

(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2004-325413**

**(P2004-325413A)**

(43) 公開日 **平成16年11月18日(2004.11.18)**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

**GO 1 N 33/53**

GO 1 N 33/53 S

**GO 1 N 33/531**

GO 1 N 33/531 B

**GO 1 N 33/543**

GO 1 N 33/543 5 8 1 J

GO 1 N 33/543 5 8 3

GO 1 N 33/543 5 8 7

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-124336 (P2003-124336)

(22) 出願日 平成15年4月28日 (2003. 4. 28)

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(72) 発明者 大田 哲也

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学

工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 抗リン脂質抗体測定試薬及び抗リン脂質抗体測定方法

(57) 【要約】

【課題】 様々な生化学自動分析機に適用でき、迅速かつ簡便に大量の検体を測定することができる、しかも非特異的凝集による判定不良が生じ難い、抗リン脂質抗体測定試薬を提供する。

【解決手段】 抗リン脂質抗体と抗原との抗原抗体反応による凝集を吸光度の変化により測定するための抗リン脂質抗体測定試薬であって、カルジオリピン、レシチン及びコレステロールからなる脂質抗原が吸着された不溶性担体と、該不溶性担体に吸着された脂質抗原をブロッキングするための水溶性高分子とを含む抗原試薬と、水溶性高分子を含む希釈用緩衝液とからなることを特徴とする、抗リン脂質抗体測定試薬。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

抗リン脂質抗体と抗原との抗原抗体反応による凝集を吸光度の変化により測定するための抗リン脂質抗体測定試薬であって、カルジオリピン、レシチン及びコレステロールからなる脂質抗原が吸着された不溶性担体と、該不溶性担体に吸着された脂質抗原をブロッキングするための水溶性高分子とを含む抗原試薬と、水溶性高分子を含む希釈用緩衝液とからなることを特徴とする、抗リン脂質抗体測定試薬。

**【請求項 2】**

脂質抗原をブロッキングするための前記水溶性高分子が、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、水溶性多糖類及びこれらの誘導体からなる群から選択された少なくとも 1 種である、請求項 1 に記載の抗リン脂質抗体測定試薬。

**【請求項 3】**

前記水溶性多糖類が、プルラン、デキストラン、デキストラン硫酸及びアルギン酸ナトリウムからなる群から選択された少なくとも 1 種である、請求項 2 に記載の抗リン脂質抗体測定試薬。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 に記載の抗リン脂質抗体測定試薬を用いた抗リン脂質抗体の測定方法であって、前記抗原試薬と、前記希釈用緩衝液と、検体とを混合し、抗原抗体反応による凝集を生じさせる工程と、前記凝集の程度を、特定波長の吸光度に基づいて測定し、それによって検体中の抗リン脂質抗体を検出する工程とを備える、抗リン脂質抗体測定方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、検体中に含まれている抗リン脂質抗体を免疫学的に測定するための抗リン脂質抗体測定試薬及び測定方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

梅毒の病原体であるトレポネーマ・パリダム (*Treponema Pallidum*) が生体に感染すると、該病原体に対する抗体とともに、リン脂質と反応性を有するワッセルマン抗体が産生される。従来の梅毒の検査法は、梅毒菌体に対する抗体を検出するために、梅毒菌体から抽出した抗原そのものを用いる方法と、ワッセルマン抗体を検出するためにカルジオリピンを含む脂質類を抗原として用いる方法の 2 つに大別される。

**【0003】**

現在、脂質抗原を用いる方法としては、VDRL 法、緒方法、RPR 法、及びガラス板法などが存在するが、定性スクリーニングには、RPR 法及びガラス板法が主に用いられている。

**【0004】**

これらの脂質抗原を用いる検査法は、梅毒以外の疾患に対しても陽性反応を呈するという欠点を有するが、ワッセルマン抗体が梅毒の感染状態を良好に反映するという利点を有する。従って、梅毒の治療経過をモニターするために、RPR 法やガラス板法が用いられている。

**【0005】**

RPR 法は、カルジオリピン及びレシチンを含む脂質をカオリンまたは炭素粉末に吸着させたものを、白色プレート上で検体とともに混合し、カオリンまたは炭素粉末の凝集の有無を判定する方法である。

**【0006】**

10

20

30

40

50

上記ガラス板法は、ガラス板上において、カルジオリピン、レシチン及びコレステリンを含む脂質抗原液を検体と混合し、コレステリン結晶の凝集の有無を判定する方法である。

【0007】

上記2つの方法は、いずれも用手法であるため、大量の検体を検査するには適していない。また、RPR法では炭素粉末の凝集を目視により、ガラス板法ではコレステリン結晶の生成を顕微鏡下で観察することにより、判定が行われる。従って、いずれの方法においても、判定に熟練を要し、判定者によって判定結果が異なることも起こり得るという問題があった。

【0008】

このような問題を解決するために、下記の特許文献1では、生化学自動分析機に適用可能な梅毒抗リン脂質抗体測定試薬が開示されている。ここでは、ブロッキング剤として不活性なタンパク質が用いられている。

10

【0009】

他方、下記の特許文献2には、カウンティングイムノアッセイ法で測定可能な梅毒抗リン脂質抗体測定試薬が開示されている。この測定試薬は、カルジオライピン重量1に対して、フォスファジルコリン2～15倍量、コレステロール0～6倍量及びこれら脂質抗原の総量が担体粒子1gあたり30～95mg含む抗原液を担体粒子と混合させることにより、上記担体粒子上に脂質抗原を感作し、さらに担体粒子をポリビニルアルコールでブロッキングすることにより構成されている。

【0010】

20

【特許文献1】

特許第3290520号

【特許文献2】

特開2001-242171号

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

特許文献1において、ブロッキング剤として用いられるタンパク質の代表例として示されている牛血清アルブミンなどでは、抽出過程において混入する他のタンパク質などの影響により非特異反応が起こり、梅毒陰性の検体を陽性と判定する偽陽性が生じるという欠点があった。

30

【0012】

また、上記特許文献2に記載の測定試薬は、カウンティングイムノアッセイ法を採用する機器に用いられるものであるが、その他の機器に用いた場合には測定を行うことはできない。

【0013】

本発明の目的は、上述した従来技術の現状に鑑み、種々の生化学自動分析機に用いることができ、迅速かつ簡便に大量の検体を測定することを可能とし、かつ客観性の高い検出結果を得ることを可能とする抗リン脂質抗体測定試薬及び抗リン脂質抗体測定方法を提供することにある。

【0014】

40

【課題を解決するための手段】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬は、抗リン脂質抗体と抗原との抗原抗体反応による凝集を吸光度の変化により測定するための抗リン脂質抗体測定試薬であって、カルジオリピン、レシチン及びコレステロールからなる脂質抗原が吸着された不溶性担体と、該不溶性担体に吸着された脂質抗原をブロッキングするための水溶性高分子とを含む抗原試薬と、水溶性高分子を含む希釈用緩衝液とからなることを特徴とする。

【0015】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬のある特定の局面では、脂質抗原をブロッキングするための前記水溶性高分子が、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、水溶性多糖類及びこれらの誘導体からなる群から選択された少なくとも1種である。

50

## 【0016】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬の他の特定の局面では、前記水溶性多糖類が、プルラン、デキストラン、デキストラン硫酸及びアルギン酸ナトリウムからなる群から選択された少なくとも1種である。

## 【0017】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定方法は、本発明に従って構成された抗リン脂質抗体測定試薬を用いた測定方法であって、前記抗原試薬と、前記希釈用緩衝液と、検体とを混合し、抗原抗体反応による凝集を生じさせる工程と、前記凝集の程度を、特定波長の吸光度に基づいて測定し、それによって検体中の抗リン脂質抗体を検出する工程とを備える。

## 【0018】

以下、本発明の詳細を説明する。

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬を用いた抗リン脂質抗体測定法は、前述したように、上記抗原試薬と、上記希釈用緩衝液と、検体とを混合し、抗原抗体反応による凝集を生じさせ、該凝集の程度波長の吸光度を測定し、該吸光度に基づいて抗リン脂質抗体を検出することにより行われる。

## 【0019】

上記カルジオリピンとしては、特に限定されないが、牛心臓から精製されたカルジオリピンが好適に用いられる。カルジオリピンの主成分は、ホスファチジルグリセロールであり、ホスファチジルグリセロール純度が高いものが好ましく、より好ましくは、90%以上の純度のものが望ましい。

## 【0020】

上記レシチンは、卵黄から精製あるいは化学的に合成されたものが用いられる。レシチンの成分はホスファチジルコリンであり、ホスファチジルコリン純度が高いものが好ましく、より好ましくは、70%以上の純度のものが望ましい。

## 【0021】

上記コレステロールは、動物の脂肪から精製されたものあるいは化学的に合成されたものが用いられ得る。コレステロールについても純度の高いものが好ましく、98%以上の純度を有するものが望ましい。

## 【0022】

上記カルジオリピン、レシチン及びコレステロールからなる脂質抗原を不溶性担体に吸着させた後、ブロッキングのために用いられる上記水溶性高分子としては、特に限定されるわけではないが、ポリビニルピロリドンに代表される水溶性ポリビニル誘導體；プルラン、デキストラン、デキストラン硫酸及びアルギン酸ナトリウムなどに代表される水溶性多糖類及びその誘導體；ポリエチレングリコールに代表されるアルキルグリコールの共重合体及びその誘導體などを用いることができる。

## 【0023】

上記水溶性高分子の分子量は水溶性高分子によっても異なるが、約1000～70000の範囲であることが望ましい。より具体的には、例えばポリビニルピロリドンの場合には、分子量は5000～40000の範囲が好ましく、プルランの場合には、分子量は10000～70000の範囲が好ましく、ポリエチレングリコールの場合には、分子量は10000～30000の範囲が好ましい。

## 【0024】

水溶性高分子の分子量が低すぎると、ブロッキング作用が十分に得られないことがあり、大きすぎると、溶解性が悪くなることがある。

本発明において用いられる上記不溶性担体としては、例えば有機高分子粉末、微生物、血球、細胞膜片、プラスチック製マイクロタイタープレートなどを挙げることができる。

## 【0025】

上記有機高分子粉末としては、例えば、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉末、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸共重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重

10

20

30

40

50

合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などの合成高分子粉末などが挙げられ、特に合成高分子ラテックスが望ましい。

【0026】

上記ラテックスを用いる場合、粒径は0.1~1.0 μmが好ましく、より好ましくは0.1~0.5 μmである。

【0027】

上記希釈用緩衝剤としては、pH5.0~9.0の緩衝液であれば、任意の緩衝液を用いることができる。用い得る緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、ペロナル緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸緩衝液などを挙げることができる。

【0028】

上記希釈用緩衝液には、測定感度の向上及び抗原抗体反応の促進を目的として、様々な水溶性高分子が含有される。このような水溶性高分子としては、例えば、特開平2-173567号公報に記載のアルキル化多糖類、あるいは特開平5-180838号公報に記載のように、プルランまたはポリビニルピロリドンなどを挙げることができる。希釈用緩衝液に含有される水溶性高分子は、前述したブロッキング用の水溶性高分子と同一であってもよく、異なってもよい。

10

【0029】

希釈用緩衝液中の水溶性高分子の濃度は0.01~10(w/v)%の範囲が好ましい。0.01(w/v)%未満では、測定感度が十分高くないことがある。

【0030】

また、上記希釈用緩衝液には、検体中に存在する他の物質により生じる非特異反応抑制を目的として、牛血清アルブミン、卵性アルブミンなどのタンパク質を添加してもよい。

20

【0031】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬を得るにあたっては、まず、不溶性担体に上記脂質抗原が吸着されるが、吸着方法は特に限定されない。例えば、不溶性担体を脂質抗原を含む緩衝液と混合することにより、脂質抗原が不溶性担体に吸着される。しかる後、不溶性担体に吸着された脂質抗原をブロッキングするための水溶性高分子が、脂質抗原が吸着された不溶性担体と混合され、抗原試薬が得られる。

【0032】

また、水溶性高分子を含む希釈用緩衝液は、緩衝液に上記水溶性高分子を混合し、溶解することにより得られる。

30

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬は、上記抗原試薬と、希釈用緩衝液とを有する2液型の測定試薬である。

【0033】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定方法では、上記抗原試薬と、希釈用緩衝液と、検体とが混合され、それによって抗原抗体反応による凝集が生じる。そして、凝集の程度が、光学的に測定される。すなわち、特定波長の吸光度を測定し、該吸光度変化量に基づいて凝集の程度が検出され、それによって検体中の抗リン脂質抗体が検出される。この場合の吸光度変化量の測定に際しては、種々の生化学自動分析機を用いることができる。

【0034】

40

【発明の実施の形態】

以下、本発明の具体的な実施例及び比較例を挙げることにより、本発明を明らかにする。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0035】

(実施例1)

1) 抗原試薬の調製

カルジオリピン(シグマ社製)の5mg/mL濃度のエタノール溶液を3mLと、ホスファチジルコリン(シグマ社製)の15mg/mL濃度のエタノール溶液を10mLと、コレステロール(ナカライテスク社製)の15mg/mL濃度のエタノール溶液を4.5mLとを混合し、脂質抗原液を得た。

50

## 【0036】

ポリスチレンラテックス懸濁液〔（平均粒径0.4 $\mu$ m、10w/v%）濃度、積水化学工業社製〕1mLを予め37で穏やかに攪拌しつつ加温し、しかる後、上記脂質抗原液3mLを添加し、37で1時間攪拌した。2重量%ポリビニルピロリドン（分子量10000、BASFS社製、品番：K-15）を含むリン酸緩衝食塩水（36mLリン酸緩衝液、pH6.5、0.74重量%NaCl、以下PBS緩衝液と略す）5mLを添加し、さらに37で1時間攪拌した。しかる後、この液を4の温度で、15000rpm及び30分の条件で遠心分離し、上清を除いた。上清を除いた後、沈殿したラテックスを1%牛血清アルブミンを含むPBS緩衝液3mLに懸濁させた。この操作を3回繰り返し、ラテックスを洗浄し、最後に10mLのEDTA・2Na（同仁化学社製）及び500mM塩化コリン（和光純薬社製）を含むPBS緩衝液20mLに懸濁させ、抗原試薬を得た。この抗原試薬は、梅毒抗リン脂質抗体を測定するためのものである。

10

## 【0037】

## 2) 希釈用緩衝液の調製

プルラン（林原社製）を1w/v%及び牛血清アルブミンを1w/v%含有する100mMリン酸緩衝液（pH7.4）を調製し、希釈用緩衝液とした。

## 【0038】

## 3) 測定

上記のようにして得られた抗原試薬と、希釈用緩衝液とを用い、日立製作所製7170型生化学自動分析機を用いて測定を行った。特定波長は700nmとし、1検体の測定について、抗原試薬60 $\mu$ L、希釈用緩衝液180 $\mu$ Lを20 $\mu$ Lの検体に対して用いた。より具体的には、検体20 $\mu$ Lに希釈用緩衝液180 $\mu$ Lを添加し、攪拌した後、37で保持した後、抗原試薬60 $\mu$ Lを添加し、攪拌し、しかる後1分後及び5分後の吸光度を測定し、この間の吸光度変化量を求めた。下記の表1に示す検体No. 1~10について、上記測定を行った。結果を下記の表1に示す。

20

## 【0039】

## （実施例2）

抗原試薬の測定に際し、2重量%ポリビニルピロリドンK-15に代えて、1重量%ポリビニルピロリドン（分子量30000、BASFS社製、品番：K-30）を用いたことを除いては、実施例1と同様にして試薬を作製し、評価した。

30

## 【0040】

## （実施例3）

実施例1の抗原試薬の調製に際して用いた2重量%ポリビニルピロリドンに代えて、3重量%プルラン（林原社製、品番：PI-20）としたことを除いては、実施例1と同様にして試薬を作製し、評価した。

## 【0041】

## （実施例4）

実施例1の抗原試薬の調製に際しての2重量%ポリビニルピロリドンに代えて、3重量%ポリエチレングリコール（和光純薬社製、分子量20000）としたことを除いては、実施例1と同様にして試薬を作製し、評価した。

40

## 【0042】

## （比較例1）

実施例1の抗原試薬の調製における2重量%ポリビニルピロリドンに代えて、1重量%牛血清アルブミンとしたことを除いては、実施例1と同様にして試薬を作製し、評価した。

## 【0043】

## （検体No. 1~10）

なお、検体No. 1~10は、用手法であるRPRカードテスト（三光純薬社製）では梅毒陰性と判定されるが、比較例1において非特異的凝集による吸光度変化量が上昇した検体である。

## 【0044】

50

検体 No. 1 ~ 10 は、上記のように R P R カードテストで陰性と判定されるものであるため、表 1 に示されている比較例 1 及び実施例 1 ~ 4 の結果の吸光度変化量は、非特異的凝集の程度を示すものである。

【 0 0 4 5 】

表 1 から明らかなように、比較例 1 では、全ての検体において凝集の程度が高く、従って前述したように R P R カードテストでは梅毒陰性と判定されている検体であるにも関わらず、比較例 1 の試薬を用いた場合には、吸光度変化量が大きく上昇し、陽性と判断されることがある。

【 0 0 4 6 】

これに対して、実施例 1 ~ 4 では、いずれも比較例 1 の場合に比べて吸光度変化量が小さく、すなわち非特異的凝集が生じ難いことがわかる。

なお、表 1 では、吸光度変化量として 吸光度  $\times 10^4$  の値が示されている。

【 0 0 4 7 】

【表 1】

検体 No.	比較例 1	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4
1	450	102	87	235	368
2	321	78	80	217	154
3	583	156	147	269	180
4	264	10	6	99	219
5	547	234	214	346	246
6	346	81	103	141	117
7	479	234	224	206	265
8	201	25	36	187	154
9	378	189	154	134	169
10	413	134	168	113	222

( $\Delta$  吸光度  $\times 10000$ )

【 0 0 4 8 】

【発明の効果】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬は、カルジオリピン、レシチン及びコレステロールからなる脂質抗原が吸着された不溶性担体と、該不溶性担体に吸着された脂質抗原をブロッキングするための水溶性高分子とを含む抗原試薬と、水溶性高分子を含む希釈用緩衝液とからなり、ブロッキングに上記水溶性高分子が用いられているため、抗リン脂質抗体の測定に際しての非特異的凝集を抑制することができる。従って、より確実に梅毒感染状態を検出することができる。また、本発明に係る測定試薬は、上記抗原試薬と希釈用緩衝液とからなるものであり、様々な生化学自動分析機に適用することができる。従って、迅速かつ簡便に大量の検体を測定することができ、しかも上記のように非特異的凝集による判定不良が生じ難いため、客観性に優れた梅毒判定結果を得ることができる。

【 0 0 4 9 】

本発明に係る抗リン脂質抗体測定方法では、本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬と検体とを混合し、抗原抗体反応による凝集を生じさせ、該凝集の程度を特定波長の吸光度を測定することにより行われる。従って、様々な生化学自動分析機において測定を行うことができ、迅速かつ簡便に大量の検体を測定することができる。また、本発明に係る抗リン脂質抗体測定試薬を用いるものであるため、非特異的凝集が生じ難く、従って、梅毒の感染状態を高精度に検出することができる。

专利名称(译)	抗磷脂抗体测定试剂和抗磷脂抗体测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004325413A</a>	公开(公告)日	2004-11-18
申请号	JP2003124336	申请日	2003-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	大田哲也		
发明人	大田 哲也		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/531.B G01N33/543.581.J G01N33/543.583 G01N33/543.587		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

需要解决的问题为了提供一种可以应用于各种生化自动分析仪的抗磷脂抗体测定试剂，可以快速，方便地测量大量标本，并且几乎不会因非特异性聚集而导致判断不良。 解决方案：该抗磷脂抗体测定试剂，用于通过吸光度的变化通过抗磷脂抗体与抗原之间的抗原 - 抗体反应来测量凝集，其不溶于由心磷脂，卵磷脂和胆固醇组成的脂质抗原被吸附一种抗原试剂，包括载体和水溶性聚合物，用于阻断吸附在不溶性载体上的脂质抗原，和含有水溶性聚合物的稀释缓冲液，其中抗磷脂抗体测定试剂。 【选择图】无

検体 No.	比較例 1	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4
1	450	102	87	235	368
2	321	78	80	217	154
3	583	156	147	269	180
4	264	10	6	99	219
5	547	234	214	346	246
6	346	81	103	141	117
7	479	234	224	206	265
8	201	25	36	187	154
9	378	189	154	134	169
10	413	134	168	113	222