

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/126051

発行日 平成21年9月10日(2009.9.10)

(43) 国際公開日 平成19年11月8日(2007.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 A	
GO 1 N 33/548 (2006.01)	GO 1 N 33/548 A	
GO 1 N 33/547 (2006.01)	GO 1 N 33/547	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2008-513291 (P2008-513291)	(71) 出願人	306008724 富士レビオ株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/059166		東京都中央区日本橋浜町二丁目62番5号
(22) 国際出願日	平成19年4月27日(2007.4.27)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(31) 優先権主張番号	特願2006-125232 (P2006-125232)	(72) 発明者	広瀬 績 東京都中央区日本橋浜町二丁目62番5号 富士レビオ株式会社内
(32) 優先日	平成18年4月28日(2006.4.28)	(72) 発明者	倉野 義裕 東京都中央区日本橋浜町二丁目62番5号 富士レビオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	中村 隆 東京都中央区日本橋浜町二丁目62番5号 富士レビオ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗リン脂質抗体測定用試薬

(57) 【要約】

要約

疎水性が高いリン脂質抗原を不溶性担体へ固定化する効率を従来法よりもさらに高め、臨床から強く求められている、より高感度な測定法を実現する、抗リン脂質抗体測定用試薬が開示されている。抗リン脂質抗体測定用試薬は、少なくとも1種の表面修飾物質が表面に結合した不溶性担体に、リン脂質が固定化されている抗リン脂質抗体測定用試薬であって、(1)表面修飾物質が炭素数14～22のアルキルアミンであり、不溶性担体がラテックス粒子であるか、又は(2)表面修飾物質が炭素数14～22のアルキルアミン、ポリリジン、ペタイン修飾化ポリリジン及びアルキル基の炭素数が1～3のポリアミノアルキル(メタ)アクリル酸並びにこれらの2種以上の混合物から成る群より選ばれる少なくとも1種であり、不溶性担体がゼラチン粒子である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1種の表面修飾物質が表面に結合した不溶性担体に、リン脂質が固定化されている抗リン脂質抗体測定用試薬であって、(1)前記表面修飾物質が炭素数14～22のアルキルアミンであり、前記不溶性担体がラテックス粒子であるか、又は(2)前記表面修飾物質が炭素数14～22のアルキルアミン、ポリリジン、ベタイン修飾化ポリリジン及びアルキル基の炭素数が1～3のポリアミノアルキル(メタ)アクリル酸並びにこれらの2種以上の混合物から成る群より選ばれる少なくとも1種であり、前記不溶性担体がゼラチン粒子である、抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 2】

前記表面修飾物質がオクタデシルアミンであり、前記不溶性担体がラテックス粒子である請求項1記載の抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 3】

前記表面修飾物質がオクタデシルアミン、ポリリジン、ベタイン修飾化ポリリジン及びポリアミノエチルメタクリル酸並びにこれらの2種以上の混合物から成る群より選ばれる少なくとも1種である請求項1記載の抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 4】

前記リン脂質は、前記表面修飾物質が表面に結合した前記不溶性担体に物理吸着により結合している請求項1ないし3のいずれか1項に記載の抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 5】

前記不溶性担体が、磁性を有する粒子である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 6】

前記リン脂質が、カルジオリピン、レシチン及びリポタンパクと複合化したコレステロールから成る群より選ばれる少なくとも1種である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 7】

請求項1ないし6のいずれか1項に記載の抗リン脂質抗体測定用試薬に含まれる前記リン脂質と、検体中のリン脂質抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定法により前記検体中のリン脂質抗体を測定することを含む、検体中のリン脂質抗体の免疫測定法。

【請求項 8】

サンドイッチ法による請求項7記載の免疫測定法。

【請求項 9】

発光酵素免疫測定による請求項8記載の免疫測定法。

【請求項 10】

請求項1～6のいずれか1項に記載されたリン脂質固定化表面修飾不溶性担体の、抗リン脂質抗体測定用試薬の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗リン脂質抗体を測定するための、リン脂質固定化修飾不溶性担体試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

疾病の診断のため、カルジオリピン、リポタンパクと複合化したコレステロール等のリン脂質に対する血液・髄液中の抗体を測定することは臨床診断上不可欠となっている。特に梅毒検査法で用いられる抗リン脂質抗体測定は、梅毒の診断に不可欠である。

【0003】

抗リン脂質抗体の測定方法としてはRPR(Rapid Plasma Regain)カード試験法、VDRL(Venereal Disease Research Lab)法、RST(Reagin Screening Test)法等が広く知られている

10

20

30

40

50

。

【0004】

現在用いられている最も代表的な梅毒検査法は、抗梅毒トレポネーマ(TP)抗体測定およびRPR法(Rapid Plasma Regain、凝集法)に代表される抗リン脂質抗体検査法であり、診断にはこれら2種類の検査法を組み合わせ用いられるのが一般的である。これら2種類の検査を組み合わせるのは、これらの検査結果が検査の時期や感染の経過によって必ずしも一致しないからである。例えば、TP抗体陰性で抗リン脂質抗体陽性の場合、梅毒初期感染である可能性が高い。また、TP抗体陽性でかつ抗リン脂質抗体も陽性ならば、梅毒陽性と判断されるが、TP抗体は陽性で抗リン脂質抗体が陰性ならば、梅毒治療後で抗体価が高い場合が考えられる。従って、抗リン脂質抗体測定が十分な感度で行われないと、感染初期及び予後の経過観察において誤った臨床判定が下される可能性がある。

10

【0005】

近年、抗リン脂質抗体の測定方法において、リン脂質をラテックス粒子等の不活性担体に固定化し(リン脂質固定化担体)、これを緩衝液中に懸濁させた試薬が考案されている。この試薬を用いた方法では、粒子上に固定化されたリン脂質抗原に検体中の抗体が結合し、その結合抗体にさらに標識二次抗体が結合し、最終的には間接的に担体に結合した標識量が信号として感知される。この方法は臨床検査の自動化を目的としたもので、現在広く用いられている。

【0006】

一方、リン脂質は疎水性が高く、ラテックスやゼラチンのような負に荷電した担体には接近、吸着がしにくい傾向がみられ、リン脂質をこれらの担体にいかに効率よく固定化するかについて、これまで様々な工夫がなされた。

20

【0007】

その一例として、ラテックスをポリリジンで修飾し、VDRL法の感度を改良したデータが示されている(例えば特許文献1)。この感度上昇は、ラテックス表面のマイナス電荷をカチオンポリマーであるポリリジンで中和して疎水性を上昇させることにより、同じく疎水性のリン脂質をより接近・固定化しやすくした結果、固定されたリン脂質量が増加したためと考えられる。しかしポリリジンは使用条件がpH11以下に限定される等の欠点がある。また、特許文献1の実施例の表で示されている当該発明の効果は検体によって異なり、感度の上昇率も十分とは言いがたい。

30

【0008】

また、例えば、4級アミノ基を有するポリアミンスルホンでプラスチック性のマイクロタイタープレート処理して梅毒抗原を固定化し、梅毒陽性家兎の血清を測定したところ、処理を行わなかったプレートに比べ約6~17倍の吸光度が得られたことが示された(特許文献2 表1)。しかしながら、同じ文献中のHBs抗原を用いて比較したデータでは、感度の上昇はいずれの希釈率においても約2倍またはそれ以下である。

【0009】

不活性担体は、一般に負に荷電している。従って、タンパク質(一般に負に荷電)やリン脂質(疎水性)との結合効率を上げるためには、カチオン基や疎水性ポリマーで修飾して担体を中和させることが有効であることは当然に推定される。しかし上記の実施例データは、問題がそれほど単純ではなく実際には他の要素が複雑に関与して、なかなか推定どおりの効果が得られないことを示している。

40

【0010】

例えば、担体の疎水性を上げることを目的として使用されるポリマーは、担体への吸着を可能とするために一端が正に荷電し、もう一端はリン脂質との結合を可能にするために疎水性であるような構造のものが選択される。その場合、そのポリマーの吸着/結合効率及び免疫反応効率への影響はそれぞれのポリマーの分子量や、結合している官能基により微妙に異なってくる。例えばポリマーの長さが十分でない場合、担体への吸着/結合効率が低く、結果的に、期待するような免疫反応の感度上昇は見られない。しかしポリマー両端の距離を十分取るためにポリマーの分子量を上げ過ぎると、ポリマーの粘度が上がり、

50

効果的な反応が困難となる（特許文献3）。また、ポリマーの構造によっては、測定対象となるタンパク質や脂質が担体上の抗原や抗体へ近づく際の物理的な障害となって、逆に反応効率を下げる場合もあり得る。

【0011】

これまでのような比較的穏やかな修飾の効果は、従来のプレートによる免疫測定法においては、プレート法自体が特に高感度とはいえないため、それほど問題にはこなかった。

【0012】

しかし、抗体測定化学発光酵素免疫測定法においては、本来高感度であった放射性免疫測定法の流れにより、高感度性が強く求められており、抗リン脂質抗体の検出も例外ではない。また、前述のように、梅毒の診断の正確性を担保するためにも、できるだけ感度のよい測定系が望ましい。しかしそれらの要求に対し、これまでの行われた工夫や改良は必ずしも十分とは言えず、新たな工夫が求められている。

10

【0013】

一方、上述のように、修飾の効果はごくわずかな条件の違いで大きく変わるため、一般論で規定される修飾方法を広く適用して、常に高感度を得ることができるとは考えにくく、再現性よく感度を上昇させるためには、担体や修飾物質の種類を設定する必要がある。しかしわずか数種の担体と修飾物質であっても、それらを組合せることにより、膨大な実験数が必要となるため、最適な組合せを見出すこと自体が困難である。

【特許文献1】特表昭63-501902

20

【特許文献2】特公平7-50111

【特許文献3】特開平2-168163

【特許文献4】特公昭63-29223

【特許文献5】特開昭59-195161

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

従って、本発明が解決しようとする課題は、疎水性が高いリン脂質抗原を不溶性担体へ固定化する効率を従来法よりもさらに高め、臨床から強く求められている、より高感度な測定法を実現する、抗リン脂質抗体測定用試薬を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0015】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定の不溶性担体の表面を特定の修飾物質で修飾した表面修飾不溶性担体にリン脂質を固定化した抗リン脂質抗体測定用試薬を用いて抗リン脂質抗体の免疫測定を行なうことにより、より高感度に抗リン脂質抗体を免疫測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0016】

すなわち、本発明は、少なくとも1種の表面修飾物質が表面に結合した不溶性担体に、リン脂質が固定化されている抗リン脂質抗体測定用試薬であって、(1)前記表面修飾物質が炭素数14～22のアルキルアミンであり、前記不溶性担体がラテックス粒子であるか、又は(2)前記表面修飾物質が炭素数14～22のアルキルアミン、ポリリジン、ペプチン修飾化ポリリジン及びアルキル基の炭素数が1～3のポリアミノアルキル（メタ）アクリル酸並びにこれらの2種以上の混合物から成る群より選ばれる少なくとも1種であり、前記不溶性担体がゼラチン粒子である、抗リン脂質抗体測定用試薬を提供する。また、本発明は、上記本発明の抗リン脂質抗体測定用試薬に含まれる前記リン脂質と、検体中のリン脂質抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定法により前記検体中のリン脂質抗体を測定することを含む、検体中のリン脂質抗体の免疫測定法を提供する。さらに、本発明は、上記したリン脂質固定化表面修飾不溶性担体の、抗リン脂質抗体測定用試薬の製造のための使用を提供する。

40

【発明の効果】

50

)カルボジイミド・メト-p-トルエンスルホン酸塩などによる反応を用いることができる。WSCを用いる結合はこの分野において周知であり、下記実施例にも記載されているように、市販の試薬を用いて簡便に行うことができる。

【0024】

粒子の修飾は、従来から用いられている物理的吸着や、WSCを用いた共有結合によって行うことができる。これら吸着や共有結合による修飾方法は、この分野において周知であり、下記実施例にもWSCを用いた共有結合の例が記載されている。共有結合による修飾は、結合が安定で、その後の反応条件にほとんど制限がないため、望ましい。

【0025】

上記表面修飾不溶性担体粒子には、リン脂質が固定化される。固定化されるリン脂質は、測定しようとする抗リン脂質抗体の対応抗原である。測定すべき抗リン脂質抗体は、リン脂質に対する抗体であればいずれのものでもよく、従来から免疫測定されている抗リン脂質抗体のいずれのものでもよい。リン脂質の好ましい例としては、カルジオリピン、レシチン及びリポタンパクと複合化したコレステロール (LDLコレステロール、HDLコレステロール、VLDLコレステロール、CMコレステロール等) から成る群より選ばれる少なくとも1種を挙げることができ、これらの2種又は3種以上の混合物も好ましい。

10

【0026】

リン脂質は、通常、従来と同様、物理吸着により固定化される。リン脂質の物理吸着の条件は周知であり、例えば、不溶性担体粒子の懸濁液にリン脂質溶液を加え、室温～37℃で0.5時間～2時間転倒混和又は攪拌することにより行なうことができる (下記実施例参照)。

20

【0027】

リン脂質を固定化した不溶性担体粒子は、非特異吸着を防止するため、マスキング (ブロッキング) を行なうことが好ましい。マスキング (ブロッキング) は、表面修飾不溶性担体粒子上の、リン脂質抗原で被覆されていない部位をタンパク質等でマスキングすることであり、この免疫測定用の抗原固定化担体に対して通常行なわれている。マスキングに用いるタンパク質は、従来と同様でよく、通常、アルブミン (ウシ血清アルブミン (BSA) 等)、スキムミルク、カゼイン等が用いられる。マスキングは、従来と全く同様に行なうことができ、下記実施例にも具体的に記載されている。

【0028】

リン脂質を固定化した粒子は、抗リン脂質抗体を免疫測定するための抗原感作粒子として従来と全く同様にして用いられる。抗リン脂質抗体の測定方法は、担体を用いる免疫測定方法であればいずれの方法でもよい。例えば下記実施例に記載されている、サンドイッチ法の1種である化学発光酵素免疫測定法や、フローメトリーによる免疫測定法など、シグナル検出の方法に限定されずに広く用いることができる。また、本発明は、抗リン脂質抗体の定量的測定における高感度化を課題としたものであるが、定性試験 (検出) においても同じく高感度化を目的として使用することができる。従って、本発明における「測定」は定量と検出の両者を包含する。

30

【0029】

免疫測定自体は周知であり、本明細書で説明する必要はないが、簡単に記載すると、例えば、サンドイッチ法では、上記したリン脂質固定化粒子を検体と接触させ、洗浄後、抗リン脂質抗体と抗原抗体反応する抗体を反応させ、洗浄後、粒子に結合した抗体を測定する。抗体を酵素、蛍光物質、放射性物質、ビオチン等で標識しておくことにより粒子に結合した抗体を測定することができる。それぞれ異なる濃度の抗リン脂質抗体を含む、濃度既知の複数の標準試料について上記方法により抗リン脂質抗体を測定し、測定された標識量と標準試料中の抗リン脂質抗体の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の検体についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、検体中の抗リン脂質抗体を定量することができる。標識として、化学発光物質を生成する反応を触媒する酵素を用い、基質として化学発光物質を生成する物質を用いるサンドイッチ法が化学発光酵素免疫測定法であり、この方法によれば、酵素免疫測定の中でも特に高感度な免疫測定が可能になる。粒子

40

50

として磁性粒子を用いる化学発光酵素免疫測定法は、自動化装置が市販されており、市販の自動化装置を用いて簡便、高感度に免疫測定を行なうことができる（下記実施例参照）

。

【実施例】

【0030】

以下、本発明を実施例及び比較例に基づき本発明を具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0031】

I. リン脂質固定化表面修飾不溶性担体粒子の調製

1. 表面修飾物質の調製

10

(1) 500 mLのナスフラスコに2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩（ポリサイエンス社）16.6 g (500 mM)、200 mLのジメチルホルムアミド（和光純薬工業（株））を入れ、更に重合開始剤であるAIBN(2, 2'-アゾイソブチロニトリル)（和光純薬工業（株）（株））100 mgを加えた。これに、冷却管とアルゴンガスで満たしたバルーンを三方コックを用いて接続し、三方コックの残されたラインに真空ポンプを接続した。真空ポンプでフラスコを1分以上吸引して減圧した後、三方コックを切り替えてアルゴンガスをフラスコに導いた。この操作を3回行い、十分にフラスコ内をアルゴンガスに置換した。置換終了後、フラスコをオイルバスに浸け65℃に加温し、3時間激しく攪拌した。

【0032】

反応終了後、反応液をエバポレーターで1/10量まで濃縮し、濃縮終了後、分画分子量10 20 000の透析チューブで2日間超純水に対して透析を行った。

【0033】

透析終了後、目的物を凍結乾燥し、約12 gを得た。平均分子量は45000であった。なお、平均分子量は、以下の条件により測定した。

カラム：G4000PWL（東ソー社製）

溶媒：臭化リチウム10mMを含有するアセトニトリル溶液

検出装置：示差屈折計

【0034】

上記方法と同様に重合を行い、ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルピリジン]、ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルイミダゾール]、ポリ[2-アミノエチルメタクリル-メタクリロキシエチル トリメチルアンモニウム塩酸]を作製した。製造物質、開始材料、重合剤、収量、及び平均分子量を以下にまとめた。

【0035】

30

【表 1】

修飾物質名	開始材料	重合剤	収量	平均分子量
ポリ[2-アミノエチルメタクリル酸]	2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩 (ポリサイエンス社) 16.6 g、ジメチルホルムアミド 200 mL	AIBN (和光純薬工業 (株)) 100 mg	約 12 g	45,000
ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルピリジン]	2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩 (ポリサイエンス社) 8.3 g ビニルピリジン (東京化成工業社) 5.1 g	AIBN (和光純薬工業 (株)) 100 mg	約 10 g	50,000
ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルイミダゾール]	2-アミノエチルメタクリル (ポリサイエンス社) 8.3 g ビニルイミダゾール (東京化成工業社) 4.7 g	AIBN (和光純薬工業 (株)) 100 mg	6.6 g	40,000
ポリ[2-アミノエチルメタクリル-メタクリロキシエチルトリメチルアンモニウム塩酸]	2-アミノエチルメタクリル (ポリサイエンス社) 8.3 g メタクリロキシエチルトリメチルアンモニウム塩酸 10 g	AIBN (和光純薬工業 (株)) 100 mg	14 g	60,000

10

20

【0036】

30

(2) ポリリジン・臭化水素酸塩 ((株)ペプチド研究所) 200 mgとベタイン (トリメチルグリシン、和光純薬工業 (株)) 224mgを水10mLに溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩 (同仁化学) 552 mgを加え室温で一夜攪拌した。反応液に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩272 mgを追加し、さらに約5時間攪拌した。反応液を透析用セルロースチューブ (三光純薬 (株)) に移して、はじめ水に対して透析し、続いて6 mM塩酸に対して一夜透析した。その後透析チューブ内の液を凍結乾燥し、収量118.9 mgを得た。

【0037】

2. 担体の修飾

40

(1) ポリアミノエチルメタクリル酸 (Poly(AEM)) によるゼラチン粒子の修飾

5%磁性ゼラチン粒子 (自家製、特許文献5) 1mLを蒸留水1mLで3回すすぎ、10mM MES (pH 5.5) 1mLに置換した。これに、上記で作製したポリ(2-アミノエチルメタクリル酸) 25mgを加えて溶解し、更に水溶性カルボジイミド(1-エチル-3-(3-[11]ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸) (同仁化学社製) 100mgを加えて3時間激しく攪拌した。これを蒸留水1mLで3回すすぎ、蒸留水1 mLに置換して、5%塩基性ポリマー修飾粒子懸濁液とした。この液0.15 mLを蒸留水1 mLで3回、44%エタノールで2回濯いだ後、蒸留水0.45 mLに置換し、修飾粒子懸濁液とした。

【0038】

(2) その他の修飾

上記と同様の工程で、理論的に可能性のある様々な物質 (下記 a ~ g) で、磁性ラテッ

50

クス粒子と磁性ゼラチン粒子を修飾した。表面修飾物質は、上記1（表1参照）で作製したもの、および市販品を用いた。粒子と表面修飾物質の割合は粒子を1.5から2.0倍（重量比）とした。

【0039】

- a ポリ-L-リジン(PL)((株)ペプチド研究所製)
- b ベタイン化ポリリジン(BPL) (上記1(2))
- c オクタデシルアミン(ODA)(和光純薬工業(株)製)
- d ポリ[2-アミノエチルメタクリル酸](Poly(AEM)) (上記1(1))
- e ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルピリジン] (Poly(2-aminoethylmethacryl-co-vinyl pyridine)) (上記1(1)、表1) 10
- f ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルイミダゾール] (Poly(2-aminoethylmethacryl-co-vinyl imidazole)) (上記1(1)、表1)
- g ポリ[2-アミノエチルメタクリル-メタクリロキシエチルトリメチルアンモニウム塩酸] (Poly(2-aminoethylmethacryl-co-methacryloxyethyl trimethylammonium-HCl)) (上記1(1)、表1)

【0040】

3. 担体の抗原感作及びマスキング

(1) 抗原感作

5 mg/mLカルジオリピン-エタノール溶液(SIGMA)を0.041 mL、10 mg/mLに作製したレシチン(卵黄製)(ナカライテスク株式会社)-エタノール溶液を0.206 mL、10 mg/mLに作成したコレステロール(ナカライテスク株式会社)-エタノール溶液0.062 mLを混合し、計0.35 mLの混合リン脂質抗原液とした。 20

【0041】

上記2で調製した修飾粒子懸濁液14種類(修飾物質7種類×担体2種類)の各液粒子に抗原を吸着させた。すなわち、各修飾粒子懸濁液(0.45mL)を攪拌しながら、混合リン脂質抗原液を加え、水浴型超音波処理機にて約30秒間超音波処理した後、37°Cで1時間転倒混和し、粒子にリン脂質抗原を吸着させ、感作粒子懸濁液とした。また、比較のため、非修飾粒子(ラテックス、ゼラチン)もそれぞれ修飾粒子と同様に感作した(「感作粒子懸濁液」と呼ぶ)。 30

【0042】

(2) マスキング

上記感作粒子懸濁液を50 mM Tris-HCl (pH 7.2)、150 mM NaCl溶液1 mLですすいだ後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% BSA(SIGMA)、0.1% NaN₃溶液1 mLに置換し、37°Cで1晩転倒混和した。0.375 mLの同溶液に置換し、2wt%感作・マスキング粒子とした。

【0043】

II. 測定と結果

1. 測定

上記Iで調製した2wt%感作・マスキング粒子を、150 mM NaCl、0.1% NaN₃、1% BSAで10倍希釈したもの0.25 mLを固相とした。また、0.1 mg/L抗ヒトIgG-アルカリフォスファターゼ標識体、0.1 mg/L抗ヒトIgM-アルカリフォスファターゼ標識体、100 mM NaCl、0.1% NaN₃、1% BSA溶液0.35 mLを標識相とした。 40

【0044】

RPR陰性血清4例(Aries Diagnostics GmbH)、RPR陽性血清4例(ProMedDx社)、陽性コントロール血清(富士レビオ株式会社)を検体とし、検体中の抗リン脂質抗体を、市販の自動分析装置を用い、発光酵素免疫測定により定量した。すなわち、それぞれルミパルス検体希釈液(富士レビオ株式会社)で10倍希釈したもの20 μ Lを検体として、ルミパルスフォルテ(富士レビオ株式会社)において2ステップ20 μ Lモードにて測定した。カットオフインデックスの算出は、検体測定発光カウントを陽性コントロール測定発光カウントにカットオフ係数0.22を乗じたもので除して求めた。 50

【0045】

2. 結果

(1) ラテックス粒子

ラテックス粒子の結果の一部を下記表2にまとめた。Cはシグナルカウント数、S/N(signal/noise)は、各シグナルカウント(C)を陰性検体のシグナルカウントの平均値で割ったものでノイズの上昇による見かけの感度上昇を排除している。各修飾粒子の感度比較は陽性検体のS/Nの平均（「平均S/N値」）で行った。

【0046】

非修飾粒子（比較例）では陽性検体は陰性検体平均の17.4倍のシグナル値、即ち、S/N値は17.4であった。各修飾粒子の陽性サンプルS/N値をこの非修飾での値と比較すると、ポリリジン(PL)、ベタイン化ポリリジン(BPL)、ポリアミノエチルメタクリル酸(poly(AEM))ではシグナル上昇が見られたものの、非修飾粒子（比較例）の2倍程度の上昇にとどまった。特にポリリジンとベタイン化ポリリジンでは各検体のシグナル値がほとんど同じで、ポリリジンをベタイン化した効果はほとんど見出せなかった。同じベタイン化ポリリジンで修飾したゼラチン粒子はポリリジンのみで修飾したものより感度が上昇していたことから（下記）、ポリリジンへのベタイン化が失敗したのではなく、ラテックス粒子においてはベタインの効果が見れないことが示唆された。

10

【0047】

一方オクタデシルアミン(ODA)で修飾した粒子は、S/N値106.5で、非修飾（比較例）の約6倍を示し、明らかな効果が確認できた。

20

【0048】

その他の修飾粒子（上記I. 2(2)、e～g）ではS/Nが非修飾粒子（比較例）とほとんど同じかむしろ低下しており、期待したような効果は得られなかった（表には示していない）。

【0049】

【表 2】

	陰性サンプル				陽性サンプル				平均 S/N 値
	1	2	3	4	1	2	3	4	
	非修飾 (比較 例)	C 13,637 S/N 0.7	27,639 1.5	17,822 0.9	16,878 0.9	175,268 9.2	283,871 14.9	394,498 20.8	
PL	C 16,572 S/N 0.7	34,143 1.4	24,801 1.0	19,589 0.8	444,961 18.7	841,267 35.4	1,011,673 42.5	1,111,119 46.7	
BPL	C 35,672 S/N 0.7	25,759 1.5	21,603 1.1	16,853 0.9	444,084 18.7	823,872 34.8	1,022,217 43.2	1,096,739 46.3	
Poly (AEM)	C 6,187 S/N 0.8	9,831 1.2	9,500 1.2	9,629 1.2	171,290 21.0	283,970 34.9	370,746 45.5	500,378 61.4	
ODA	C 4,442 S/N 1.2	2,763 0.7	4,590 1.2	3,196 0.9	209,341 55.9	282,404 75.4	518,153 138.3	585,823 156.3	

10

20

30

40

(3) ゼラチン粒子

不溶性担体としてゼラチン粒子を用いた場合の結果を下記表3に示す。

【0051】

表3に示されるように、ゼラチン粒子では、ラテックス粒子に比べ、修飾の効果が顕著であった。非修飾粒子（比較例）の陽性検体S/Nの平均値3.2に対し、ポリリジン(PL)では33.7(10.5倍)、ベタイン化ポリリジン(BPL)では46.5(14.5倍)、ポリアミノエチルメタクリル酸(poly(AEM))では75.7(23.7倍)、オクタデシルアミン(ODA)では161.4(50.4倍)を示した。また、ポリリジンよりもベタイン化ポリリジンのほうが、S/N値が上昇しており、ラテックスではほとんど示されなかったベタイン化の効果が現れていた。

【0052】

10

その他の修飾粒子（上記I.2(2)、e～g）ではラテックス粒子と同様、S/N値が非修飾粒子（比較例）とほとんど同じかむしろ低下しており、期待したような効果は得られなかった（データ示さず）。

【0053】

【表 3】

	陰性サンプル				陽性サンプル				平均 S/N 値
	1	2	3	4	1	2	3	4	
	非修飾 (比 較例)	C 3,332	1,606	31,309	15,132	18,431	41,834	54,735	
	S/N 0.3	0.1	2.4	1.2	1.4	3.3	4.3	3.8	3.2
PL	C 4,404	7,951	9,348	8,415	122,775	244,544	293,144	354,173	
	S/N 0.6	1.1	1.2	1.1	16.3	32.5	38.9	47.0	33.7
BPL	C 6,636	15,625	14,447	12,729	312,369	489,242	630,624	865,556	
	S/N 0.5	1.3	1.2	1.0	25.3	39.6	51.0	70.0	46.5
Poly (AEM)	C 4,049	7,246	6,560	6,101	219,159	480,418	479,827	634,197	
	S/N 0.7	1.2	1.1	1.0	36.6	80.2	80.1	105.9	75.7
ODA	C 1,265	818	1,428	1,013	81,273	167,859	257,299	223,880	
	S/N 1.1	0.7	1.3	0.9	71.9	148.4	227.5	197.9	161.4

10

20

30

40

【産業上の利用可能性】

【0054】

本願発明による担体は、高密度にリン脂質を結合しているため、抗リン脂質抗体の高感度測定試薬として使用できる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/059166
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/571(2006.01) i, G01N33/543(2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/571, G01N33/543 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-132821 A (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 22 May, 1998 (22.05.98), (Family: none)	1-10
A	JP 10-282096 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 23 October, 1998 (23.10.98), (Family: none)	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 July, 2007 (19.07.07)		Date of mailing of the international search report 31 July, 2007 (31.07.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/059166													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/571(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/571, G01N33/543															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2007年														
日本国実用新案登録公報	1996-2007年														
日本国登録実用新案公報	1994-2007年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号													
A	JP 10-132821 A (日水製薬株式会社) 1998.05.22 (ファミリーなし)	1-10													
A	JP 10-282096 A (積水化学株式会社) 1998.10.23 (ファミリーなし)	1-10													
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日に後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日に後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日に後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 19.07.2007		国際調査報告の発送日 31.07.2007													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典	2J 9507												
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252												

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/553 (2006.01)	G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 33/571 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 4 1 A	
	G 0 1 N 33/571	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 杉山 正巳
東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于测量抗磷脂抗体的试剂		
公开(公告)号	JPWO2007126051A1	公开(公告)日	2009-09-10
申请号	JP2008513291	申请日	2007-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	広瀬 績 倉野 義裕 中村 隆 杉山 正巳		
发明人	広瀬 績 倉野 義裕 中村 隆 杉山 正巳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/548 G01N33/547 G01N33/553 G01N33/571		
CPC分类号	G01N33/92		
FI分类号	G01N33/543.525.W G01N33/53.N G01N33/545.A G01N33/548.A G01N33/547 G01N33/553 G01N33/543.541.A G01N33/571		
代理人(译)	谷川 荣次郎		
优先权	2006125232 2006-04-28 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

总结 公开了一种用于测量抗磷脂抗体的试剂，其进一步提高了将高疏水性磷脂抗原固定在不溶性载体上的效率，并且实现了临床实践强烈要求的更高灵敏度的测定。已经完成了。抗磷脂抗体测定试剂是将磷脂固定在具有至少一种与表面结合的表面改性物质和(1)表面改性物质的不溶性载体上的抗磷脂抗体测定试剂。是具有14至22个碳原子的烷基胺并且不溶性载体是乳胶颗粒，或者(2)表面改性剂是具有14至22个碳原子的烷基胺，聚赖氨酸，甜菜碱改性的聚赖氨酸和烷基的碳原子数。是选自1至3个聚氨基烷基(甲基)丙烯酸和其两种或更多种的混合物中的至少一种，并且不溶性载体是明胶颗粒。

修饰物質名	開始材料	重合剂	収量	平均分子量
ポリ[2-アミノエチルメタクリル酸]	2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩(ポリサイエンス社) 16.6 g、ジメチルホルムアミド 200 mL	AIBN(和光純薬工業(株)) 100 mg	約 12 g	45,000
ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルピリジン]	2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩(ポリサイエンス社) 8.3 g ビニルピリジン(東京化成工業社) 5.1 g	AIBN(和光純薬工業(株)) 100 mg	約 10 g	50,000
ポリ[2-アミノエチルメタクリル-ビニルイミダゾール]	2-アミノエチルメタクリル(ポリサイエンス社) 8.3 g ビニルイミダゾール(東京化成工業社) 4.7 g	AIBN(和光純薬工業(株)) 100 mg	6.6 g	40,000
ポリ[2-アミノエチルメタクリル-メタクリロキシエチルアンモニウム塩]	2-アミノエチルメタクリル(ポリサイエンス社) 8.3 g メタクリロキシエチルトリメチルアンモニウム塩 10 g	AIBN(和光純薬工業(株)) 100 mg	14 g	60,000