

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6658164号  
(P6658164)

(45) 発行日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(24) 登録日 令和2年2月10日(2020.2.10)

(51) Int.Cl. F 1  
**GO 1 N 33/531 (2006.01)**  
 GO 1 N 33/531 A  
 GO 1 N 33/531 B

請求項の数 2 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2016-55592(P2016-55592)  
 (22) 出願日 平成28年3月18日(2016.3.18)  
 (65) 公開番号 特開2017-172975(P2017-172975A)  
 (43) 公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)  
 審査請求日 平成31年2月14日(2019.2.14)

(73) 特許権者 000003300  
 東ソー株式会社  
 山口県周南市開成町4560番地  
 (72) 発明者 三谷 俊介  
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ  
 ー株式会社 東京研究センター内  
 (72) 発明者 河合 信之  
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ  
 ー株式会社 東京研究センター内  
 審査官 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応試薬及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

測定対象である抗体に対する固相抗原、蛋白質及び界面活性剤を含有する凍結乾燥試薬、並びに

測定対象である抗体に対する標識抗体、蛋白質及び界面活性剤を含有する凍結乾燥試薬、を有することを特徴とする免疫反応試薬。

【請求項2】

測定対象である抗体に対する固相抗原、蛋白質及び界面活性剤を溶液中に共存させ凍結乾燥し、かつ

測定対象である抗体に対する標識抗体、蛋白質及び界面活性剤を溶液中に共存させ凍結乾燥する

ことを特徴とする、免疫反応試薬の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体外診断薬等に使用される凍結乾燥状態の免疫反応試薬及びその製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ビーズや微粒子などの固相担体に固定化した抗原(以下、固相抗原)、酵素等の標識が

結合した抗体（以下、標識抗体）は、臨床検査等の分野で広く利用されている。しかしながら抗体、抗原や酵素等の活性は温度の影響を受けやすく、活性を維持した状態で長期間保存することは困難である。このためこれらの活性を維持するために様々な安定化方法が提案されている。

【0003】

特許文献1では、二糖類以上の非還元糖類及び糖アルコール等を添加して凍結乾燥することで標識抗体を安定化させることが報告されている。特許文献2では、ガラクトース、ラクトース及びフルクトースからなる群より選ばれる糖とアルブミンあるいはデキストランとの存在下で凍結乾燥することでヒト由来アルカリホスファターゼを安定化させることが報告されている。しかしながら凍結乾燥状態の免疫反応試薬においては、適切な化合物、糖や蛋白質などを選択して臨床検査の分野で求められている保存安定性が得られた場合には、試薬が強固な乾燥ケーキ状となっている場合が多く、再溶解した後の溶解性が悪く、その結果、測定再現性が悪くなり測定対象成分を高精度に測定することが妨げられることが問題となっていた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開昭60-149972号公報

【特許文献2】特許第4169344号公報

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

臨床検査の分野において、試薬の長期間の保存安定性は種々の試薬で求められている。また測定時における再現性も同時に求められている。そこで本発明の目的は、体外診断薬等に使用される安定かつ測定再現性が良好な凍結乾燥状態の免疫反応試薬及びその製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を行なった結果、凍結乾燥状態の免疫反応試薬を安定化するために蛋白質を選定し、さらに界面活性剤を加えることにより、保存安定性と測定再現性が共に良好であることを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0007】

即ち本発明は以下のとおりである。

(1) 測定対象である抗体に対する固相抗原、蛋白質及び界面活性剤を含有する凍結乾燥試薬、並びに

測定対象である抗体に対する標識抗体、蛋白質及び界面活性剤を含有する凍結乾燥試薬、を有することを特徴とする免疫反応試薬。

(2) 測定対象である抗体に対する固相抗原、蛋白質及び界面活性剤を溶液中に共存させ凍結乾燥し、かつ

測定対象である抗体に対する標識抗体、蛋白質及び界面活性剤を溶液中に共存させ凍結乾燥する

40

ことを特徴とする、免疫反応試薬の製造方法。

【0008】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】

本発明における測定対象は抗体であり、特に限定されるものではないが、例えば臨床検査に利用される物質であり、ヒトイムノグロブリン、抗甲状腺ペルオキシターゼ抗体、抗サイログロブリン抗体等があげられる。

【0010】

本発明において固相抗原は、前述の測定対象である抗体に対する抗原をビーズや微粒子

50

などの固相担体に固定化したものであり、抗原抗体反応を行う溶液に不溶性のものを指すが、固相に直接抗原が結合していなくても、アビジン - 固相複合体を結合するためのビオチンを結合した抗原で可溶性のものも含まれる。

【0011】

標識抗体は、前述の測定対象である抗体に対する抗体であって標識を結合したものであり、抗原抗体反応を行う溶液に可溶性のものを指すが、標識を直接抗体に結合していなくても、アビジン - 標識複合体を結合するためのビオチンを結合した抗体で可溶性のものも含まれる。

【0012】

固相としては、ビーズや微粒子を使用することができる。特に微粒子が好ましく、ガラス、金属、セラミックス等の無機物であってもよく、また高分子ポリマー等の有機物であってもよい。またそれらの微粒子は磁性体を含むものであってもよい。微粒子の粒子径は0.1から50 μmが好ましく、さらには1から10 μmが好ましい。

【0013】

標識としては特に限定されるものではないが、例えば酵素、放射性同位元素等があげられ、特に酵素が好ましく、例えばアルカリ性ホスファターゼ、パーオキシダーゼ等があげられる。

【0014】

これらを用いる免疫測定法は固相法であり、サンドイッチ法や競合法が含まれる。また、固相に抗原が直接結合されていないとしても、抗原抗体反応に続く反応工程で固相に結合するような測定法、例えば、ビオチニル化抗原を用いたサンドイッチ法による免疫反応工程の後に、アビジン - 固相複合体を反応させるような測定法も含まれる。また標識に抗体が直接結合されていないとしても、抗原抗体反応に続く反応工程で標識を結合するような測定法、例えば、ビオチニル化抗体を用いたサンドイッチ法による免疫反応工程の後に、アビジン - 標識複合体を反応させるような測定法も含まれる。

【0015】

本発明における抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、抗体を産生する実際上任意の動物種、例えばウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウスまたはラットなど由来の抗体が使用できる。抗体の形態には完全抗体や、それを酵素処理や化学処理により切断したF(a b')<sub>2</sub>やF a b' 等のような抗体断片であってもよい。

【0016】

本発明に用いられる蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン、コラーゲンペプチド、スキムミルク等を使用することができ、特にウシ血清アルブミンが好ましい。凍結乾燥前の溶液において0.1~20% (重量/容量)の濃度範囲とすることが好ましく、特に1~10% (重量/容量)の濃度範囲とすることが好ましい。

【0017】

本発明に用いられる界面活性剤としては、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤を使用することができる。特に非イオン性界面活性剤が好ましく、Triton X - 100、Triton X - 114、ノニデットP40、Tween 20、Tween 80が使用でき、中でもTriton X - 100が好ましい、界面活性剤は凍結乾燥前の溶液において0.001~1% (重量/容量)の濃度範囲とすることが好ましく、特に0.01~0.5% (重量/容量)の濃度範囲とすることが好ましい。

【0018】

本発明の免疫反応試薬は、固相抗原、蛋白質及び界面活性剤を溶液中に共存させ、凍結乾燥し、かつ標識抗体、蛋白質及び界面活性剤を溶液中に共存させ、凍結乾燥することにより製造することができる。

【0019】

このときの溶液としては、緩衝液や水、更にそれらに糖や塩類を含有させたものがあげ

10

20

30

40

50

られる。糖であれば例えばスクロース、マンニトール、トレハロースやイノシトール等を使用することができる。緩衝液としては、例えばT r i s、M O P S O、M O P SやM E S等を使用することができ、塩類としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛等を使用することができる。なお、凍結乾燥時にこれら以外にも、必要に応じて他の試薬成分等を共存させることもできる。

【0020】

このようにして、本発明の凍結乾燥状態の免疫反応試薬を製造することができる。

【発明の効果】

【0021】

本発明によれば、保存安定性が良好かつ測定再現性が良好な、体外診断薬等に使用される凍結乾燥状態の免疫反応試薬を得ることが可能となる。例えば、本発明で得られた免疫測定試薬は長期間の保存が可能となる。さらに精度よく測定することができるので、本発明によって高精度な測定も実現できる。

10

【実施例】

【0022】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は本実施例により限定されるものではない。

【0023】

免疫測定装置として全自動エンザイムイムノアッセイ装置(A I A - C L 2 4 0 0、東ソー社製)と免疫測定用試薬として当該装置用免疫反応試薬を用い、2ステップサンドイッチ法により各測定を行った。なお、各免疫反応試薬は後述したようにして調製した。

20

【0024】

(実施例1)

甲状腺ペルオキシターゼ固定化磁性微粒子をスクロース、塩化ナトリウム、ヘパリンナトリウム、カゼインナトリウム、プロクリン300、未脱脂ウシ血清含むT r i s緩衝液に加え、さらに5%(重量/容量)ウシ血清アルブミン、0.1%(重量/容量)T r i t o n X - 1 0 0を加えて凍結乾燥を行った。なお、未脱脂ウシ血清中のウシ血清アルブミンの濃度はごく少量であり、組成には実質的に影響しないものである。さらにアルカリ性ホスファターゼ標識抗ヒトI g G抗体をトレハロース、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、プロクリン300を含むM O P S緩衝液に加え、さらに5%(重量/容量)ウシ血清アルブミン、0.2%(重量/容量)T r i t o n X - 1 0 0を加えて凍結乾燥を行った。

30

【0025】

次に調製した試薬に対して、35℃で13日間の加速劣化試験を実施した。尚、比較のための試験は4℃で13日間保存した。前記自動免疫測定装置で各試薬に対して血清サンプル3種類を測定し、アルカリ性ホスファターゼの基質である化学発光基質の発光強度を測定した。各血清サンプルは5回ずつ測定し、その平均値を測定値とした。さらにその測定値を元に、測定再現性を算出した。結果を表1に示す。

【0026】

【表1】

	4℃、13日間	35℃、13日間		
	発光強度	発光強度	残存率(%)	再現性(%)
血清サンプル1	55410	49912	90.1	0.9
血清サンプル2	391560	353935	90.4	2.4
血清サンプル3	730530	658321	90.1	1.8

40

(比較例1)

甲状腺ペルオキシターゼ固定化磁性微粒子をスクロース、塩化ナトリウム、ヘパリンナトリウム、カゼインナトリウム、プロクリン300、未脱脂ウシ血清を含むT r i s緩衝

50

液に加え、さらに5%（重量/容量）ウシ血清アルブミンを加えて凍結乾燥を行った。なお、未脱脂ウシ血清中のウシ血清アルブミンの濃度はごく少量であり、組成には実質的に影響しないものである。さらにアルカリ性ホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体をトレハロース、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、プロクリン950及びゲンタマイシン硫酸塩を含むTris緩衝液に加え、さらに5%（重量/容量）グリゼートを加え、さらに1%（重量/容量）ウシ血清アルブミンを加えて凍結乾燥を行った。

【0027】

次に調製した試薬に対して、実施例1と同様にして試験を行った。結果を表2に示す。

【0028】

【表2】

10

	4℃、13日間	35℃、13日間		
	発光強度	発光強度	残存率 (%)	再現性 (%)
血清サンプル1	31719	26721	84.2	4.1
血清サンプル2	242182	193501	79.9	9.5
血清サンプル3	476510	366974	77.0	14.3

（比較例2）

甲状腺ペルオキシターゼ固定化磁性微粒子をスクロース、塩化ナトリウム、ヘパリンナトリウム、カゼインナトリウム、プロクリン300、未脱脂ウシ血清を含むTris緩衝液に加え、さらに5%（重量/容量）ウシ血清アルブミン、0.1%（重量/容量）Triton X-100を加えて凍結乾燥を行った。なお、未脱脂ウシ血清中のウシ血清アルブミンの濃度はごく少量であり、組成には実質的に影響しないものである。さらにアルカリ性ホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体をトレハロース、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、プロクリン950及びゲンタマイシン硫酸塩を含むTris緩衝液に加え、さらに5%（重量/容量）グリゼートを加え、さらに1%（重量/容量）ウシ血清アルブミンを加えて凍結乾燥を行った。

20

【0029】

次に調製した試薬に対して、実施例1と同様に試験を行った。結果を表3に示す。

30

【0030】

【表3】

	4℃、13日間	35℃、13日間		
	発光強度	発光強度	残存率 (%)	再現性 (%)
血清サンプル1	33917	30304	89.3	5.8
血清サンプル2	265547	241372	90.9	3.6
血清サンプル3	539465	472081	87.5	5.8

40

界面活性剤が含まれていない比較例1の場合は、サンプルの発光強度の残存率が4 保存品と比較して、13日間で84.2%、79.9%、77.0%であり、5回測定の再現性は4.1%、9.5%、14.3%であった。また固相抗原に界面活性剤を添加した比較例2の場合、発光強度の残存率は13日間で89.3%、90.9%、87.5%であり、5回測定の再現性は5.8%、3.6%、5.8%と安定性と測定再現性が良くなる傾向が見られた。これに対し、固相抗原と酵素標識抗体ともに界面活性剤とウシ血清アルブミンを添加した実施例1の場合、発光強度の残存率は13日間で90.1%、90.4%、90.1%であり、5回測定の再現性は0.9%、2.4%、1.8%と安定性と測定再現性がともに大きく改善された。これは固相抗原と酵素標識抗体ともに界面活性剤とウシ血清アルブミン添加を行ったことで免疫反応試薬の性能が向上したことを示してい

50

8。

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開昭62-151758(JP,A)  
特開2014-125473(JP,A)  
特開2013-238502(JP,A)  
特開2014-002117(JP,A)  
特開2011-137694(JP,A)  
特開2002-181812(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/531

专利名称(译)	免疫反应试剂及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6658164B2</a>	公开(公告)日	2020-03-04
申请号	JP2016055592	申请日	2016-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
当前申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	三谷俊介 河合信之		
发明人	三谷 俊介 河合 信之		
IPC分类号	G01N33/531		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/531.B		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2017172975A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

解决的问题：提供一种用作体外诊断药物等的免疫反应试剂，该试剂稳定，测量重现性高并且处于良好的冻干状态。解决方案：免疫反应试剂包括：干燥试剂，其含有作为测量对象的抗体的固相抗原，蛋白质（牛血清白蛋白等）和表面活性剂（TritonX-100等）；以及冻干试剂，其包含作为测量对象的抗体的标记抗体，蛋白质（牛血清白蛋白等）和表面活性剂（TritonX-100等）。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6658164号 (P6658164)
(45) 発行日 令和2年3月4日 (2020. 3. 4)		(24) 登録日 令和2年2月10日 (2020. 2. 10)
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/531 (2006.01)	F I G O 1 N 33/531 G O 1 N 33/531	A B
請求項の数 2 (全 7 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-55592 (P2016-55592)	(73) 特許権者 000003300 東ソー株式会社	
(22) 出願日 平成28年3月18日 (2016. 3. 18)	山口県周南市開成町4560番地	
(65) 公開番号 特開2017-172975 (P2017-172975A)	(72) 発明者 三谷 俊介 神奈川県横浜市早川2743番地1 東ソ 株式会社 東京研究センター内	
(43) 公開日 平成29年9月28日 (2017. 9. 28)	(72) 発明者 河合 信之 神奈川県横浜市早川2743番地1 東ソ 株式会社 東京研究センター内	
審査請求日 平成31年2月14日 (2019. 2. 14)	審査官 三木 隆	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 免疫反応試薬及びその製造方法		