测量试剂，其中抑制血液样品测量期间的非特异性反应。在含有两种或多种具有pH缓冲作用的胺化合物的缓冲溶液中，携带抗胰岛素抗体的颗粒进行免疫反应。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6457933号 (P6457933)
(45) 発行日 平成31年1月23日(2019.1.23)	(24) 登録日 平成30年12月28日(2018.12.28)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O I N 33/53 (2006.01)	G O I N 33/53 B	
G O I N 33/543 (2006.01)	G O I N 33/543 5 8 3	
G O I N 33/531 (2006.01)	G O I N 33/531 B	
	G O I N 33/543 5 8 1 J	
請求項の数 3 (全 6 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-508826(P2015-508826)	(73) 特許権者 390037327 积水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋三丁目1番3号	
(86) (22) 出願日 平成26年3月31日(2014.3.31)	(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所	
(88) 国際出願番号 PCT/JP2014/059548	(72) 発明者 近藤 純一 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積 水メディカル株式会社内	
(87) 国際公開番号 W02014/157723	(72) 発明者 新山 加菜美 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積 水メディカル株式会社内	
(87) 国際公開日 平成26年10月2日(2014.10.2)	(72) 発明者 山本 光章 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積 水メディカル株式会社内	
審査請求日 平成29年3月29日(2017.3.29)		
(31) 優先権主張番号 特願2013-74793(P2013-74793)		
(32) 優先日 平成25年3月29日(2013.3.29)		
(33) 優先権主張国 日本国(JP)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 インスリン測定方法		