

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 55107

(P2002 - 55107A)

(43)公開日 平成14年2月20日 (2002.2.20)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/536			G 0 1 N 33/536	F
	33/543	583	33/543	583

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 11数)

(21)出願番号 特願2000 - 240277(P2000 - 240277)

(22)出願日 平成12年8月8日(2000.8.8)

(71)出願人 390004097

株式会社医学生物学研究所
愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号
住友商事丸の内ビル5F

(72)発明者 成子 隆

長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 - 10
3 株式会社医学生物学研究所内

(72)発明者 清水 喜久男

長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 - 10
3 株式会社医学生物学研究所内

(74)代理人 100108280

弁理士 小林 洋平 (外 1 名)

(54)【発明の名称】 測定方法および、試薬キット

(57)【要約】

【課題】 従来の免疫比濁法あるいは免疫比濁法を改良することにより、地帯現象による影響を押さえて、より高い精度と感度を実現可能な測定方法および試薬キットを提供すること。

【解決手段】 液相中において被験物質とその被験物質に反応して不溶性の高分子複合体を生じる反応性物質とを添加することにより被験物質を測定する方法であって、液相中には、反応性物質に対して被験物質と同等の反応性を有する添加物質を混合させておき、いわゆる測定器毎の検出限界をカバーするゲタを履かせた状態として反応させることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 液相中において、被験物質とその被験物質に反応して不溶性の高分子複合体を生じる反応性物質とを混合することにより前記高分子複合体を生じさせて前記被験物質を測定する方法であって、

前記液相中には、前記被験物質と前記反応性物質とを混合する際に、前記反応性物質に対して前記被験物質と同等の反応性を有する添加物質を混合しておくことを特徴とする測定方法。

【請求項2】 以下の(a)~(c)のステップ、(a)液相中において、前記被験物質と前記添加物質とを混合して混合物とするステップ、(b)前記混合物にさらに前記反応性物質を加えて第1の不溶性高分子複合体を形成させるステップ、(c)前記第1の不溶性高分子複合体に一定波長の光を照射し、その散乱光若しくは透過光を測定するステップ、を含むことを特徴とする請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】 以下の(d)~(g)のステップ、(d)液相中において、前記被験物質と同等の反応性を有する標準物質の所定量と前記添加物質とを混合して第2混合物とするステップ、(e)前記第2混合物にさらに前記反応性物質を加えて第2の不溶性高分子複合体を形成させるステップ、(f)前記第2の不溶性高分子複合体に一定波長の光を照射し、その散乱光若しくは透過光を測定することにより検量線を作成するステップ、(g)前記第1の不溶性高分子複合体の散乱光若しくは透過光と前記検量線とから前記被験物質の濃度を定量するステップ、を含むことを特徴とする請求項2に記載の測定方法。

【請求項4】 前記反応性物質が抗体であることを特徴とする請求項1~3のいずれかに記載の測定方法。

【請求項5】 前記反応性物質が不溶性支持体に結合されていることを特徴とする請求項1~4のいずれかに記載の測定方法。

【請求項6】 前記反応性物質が水溶性高分子に結合されていることを特徴とする請求項1~4のいずれかに記載の測定方法。

【請求項7】 前記被験物質が血漿蛋白質であることを特徴とする請求項1~6のいずれかに記載の測定方法。

【請求項8】 液相中において、被験物質とその被験物質に反応して不溶性の高分子複合体を生じる反応性物質とを混合することにより前記被験物質を測定する試薬キットであって、

前記反応性物質に対して前記被験物質と同等の反応性を有する添加物質を含む第1の溶液と、前記反応性物質を含む第2の溶液とを備えたことを特徴とする試薬キット。

【請求項9】 前記反応性物質が抗体であることを特徴とする請求項8に記載の試薬キット。

【請求項10】 前記反応性物質が不溶性支持体に結合されていることを特徴とする請求項8または請求項9の

いずれかに記載の試薬キット。

【請求項11】 前記反応性物質が水溶性高分子に結合されていることを特徴とする請求項8または請求項9のいずれかに記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、測定方法および、試薬キットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体が病気であるか否かを診断及び治療するために、各種の診断方法が開発されている。それらの診断方法のうち、特に生体の状態を客観的に判断するために、血液や尿を用いた検体検査は病気の診断のために必須の検査となっている。検体検査では血清が最も普通に用いられ、血清中の成分の変動を測定することは臨床検査において基本的な検査となっている。特にCRP(C反応性蛋白質)は炎症症状を反映するものとして最も普通に測定される他、IgGやIgA、IgMのような免疫グロブリンやC3、C4といった補体成分は生体の状態を反映するものとしてよく測られている。

【0003】上記の免疫グロブリンや補体成分のような血漿蛋白質の測定は、かつては一元免疫拡散法(SRID)によって測定されていた。しかしながら、一元免疫拡散法は、測定に時間がかかること、多数検体を同時に測定することが困難であることなどから、現在は血漿蛋白質の測定法としては、免疫比濁法若しくは免疫比濁法が最もよく用いられている。このうち、免疫比濁法は、抗体を含む溶液中に抗原を加えると、抗原抗体反応によって巨大な免疫複合体を生じ、これが溶液中に濁りとして析出してくることから、この濁りによる透過光の減少率を吸光度計によって測定し、標準品による吸光度と比較することにより抗原の濃度を求めようとするものである。一方、免疫比濁法は、抗原抗体反応によって免疫複合体を生じさせ、照射光に対する散乱光の強度を測定することによって抗原の濃度を求めるものである。つまり免疫比濁法や免疫比濁法は、抗体過剰状態において抗原を添加した場合に生じる不溶性免疫複合体の量が、加える抗原量に比例するという知見に基づいており、予め既知濃度の抗原と所定濃度の抗体とを反応させて検量線を作成しておき、その検量線を利用して、検体と所定濃度の抗体との反応から得られた免疫複合体の吸光度とを比較して検体中の抗原濃度を定量する。

【0004】これらの免疫比濁法や免疫比濁法は、従来の一元免疫拡散法に比べると高い感度を有し(特に免疫比濁法)、短時間で定量可能なため、比較的高い濃度で存在する血漿蛋白質の測定には便利である。なお、血漿中の濃度が低く、これらの方法では測定できないような被験物質については、酵素免疫測定法(EIA)や放射免疫測定法(RIA)が用いられているが、免疫比濁法や免疫比濁法においても、より高い感度を実現するための工夫が

なされてきている。

【0005】免疫比濁法や免疫比臙法において、測定系の性能を確認するためには希釈試験や添加回収試験、再現性試験が実施される。希釈試験は検体の希釈系列を作成して各希釈検体について測定し、測定値が希釈倍数に比例していることを確認するものであり、測定系の定量性を保証するものである。また、添加回収試験は検体に標準品としての既知濃度の抗原を添加して測定し、測定値から標準品の濃度を差し引いた測定値と、検体その物の測定値とを比較して標準品の反応性と検体の反応性と

10 の違いをみるものである。
【0006】再現性試験は同一の検体を複数回測定して、測定毎の測定値のばらつきをみるもので、測定系の安定性を保証するものである。また、免疫比濁法や免疫比臙法において、測定系の感度は、検体と抗体とを反応させて免疫複合体を生じさせたときの吸光度または散乱強度と、抗原を含まない0濃度における吸光度または散乱強度との差によって規定される。また、検体中に含まれる抗原の濃度における吸光度または散乱強度の安定性も感度に影響を与える要因である。従って、測定系の感度

20 【0007】

【発明が解決しようとする課題】一般的に、抗原抗体反応においては、抗原あるいは抗体が過剰の領域では抗原抗体複合物が不溶性ではなく可溶性となるために、吸光度が抗原量に比例しないという地帯現象が知られている。図1には、横軸に抗原量を、縦軸に免疫複合体を含む溶液の吸光度を示した。抗原量が低値の領域A及び高値の領域Bでは、理論的な不溶性の免疫複合体が示すと考えられる吸光度よりも低い吸光度しか示さない。実際に、前述の希釈試験では、領域Aにおいて抗原抗体反応による不溶性免疫複合体の生成が定量的に進まないために、測定値が希釈倍数に比例しない(測定値が、理論的な値を下回る)現象が知られている。

40 【0008】ところで、臨床検査の現場においては、免疫比濁法や免疫比臙法は多くの場合に専用若しくは汎用の自動測定機器を用いて行われており、検体の希釈から測定結果の打ち出しまでが自動的に行われている。従って、これらの機器を用いて検体の測定を行おうとする場合、測定器の定められた位置に検体や緩衝液、反応液をセットし、測定器のスイッチを入れれば、機械が定められた測定条件に従って自動的に検体の希釈、分注、測定を行い、結果を打ち出してくれる。これらの測定機器は多くのメーカーから発売されており、各測定機器間において規格が定まっているわけではないので、測定に用い

るセルの容量や検体の採取量、反応時間などは様ではない。また、測定の精度や安定性を高めるためには、その機械に最も適した条件で測定する必要があり、そのためには測定機器毎に専用の試薬を準備することが好ましい。

【0009】ところが、通常は測定機器のメーカーと、その測定機器で使用する試薬のメーカーとは異なっているため、試薬メーカーが測定機器毎に異なる試薬を準備することは容易でない。そこで試薬メーカーは、標準的な試薬を作製し、機械側で検体採取量、試薬採取量、測定波長等を調整して測定系の性能を確保している。しかし、上記のように複数の測定機器によってセルの容量や検体あるいは試薬の採取可能な容量が異なるために、採取量の増加には限界がある。また、検体量を増やすことは患者にとっても負担となる。一方、界面活性剤等を用いて濁度を増強した場合には、特に過剰量の抗原を含むミエローマ検体などを測定した場合には非特異的な濁りも増加するため、十分な性能を確保することは容易でなく、地帯現象の解消も困難であった。

【0010】本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、従来の免疫比濁法あるいは免疫比臙法を改良することにより、非特異反応がなく、より高い精度と感度を実現可能な測定方法および試薬キットを提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った結果、液相中において、被験物質とその被験物質に反応して不溶性の高分子複合体を生じる反応性物質とを反応させる際に、液相中に反応性物質に対して被験物質と同等の反応性を有する添加物質を混合しておくことにより、非特異反応がなく、より高い精度と感度とを実現できることを見だし、基本的には本発明を完成するに至った。そこで、上記の課題を解決するための発明に係る測定方法は、液相中において、被験物質とその被験物質に反応して不溶性の高分子複合体を生じる反応性物質とを混合することにより前記高分子複合体を生じさせて前記被験物質を測定する方法であって、前記液相中には、前記被験物質と前記反応性物質とを混合する際に、前記反応性物質に対して前記被験物質と同等の反応性を有する添加物質を混合しておくことを特徴とする。

【0012】また、そのために、以下の(a)~(c)のステップ、(a)液相中において、前記被験物質と前記添加物質とを混合して混合物とするステップ、(b)前記混合物にさらに前記反応性物質を加えて第1の不溶性高分子複合体を形成させるステップ、(c)前記第1の不溶性高分子複合体に一定波長の光を照射し、その散乱光若しくは透過光を測定するステップ、を含む測定方法であることが好ましい。また、さらに以下の(d)~(g)のステップ、(d)液相中において、前記被験物質と同等の反応性を有

する標準物質の所定量と前記添加物質とを混合して第2混合物とするステップ、(e)前記第2混合物にさらに前記反応性物質を加えて第2の不溶性高分子複合体を形成させるステップ、(f)前記第2の不溶性高分子複合体に一定波長の光を照射し、その散乱光若しくは透過光を測定することにより検量線を作成するステップ、(g)前記第1の不溶性高分子複合体の散乱光若しくは透過光と前記検量線とから前記被験物質の濃度を定量するステップ、を含む測定方法であることが好ましい。

【0013】また、上記の課題を解決するための発明に係る試薬キットは、液中相において被験物質とその被験物質に反応して不溶性の高分子複合体を生じる反応性物質とを反応させることにより前記被験物質を測定するものであって、前記反応性物質に対して前記被験物質と同等の反応性を有する添加物質を含む第1の溶液と、前記反応性物質を含む第2の溶液とを備えたことを特徴とする。

【0014】なお、上記の測定方法または試薬キットにおいて、反応性物質は、抗体であることが好ましい。また、反応性物質は、単体で存在する場合他に、不溶性支持体に結合されていること、または水溶性高分子に結合されていることが好ましい。また、反応性物質に疎水基を導入することによって疎水性を向上させ、被験物質との反応で不溶化し易くしたのものであっても良い。また、前記被験物質は、血漿蛋白質であることが好ましい。

【0015】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施形態について、以下に例示しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、下記の記述によって限定されるものではない。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。本発明は、液中相において、被験物質と反応性物質とを反応させる際に、反応性物質に対して被験物質と同等の反応性を有する添加物質を混合しておき、いわゆる測定器毎の検出限界をカバーする「ゲタを履かせた」状態として反応させることを重要な点としている。反応の安定性は、一般に測定する吸光度によっても異なるが、被験物質の低濃度域では、吸光度若しくは散乱強度が低いいため測定系が不安定になる。本発明では、検体に含有される被験物質と同等の反応性を有する添加物質を加えることにより、吸光度若しくは散乱強度が増強され、測定系の安定性が向上するものである。

【0016】「反応性物質」としては、抗体が挙げられるが、その他にも被験物質に対して特異的に反応する物質であって、反応によって不溶性の高分子複合体を形成する物であればよく、例えば、人工的に多価にしてリガンドとレセプター、酵素と基質等でもよい。また、反応性物質に疎水基を導入することにより、被験物質との反応後に不溶性の高分子複合体を生じ易くすることもできる。また、反応性物質として抗体を選択した場合には、

抗体溶液として使用する場合の他、ラテックスなどの不溶性支持体に結合させてラテックス比濁法とすることもできる。また、抗体は、デキストランやフィコールなどの水溶性高分子に結合させておき、被験物質と架橋しやすくして用いることもできる。

【0017】「被験物質」としては、例えば、血漿蛋白質がある。血漿蛋白質には、炎症マーカーとしてのCRP、1-AG(1糖蛋白)、ハプトグロビンのほか、アルブミン、IgG・IgA・IgMなどの免疫グロブリン、C3・C4などの補体成分、トランスフェリン、ハプトグロビン、2マクログロブリン、1アンチトリプシン等が含まれる。また、被験物質を含む「検体」としては、血清・血漿の他に、尿あるいは他の体液について、同様の方法で測定可能である。

【0018】反応性物質に対して被験物質と同等の反応性を有する「添加物質」としては、血漿蛋白質の場合には、被験物質を精製蛋白質としてその所定量を用いる場合の他に、所定量の被験物質を含有する血漿あるいは血清を添加することもできる。ここで、「所定量」とは、未知検体のそれぞれに対して、同量の添加物質を添加しておくことを意味する。これにより、被験物質を含まない0濃度の点においても、「所定量」の被験物質が含有された状態で測定することとなり、いわゆるゲタを履かせた状態となる。このため、被験物質が低値の領域Aにおける地帯現象を回避できる。

【0019】また、「所定量」の範囲を決定するには、第1に、その測定系における被験物質・反応性物質が示す反応曲線のプロフィールを考慮して定めることができる。本発明は、特に低値の領域Aにおける地帯現象を回避するために有効であることから、反応曲線が直線性を失う低値の領域Aにおける最大値MA(図1中に示す)以上の被験物質を「所定量」として添加することが好ましい。また第2に、その測定系において知られている正常値及び異常値の範囲を考慮して定めることができる。すなわち、その測定系を用いる場合に、一般的な臨床検査の現場において、正常値または異常値として発生し得る検査値のばらつきの範囲に基づき、その検査値のばらつきの範囲が、被験物質・反応性物質が示す反応曲線が直線性を示す領域に含まれるようにして設定することができる。なお、「所定量」を定める際に、余りに過大量の添加物質を選択して、高値の領域Bが、検査値のばらつきの範囲の上限值よりも低くなる事態を避けることが好ましい。

【0020】また、添加物質は、被験物質と反応性物質とを反応させる段階で存在していれば足り、その添加物質の形態(例えば、粉体、液体等)・添加時期には依らないが、例えば本発明の試薬キットとして提供する場合には、第1の溶液中に予め添加しておくことができる。このように第1の溶液中に添加しておけば、添加物質として別に加える必要がないので測定操作が簡易となる。

【0021】添加物質として、所定量の被験物質を含有する血清若しくは血漿を加えた場合には、全ての血漿蛋白質の測定系に応用できるので便利である。なお、添加物質としては、必ずしも被験物質と同一のものを使用する必要はなく、反応性物質に対して被験物質と同等の反応性を有する物質であれば良く、被験物質そのものを精製して使用する場合は他に、遺伝子組換えタンパク質として得たものを使用することもできる。特に、被験物質がIgGである場合には、添加物質として、F(ab')₂フラグメントを使用することが可能である。

【0022】また、「標準物質」を使用して、検量線を作成することにより、未知検体中の被験物質量を定量的に求めることもできる。その際には、検量線を作成するサンプル中にも、検体に加える所定量の添加物質と同量の添加物質を加えておく。なお、「標準物質」としては、一般的には、被験物質の所定量を使用することが多いが、これに限られるものではなく、反応性物質に対して被験物質と同等の反応性を有する物質であれば、標準物質として使用することができる。

【0023】なお、「液相」としては、水溶液を使用するのが好ましく、通常は被験物質と反応性物質との反応が良好に促進されるように緩衝液を用いるのが好ましい。緩衝液の種類としては、特に限定されず、一般に生化学用に使用される緩衝液のうち、反応系に合わせて良好なものを選択することができる。以下に本発明を実施する場合の好ましい形態を例示する。

【0024】[実施形態1] ヒト血清中IgGの測定系第1の溶液(以下、「希釈用試液」という。)中に、添加物質としてヒトIgGを0.1mg/dL~20mg/dL、好ましくは0.5mg/dL~10mg/dL、更に好ましくは1mg/dL~5mg/dLとなるように添加しておく。第2の溶液(以下、「反応用試液」という。)中には、反応性物質として抗ヒトIgG抗血清を所定の濃度に調整しておく。検体として、ヒト血清2μLを採り、これに希釈用試液250μLを添加し、適当な時間が経過した後に反応用試液100μLを加える。さらに、適当な時間が経過した後に、反応溶液の吸光度を660nmで測定する。上記の方法により、検体中IgG濃度が、50mg/dL~750mg/dLの範囲で良好な直線性を備えた測定系を提供できる。

【0025】[実施形態2] ヒト血清中IgAの測定系希釈用試液中に、添加物質としてヒトIgAを0.01mg/dL~3mg/dL、好ましくは0.05mg/dL~1.5mg/dL、更に好ましくは0.1mg/dL~0.8mg/dLとなるように添加しておく。反応用試液中には、反応性物質として抗ヒトIgA抗血清を所定の濃度に調整しておく。検体として、ヒト血清4μLを採り、これに希釈用試液250μLを添加し、適当な時間が経過した後に反応用試液100μLを加える。さらに、適当な時間が経過した後に、反応溶液の吸光度を600nmで測定する。上記の方法により、検体中IgA濃度が、10mg/dL~1400mg/dLの範囲で良好な直線性を備えた測定系を

提供できる。

【0026】[実施形態3] ヒト血清中IgMの測定系希釈用試液中に、添加物質としてヒトIgMを0.01mg/dL~2mg/dL、好ましくは0.05mg/dL~1.0mg/dL、更に好ましくは0.1mg/dL~0.5mg/dLとなるように添加しておく。反応用試液中には、反応性物質として抗ヒトIgM抗血清を所定の濃度に調整しておく。検体として、ヒト血清4μLを採り、これに希釈用試液250μLを添加し、適当な時間が経過した後に反応用試液100μLを加える。さらに、適当な時間が経過した後に、反応溶液の吸光度を主波長として340nmで、副波長として700nmで測定する。上記の方法により、検体中IgM濃度が、5mg/dL~760mg/dLの範囲で良好な直線性を備えた測定系を提供できる。

【0027】[実施形態4] ヒト血清中C3の測定系希釈用試液中に、添加物質としてヒトC3を0.01mg/dL~2mg/dL、好ましくは0.05mg/dL~1.0mg/dL、更に好ましくは0.1mg/dL~0.5mg/dLとなるように添加しておく。反応用試液中には、反応性物質として抗ヒトC3抗血清を所定の濃度に調整しておく。検体として、ヒト血清4μLを採り、これに希釈用試液250μLを添加し、適当な時間が経過した後に反応用試液100μLを加える。さらに、適当な時間が経過した後に、反応溶液の吸光度を600nmで測定する。上記の方法により、検体中C3濃度が、5mg/dL~800mg/dLの範囲で良好な直線性を備えた測定系を提供できる。

【0028】[実施形態5] ヒト血清中C4の測定系希釈用試液中に、添加物質としてヒトC4を0.001mg/dL~0.2mg/dL、好ましくは0.005mg/dL~0.1mg/dL、更に好ましくは0.01mg/dL~0.05mg/dLとなるように添加しておく。反応用試液中には、反応性物質として抗ヒトC4抗血清を所定の濃度に調整しておく。検体として、ヒト血清10μLを採り、これに希釈用試液250μLを添加し、適当な時間が経過した後に反応用試液50μLを加える。さらに、適当な時間が経過した後に、反応溶液の吸光度を主波長として340nmで、副波長として700nmで測定する。上記の方法により、検体中C4濃度が、1.5mg/dL~150mg/dLの範囲で良好な直線性を備えた測定系を提供できる。

【0029】

【実施例】[実施例1] ヒトIgAの測定系

健全ヒト血清を検体とし、これを株式会社医学生物学研究所製の免疫比濁法によるヒトIgA測定試薬キット(商品名:TAC-2テストIgA。検体中のIgAと、反応性物質である抗ヒトIgA抗血清とを反応させて免疫複合体を生成させることにより、IgA量を測定する試薬キットである。)を用いて測定した。操作手順を簡単に説明すると次のようである。検体4μLに希釈用試液250μLを添加した後、適当な時間をおいて反応用試液(抗ヒトIgA抗血清を含む)100μLを添加し、反応用試液の添加前(24番目の測光ポイント)と添加後(50番目の測光ポイント)との測定値の差を測定した。吸光度は、600nmにて

測定した。

【0030】なお、予め検体をキット添付の希釈用試液を用いて希釈し、1/1~1/10の希釈系列を作製し、この希釈列検体10例について前記試薬キットの取扱説明書の操作法に基づき、日立7150型自動分析機を用いて測定し、測定系の希釈直線性を検討した。測定は、従来の試薬キットの操作手順通りに希釈用試液をそのまま用いた場合と、予め希釈用試液に添加物質としてヒト血清0.2%（ヒトIgAとして約0.2mg/dL相当）を加えた場合との両者で行った。

【0031】測定結果は、表1、図2及び図3に示す通り

希釈率	濃度(mg/dL)	濁度(0.1mAbs)			
		血清未添加		血清添加	
		理論値	実測値	理論値	実測値
0	0.0	40	40	252	252
1/10	7.6	167	52	399	409
2/10	15.2	293	192	546	555
3/10	22.9	420	331	693	701
4/10	30.5	547	471	841	847
5/10	38.1	674	610	988	993
6/10	45.7	800	750	1135	1139
7/10	53.3	927	889	1282	1285
8/10	61.0	1054	1029	1430	1432
9/10	68.6	1181	1168	1577	1578
10/10	76.2	1307	1307	1724	1724

【0033】[実施例2]ヒトC4の測定系
健康ヒト血清を検体とし、これを株式会社医学生物学研究所製の免疫比濁法によるヒトC4測定試薬キット（商品名：TAC-2テストC4。検体中のC4と、反応性物質である抗ヒトC4抗血清とを反応させて免疫複合体を生成させることにより、C4量を測定する試薬キットである。）を用いて測定した。操作手順を簡単に説明すると次のようである。検体4μLに希釈用試液250μLを添加した後、適当な時間をおいて反应用試液（抗ヒトC4抗血清を含む）50μLを添加し、反应用試液の添加直前（24番目の測光ポイント）と添加後（50番目の測光ポイント）との測定値の差を測定した。吸光度は、主波長として340nmで、副波長として700nmで測定した。

【0034】なお、予め検体をキット添付の希釈用試液を用いて希釈し、1/1~1/10の希釈系列を作製し、この希釈列検体10例について前記試薬キットの取扱説明書の操作法に基づき、日立7150型自動分析機を用いて測定

*りであった。希釈用試液をそのまま用いた場合には、希釈に伴って抗原の低値域で吸光度は希釈直線から外れ、実際に期待される値よりも低値に測定された。これはIgAの低濃度において、地帯現象を生じたためであると考えられた。これに対し、希釈用試液にヒト血清0.2%を加えた場合には、希釈列が与える吸光度は、濃度依存性の良好な直線性を示し、各濃度の吸光度は理論値とよく一致した。

【0032】

10 【表1】

*し、測定系の希釈直線性を検討した。測定は、従来の試薬キットの操作手順通りに希釈用試液をそのまま用いた場合と、予め希釈用試液に添加物質としてヒト血清0.2%（ヒトC4として約0.03mg/dL相当）を加えた場合との両者で行った。

【0035】測定結果は、表2、図4及び図5に示す通りであった。希釈用試液をそのまま用いた場合には、希釈に伴って抗原の低値域で吸光度は希釈直線から外れ、実際に期待される値よりも低値に測定された。これはC4の低濃度において、地帯現象を生じたためであると考えられた。これに対し、希釈用試液にヒト血清0.2%を加えた場合には、希釈列が与える吸光度は、濃度依存性の良好な直線性を示し、各濃度の吸光度は理論値とよく一致した。

【0036】

【表2】

希釈率	濃度(mg/dL)	濁度(0.1mAbs)			
		血清未添加		血清添加	
		理論値	実測値	理論値	実測値
0	0.0	93		150	
1/10	0.7	151	128	210	207
2/10	1.4	209	188	269	267
3/10	2.1	267	249	329	327
4/10	2.8	325	310	389	387
5/10	3.6	383	370	448	447
6/10	4.3	441	431	508	506
7/10	5.0	499	491	567	566
8/10	5.7	557	552	627	626
9/10	6.4	615	612	687	686
10/10	7.1	673	673	746	746

【0037】[実施例3] ミエローマ検体を使用したヒトC4の測定系

免疫比濁法においては、反応後の濁度を増強するために反応液中に界面活性剤を添加する場合が多い。このように界面活性剤によって濁度を増強した場合には、非特異的な反応も増強されてしまうために、例えばミエローマ検体のように高濃度のタンパク質を含む場合には、希釈用試液と検体とを混合した時点で濁りを生じてしまうため、正確な定量を行うことが困難となる。

【0038】そこで、希釈用試液に添加物質としてヒト血清0.2% (ヒトC4として約0.2mg/dL相当) を添加し、IgMミエローマ血清を検体として、株式会社医学生物学研*

測光ポイント	濁度(0.1mAbs)	
	血清(-)	血清(+)
1	3880	561
2	3274	445
3	2493	351
4	1921	354
5	1529	350
6	1284	343
7	1139	343
8	1062	348
9	1000	349
10	974	348
11	938	348
12	925	350
13	906	352
14	911	351
15	892	349
16	895	349
17	890	351
18	879	348
19	875	348
20	882	347
21	876	345
22	874	345
23	875	344
24	874	343
25	405	279

【0040】表3及び図6に示すように、添加物質を加えない測定系(四角点で示すグラフ)では、検体と希釈用試液を混合した時点(第1ポイント)で大きな濁り(ABS=3880)が発生し、その後、徐々に濁度が減少した。また、反応用試液(抗血清)を加えることによって、25番目の測光ポイント以後の吸光度が再び上昇した。C4濃度の測定値は、抗血清添加前の吸光度(24番目の測光ポイント)と、抗血清添加後の吸光度(50番目の測光ポイント)との差から計算されている。ミエローマ検体では、希釈用試液を添加した直後から界面活性剤の影響により濁りが発生し、抗血清添加前における吸光度が高いため、相対的に低い濃度に定量されたものと考えられた。

【0041】一方、希釈用試液に添加物質(ヒト血清0.2%)を加え、界面活性剤の添加量を4%に減らした測定系(三角点で示すグラフ)では、検体と希釈用試液との混合時に極端な濁りを生ぜず、抗血清添加前の吸光度(2

* 研究所製の免疫比濁法によるヒトC4測定試薬(前述)を用い、日立7150型自動分析機により測定した。なお、操作手順は、実施例2に記述したものと同様である。また、反応用試液は、24番目の測定ポイント後に添加した。吸光度の経時的な変化を表3及び図6に示した。また、C4濃度は、従来の測定系(希釈用試液にヒト血清を加えない系。界面活性剤5.5%含有)では、0.0mg/dLと測定されたが、ヒト血清を加えた系(界面活性剤は4%に減量)では、6.2mg/dLと測定された。

【0039】
【表3】

測光ポイント	濁度(0.1mAbs)	
	血清(-)	血清(+)
26	394	369
27	428	408
28	455	443
29	488	479
30	511	513
31	536	546
32	556	577
33	574	603
34	589	626
35	604	648
36	620	667
37	633	685
38	644	701
39	656	719
40	666	732
41	674	747
42	686	761
43	695	775
44	704	789
45	711	800
46	718	811
47	725	822
48	731	832
49	737	843
50	742	854

4番目の測光ポイント)が低値を示すため、正味の反応量が吸光度として測定されたため、従来の測定系に比べて実際の値に近い値が定量されたものと考えられた。

【0042】[実施例4] ヒトC3の測定系
低値の領域における測定系の安定性を確認するため、ヒト血清を希釈用試液で適当な倍率に希釈し(従来のヒト血清を添加しない測定系においては、地帯現象が発生する領域に相当する)、低値検体を調製して10重測定した。測定には、株式会社医学生物学研究所製のヒトC3測定試薬キット(商品名:TAC-2テストC3。検体中のC3と、反応性物質である抗ヒトC3抗血清とを反応させて免疫複合体を生成させることにより、C3量を測定する試薬キットである。)を用いて測定した。操作手順を簡単に説明すると次のようである。検体4μLに希釈用試液250μLを添加し、適当な時間が経過した後に反応用試液(抗ヒトC3抗血清を含む)100μLを加える。さらに、適当な時間が経過した後に、反応溶液の吸光度を600nmで

40

50

測定した。また、希釈用試液には、添加物質を加えないものと、添加物質としてヒト血清0.2%（ヒトC3として約0.2mg/dL相当）を加えたものを使用した。

【0043】測定結果を表4に示した。希釈用試液にヒト血清を加えた場合と、ヒト血清を加えなかった場合とでC3濃度の測定値を比較すると、ヒト血清を加えない系では10重測定の平均値が2.81mg/dLであり、C.V.値が23.09%であった。一方、希釈用試液にヒト血清を加えた系では、10重測定の平均値が10.30mg/dLであり、C.V.値が4.80%であった。このことから、添加物質としてヒト血清を加えない場合には、地帯現象によって、実際の値よりも低い測定結果が得られることに加え、測定値間のばらつきも大きかった。一方、添加物質としてヒト血清を加えた場合には、地帯現象が回避されたことにより、被験物質と反応性物質との反応によって、不溶性高分子複合体が比例的に生じ、その結果としてばらつきが少なく、実際の値に近い測定結果が得られたものと考えられた。

【0044】

【表4】

	測定値(mg/mL)	
	血清未添加	血清添加
1	2.5	10.5
2	2.2	9.9
3	3.3	10.0
4	2.0	10.5
5	2.8	10.3
6	3.0	11.0
7	2.3	10.5
8	3.2	9.7
9	2.6	9.6
10	4.2	11.0
平均	2.81	10.30
C.V.(%)	23.09	4.80

*【0045】

【発明の効果】被験物質を測定する際に本発明を用いることにより、地帯現象の影響を受けることなく低濃度に至るまで感度よく、かつばらつきが少ない測定を行うことができる。また、本発明を用いることにより、ミエローマ検体の測定においても、非特異反応の影響を受けることなく、正確な定量を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】被験物質の濃度と濁度との関係を示す模式的なグラフ

【図2】IgAの測定系において、添加物質を加えない場合のサンプル濃度と濁度との関係を示すグラフ

【図3】IgAの測定系において、添加物質を加えた場合のサンプル濃度と濁度との関係を示すグラフ

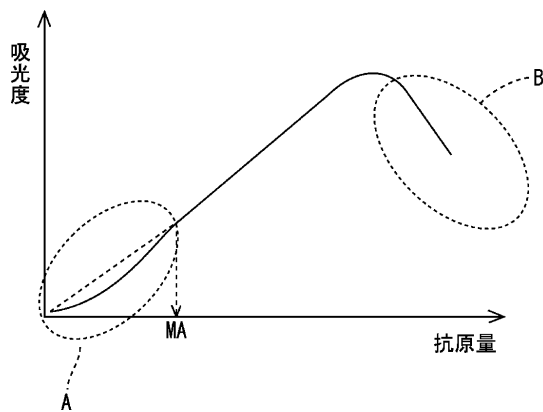
【図4】C4の測定系において、添加物質を加えない場合のサンプル濃度と濁度との関係を示すグラフ

【図5】C4の測定系において、添加物質を加えた場合のサンプル濃度と濁度との関係を示すグラフ

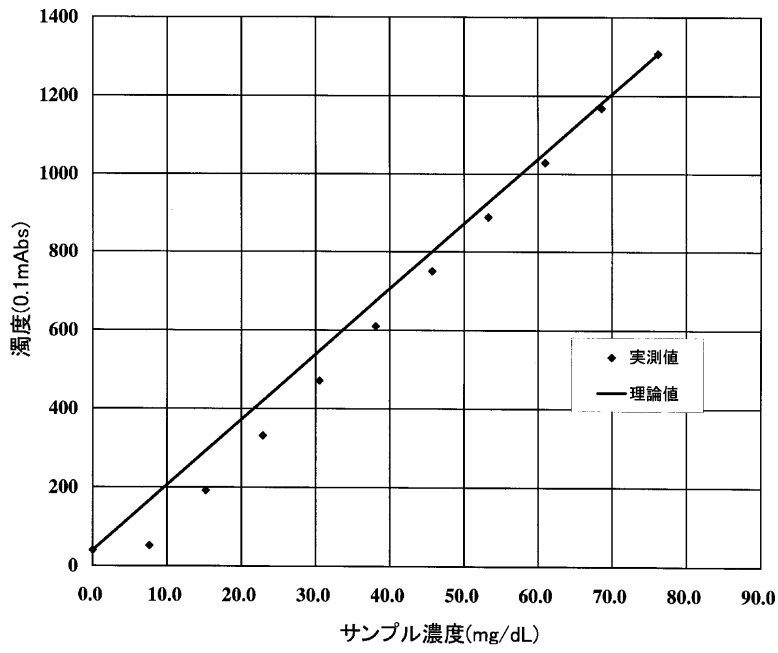
【図6】ミエローマ検体を使用してC4を測定したときの経時的な濁度の変化を示すグラフ

*20

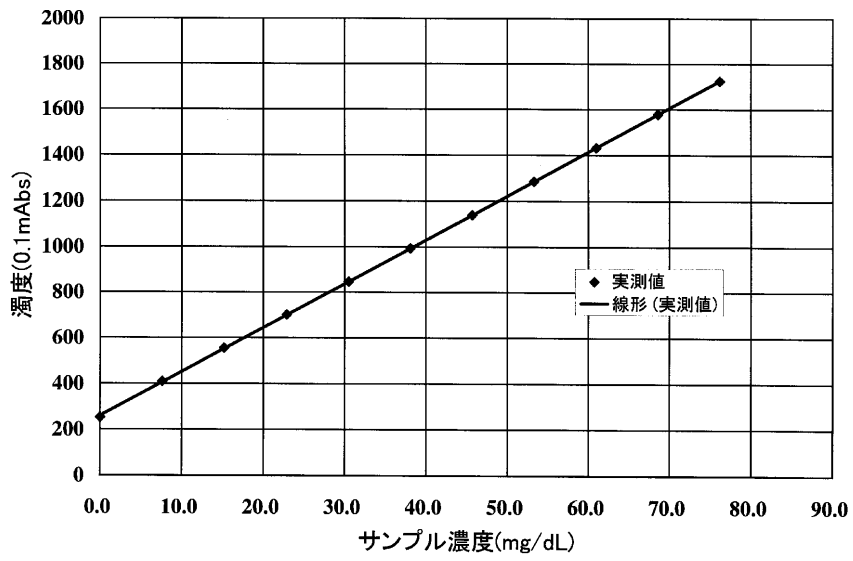
【図1】



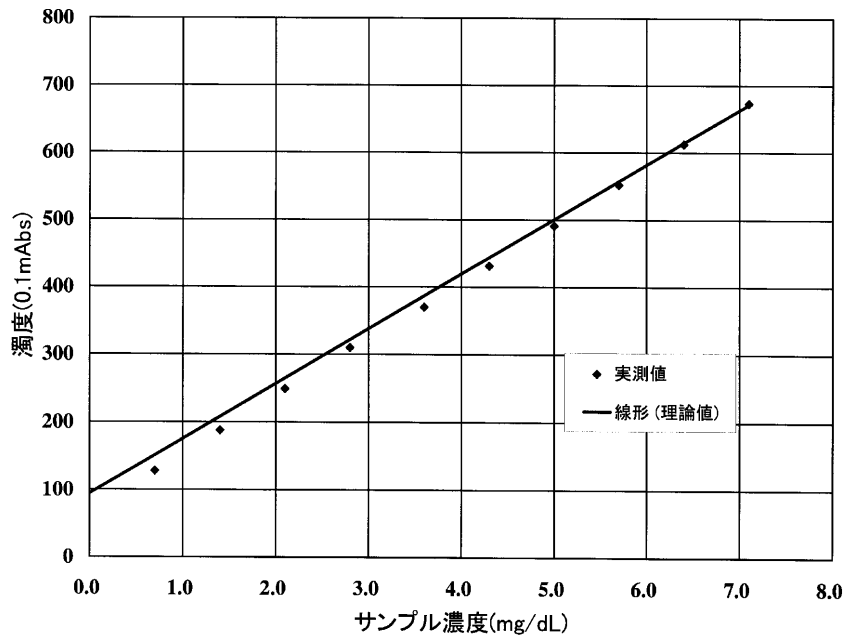
【図2】



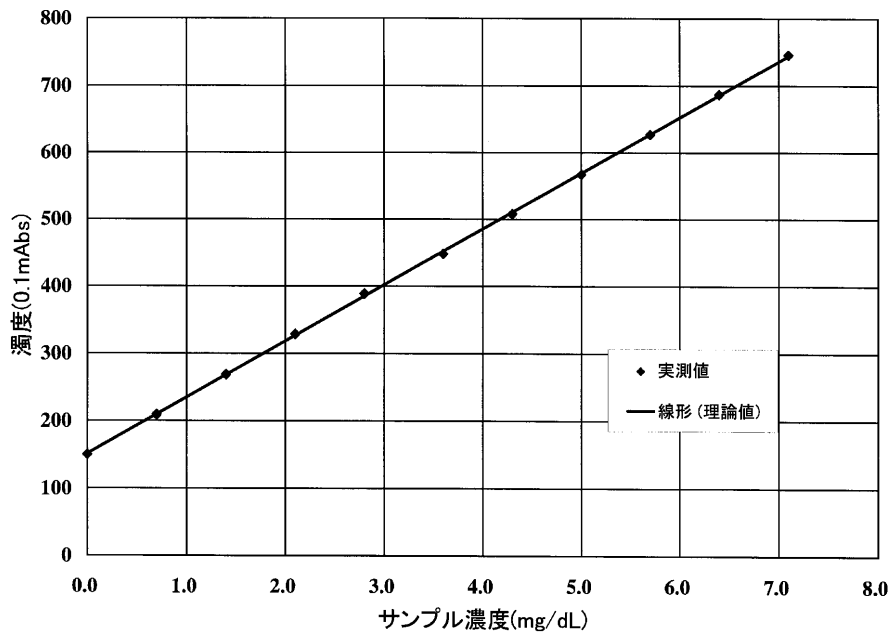
【図3】



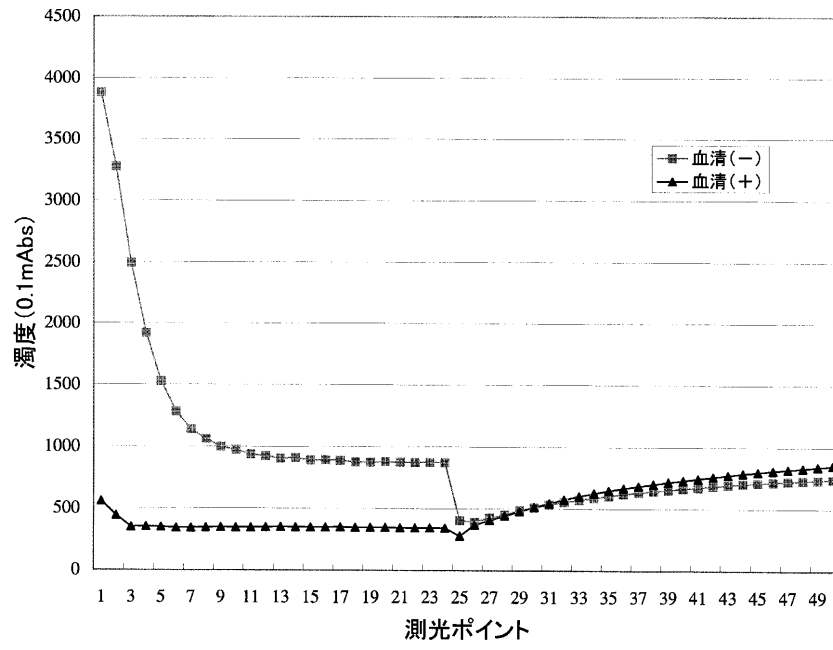
【図4】



【図5】



【図6】



专利名称(译)	测量方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2002055107A	公开(公告)日	2002-02-20
申请号	JP2000240277	申请日	2000-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
[标]发明人	成子隆 清水喜久男		
发明人	成子隆 清水喜久男		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/536.F G01N33/543.583		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种测量方法和试剂盒，其通过改进常规的免疫比浊法或免疫比浊法来抑制区域现象的影响，从而能够实现更高的精度和灵敏度。一种通过在液相中加入测试物质和与该测试物质反应形成不溶性聚合物配合物的反应性物质来测量测试物质的方法，该方法包括：其特征在于，将具有与被检物质相同的反应性的添加物与反应性物质混合，并在覆盖有各测定装置的所谓检测极限的吸气剂下进行反应。

50型自動分析機を用いて測定 *

希釈率	濃度(mg/dL)	濁度(0.1mAbs)			
		血清未添加		血清添加	
		理論値	実測値	理論値	実測値
0	0.0	93		150	
1/10	0.7	151	128	210	207
2/10	1.4	209	188	269	267
3/10	2.1	267	249	329	327
4/10	2.8	325	310	389	387
5/10	3.6	383	370	448	447
6/10	4.3	441	431	508	506
7/10	5.0	499	491	567	566
8/10	5.7	557	552	627	626
9/10	6.4	615	612	687	686
10/10	7.1	673	673	746	746