

(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2001 - 228154

(P2001 - 228154A)

(43)公開日 平成13年8月24日 (2001.8.24)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	583		G 0 1 N 33/543	583
	587			587
33/531			33/531	B

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 4 数)

(21)出願番号 特願2000 - 36343(P2000 - 36343)

(22)出願日 平成12年2月15日(2000.2.15)

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 横山 和正

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

国際試薬株式会社内

(72)発明者 日裏 久英

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬

株式会社研究開発センター内

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆 (外1名)

(54)【発明の名称】 分析方法と凝集反応試薬

(57)【要約】

【課題】 本発明の課題は、不溶性担体を用いる凝集免疫測定法において、濁度の小さい担体を用いて高感度で特異性の高い凝集免疫測定法を提供すること。

【解決手段】 試料中の被検物質と結合対を形成する物質をフルオロ有機化合物を含む水性乳化物として調製することを特徴とする凝集反応用試薬、及びこの試薬を用いて凝集反応により高感度に被検物質を測定する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の被検物質と結合対を形成する物質を用いる凝集反応用試薬であって、該結合対を形成する物質をフルオロ有機化合物を含む水性乳化物として調製することを特徴とする凝集反応用試薬。

【請求項2】 前記フルオロ有機化合物が、炭素数8～20である請求項1に記載の凝集反応用試薬。

【請求項3】 前記フルオロ有機化合物が、ヘテロ原子を含んでいても良いアルキル又は環状化合物である請求項2に記載の凝集反応用試薬。

【請求項4】 前記水性乳化物が、リン脂質、レシチン、水素添加リン脂質、水素添加レシチン、炭素数8～24の合成リン脂質、非イオン性合成界面活性剤、両イオン性合成界面活性剤、及び陰イオン性合成界面活性剤の中から選ばれた一又は2以上の乳化剤によって調製される請求項1～3のいずれか1項に記載の凝集反応用試薬。

【請求項5】 前記水性乳化物の粒子系が0.05～1.2μmである請求項4に記載の凝集反応用試薬。

【請求項6】 前記結合対を形成する物質が、抗原、ハプテン又は抗体である請求項1～5のいずれか1項に記載の凝集反応用試薬。

【請求項7】 試料中の被検物質を、該被検物質と結合対を形成する物質を用いる凝集反応により測定する方法であって、請求項1～6のいずれか1項に記載の試薬を用いることを特徴とする方法。

【請求項8】 凝集反応を光学的測定法により測定する請求項7に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は臨床検査に用いられる生体試料中の物質の測定法に関する。さらに詳しくは、試料中の被検物質と結合対を形成する物質を用いる凝集反応用試薬及び凝集反応測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】抗原抗体反応を凝集反応で測定する方法は古くから行われている。その一つとして、免疫比濁法がある。この方法は抗原抗体反応のみによって生成される凝集反応を光学的に測定するもので、簡便でしかも定量性が高いことから広く用いられているが、凝集体のサイズが小さいため、大きな信号が得られないといった問題がある。すなわち、測定感度が低いため測定可能な物質は限定されている。

【0003】この凝集反応を感度良く行う方法として、不溶性担体粒子に抗原又は抗体を吸着させて、その粒子の抗原抗体反応による凝集反応を用いる方法が実施されている。不溶性担体粒子としてラテックス粒子を用いるラテックス免疫測定法は広く用いられている。一般に抗原をラテックス免疫測定法で測定する場合には、ラテックス粒子表面に固相化された抗体と被検物質を含む試料

とを反応させて抗原抗体複合体を形成させ、ラテックス粒子の凝集の程度を測定することにより被検物質の濃度を測定している。

【0004】一方、被検物質が抗体の場合には、抗原物質をラテックス粒子に結合させておき、被検物質を含む試料と反応させ、その結果生じるラテックス粒子の凝集を測定することにより被検物質である抗体の濃度を測定している。しかしながら、抗原をラテックス粒子に結合させる場合には、抗原の物理化学的な性質により、必ずしも満足な抗原結合ラテックス粒子が調製されるとは限られなかった。

【0005】また一般に、ラテックス粒子の懸濁液は濁度が大きく、凝集反応を光学的に測定する場合、反応前からすでに大きな吸光度等を持つためS/N比〔(反応後の吸光度と反応前の吸光度との差)/反応前の吸光度〕が小さく測定感度が低いといった問題があった。

【0006】ラテックス以外の不溶性担体として、リポソームを用いる試みも行われているが、リポソーム自体の不安定さ等のために実用化されるに至っていない。その他種々の不溶性担体を利用する試みが行われているが、実用化には至っていない。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】不溶性担体を用いる凝集免疫測定法において、濁度の小さい担体を用いて高感度で特異性の高い凝集免疫測定法を提供する。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、抗原、ハプテンまたは抗体をフルオロ有機化合物の水性乳化物に結合させ、その乳化物を被検物質と反応させることにより、反応前の初期濁度が従来のラテックス凝集試薬よりも低く、感度の高い測定方法を提供できることを見出した。さらに、従来のラテックス粒子では、カルジオリピン等の脂質抗原を結合させて抗脂質抗体を測定しようとしても、抗原の物理化学的性質に起因して、安定で感度および特異性の良い試薬の調製ができなかったにも拘わらず、フルオロ有機化合物の水性乳化物を用いることにより、このような脂質抗原をも安定に結合でき、感度及び特異性に優れた検査試薬を提供できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】本発明は、試料中の被検物質と結合対を形成する物質を用いる凝集反応用試薬であって、該結合対を形成する物質をフルオロ有機化合物を含む水性乳化物として調製することを特徴とする凝集反応用試薬を提供する。

【0010】本発明に使用しうるフルオロ有機化合物は、炭素数8～20であり、これらはヘテロ原子を含んでいても良いアルキル又は環状化合物である。例えばパーフルオロテトラヒドロフラン、パーフルオロトリブチルアミン、パーフルオロオクタン、パーフルオロデカリン、パーフルオロメチルデカリン及び2-モノヒドロ

ノナコサフルオロ-3,6,9,12-テトラオキサ-5,8,11-トリメチルペンタデカンが好適に例示される。又、フルオロ有機化合物としては、ここに例示されたものに拘わらず広く公知の炭素数8~20のフルオロ有機化合物が利用できる。

【0011】フルオロ有機化合物を含む水性乳化物の調製は、リン脂質、レシチン、水素添加リン脂質、水素添加レシチン、炭素数約8~約24の合成リン脂質、非イオン性合成界面活性剤、両イオン性合成界面活性剤、及び陰イオン性合成界面活性剤の中から選ばれた一又は2以上10の乳化剤によって行うことができる。

【0012】リン脂質は、動物性、植物性の例えば卵黄、大豆由来のものが好適に例示されるが無論これに限定されず広く多種リン脂質が利用できる。リン脂質は、水素添加されたものあるいは合成の例えば炭素数8~24程度のものも利用できる。レシチンは、リン脂質がさらに精製されたものであり、上記記載のリン脂質由来のものが広く利用できる。

【0013】前記界面活性剤としては、非イオン性、両イオン性及び陰イオン性の合成界面活性剤が用いられ、20例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル、アルキル-N-ベタイン、アルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキル-N-サルコシン酸塩等があげられる。なかでも分子量5,000~15,000のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が好適に用いられる。

【0014】本発明において被検物質と結合対を形成する物質は、抗原、ハプテン、抗体等の臨床検査等で測定30対象にされている種々の物質に対して各既知の結合対を形成する物質が挙げられる。測定対象の具体的な例としては、カルジオリピン等のリン脂質、スフィンゴミエリン等のスフィンゴ脂質や糖脂質抗原、CRP、フィブリン/フィブリノゲン分解産物(FDP)、FDP-D-dimer、リウマチ因子、抗ストレプトリジンO、AFP、フェリチンHBs、HBs抗原、HBs抗体、HCV抗体、HIV抗体等を挙げることができる。これらの物質を含む試料としては例えば、血漿、血清、尿、髄液、リンパ液、唾液等がある。

【0015】乳化は、上記の乳化剤を単独又は複数用いて行うことができる。さらに乳化は所望によりグリセロール又はソルビトール等の多価アルコールを含有させて行うこともできる。このようなフルオロ有機化合物の安定な水性乳化物の調製法は、上記の方法以外にも、広く知られている乳化方法および乳化物の安定化手段が利用できる。

【0016】乳化の方法は、被検物質と結合対を形成する物質(例えば抗原又はハプテン又は抗体)を所定量の界面活性剤を含む(1~10%W/V)適当な緩衝液に50

溶解させ(0.001~0.1%W/V)、それにフルオロ有機化合物を加え(1~20%W/V)、ブレンダーでかき混ぜ粗乳化液を調製する。それを超音波処理又は噴射式乳化機を用いて乳化する。調製した乳化液を遠心分離により粒径を0.05~1.2µmに揃えて調製することもできる。

【0017】なお、本発明において、結合対を形成する物質の種類によっては、予め、アルブミン、ゼラチン等のキャリアー蛋白を含むフルオロ有機化合物の乳化液を調製しておき、その溶液にグルタルアルデヒドやカルボジイミド等の化学結合剤を用いて結合対を形成する物質(抗原又はハプテン又は抗体)を乳化液に結合させる方法をとることも可能である。

【0018】このようにして調製された抗原、ハプテン又は抗体を含有するフルオロ有機化合物を含む水性乳化物は、凝集反応用試薬として使用に供される。さらに、この試薬を用いることにより、試料中の被検物質と結合対を形成する物質を用いる感度の高い凝集反応測定方法を提供することができる。

【0019】カルジオリピンを例にさらに詳細に説明する。所定量のカルジオリピンと界面活性剤を適当な緩衝液に溶解する。その溶液に所定量のフルオロ有機化合物を加え、ブレンダーミキサーで攪拌し、粗乳化液を調製する。調製したカルジオリピン結合粗乳化液を超音波処理しカルジオリピン結合乳化液とする。その溶液に牛又はヒト血清アルブミン、ゼラチン又はその分解物等の蛋白の添加、適当な緩衝液によるpHの調整、塩化ナトリウム等の添加による塩濃度の調整、その他適宜防腐剤、安定化剤等を添加し、担体濃度の調整を行い、抗カルジオリピン抗体測定試薬とする。

【0020】抗カルジオリピン抗体の測定は被検試料を上記で調製した抗カルジオリピン抗体測定試薬に添加混合して、抗カルジオリピン抗体測定試薬の凝集反応を波長500~750nmでの吸光度変化量を測定することにより行うことができる。さらに、凝集反応の反応液に、増感剤、非特異吸収剤であるポリエチレングリコール、デキストラン等を添加剤として含ませることも可能である。又、これら添加剤等を含む第一試薬を用意し、被検試料とその第一試薬を反応させた後、上述の抗カルジオリピン抗体測定試薬を作用させて、その凝集反応を計測することも可能である。

【0021】反応温度は特に限定されないが、一般に用いられている自動分析装置であれば37で行われる。また測定時間も特に限定されないが、通常の自動分析器では5~10分である。凝集反応のモニターは反応開始後一定時間の光学的変化を測定することにより、行われる。通常の自動分析器では吸光度の変化量としてモニターされるのが一般的であるが、場合によっては、散乱光等の異なった光学的な検出原理を利用することも可能である。ここでは波長500~750nmの例を示した

が、用いる波長は特に限定されるものではなく、目的とする感度が得られるように適宜選択され、場合によってはより短波長あるいは長波長の光を用いることもできる。

【0022】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0023】

【実施例1】抗カルジオリピン抗体測定試薬の調製

100mLの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH=7.2)に分子量10500のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体4gと牛心筋由来精製カルジオリピン10mgを溶解する。得られた溶液をろ過し、パーフルオロブチルテトラヒドロフラン10gを加え、ホモミキサーを用いて室温で15分間攪拌して、粗乳化液を得た。この粗乳化液を15分間40以下で超音波処理し、カルジオリピン結合乳化液を調製した。

【0024】得られたカルジオリピン結合乳化液に最終濃度1w/v%の牛血清アルブミン、及び0.13mol/Lの塩化ナトリウムを加えて、抗カルジオリピン抗体測定試薬とした。

【0025】

【実施例2】抗カルジオリピン抗体の測定

血清試料20μLと3w/v%のポリエチレングリコール6000と0.15mol/Lの塩化ナトリウムを含む50mmol/LのHEPES緩衝液(pH7.5)200μLを混和し、37で5分間インキュベートした後、実施例1で調製した抗カルジオリピン抗体測定試\*

\*薬100μLを添加し、37で反応させた。反応開始後波長660nmで吸光度の変化を測定し、抗カルジオリピン抗体測定試薬添加後1分後から5分後までの4分間の吸光度の変化量を求めた。

【0026】その結果、抗カルジオリピン抗体陰性の血清5例は何れも吸光度の変化は観測されなかったが、抗カルジオリピン抗体陽性の血清5例では有意に吸光度の上昇が観測され、本発明の方法により、抗カルジオリピン抗体が測定できることが判った。

【0027】

【実施例3】CRP測定試薬の調製

牛心筋由来のカルジオリピンに代えて、10mgの抗CRP抗体(ヤギ由来)を用いた以外は実施例1と同様に操作してCRP測定試薬を調製した。調製したCRP測定試薬を用いて、血清中のCRP測定を試みた。市販のCRP測定用のラテックス試薬、リアスオートCRP(国際試薬株式会社製)の第一試薬を共通に用い、上記で調製したCRP測定試薬及び市販のラテックス試薬を第二試薬として用い、感度比較を行った。測定はCRP濃度10μg/mLの試料20μLと第一試薬200μLを5分間反応させ、その後第二試薬を50μLを加え反応を開始し、反応開始後1分から5分までの4分間の吸光度変化量を波長700nmで測定した。その結果を表1に示した。

【0028】

【表1】本発明CRP測定試薬Aと従来のラテックス法CRP測定試薬Bの感度比較

	反応開始前の吸光度(A0)	反応開始後4分間の吸光度差(ΔA)	S/N比(ΔA/A0)
A	0.35	0.06	0.171
B	1.32	0.07	0.053

【0029】上記の結果、本発明のCRP測定試薬は従来のラテックス試薬よりも初期吸光度が低いため、S/N比が3倍以上も大きく感度良く測定できることが判った。

【0030】

【発明の効果】本発明は、抗原、ハプテンまたは抗体をフルオロ有機化合物の水性乳化物に結合させ、その乳化物を被検物質と反応させることにより、反応前の初期濁

度が従来のラテックス凝集試薬よりも低く、感度の高い測定方法を提供できる。従来のラテックス粒子では、カルジオリピン等の脂質抗原を結合させて抗脂質抗体を測定しようとしても、抗原の物理化学的性質に起因して、安定で感度および特異性の良い試薬の調製ができなかったにも拘わらず、フルオロ有機化合物の水性乳化物を用いることにより、このような脂質抗原をも安定に結合でき、感度及び特異性に優れた検査試薬を提供できる。

专利名称(译)	分析方法和凝集反应试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001228154A</a>	公开(公告)日	2001-08-24
申请号	JP2000036343	申请日	2000-02-15
申请(专利权)人(译)	国际试剂有限公司		
[标]发明人	横山和正 日裏久英		
发明人	横山 和正 日裏 久英		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.583 G01N33/543.587 G01N33/531.B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种使用不溶性载体的凝集免疫测定方法，所述不溶性载体使用具有低浊度的载体，该不溶性载体是高度敏感和高度特异性的。 解决方案：用于凝集反应的试剂，其特征在于，将与样品中与测试物质形成结合对的物质制备为含有氟有机化合物的水乳液，并且通过使用该试剂的凝集反应具有高灵敏度。 提供了一种用于测量测试物质的方法。

で調製した抗カルジオリピン抗体測定試

	反応開始前の 吸光度 (A0)	反応開始後4分間の 吸光度差 (ΔA)	S/N比 (ΔA/A0)
A	0.35	0.06	0.171
B	1.32	0.07	0.053