

(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2004-163444

(P2004-163444A)

(43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)

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

GO 1 N 33/535

F I

GO 1 N 33/535

テーマコード (参考)

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2004-71926 (P2004-71926)	(71) 出願人	000120456 栄研化学株式会社 東京都文京区本郷1丁目33番8号
(22) 出願日	平成16年3月15日(2004.3.15)	(72) 発明者	渡辺 誠 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内
(62) 分割の表示 原出願日	特願平7-178122の分割 平成7年6月21日(1995.6.21)	(72) 発明者	柴田 典緒 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内

(54) 【発明の名称】 化学発光分析試薬の安定化

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、化学発光分析用のルミノール試薬組成物に関し、長期保存においても化学発光量が低下しにくい安定な組成物の提供を目的とする。

【構成】 本発明は、ルミノール試薬に無機アジドを0.01~0.1%含有せしめることにより、試薬の保存安定性を高める方法、及び安定性の高い試薬組成物に関する。

【効果】 本発明により、ルミノール試薬の保存安定性が向上し、全自動化学発光酵素免疫測定装置への適用が容易となる。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物の化学発光をシグナルとする化学発光分析用の試薬組成物において、無機アジドを 0.01 ~ 0.1 % 含む試薬組成物。

**【請求項 2】**

無機アジドがアジ化ナトリウムである請求項 1 に記載の試薬組成物。

**【請求項 3】**

発光増強剤を含む請求項 1 に記載の試薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

10

**【0001】**

本発明は、化学発光分析試薬の安定化試薬および方法に関するものである。更に詳しくは安定化した 2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物試薬および 2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物試薬の安定化技術に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

近年、化学発光を測定系とする全自動分析装置ならびに分析用試薬が、いくつか開発され、臨床検査室で容易に化学発光測定を利用する環境が整いつつある。これらの測定系に用いられる代表的な化学発光物質は、5 - アミノ - 2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン（ルミノール）、6 - アミノ - 2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン（イソルミノール）等の 2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物、ジオキセタンおよびアクリジニウムエステル等が知られている。ルミノール、イソルミノールは、主としてペルオキシダーゼ（POD）を標識とした競合法またはサンドイッチ法の EIA で用いられる。ジオキセタンは、アルカリフォスファターゼを標識とした EIA で、アクリジニウム化合物は、それ自体を標識とした化学発光法で用いられている。

20

**【0003】**

ルミノールおよびイソルミノールは、容易かつ比較的安価に入手可能な原料であり、フェノール化合物等の増感物質によって十分な発光強度が得られる。一般的な測定は、抗体または抗原を結合した固相と検体および POD 標識抗体または抗原とを反応させ、サンドイッチ型の結合物を形成させる。続いて過剰の POD 標識抗体または抗原を洗浄により除いた後、過酸化水素水および増感物質を含むルミノールまたはイソルミノール溶液を加えて、放出される光の量を測定することからなる。

30

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

本発明の課題は、2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物による発光試薬を溶液状態で安定化する技術を提供する事にある。2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物は溶解直後の非特異発光が高いため、化学発光分析には、1 週間程度エイジングした溶解試薬を使用しなければならない。ところが長期保存した溶液を用いると、保存状態が低温（4℃）であっても、発光強度が次第に低下してしまう欠点があった。発光強度の低下は S/N 比の低下につながる。

40

**【課題を解決するための手段】****【0005】**

本発明は、2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物含有発光試薬に無機アジドを添加することを主要な特徴とする。

**【発明の効果】****【0006】**

本発明により、2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 フタラジオン化合物試薬の保存安定性が向上し、全自動化学発光酵素免疫測定装置への適用が容易となる。

**【発明を実施するための最良の形態】**

50

## 【0007】

無機アジドは0.01～0.1%の範囲で2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物試薬に添加するのが好ましい。この濃度範囲以上の無機アジドの添加は、反応中にPOD活性を阻害して発光強度の低下をもたらすおそれがある。一方、この濃度範囲以下の無機アジド添加は、測定中の発光強度を安定化する作用が期待できるものの(特開平6-34630)、長期保存した2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物溶液の安定化には寄与しない場合がある。

## 【0008】

無機アジドとしては、アジ化ナトリウム、アジ化カリウム等のアルカリ金属アジドおよびアジ化バリウム等のアルカリ土類金属アジドが使用されるが、特に好ましいのは、アジ化ナトリウムである。アジ化ナトリウムは広く一般に防腐剤として用いられているが、本発明の安定化効果は、雑菌汚染を防止することによって達せられたものではない。

10

## 【0009】

溶液組成物の安定化技術として、しばしば特定の緩衝液およびpHの効果が取り上げられているが、本発明の2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物溶液の安定化技術においては、緩衝液の種類は特に問わない。りん酸緩衝液、ほう酸緩衝液、くえん酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液など通常用いられる緩衝液から1種またはこれらの2種を組合わせたものから適宜選べばよい。緩衝液のpHは5～10の範囲内に調整されていれば、安定化効果は変わらない。pH3以下の酸性条件ではアジ化ナトリウムが分解されるので、安定化効果は得られない。

20

## 【0010】

2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物発光試薬中の2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物濃度は特に限定されるものではなく、試薬構成の量的比に合わせて任意に選べばよい。全自動化学発光分析機AL-1000(栄研化学販売)用試薬では、洗浄した固相ビーズにPOD基質である過酸化水素水とルミノール発光試薬をそれぞれ100μl分注するシステムであり、このシステムに適合する発光試薬の適当なルミノール濃度は0.001～10mMであり、好ましくは0.01～1mMである。化学発光エンハンサーは、試薬構成上ならびに測定操作の簡便化のため、2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物発光試薬に共存させる方が望ましい。フェノール系エンハンサーとしては、4-ヨードフェノール、4-フェニルフェノール、2-クロロ-4-フェニルフェノールが特に有効とされるが(特公平3-5539)、これらのエンハンサーはいずれも、0.01～10mMの濃度範囲で2,3-ジヒドロ-1,4フタラジオン化合物と同一溶液中に共存させることができる。

30

## 【実施例1】

## 【0011】

C E A測定による無機アジド含有ルミノール試薬の安定化効果

無機アジド無添加ルミノール試薬と無機アジド添加ルミノール試薬をそれぞれ4、37に2週間および1カ月間保存し、ルミスポットC E A(栄研化学製・登録商標)の指示書に記載されたプロトコールにしたがって、全自動化学発光酵素免疫測定装置AL-1000により免疫反応を実施した。C E Aの酵素免疫反応後のペルオキシダーゼ活性を各種ルミノール試薬により測定し、発光強度を比較した。

40

## 【0012】

1-(a) 固相化抗体

市販の抗C E Aウサギポリクローナル抗体(D A K O製)をP B Sで希釈して1μg/mlとした抗体溶液中にポリスチレンビーズ(直径1/4インチ,積水化学工業製)を浸漬し4で一晚放置した。放置後生理食塩水で洗浄し、0.3% B S A含有P B Sに室温3時間浸漬して固相化抗体を得た。

## 【0013】

1-(b) P O D標識抗体

市販の抗C E Aモノクローナル抗体(D A K O製)を石川らの方法(特願昭57-33

50

662等)によりPOD(東洋紡績社製,西洋ワサビ由来)と結合させ、POD標識抗体を作製した。これをセファデックスG-200を用いて分画精製し、2%BSAを含むPBSで250倍に希釈して使用した。

【0014】

1-(c)発光試薬1、2

30%過酸化水素水(和光純薬工業製)0.3mlを0.1M、pH8.0のりん酸緩衝液1000mlに溶解し、過酸化水素試薬とした。ルミノール(東京化成製)225mgおよびp-ヨードフェノール(和光純薬工業製)11mgを0.1M、pH8.0のりん酸緩衝液1000mlに溶解し、一部はそのままルミノール試薬Aとし、一部はさらにアジ化ナトリウム(和光純薬工業製)を0.025%となるように加えルミノール試薬B

10

【0015】

1-(C)免疫学的測定法

試料として市販精製CEA(SCRIPPS社)を用い、これを0.2%BSA加PBSで使用濃度に希釈して免疫反応に供した。測定は全自動化学発光酵素免疫測定装置AL-1000にて行った。プロトコールは次の通りである。各免疫反应用チューブにあらかじめ抗体固相化ビーズを1コづつ入れておき、その中に被検試料60 $\mu$ lと希釈液200 $\mu$ lを添加し、37 $^{\circ}$ C約7分反応させた。反応後溶液を吸引除去して、ビーズをPBSで洗浄し、POD標識抗体40 $\mu$ lおよび希釈液170 $\mu$ lを加え37 $^{\circ}$ C,約7分反応させた。反応後溶液を除去し、ビーズを洗浄した後、前記の過酸化水素試薬、100 $\mu$ lおよびルミノール試薬A、100 $\mu$ lまたはルミノール試薬B、100 $\mu$ lを加え、発光強度(3秒間の積算値)を測定した。

20

【0016】

結果を表1に示す。表中の数値は、検体が精製CEAの場合は発光の計測値を、また検体が血清の場合はCEA濃度(ng/ml)を示す。測定値の右に示される%値は、調製時の試薬による測定値に対する比率である。低濃度の精製CEAにおいて、アジ化ナトリウムの顕著な効果が認められた。血清測定値はそれぞれの試薬でキャリブレーションを行った後の測定のため、アジ化ナトリウム添加効果は小さくなるが、測定値の正確性は明らかに無添加試薬より良好との結果が得られた。

【0017】

30

【表 1】

ルミノール試薬の安定性（保存温度 37℃, 発光量）：CEA

0.00% アジ化ナトリウム						
CEA(ng/ml)	調製時		2Weeks		4Weeks	
0.00	61	100%	41	67%	35	57%
0.98	110	100%	70	64%	62	56%
1.95	252	100%	164	65%	112	44%
7.80	2,180	100%	1,669	77%	1,236	57%
31.25	15,702	100%	14,053	89%	11,167	71%
125.00	60,336	100%	57,286	95%	52,452	87%
500.00	215,164	100%	216,811	101%	211,064	98%
血清 A	3.7 ng/ml	100%	3.2 ng/ml	92%	3.0 ng/ml	89%
血清 B	17.1 ng/ml	100%	17.0 ng/ml	99%	20.3 ng/ml	119%
0.02% アジ化ナトリウム 添加						
CEA(ng/ml)	調製時		2Weeks		4Weeks	
0.00	58	100%	59	102%	52	90%
0.98	109	100%	113	104%	100	92%
1.95	244	100%	227	93%	220	90%
7.80	2,139	100%	2,164	101%	2,023	95%
31.25	14,879	100%	13,910	93%	13,368	90%
125.00	60,852	100%	57,933	95%	55,599	91%
500.00	201,077	100%	203,147	101%	205,463	102%
血清 A	3.9 ng/ml	100%	4.0 ng/ml	102%	3.8 ng/ml	96%
血清 B	17.9 ng/ml	100%	17.2 ng/ml	96%	18.3 ng/ml	102%

10

20

30

## 【実施例 2】

## 【0018】

AFP測定による無機アジド含有ルミノール試薬の安定化効果

前記発光試薬 2 - A と発光試薬 2 - B をそれぞれ 4、37 に 2 週間および 1 カ月間保存し、ルミスポット AFP（栄研化学製・登録商標）の指示書に記載されたプロトコールにしたがって、全自動化学発光酵素免疫測定装置 AL - 1000 により免疫反応を実施した。AFP の酵素免疫反応後のペルオキシダーゼ活性を各種ルミノール試薬により測定し、残存発光強度を比較した。

## 【0019】

## 2 - (a) 固相化抗体

市販の抗 AFP ウサギポリクローナル抗体（UCB 社製）を PBS で希釈して 1 μg/ml とした抗体溶液中にポリスチレンビーズ（直径 1 / 4 インチ、積水化学工業製）を浸漬し 4 で一晩放置した。放置後、生理食塩水で洗浄し 0.3% BSA 含有 PBS に室温 3 時間浸漬して固相化抗体を得た。

## 【0020】

## 2 - (b) POD 標識抗体

市販の抗 AFP モノクローナル抗体（ザイメット社製）を石川らの方法（特願昭 57 - 33662 等）により POD（東洋紡績社製、西洋ワサビ由来）と結合させ、POD 標識抗体を作製した。これをセファデックス G - 200 を用いて分画精製し、2% BSA を含

40

50

むPBSで1000倍に希釈して使用した。

【0021】

2-(c)免疫学的測定法

試料として市販AFP標準(日本バイオテスト研究所製)を用い、これを0.2%BSA加PBSで使用濃度に希釈して免疫反応に供した。測定は全自動化学発光酵素免疫測定装置AL-1000(栄研化学)にて行った。プロトコールは次の通りである。各免疫反応チューブにあらかじめ抗体固相化ビーズを1コづつ入れておき、その中に被検試料20 $\mu$ lと希釈液250 $\mu$ lを添加し、37 $^{\circ}$ C約7分反応させた反応後溶液を吸引除去して、ビーズをPBSで洗浄し、POD標識抗体40 $\mu$ lおよび希釈液170 $\mu$ lを加え37 $^{\circ}$ C、約7分反応させた。反応後溶液を除去し、ビーズを洗浄した後下記の各化学発光試薬を200 $\mu$ l加え、発光強度(3秒間の積算値)を測定した。

10

【0022】

結果を表2に示す。表中の数値は、検体がAFP標準品の場合は発光の計測値を、また検体が血清の場合はAFP濃度(ng/ml)を示す。測定値の右に示される%値は、調製時の試薬による測定値に対する比率である。AFPにおいてもCEAと同様に、アジ化ナトリウムを添加したルミノール試薬の安定性は顕著に向上している。

【0023】

【表2】

ルミノール試薬の安定性(保存温度37 $^{\circ}$ C, 発光量) : AFP

20

0.00% アジ化ナトリウム						
AFP(ng/ml)	調製時		2Weeks		4Weeks	
0.00	77	100%	51	66%	45	58%
0.98	178	100%	137	77%	104	58%
3.90	1,013	100%	736	73%	506	50%
15.60	8,267	100%	7,206	87%	6,803	82%
62.50	44,401	100%	41,654	94%	34,017	77%
250.00	155,355	100%	151,350	97%	144,834	93%
1000.00	485,391	100%	470,699	97%	452,224	93%
血清 A	43.7 ng/ml	100%	42.5 ng/ml	97%	41.1 ng/ml	94%
血清 B	97.3 ng/ml	100%	101.7 ng/ml	105%	99.2 ng/ml	102%
0.02% アジ化ナトリウム 添加						
AFP(ng/ml)	調製時		2Weeks		4Weeks	
0.00	148	100%	149	101%	119	80%
0.98	238	100%	224	94%	227	95%
3.90	1,206	100%	1,093	91%	987	82%
15.60	9,266	100%	9,113	98%	7,737	83%
62.50	42,065	100%	40,466	96%	41,581	99%
250.00	159,818	100%	159,187	100%	152,363	95%
1000.00	514,990	100%	498,627	97%	482,278	94%
血清 A	44.7 ng/ml	100%	43.9 ng/ml	98%	43.6 ng/ml	98%
血清 B	99.3 ng/ml	100%	100.8 ng/ml	101%	106.9 ng/ml	108%

30

40

专利名称(译)	化学发光分析试剂的稳定化		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004163444A</a>	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2004071926	申请日	2004-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
[标]发明人	渡辺 誠 柴田 典緒		
发明人	渡辺 誠 柴田 典緒		
IPC分类号	G01N33/535		
FI分类号	G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及化学发光分析用鲁米诺试剂组合物，其目的在于提供即使长期保存也不容易降低化学发光量的稳定的组合物。本发明涉及通过向鲁米诺试剂中添加0.01~0.1%的无机叠氮化物来提高试剂的保存稳定性的方法，以及具有高稳定性的试剂组合物。[效果]根据本发明，提高了鲁米诺试剂的保存稳定性，并且易于将其应用于全自动化学发光酶免疫测定装置。[选择图]无

ルミノール試薬の安定性（保存温度37℃，発光量）：CEA

0.00% アジ化 ナトリウム						
CEA(ng/ml)	調製時		2Weeks		4Weeks	
0.00	61	100%	41	67%	35	57%
0.98	110	100%	70	64%	62	56%
1.95	252	100%	164	65%	112	44%
7.80	2,180	100%	1,669	77%	1,236	57%
31.25	15,702	100%	14,053	89%	11,167	71%
125.00	60,336	100%	57,286	95%	52,452	87%
500.00	215,164	100%	216,811	101%	211,064	98%
血清 A	3.7 ng/ml	100%	3.2 ng/ml	92%	3.0 ng/ml	89%
血清 B	17.1 ng/ml	100%	17.0 ng/ml	99%	20.3 ng/ml	119%
0.02% アジ化 ナトリウム 添加						
CEA(ng/ml)	調製時		2Weeks		4Weeks	
0.00	58	100%	59	102%	52	90%
0.98	109	100%	113	104%	100	92%
1.95	244	100%	227	93%	220	90%
7.80	2,139	100%	2,164	101%	2,023	95%
31.25	14,879	100%	13,910	93%	13,368	90%
125.00	60,852	100%	57,933	95%	55,599	91%
500.00	201,077	100%	203,147	101%	205,463	102%
血清 A	3.9 ng/ml	100%	4.0 ng/ml	102%	3.8 ng/ml	96%
血清 B	17.9 ng/ml	100%	17.2 ng/ml	96%	18.3 ng/ml	102%