

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580006266.6

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)

[43] 公开日 2007年3月7日

[11] 公开号 CN 1926432A

[22] 申请日 2005.2.25
[21] 申请号 200580006266.6
[30] 优先权
 [32] 2004.2.26 [33] JP [31] 051184/2004
[86] 国际申请 PCT/JP2005/003135 2005.2.25
[87] 国际公布 WO2005/086594 日 2005.9.22
[85] 进入国家阶段日期 2006.8.28
[71] 申请人 电化生研株式会社
 地址 日本东京都
[72] 发明人 皆川康纪 斋藤美千惠 松井宽史

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 孙秀武 吴娟

权利要求书3页 说明书9页

[54] 发明名称

免疫测定法用测定值降低抑制剂及使用其的
免疫测定法

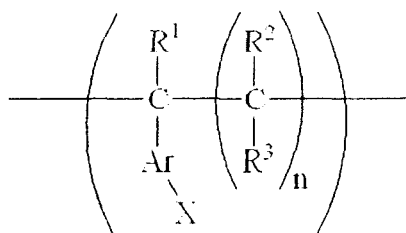
[57] 摘要

本发明公开了可抑制被检样品中的干扰物质的影响并使免疫测定法的准确性提高的免疫测定法用测定值降低抑制剂、以及使用其的抑制干扰物质引起的测定值降低的免疫测定法和免疫测定法用试剂。用于抑制干扰物质引起的测定值降低的免疫测定法用测定值降低抑制剂含有离子型表面活性剂,所述离子型表面活性剂为具有离子性官能团的疏水性环状单体聚合而成的聚合物,分子量为1000-10万。

1. 一种用于抑制干扰物质引起的测定值降低的免疫测定法用测定值降低抑制剂，其含有离子型表面活性剂，所述离子型表面活性剂为具有离子性官能团的疏水性环状单体聚合而成的聚合物，分子量为1000-10万。

2. 权利要求1所述的测定值降低抑制剂，其中，所述重复单元由以下通式 [I] 表示，

[化 I]



[I]

其中，Ar 为疏水性环；X 为离子性官能团；R¹ 至 R³ 相互独立，为氢原子或者烷基；n 为 0-10 的整数；与构成 Ar 的各碳原子键合的氢原子可以被不妨碍本发明效果的取代基取代。

3. 权利要求1或2所述的测定值降低抑制剂，其中，所述疏水性环状单体为芳香族单体。

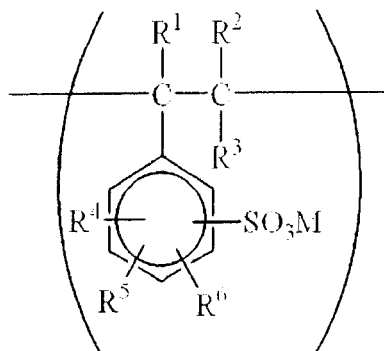
4. 权利要求3所述的测定值降低抑制剂，其中，所述芳香族单体含有苯环。

5. 权利要求1-4 任意一项所述的测定值降低抑制剂，其中，所述离子性官能团为磺酸基或其盐、羧酸或其盐、或胺。

6. 权利要求5所述的测定值降低抑制剂，其中，所述离子性官能团为磺酸基或其盐。

7. 权利要求2所述的测定值降低抑制剂，其中，所述重复单元由以下通式 [II] 表示，

[化2]



[II]

其中，M 为在水溶液中成为 1 价阳离子的原子或基团； R^1 至 R^3 与上述通式 [I] 中的 R^1 至 R^3 意义相同； R^4 至 R^6 相互独立，为氢原子、低级烷氧基或低级烷基。

8. 权利要求 5 所述的测定值降低抑制剂，其中，所述重复单元为茴香脑磺酸盐或苯乙烯磺酸盐。

9. 权利要求 1-8 任意一项所述的测定值降低抑制剂，其中，所述免疫测定法为免疫凝集法。

10. 免疫测定法，其是在权利要求 1-9 任意一项所述的测定值降低抑制剂存在下进行的。

11. 权利要求 10 所述的免疫测定法，其包括：使被检样品与所述测定值降低抑制剂接触的第 1 工序，和接着使第 1 工序后的被检样品与致敏粒子或抗血清进行抗原抗体反应的第 2 工序。

12. 权利要求 10 或 11 所述的免疫测定法，其中，被检样品为生物样品。

13. 权利要求 12 所述的免疫测定法，其中，被检样品为血液、血清或血浆。

14. 权利要求 10-13 任意一项所述的免疫测定法，其中，反应溶液中的所述测定值降低抑制剂的浓度为 0.01%-5%（重量/体积）。

15. 权利要求 10-14 任意一项所述的免疫测定法，其为免疫凝集法。

16. 免疫测定法用试剂，其为至少含有缓冲液、致敏粒子或抗血清

的免疫测定法用试剂,其特征在于含有权利要求 1-9 任意一项所述的测定值降低抑制剂。

17. 权利要求 14 所述的试剂,所述免疫测定法用试剂为由第 1 试剂和第 2 试剂构成的 2 液系试剂,所述第 1 试剂至少含有缓冲液,并先与被检样品混合,所述第 2 试剂至少含有缓冲液和致敏粒子,添加至被检样品和第 1 试剂的混合物中,所述测定值降低抑制剂包含于所述第 1 试剂中。

18. 权利要求 16 或 17 所述的试剂,其中,所述免疫测定法为免疫凝集法。

19. 权利要求 1-9 任意一项所述的离子型表面活性剂作为免疫测定法用测定值降低抑制剂的用途。

20. 抑制免疫测定法的测定值降低的方法,其包括使权利要求 1-9 任意一项所述的离子型表面活性剂共存于免疫测定法的反应液中。

免疫测定法用测定值降低抑制剂及使用其的免疫测定法

技术领域

本发明涉及一种用于抑制干扰物质导致的测定值降低的免疫测定法用测定值降低抑制剂以及使用其的免疫测定法、和免疫测定法用试剂。

背景技术

在临床检查中，将生物样品作为被检样品的检查项目有很多。已知对于其中的免疫学测定法，生物样品中存在着影响目标物质免疫反应的干扰物质。该影响是指影响测定值的准确性，有许多报道。

作为确认和降低这些干扰物质的影响的最一般方法，有将被检样品进行预稀释从而降低干扰物质浓度的方法。但是用这种方法时，通过稀释操作，目标物质浓度也与干扰物质同时降低，难于利用于检测样品中的低浓度物质的测定系统中。而且，增加稀释操作也延长了测定时间，在快速性方面有欠缺。另一方面，在干扰物质已知的情况下，可采取加入具有抑制或抑止干扰活性的功能的化合物或加热等的预处理方法，但只对已知的特定物质有效，还有因测定项目不同未知物质对测定产生不良影响的可能性。

另外，特开平 9-304384 号公报中记载了为了避免免疫测定法的假阳性，使用含有磺酸基或其盐的共扼二烯类聚合物，但比起特定样品中存在的假阳性物质，所有生物样品中可能存在的干扰物质的避免对提高准确性是必要的。

专利文献 1: 特开平 9-304384 号公报

发明内容

本发明的目的在于提供免疫测定法用测定值降低抑制剂以及使用其的抑制干扰物质导致的测定值降低的免疫测定法、和免疫测定法用试剂，所述免疫测定法用测定值降低抑制剂可抑制被检样品中的干扰物质的影响，从而提高免疫测定法的准确性。

本发明人进行了深入研究，结果发现，通过在进行免疫测定法的

反应溶液中使离子型表面活性剂共存，可抑制被检样品中干扰物质的影响，提高免疫测定法的准确性，从而完成了本发明，所述离子型表面活性剂为具有离子性官能团的疏水性环状单体聚合而成的聚合物，分子量为1000-10万。

即，本发明提供用于抑制干扰物质导致的测定值降低的免疫测定法用测定值降低抑制剂，其含有离子型表面活性剂，所述离子型表面活性剂为具有离子性官能团的疏水性环状单体聚合而成的聚合物，分子量为1000-10万。另外，本发明提供在上述本发明的测定值降低抑制剂的存在下进行的免疫测定法。进一步，本发明提供免疫测定法用试剂，其为至少含有缓冲液、致敏粒子或抗血清的免疫测定法用试剂，其特征在于含有上述本发明的测定值降低抑制剂。另外，本发明还提供上述离子型表面活性剂作为免疫测定法用测定值降低抑制剂的用途。本发明还提供抑制免疫测定法中的测定值降低的方法，其包括使上述离子型表面活性剂共存于免疫测定法的反应液中。

发明效果

通过在本发明的免疫测定法测定值降低抑制剂存在下进行免疫测定法，可降低被检样品中的干扰物质的影响，与不存在测定值降低抑制剂的情况相比，免疫测定法的准确性提高。

具体实施方式

免疫测定法中的免疫凝集法是根据由抗原抗体反应导致的反应液的浊度或吸光度等光学性质的变化，检测或定量被检样品中的抗原或抗体的方法，其包括免疫比浊法和免疫浊度法（浊度测定法）。为了提高检测的灵敏度，通常将与被检样品中的目标抗原或目标抗体进行抗原抗体反应的抗体或抗原固定在胶乳粒子这样的粒子上（致敏粒子），由于抗原抗体反应该致敏粒子凝集，根据由此引起的光学性质变化对被检物质进行检测或定量（使用胶乳粒子时也特别地称为胶乳凝集法）。要说明的是，也常常不用致敏粒子而使用抗血清。

本发明的免疫测定法的测定值降低抑制剂含有离子型表面活性剂，所述离子型表面活性剂为具有离子性官能团的疏水性环状单体聚合而成的聚合物，分子量为1000至10万。

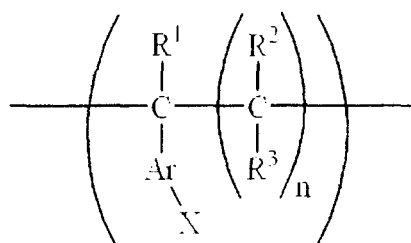
作为离子性官能团，优选磺酸基或其盐，羧基或其盐、或者胺（在水溶液中电离的季铵等），特别优选磺酸基或其盐。离子型表面活性剂可以为阴离子表面活性剂，也可以为阳离子表面活性剂。

另外，作为疏水性环，可列举芳香环或环烷基环，也可以是含有氧原子、氮原子或硫原子等的杂环，可以是它们稠合而成的稠合环。疏水性环优选芳香环，作为芳香环，可列举苯环、萘环、蒽环等，优选苯环或萘环，更优选苯环。

作为用作测定值降低抑制剂的优选聚合物，可列举聚茴香脑磺酸钠盐、聚苯乙烯磺酸钠盐、萘磺酸甲醛缩合物的钠盐、芳香族磺酸甲醛聚合物的钠盐（具体地，有デイスロール（商品名，日本乳化剂公司制造）、デモール（商品名，花王公司制造）、ポリテイ PS-1900（ライオン）、ポリテイ N-100K（商品名，ライオン公司制造）等）。

另外，作为用作测定值降低抑制剂的优选聚合物，可列举重复单元用以下通式 [I] 表示的聚合物：

[化 1]



[I]

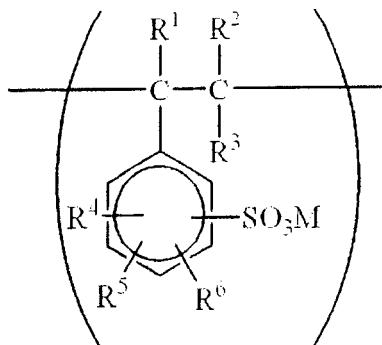
其中，Ar 为疏水性环；X 为离子性官能团；R¹ 至 R³ 互相独立，为氢原子或烷基；n 为 0 至 10 的整数；与构成 Ar 的各碳原子键合的氢原子可以被不妨碍本发明效果的取代基取代。

在上述通式 [I] 中，X 和 Ar 分别为上述离子性官能团和疏水性环。R¹ 至 R³ 为烷基时，优选低级（在本说明书和权利要求书中，“低级”是指碳原子数为 1-4）烷基。另外，n 优选为 0-3。与构成 Ar 的各碳原子键合的氢原子可以被不妨碍本发明效果的取代基取代，作为该取代基的例子，可列举低级烷基和低级烷氧基。

通式 [I] 表示的重复单元中，优选以下通式 [II] 表示的重复

单元:

[化2]

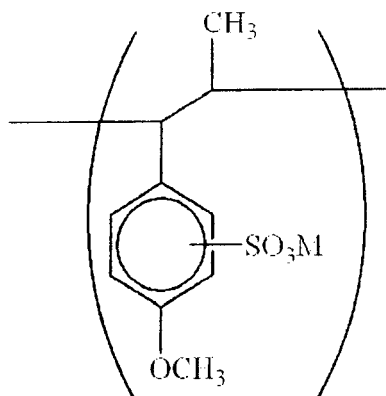


[II]

式 [II] 中, M 为在水溶液中成为 1 价阳离子的原子或者基团, 优选为钠或钾这样的碱金属; R^1 至 R^3 互相独立, 表示氢原子或低级烷氧基; R^4 至 R^6 互相独立, 表示氢原子或低级烷基。

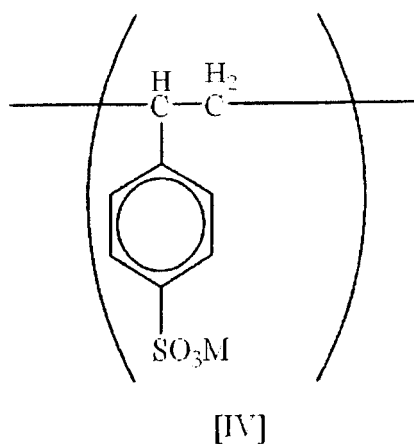
上述通式 [I] 表示的重复单元中, 作为特别优选的, 可列举下述通式 [III] 表示的茴香脑磺酸盐, 下式 [IV] 表示的苯乙烯磺酸盐和下式 [V] 表示的萘酸磺酸甲醛缩合物盐。

[化3]

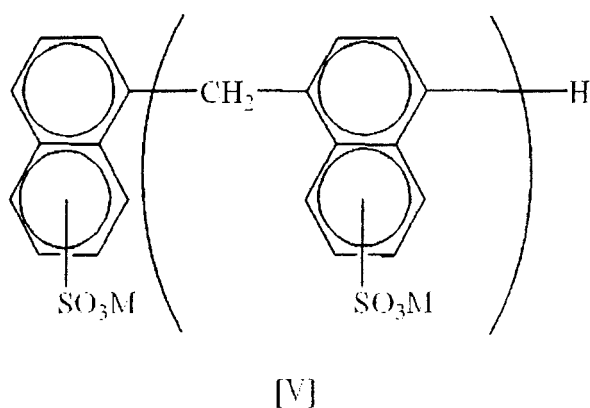


[III]

[化4]



[化5]



在式 [III]、[IV] 和 [V] 中，M 与式 [I] 中的同义，优选钠或钾这样的碱金属。

所述聚合物的分子量为 1000-10 万，优选为 1000-6 万。

所述重复单元可以采用 1 种，也可以将 2 种或以上组合采用。用作测定值降低抑制剂的聚合物优选仅由上述重复单元构成，但在不对本发明效果产生不良影响的范围也可以含有其他单元。通常，这种其他单元在聚合物中的含量为 20 摩尔%或以下，优选为 10 摩尔%或以下，更优选为 5 摩尔%或以下。

本发明的免疫测定法为在上述本发明的测定值降低抑制剂存在下进行的免疫测定法。对测定值降低抑制剂的用量没有特别限定，但通常在反应溶液中的最终浓度为 0.01%-5% (重量/体积)，优选为 0.1-1%

左右。优选根据使用的高分子离子型表面活性剂的种类、被检样品和缓冲液、抗血清液、或致敏胶乳粒子的混合比例等，选择可得到效果的最适浓度。

对用于本发明的免疫测定法的被检样品没有特别限定，优选可最大发挥抑制干扰物质的影响的这种本发明效果的生物样品，尤其优选血液、血清、血浆、尿、粪便、唾液、组织液、骨髓液、ぬぐい液等体液等或它们的稀释物，更优选血液、血清和血浆或它们的稀释物。

免疫测定法为免疫凝集法时，对所使用的致敏粒子致敏的抗体或抗原没有特别限定，与以往同样，可列举例如 C- 反应性蛋白 (CRP)、类风湿因子 (RF)、铁蛋白 (FER) 以及肌红蛋白 (Mb) 以及它们的抗体，当然，并不限于此。

除了在上述测定值降低抑制剂的存在下进行免疫测定法之外，本发明的免疫测定法与以往的一样进行。即，免疫测定法为免疫凝集法时，对反应液中的致敏粒子的浓度没有特定限定，但通常为 0.01-0.5% 左右，反应通常在 1℃-56℃，优选在 37℃ 条件下进行 1 分钟-10 分钟左右。反应条件并不限于此。作为反应介质，通常使用甘氨酸缓冲液等各种缓冲液。在反应开始前和开始后的一定时间后测定反应溶液的浊度或吸光度，或者在反应开始前以及开始后经时测定，根据浊度或吸光度变化的大小 (终点法) 或者变化速度 (速率法) 对被检物质进行检测或定量。免疫凝集法既可以用手动进行，也可以用自动分析装置进行。

免疫测定法为免疫凝集法时，在本发明的方法中，测定值降低抑制剂可以和致敏粒子或抗血清同时与被检样品混合，但包括被检样品与测定值降低抑制剂接触的第 1 工序，然后，第 1 工序后的被检样品与致敏粒子或抗血清进行抗原抗体反应的第 2 工序时，可最大限地获得本发明的效果，是优选的。此时，对第 1 工序和第 2 工序没有特别限定，反应时间分别通常为 1 分钟-10 分钟，优选为 1 分钟-5 分钟，反应温度通常为 1℃-56℃，优选为 37℃ 的条件下进行。以二阶段进行反应时，在第 1 工序的反应液中测定值降低抑制剂的浓度优选为 0.01%-5% (重量/体积)，更优选为 0.05-1% 左右。

本发明的免疫测定法并不限于免疫凝集法，还包括夹心 ELISA 等夹心法、免疫层析法、竞争法等。在这些免疫测定法的情况下，也可

以使免疫反应的介质中含有本发明的测定值降低抑制剂进行各免疫测定法。这时测定值降低抑制剂的浓度可以与上述相同。

本发明还提供含有缓冲液、致敏粒子和上述测定值降低抑制剂的免疫测定法用试剂。如上所述，免疫凝集法以二阶段进行反应时，免疫测定法用试剂为含有第1试剂和第2试剂的2液系试剂从操作性和试剂稳定性的观点考虑是优选的，所述第1试剂至少含有缓冲液，并先与被检样品混合，所述第2试剂至少含有缓冲液和致敏粒子，添加至被检样品和第1试剂的混合物中，此时，所述测定值降低抑制剂包含于上述第1试剂中。此时，对第1试剂中的测定值降低抑制剂的浓度没有特定的限定，但通常为0.01-5% (w/v)，优选为0.01-1% (w/v)左右。除了这些试剂，也可以使用稀释液稀释被检样品。

下面通过实施例更具体地说明本发明。但本发明并不限于下述实施例。

实施例1

试剂

配制由以下组成构成的肌红蛋白测定用胶乳比浊用试剂。

第1试剂

170 mM 甘氨酸缓冲液 pH 7.0
50 mM EDTA
100 mM 氯化钠
0.3% 聚茴香脑磺酸钠盐 (分子量 4 万)

第2试剂

Mb-胶乳 [生研] / 胶乳悬浮液 (デンカ生研公司制造)

实施例2

试剂

配制由以下组成构成的肌红蛋白测定用胶乳比浊用试剂。

第1试剂

170 mM 甘氨酸缓冲液 pH 7.0
50 mM EDTA
100 mM 氯化钠
0.3% 聚苯乙烯对磺酸钠盐 (分子量 1 万 4 千)

第2试剂

Mb-胶乳 [生研] /胶乳悬浮液 (デンカ生研公司制造)

(比较例1)

试剂

作为比较用试剂, 配制了第1试剂中不含聚茴香脑磺酸钠盐和聚苯乙烯对磺酸钠盐并由以下组成构成的肌红蛋白测定用胶乳比浊用试剂。

第1试剂

170 mM 甘氨酸缓冲液 pH 7.0

50 mM EDTA

100 mM 氯化钠

第2试剂

Mb-胶乳 (生研) /胶乳悬浮液 (デンカ生研公司制造)

实施例1、实施例2和比较例1的第1试剂和第2试剂使用的缓冲液可以使用磷酸缓冲液, グッド缓冲液等, 对于pH, 可使用缓冲液的优选pH。

测定例

被检样品 随机抽取的临床检体1例 (血清)

检测方法 样品调制 用生理盐水作为稀释液将被检样品稀释为稀释浓度1/10 (稀释10倍) -10/10 (不稀释) 的级别。

测定方法 利用东芝TBA-30R型自动分析装置的测定

利用自动分析装置的测定

使用实施例1、实施例2和比较例1的各试剂进行测定。在上述调制的样品20 μL 中添加200 μL 第1试剂, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌混合, 放置5分钟后, 加入100 μL 第2试剂, 进一步在37 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌混合, 然后按570 nm的吸光度变化量测定约2分钟的凝集反应。然后在相同条件下测定预先已知浓度的样品, 作成表示浓度和吸光度变化量的关系的标准曲线。根据第1试剂中的测定值降低抑制剂的有无, 比较求出的各测定值 (ng/mL)。

结果示于下表1。表1中的“理论值”是以各例中可忽略共存的干扰物质引起的测定值降低作用的稀释浓度1/10 (10倍稀释) 的测定值为基准, 将其与稀释浓度的分子相乘得到的值 (稀释浓度为10/10时为

10倍；2/10时为2倍）。另外，差（%）指（理论值-测定值）/理论值×100（%），差（%）越小，表示与理论值的偏差越小。

表 1

稀释 浓度	比较例 1			实施例 1			实施例 2		
	测定值	理论值	差(%)	测定值	理论值	差(%)	测定值	理论值	差(%)
1/10	63	63	0%	61	61	0%	63	63	0%
2/10	114	126	10%	121	122	1%	124	126	2%
3/10	152	189	20%	181	183	1%	186	189	2%
4/10	200	252	21%	238	244	2%	239	252	5%
5/10	233	315	26%	296	305	3%	299	315	5%
6/10	287	378	24%	354	366	3%	361	378	4%
7/10	316	441	28%	416	427	4%	422	441	4%
8/10	357	504	29%	471	488	3%	486	504	4%
9/10	398	567	30%	526	549	4%	542	567	4%
10/10	424	630	33%	581	610	5%	603	630	4%

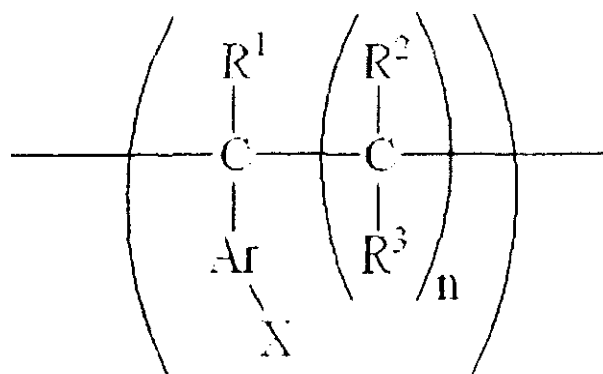
（测定值、理论值单位：ng/ml）

如表 1 所示，对于不含有测定值降低抑制剂的比较例 1，没有稀释的样品（稀释浓度为 10/10）的理论值与测定值的差达到 33%，与此相对，本发明的实施例 1 以及 2 中，在即使没有稀释的条件下，差也为 5% 或 4%。这些结果表明，通过添加本发明的测定值降低抑制剂，理论值和测定值的差变小，通过降低干扰物质的影响大幅度提高了测定值的准确性。

专利名称(译)	免疫测定法用测定值降低抑制剂及使用其的免疫测定法		
公开(公告)号	CN1926432A	公开(公告)日	2007-03-07
申请号	CN200580006266.6	申请日	2005-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	皆川康纪 斋藤美千惠 松井宽史		
发明人	皆川康纪 斋藤美千惠 松井宽史		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/536 G01N33/52		
CPC分类号	G01N33/52 G01N33/5306		
代理人(译)	孙秀武 吴娟		
优先权	2004051184 2004-02-26 JP		
其他公开文献	CN1926432B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了可抑制被检样品中的干扰物质的影响并使免疫测定法的准确性提高的免疫测定法用测定值降低抑制剂、以及使用其的抑制干扰物质引起的测定值降低的免疫测定法和免疫测定法用试剂。用于抑制干扰物质引起的测定值降低的免疫测定法用测定值降低抑制剂含有离子型表面活性剂，所述离子型表面活性剂为具有离子性官能团的疏水性环状单体聚合而成的聚合物，分子量为1000 - 10万。



[1]