

(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2005-91111**(P2005-91111A)**(43) 公開日 **平成17年4月7日(2005.4.7)**

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2GO45
GO 1 N 33/493	GO 1 N 33/493	A
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	583
GO 1 N 33/553	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2003-323607 (P2003-323607)	(71) 出願人	303036670 合同酒精株式会社 東京都中央区銀座6丁目2番10号
(22) 出願日	平成15年9月16日 (2003.9.16)	(72) 発明者	近藤 英彦 松戸市上本郷字仲原250 合同酒精株式会社酵素医薬品研究所内
		(72) 発明者	石田 尚彦 松戸市上本郷字仲原250 合同酒精株式会社酵素医薬品研究所内
		Fターム(参考)	2G045 AA15 BB29 BB41 BB51 DA51 FA29 FB03 GC10

(54) 【発明の名称】 尿中総ヘモグロビン定量試薬

(57) 【要約】

【課題】 赤血球が混在する尿試料中の総ヘモグロビンを、特異的かつ特別の前処理を必要とせず、簡便に精度よく定量できる免疫分析試薬を提供する。

【解決手段】 本発明の定量分析試薬は、金コロイド粒子凝集法による尿中総ヘモグロビンの定量的免疫分析において、尿中に混在する赤血球を溶血させる界面活性剤と、粒子凝集反応を促進させる高分子重合体を試薬中に予め含有させることを特徴とするものである。本試薬は汎用自動分析装置に適用できるので、集団検診など大量の検体を処理する場合に、処理能力が向上し、省力化や効率化が期待できる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

金コロイド粒子凝集法を用いる定量的免疫分析において、試薬中にポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤並びに高分子重合体を含有させることを特徴とする尿中総ヘモグロビン定量試薬。

【請求項 2】

ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数 5 ~ 20）またはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（付加モル数 5 ~ 20）であり、かつ、その濃度が 0.01 ~ 0.5 重量%である請求項 1 記載の尿中総ヘモグロビン定量試薬。

10

【請求項 3】

高分子重合体が平均分子量 4,000 ~ 25,000 のポリエチレングリコールであり、かつ、その濃度が 1 ~ 10 重量%である請求項 1 記載の尿中総ヘモグロビン定量試薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、金コロイド粒子凝集法を用いる尿中総ヘモグロビンの定量試薬に関する。さらに詳しくは、尿中の赤血球を迅速にかつ完全に溶解させ、尿中の微量な総ヘモグロビンを精度良く定量する方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

腎尿路系の疾患による血尿では、尿中に赤血球とヘモグロビンが混在している場合が多い。従来より、肉眼的には判断できない微量な血尿の検査法としては、試験紙による潜血反応（試験紙法）と顕微鏡による沈渣有形成分検査が一般的である。しかしながら、試験紙法は、簡便に尿中のヘモグロビンを定性判定できるが、混在する赤血球は斑点状の呈色となり、機器判定では低めに判定されるという問題点があった。また、試験紙法はヘモグロビンのペルオキシダーゼ様活性による酸化還元反応を反応原理とするため、アスコルビン酸などの尿中に存在する還元物質や、ミオグロビンなどのペルオキシダーゼ様活性を有する他の物質の影響を受けやすく、特異性が低いという問題もあった。

【0003】

30

そこで、特異性を高めるために、抗原抗体反応を利用した尿中ヘモグロビン測定方法が試みられている（非特許文献 1）。すなわち、抗ヘモグロビン抗体を感作させたポリスチレンラテックスを用いた粒子凝集法で尿試料を分析した結果、アスコルビン酸やミオグロビンの影響を受けることなく尿中のヘモグロビンを特異的に定性判定できることが記載されている。しかしながら、尿中に赤血球が混在する尿検体の場合はこれを検出できず、陰性結果となるという問題点があった。

【0004】

一方、赤血球が混在する尿を -80 で凍結し、再融解した尿試料について、抗ヘモグロビン抗体を感作させたポリスチレンラテックス法で分析すると、尿中の総ヘモグロビン量を正確に定量できることが開示されている（非特許文献 2）。しかしながら、凍結に際して、尿試料にヘモグロビン安定化試薬を加える必要があること、さらに -80 という超低温での凍結処理と再融解操作に多大な時間と労力、設備を必要とするという問題があった。

40

【0005】

特許文献 1 や特許文献 2 には、生体試料中に存在する赤血球を溶血させるために、フローサイトメトリー用試薬等に界面活性剤が使用されている。しかしながら、粒子凝集法を用いる定量的免疫分析において反応系に界面活性剤が存在すると、界面活性剤の種類によっては、分析対象となる抗原や試薬中の抗体が変性して全く反応が起こらないという現象を引き起こす。さらに、タンパク質変性作用が穏やかな界面活性剤であっても、粒子凝集を抑制するため、反応性が著しく低下し、試料中に微量に存在する抗原を精度良く測定でき

50

ないという問題があった。

【0006】

【特許文献1】特開平06-109725号公報

【特許文献2】特開平09-329596号公報

【非特許文献1】臨床検査 vol. 39 969-973頁 1992年

【非特許文献2】臨床病理 vol. 51 403-408頁 2003年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、赤血球が混在する尿試料中の総ヘモグロビン定量における、上記の問題点を解決し、前処理を必要とせずに尿中の微量な総ヘモグロビンを簡便かつ精度良く定量する試薬の提供を目的とするものである。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、金コロイド粒子凝集法による尿中総ヘモグロビンの定量的免疫分析において、尿中に混在する赤血球を溶血させる界面活性剤と、粒子凝集反応を促進させて反応性を高める高分子重合体を試薬中に予め含有させることを特徴とするものである。

【0009】

すなわち、臨床検査に用いられている汎用自動分析装置で広く採用されている2種類の試薬を用いる反応系において、本発明の定量分析試薬は、第1試薬に界面活性剤を含有させ、第1試薬又は第2試薬のどちらか一方、あるいは第1試薬と第2試薬の両方に所定の濃度で高分子重合体を含有させることで、上記課題を解決する。

20

【発明の効果】

【0010】

本発明の定量分析試薬によれば、赤血球が混在する尿試料の微量な総ヘモグロビン量でも、特別な前処理を必要とせずに、特異的に簡便かつ精度よく定量することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明に用いる試薬は、赤血球を溶血させる作用を有する界面活性剤を含有する第1試薬、並びにヘモグロビンに対する抗体を結合させた金コロイド粒子担体を含有する第2試薬から構成される。他方の必須成分である粒子凝集反応を促進する高分子重合体は、第1試薬又は第2試薬のどちらか一方、あるいは第1試薬と第2試薬の両方に所定の濃度で含有させる。

30

【0012】

本発明に用いる界面活性剤としては、赤血球を溶血させる作用を有するポリオキシエチレン系の非イオン性界面活性剤を使用することができる。例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数5~20)またはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル(付加モル数5~20)等が挙げられる。特にポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数10)またはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル(付加モル数10)の使用が好適である。また、以上を組み合わせることも可能である。これらの界面活性剤の含有量は、0.01~0.5重量%である。

40

【0013】

また、本発明に用いる高分子重合体としては、反応を促進する作用を有する平均分子量4,000~25,000のポリエチレングリコールが使用できる。高分子重合体の含有量は、1~10重量%である。

さらに、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム緩衝液やグッド緩衝液等を使用すると、一定のpHを維持するために、好都合である。

【0014】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

50

【実施例 1】

【0015】

(試薬の作製) 0.2重量%ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数10)、6重量%ポリエチレングリコール6000(平均分子量6,000)、0.1重量%アジ化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH6.8)を第1試薬とした。

【0016】

フレンスらによる(Nature Phys.Sci., Vol.241, p20-22 (1973))に記載された方法により、塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元し、金コロイド液を調製した。特開平2-141665号公報に記載の抗ヒトヘモグロビン・マウスモノクローナル抗体を金コロイド液1mlあたり6μg添加した後、0.5mLの1%ウシ血清アルブミン溶液を加えた。次いで、10,000rpm、10分間遠心分離することにより暗赤色沈殿である抗体結合金コロイドを回収し、1%ウシ血清アルブミンを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5)に、波長540nmにおける吸光度が2.4になるように懸濁し、第2試薬とした。

10

【実施例 2】

【0017】

(測定)ヘパリン採血したヒト血液を生理食塩水で100倍に希釈してヒト赤血球浮遊液を調製した。生理食塩水でさらに1,000、2,000、4,000倍希釈したものを非溶血試料として測定した。測定には、汎用自動分析装置((株)日立製作所製7070形自動分析装置)を用いた。反応系は、試料:5μl、第1試薬:130μl、第2試薬:140μlとし、反応開始直後と5分後の吸光度差を主波長546nm、副波長700nmで測定した。また、実験に先立ち、標準ヘモグロビンとして合同酒精(株)製キャリブレーター2010を用いて、同一の条件で吸光度差を測定し、ヘモグロビン濃度と吸光度差の関係を示す検量線を作成した。この検量線から、試料中のヘモグロビン濃度を算出した。

20

比較例1として、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数10)を添加していない第1試薬を使用した。また、本発明の定量性を確認するために、ヒト赤血球浮遊液を蒸留水で同様の倍率に希釈し、完全に溶血させた試料の測定も行った。その結果を図1に示した。

30

本発明の試薬を用いると、赤血球が混在する試料の総ヘモグロビン濃度を正確に分析することができた。一方、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数10)を添加しない試薬を用いた場合は、著しく低いヘモグロビン測定値となり、定量できなかった。

【0018】

ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数10)のかわりに、試験紙に溶血剤として広く用いられている界面活性剤の0.2重量%ラウリル硫酸ナトリウムを添加した第1試薬を使用した場合は、全く反応が見られなくなり、測定することができなかった。

40

【実施例 3】

【0019】

(試薬の作製)0.05重量%ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル(付加モル数10)、3重量%ポリエチレングリコール20000(平均分子量20,000)、0.1重量%アジ化ナトリウムを含む0.02Mピペラジン-N,N'-ビス2-エタンスルホン酸緩衝液(pH6.8)を第1試薬とした。第2試薬は実施例1と同じものを使用した。

【実施例 4】

【0020】

(測定)赤血球が混在した尿を試料として、10回測定を繰り返した。実施例2と同様に、測定には、汎用自動分析装置((株)日立製作所製7070形自動分析装置)を用いた。反応系は、試料:5μl、第1試薬:130μl、第2試薬:140μlとし、反応

50

開始直後と5分後の吸光度差を主波長546nm、副波長700nmで測定した。標準ヘモグロビンにより作製した検量線から、試料中のヘモグロビン濃度 (ng/mL) を算出した。

ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル (付加モル数10) を添加していない第1試薬を使用した測定結果を比較例2、ポリエチレングリコール20000を添加していない第1試薬を使用した測定結果を比較例3として、表1に結果を示した。

【0021】

【表1】

測定回数	本発明 (ng/mL)	比較例2 (ng/mL)	比較例3 (ng/mL)
1	1543	487	1620
2	1470	496	1407
3	1475	484	1481
4	1551	507	1258
5	1462	490	1288
6	1559	532	1273
7	1443	517	1467
8	1511	500	1803
9	1477	506	1393
10	1491	503	1555
平均値	1498	502	1455
標準偏差	40.6	14.5	171.6
変動率 (%)	2.7	2.9	11.8

10

20

【0022】

本発明の試薬を用いると、実際に赤血球が混在する尿検体を分析した場合にも、総ヘモグロビン濃度を再現性良く分析することができた。一方、界面活性剤を添加しない試薬を用いた比較例2では、著しく低いヘモグロビン測定値となり定量性がなかった。また、高分子重合体を添加しない比較例3では、反応に伴う吸光度差が著しく低下し、ヘモグロビン測定値のばらつきを示す変動率が大きくなった。

30

【産業上の利用可能性】

【0023】

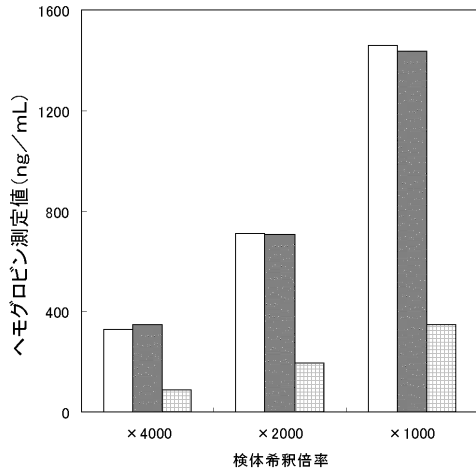
本試薬は、汎用自動分析装置に適用できるので、集団検診など、大量の検体を処理する場合に、処理能力が向上し、省力化や効率化が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本発明の効果 (実施例2, 比較例1)

【 図 1 】



□ 蒸留水による溶血試料 ■ 本発明 ▨ 比較例 1

专利名称(译)	尿总血红蛋白定量试剂		
公开(公告)号	JP2005091111A	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003323607	申请日	2003-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	合同酒精株式会社		
申请(专利权)人(译)	合同酒精株式会社		
[标]发明人	近藤英彦 石田尚彦		
发明人	近藤 英彦 石田 尚彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/493 G01N33/543 G01N33/553		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/493.A G01N33/543.583 G01N33/553		
F-TERM分类号	2G045/AA15 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB51 2G045/DA51 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/GC10		
其他公开文献	JP4515733B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫测定试剂，能够简单准确地定量尿液样品中的总血红蛋白，其中红细胞混合而无需特殊和特殊的预处理。 解决方案：本发明的定量分析试剂是通过金胶体颗粒凝集法对尿总血红蛋白进行定量免疫测定，其包含用于引起尿中共存的红细胞溶血的表面活性剂和高其特征在于分子聚合物预先包含在试剂中。由于该试剂可以应用于通用自动分析仪，因此当处理诸如组检查的大量样本时，提高了产量，可以预期节省劳力和效率。 【选择图】无

【表 1】

測定回数	本発明 (ng/mL)	比較例 2 (ng/mL)	比較例 3 (ng/mL)
1	1543	487	1620
2	1470	496	1407
3	1475	484	1481
4	1551	507	1258
5	1462	490	1288
6	1559	532	1273
7	1443	517	1467
8	1511	500	1803
9	1477	506	1393
10	1491	503	1555
平均值	1498	502	1455
標準偏差	40.6	14.5	171.6
変動率 (%)	2.7	2.9	11.8