

(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2007-127438

(P2007-127438A)

(43) 公開日 平成19年5月24日(2007.5.24)

(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 8 1 J	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 W	
	GO 1 N 33/543 5 0 1 J	
	GO 1 N 33/531 B	
	GO 1 N 33/543 5 8 7	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-318348 (P2005-318348)	(71) 出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22) 出願日	平成17年11月1日(2005.11.1)	(74) 代理人	100086586 弁理士 安富 康男
		(74) 代理人	100119529 弁理士 諸田 勝保
		(72) 発明者	李 艶 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	赤峰 隆之 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 非特異反応抑制剤、免疫学的測定試薬免疫測定方法及び非特異反応抑制剤の製造方法

(57) 【要約】

【課題】免疫測定を行う場合に生じる非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な非特異反応抑制剤、免疫測定試薬、及び、免疫測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原を平均粒子径0.05~0.5 μmの担体に担持した免疫測定粒子を使用する免疫測定方法に用いられる非特異反応抑制剤であって、被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を有機溶媒存在下で担持した不溶性担体からなり、前記不溶性担体の平均粒子径は、前記担体の平均粒子径よりも小さい非特異反応抑制剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原を平均粒子径 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の担体に担持した免疫測定粒子を使用する免疫測定方法に用いられる非特異反応抑制剤であって、

被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を有機溶媒存在下で担持した不溶性担体からなり、

前記不溶性担体の平均粒子径は、前記担体の平均粒子径よりも小さい

ことを特徴とする非特異反応抑制剤。

【請求項 2】

被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原を平均粒子径 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の担体に担持した免疫測定粒子と、請求項 1 記載の非特異反応抑制剤とを含有することを特徴とする免疫測定試薬。

【請求項 3】

免疫測定粒子には、更にブロッキング剤が担持されており、前記ブロッキング剤と、免疫学的に反応しない抗原とは同じ物質であることを特徴とする請求項 2 記載の免疫測定試薬。

【請求項 4】

請求項 2 又は 3 記載の免疫測定試薬を用いてなることを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 5】

被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原を平均粒子径 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の担体に担持した免疫測定粒子を使用する免疫測定方法に用いられる非特異反応抑制剤の製造方法であって、

被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を有機溶媒存在下で不溶性担体に担持させる

ことを特徴とする非特異反応抑制剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫測定を行う場合に生じる非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な非特異反応抑制剤、免疫測定試薬、免疫測定方法及び非特異反応抑制剤の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、血液、尿等に含まれる微量物質の測定に免疫測定方法が広く用いられている。免疫測定方法は、抗原抗体反応の特異的な強い結合に基づいており、種々の物質が潜在する試料からでも、目的物質を特異的に感度良く測定することが可能である。しかしながら、このような免疫測定法では、血清等の検体と反応させた場合に、被測定物質である抗原を含む陽性検体のみならず、これら抗原を含まない陰性検体に対しても反応を起こし、陽性と判定されることがあった。

【0003】

このような非特異反応が起こる理由は明らかではないが、原因の 1 つとして、血清中に含まれる補体等の因子の影響が考えられている。また、不溶性担体に測定物質に対する抗原を固定化する際に変成した抗原の Fc 部分に、被検液中のリウマチ因子が反応し、非特異凝集を惹起する場合や、不溶性担体を懸濁させる緩衝液に、不活性なタンパク質（ウシ血清アルブミン等）を安定剤として添加する際に、使用する試薬のグレードによって、不純物が多く含まれていたり、ある種のタンパク質分解酵素が含まれていたりする場合には、正・負の誤差を含めて、正確な測定ができない場合が多かった。

【0004】

非特異反応を抑制することを目的として、検体をグリシン等の緩衝液で希釈する方法や、

10

20

30

40

50

血清中の補体を失活させる非動化処理と呼ばれる方法が従来から行われている。しかし、このような処理では、非特異反応を十分に抑制することが困難であり、また、免疫測定方法の操作が煩雑化するという問題があった。また、動物の変成グロブリンを添加したり、タンパク質分解酵素阻害剤を添加する方法も報告されているが、これらはいずれも、変成条件の設定が微妙で安定した変成グロブリンの製造が困難であったり、コストが高くつく等の問題があり、いずれも非特異反応の抑制という点では不十分であった。

【0005】

このような問題を解決するため、特許文献1には、非特異反応の抑制を目的として、特異的に反応する粒子よりも小さい粒子に被測定物質と免疫学的に反応しない抗体又は抗原を固定したものを添加する方法が開示されている。また、特許文献2には、非特異反応を抑制

10

【特許文献1】特許第3623657号公報

【特許文献2】特開平11-23573号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記現状に鑑み、免疫測定を行う場合に生じる非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な非特異反応抑制剤、免疫測定試薬、及び、免疫測定方法を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原を、平均粒子径0.05~0.5 μ mの担体に担持した免疫測定粒子を使用する免疫測定方法に用いられる非特異反応抑制剤であって、被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を有機溶媒存在下で担持した不溶性担体からなり、前記不溶性担体の平均粒子径は、前記担体の平均粒子径よりも小さい非特異反応抑制剤である。

以下に、本発明を詳述する。

30

【0008】

本発明者らは、鋭意検討の結果、非特異反応の抑制を目的として添加する粒子の不溶性担体として、免疫測定粒子の担体よりも小さいものを用いることに加えて、有機溶媒存在下で被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を不溶性担体に担持することにより、非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な非特異反応抑制剤が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

本発明の非特異反応抑制剤は、被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を有機溶媒存在下で担持した不溶性担体からなるものである。

【0010】

上記被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体とは、被測定物質である抗原に特異的な反応性を持たない抗体のことをいい、このような抗体としては、例えば、ヒト由来の血液や尿等の検体を対象に免疫測定を行う場合であれば、ヒト以外の正常動物血清由来の抗体等が挙げられる。

40

【0011】

上記被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体は、一般的に用いられている方法で断片化されてもよい。上記断片化の方法としては、通常、各種酵素により抗体分子を分解する方法が挙げられ、例えば、パパイン等による分解ではFab断片が得られ、また、ペプシン等による分解ではF(ab)₂断片が得られる。

【0012】

50

また、上記被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体と、免疫測定において使用する免疫測定粒子に用いられる被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体（以下、特異抗体ともいう）とは、同じ酵素によって断片化されたものを用いることが好ましい。例えば、上記特異抗体として、被測定物質に特異的反応性をもつ、家兎由来のサブクラス I g G 抗体をペプシン処理によって断片化し、カラムクロマトグラフィー（ゲルろ過）及びアフィニティークロマトグラフィーによって精製した F (a b) 2 断片を用いる場合、本発明の非特異反応抑制剤に用いる被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体としては、被測定物質に特異的反応性をもたない、家兎由来のサブクラス I g G の抗体をペプシン処理によって断片化し、カラムクロマトグラフィー（ゲルろ過）によって精製した F (a b) 2 断片を使用することが好ましい。

10

【 0 0 1 3 】

上記被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗原とは、被測定物質である抗体に特異的な反応性を持たない抗原のことをいい、このような抗原としては、例えば、ウシ血清アルブミン（ B S A ）、カゼイン、カザミノ等が挙げられる。上記被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗原としては、後述する免疫測定粒子において使用されるブロッキング剤や、免疫測定試薬に安定化剤として用いられているものと同ーでも異なるものであってもよい。また、上記被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗原としては、熱処理されたものを用いてもよい。

【 0 0 1 4 】

本発明の非特異反応抑制剤は、上記抗体又は抗原を有機溶媒存在下で不溶性担体に担持させたものである。具体的には例えば、不溶性担体の水溶液に有機溶媒を添加した後、被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を感作させることにより、不溶性担体表面に物理的に吸着させる。このような方法を用いて抗体又は抗原を担持させることにより、検体中の非特異反応誘起物質との反応がより顕著となり、更に非特異反応の抑制効果を向上させることが可能となる。

20

【 0 0 1 5 】

上記有機溶媒としては、不溶性担体を溶解又は変性させないものであれば特に限定されず、例えば、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等が挙げられる。また、上記有機溶媒の濃度は、担持を行う際の反応溶液全体に対して好ましい下限が 1 %、好ましい上限が 5 0 % である。1 % 未満であると、非特異反応の抑制効果が不充分となることがある。5 0 % を超えると、有機溶媒に免疫的に反応しない物質が析出し、非特異反応抑制剤が調製できなくなることがある。

30

【 0 0 1 6 】

また、本発明の非特異反応抑制剤は、懸濁用媒体に懸濁させた状態とすることが好ましい。上記懸濁用媒体としては、被測定物質の種類、使用される測定原理、測定方法に応じた各種緩衝液が用いられ、測定物質を失活させることがなく、かつ、抗原抗体反応を阻害しないようなイオン濃度や p H を有する緩衝液であれば特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、トリス - 塩酸緩衝液、グリシン緩衝液等が挙げられる。好ましくは、グッド緩衝液群に属するものであり、例えば、トリス（ヒドロキシ）アミノメタン及びスルホン酸基を有するものである。より好ましくは、2 - ヒドロキシ - N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸（ T A P S O ）、N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸（ T A P S ）、N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 2 - アミノプロパンスルホン酸（ T E S ）等が挙げられる。

40

【 0 0 1 7 】

上記緩衝液には、被測定物質を失活させることなく、かつ、抗原抗体反応を阻害しない範囲で添加剤を用いてもよい。このような添加剤としては、例えば、特異性を高めるための塩化コリン等の第 4 級アンモニウム塩；反応促進剤；アルブミン、ショ糖等の安定化剤；感度を高める効果が期待されるポリエチレングリコール、デキストラン等の水溶性多糖類；防腐剤としてアジ化ナトリウム；塩濃度調整のための塩化ナトリウム等を適宜添加することもできる。

50

【0018】

上記緩衝液のpHの好ましい下限は7.0、好ましい上限は8.5であり、より好ましい下限は7.5、より好ましい上限は8.0である。

【0019】

上記不溶性担体の平均粒子径は、免疫測定粒子に用いる担体の平均粒子径よりも小さいものであれば特に限定されず、免疫測定粒子に用いられる担体の形状、大きさ、検出方法、測定機器等によって適宜選択されるが、好ましい下限は0.01 μ m、好ましい上限は0.25 μ mである。0.01 μ m未満であると、非特異反応抑制剤として調製する際、非常に手間がかかる場合がある。0.25 μ mを超えると、不溶性担体の単位重量当たりの表面積が小さくなり、担体数を多くしないと非特異反応の抑制効果が充分でなかったり、その不溶性担体が示すシグナルに対して、被測定物質である抗原又は抗体と、免疫測定粒子との特異的反応を示すシグナルが小さくなったりして、結果として検出感度が悪化することがある。また、本発明の非特異反応抑制剤の濃度が比較的濃い場合には、免疫測定を行う場合にバックグラウンドが大きくなってしまふことがあるため、更に小さい粒子径の不溶性担体を用いることが好ましい。

10

【0020】

上記不溶性担体の形状は、その調製のしやすさや使用簡便性から球状粒子が好ましい。なお、本発明においては、抗体の吸着性に優れており、かつ、生物学的活性を長期間安定に保持できる等の理由から、ラテックスからなる不溶性担体であることが好ましく、ポリスチレン系のラテックス粒子であることがより好ましい。

20

【0021】

上記不溶性担体の材質としては、従来より免疫化学的凝集反応及び凝集阻止反応において、微粒子の担体に一般的に用いられているもの等が挙げられ、工業的に大量生産が可能な有機系微粒子が好ましいが、これに限定されるものではない。上記工業的に大量生産が可能な有機系微粒子としては、例えば、スチレン、塩化ビニル、アクリロニトリル、酢酸ビニル、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル等のビニル系モノマーを重合させてなる単一重合体及び共重合体（ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体等）からなる微粒子；スチレン-ブタジエン共重合体、メチルメタクリレート-ブタジエン共重合体、アクリロニトリル-ブタジエン共重合体等のブタジエン系共重合体からなる微粒子；不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストラン等の有機系高分子からなる微粒子；官能基としてカルボキシル基、1級アミノ基、カルバモイル基（-CONH₂）、水酸基、アルデヒド基等を有し、かつ、基体が上記有機系微粒子からなる反応性有機系微粒子等が挙げられる。なお、上記不溶性担体の材質は、後述する免疫測定粒子に用いられる担体の材質と同じものを用いることが好ましい。

30

【0022】

本発明の非特異反応抑制剤を用いて測定可能な被測定物質としては、生体試料中に含まれる生理活性物質であり、抗原抗体反応を利用して測定し得る物質であれば特に限定されず、例えば、タンパク質、糖タンパク質、脂質タンパク質、レセプター、酵素、ウイルス抗原・抗体等が挙げられ、具体的には、CRP、ヒトフィブリノーゲン、リウマチ因子、アルファ₁-フェトプロテイン（AFP）、HBs抗原、フェリチン、抗ストレプトリジンO抗体、梅毒トレポネーマ抗体、梅毒脂質抗原に対する抗体、HBs抗体、HBc抗体、HBe抗体等が挙げられる。

40

【0023】

このように、免疫測定を行う場合に生じる非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な本発明の非特異反応抑制剤は、被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原を有機溶媒存在下で不溶性担体に担持させることにより製造することができる。このような非特異反応抑制剤の製造方法もまた本発明の1つである。

【0024】

本発明の非特異反応抑制剤と、被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原を、

50

平均粒子径 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の担体に担持した免疫測定粒子とを併用することと免疫測定試薬とすることができる。このような免疫測定試薬もまた本発明の1つである。

【0025】

上記免疫測定粒子は、被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体又は抗原（以下、特異抗体又は特異抗原ともいう）を、平均粒子径 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の担体に担持したものである。

【0026】

上記被測定物質に対して免疫学的に反応する抗体としては、例えば、モノクローナル抗体であってもよいし、免疫源を通常のウサギ、マウス、馬、ヤギ等の動物に接種することによって得られるポリクローナル抗体であってもよい。上記モノクローナル抗体は、細胞融合技術分野において、それ自体公知の手法を適宜に選択し、またそれらを組み合わせてモノクローナル抗体産生融合細胞株を形成し、該細胞株を利用して産生、取得できる。また、上記被測定物質に対して免疫学的に反応する抗原としては特に限定されず、免疫原性を有する物質以外にハプテンであってもよい。

10

【0027】

上記免疫測定粒子には、更にブロッキング処理が行われていることが好ましい。上記ブロッキング処理とは、特異抗体又は特異抗原を担体に担持した後、試料中のタンパク質等が担体へ非特異的に吸着するのを防止するために、特異抗体又は特異抗原に対して免疫学的に反応しないタンパク質等を更に結合させることをいう。

上記ブロッキング処理に用いられるブロッキング剤としては、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン等が挙げられる。

20

【0028】

上記ブロッキング剤と、非特異反応抑制剤に用いる免疫学的に反応しない抗原とは同じ物質であることが好ましい。

上記ブロッキング剤として用いられる物質は、免疫学的に不活性であり、被測定物質である抗原又は抗体と特異的な反応性をもたないが、血清中の非特異反応誘起物質と反応する場合がある。また、不溶性担体との相互作用や結合反応の副反応によって、何らかの変性を受けている場合があり、このような変性が原因で、血清中の非特異反応誘起物質と反応が起こってしまう場合がある。

しかしながら、上記ブロッキング剤と、非特異反応抑制剤に用いる免疫学的に反応しない抗原とを同じ物質とすることにより、このような場合であっても、上記抗原が血清中の非特異反応誘起物質と反応を起こし、非特異反応が阻害（抑制）されると考えられる。

30

【0029】

また、上記ブロッキング剤として、ウシ血清アルブミンを用いる場合、予めウシ血清アルブミンを熱変性させたものを用いることが好ましい。ここで、熱処理による変性具合は熱処理時の温度と変性時間によって変化するため、熱処理時の温度が比較的低い場合には変性させる時間を長くする必要があり、該温度が高い場合には処理時間を短くする必要がある。

【0030】

上記免疫測定粒子の平均粒子径の下限は $0.05 \mu\text{m}$ 、上限は $0.5 \mu\text{m}$ である。上記範囲内であれば、担体に担持された特異抗体又は特異抗原と被測定物質との抗原抗体反応により惹起される凝集反応の結果生じた凝集塊を肉眼又は光学的に検出することが可能となる。

40

【0031】

本発明の免疫測定試薬は、その添加方法によって、非特異反応抑制効果、使用簡便性等の観点からその剤型を選択する。具体的には例えば、本発明の非特異反応抑制剤と、上記免疫測定粒子とを同一の媒体に分散させることにより1液系の試薬として使用してもよく、また、本発明の非特異反応抑制剤を含有する第1試薬と、上記免疫測定粒子を媒体に添加した緩衝液からなる第2試薬とで構成された2液系の試薬として使用してもよい。

【0032】

50

本発明の免疫測定試薬を用い、検体中の被測定物質との抗原抗体反応により生じる凝集の度合いを光学的に測定又は目視にて観察することにより、検体中の被測定物質を測定することができる。このような免疫測定方法もまた本発明の1つである。具体的には、本発明の免疫測定試薬が1液系の試薬である場合は、検体に本発明の免疫測定試薬を添加し、抗原抗体反応を生じさせることにより、検体中の被測定物質を測定することができ、本発明の免疫測定試薬が2液系の試薬である場合には、本発明の非特異反応抑制剤を含有する第1試薬を検体に添加した後、更に免疫測定粒子を媒体に添加した緩衝液からなる第2試薬を添加することで、抗原抗体反応を生じさせ、検体中の被測定物質を測定することができる。

【0033】

10

本発明の免疫測定方法において、非特異反応抑制剤の添加量としては、不溶性担体に担持された被測定物質に対して免疫学的に反応しない抗体又は抗原の量、不溶性担体の大きさ、種類及び平均粒子径、免疫測定粒子の濃度、種類及び平均粒子径、検出方法、並びに、測定機器や、非特異反応抑制効果の程度、免疫測定粒子との抗原抗体反応への妨害の有無、使用簡便性等の観点から適宜選ばれる。

【0034】

本発明の免疫測定試薬が1液系試薬である場合、非特異反応抑制剤の添加量の好ましい下限は、抗原抗体反応液全体に対して0.001重量%、好ましい上限は20重量%である。0.001重量%未満であると、非特異反応の抑制効果が不充分となることがある。20重量%を超えると、不溶性担体が示すシグナルに対して、被測定物質である抗原又は抗体と特異抗体又は特異抗原を固定化した不溶性担体との特異的反応を示すシグナルが小さくなり、結果として検出感度が悪くなることがある。

20

【0035】

本発明の免疫測定試薬が2液系試薬である場合、上記非特異反応抑制剤の添加量は、後に抗原抗体反応を行う際に添加されるそのラテックス液の濃度と併せて、検出系の測定上限を越えない範囲であれば、特に限定されない。例えば、分光光度計による検出を行う際には、反応終了後の吸光度が3.0を超えない範囲であればよい。プレート上で肉眼判定する場合では特に限定されない。

【0036】

本発明の免疫測定方法を行う場合の測定条件としては、上記免疫測定粒子と、被測定物質である抗原又は抗体を含む試料との抗原抗体反応が起こりうる条件であれば、特に限定されないが、測定温度については恒温で行うことが好ましく、特に25 ~ 37で行うのが好ましい。測定時間についても特に限定されないが、5秒 ~ 15分が好ましい。

30

【0037】

上記免疫測定粒子の凝集の程度を測定する方法としては、特に限定されず公知の方法を用いることができる。上記凝集を定量的に測定する場合、簡便性及び精度の点から、例えば、光学的に測定することが好ましく、具体的には、不溶性担体の大きさ、その濃度の選択、反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度又は透過光強度を光学機器を用いて測定することが好ましい。上記測定に用いる光の波長としては、300 ~ 1200 nmが好ましい。

40

【発明の効果】**【0038】**

本発明によれば、免疫測定を行う場合に生じる非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な非特異反応抑制剤、免疫測定試薬、及び、免疫測定方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0039】**

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0040】

50

(実施例1)

(1) 緩衝液 (第1試薬)

(1-1) 非特異反応抑制剤の調製

平均粒子径が $0.05 \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス (固形分 10 重量%、積水化学工業社製) 1.0 mL にエタノールを 3 mL 入れ、室温で 30 分間攪拌した。次いで、この液にウシ血清アルブミン (以下、ウシ血清アルブミンのことを BSA という) を 5.0 重量% 含有したリン酸塩緩衝食塩水 (以下、リン酸塩緩衝食塩水のことを PBS ともいう) を 30 mL 添加し、室温にて 120 分間攪拌した後、 $30,000 \text{rpm}$ で遠心分離することにより洗浄した。得られた沈殿物にリン酸塩濃度 25mM の PBS を 10 mL 添加し、ラテックス粒子を懸濁させ、非特異反応抑制剤を調製した。

10

【0041】

(1-2) 緩衝液 (第1試薬) の調製

1.0 (W/V)% のプルラン (林原社製)、1.0 (W/V)% の BSA を含有する PBS (pH 6.5、リン酸塩濃度 25mM) に、0.9 (W/V)% 塩化ナトリウムと 0.1 (W/V)% アジ化ナトリウムを添加した緩衝液に、(1-1) で調製した非特異反応抑制剤を 5 重量% となるように添加し、緩衝液 (第1試薬) とした。

【0042】

(2) 脂質抗原感作ラテックス試薬 (第2試薬)

(2-1) 脂質抗原液の調製

カルジオリピンのエタノール溶液 (5mg/mL 、シグマ社製) 2 mL、精製レシチン (ナカライテスク社製) のエタノール溶液 (10mg/mL) 10 mL 及びコレステロール (ナカライテスク社製) のエタノール溶液 (10mg/mL) 3 mL を混合し、脂質抗原液を得た。

20

【0043】

(2-2) 脂質抗原感作ラテックス試薬 (第2試薬) の調製

ポリスチレンラテックス (平均粒子径 $0.4 \mu\text{m}$ 、10 (W/V)%、積水化学工業社製) $100 \mu\text{L}$ に、(2-1) で調製した脂質抗原液 $250 \mu\text{L}$ を一気に添加し、そのまま 37 で緩やかに 2 時間攪拌した。次に 5 (W/V)% 濃度で BSA を含む PBS (pH 6.5、リン酸塩の濃度 100mM) 3 mL を一気に添加し、更に 1 時間、37 で攪拌した。 15000rpm 、4 で 30 分間遠心分離し、上清を除き、沈殿したラテックス粒子を 1 (W/V)% 濃度で BSA を含む PBS 2 mL に再び懸濁した。この操作を 2 回繰り返してラテックス粒子を洗浄し、最後に 10mM 濃度で EDTA・4Na、 500mM 濃度で塩化コリンを含む PBS 10 mL に懸濁させて脂質抗原感作ラテックス試薬 (第2試薬) とした。

30

【0044】

(実施例2)

エタノールの添加量を 12 mL として非特異反応抑制剤を調製した以外は実施例1と同様にして、緩衝液 (第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬 (第2試薬) を調製した。

【0045】

(実施例3)

実施例1と同様の方法で非特異反応抑制剤を調製した後、(1-2) 緩衝液 (第1試薬) の調製において、非特異反応抑制剤を 10 重量% となるように添加した以外は実施例1と同様にして、緩衝液 (第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬 (第2試薬) を調製した。

40

【0046】

(実施例4)

実施例2と同様の方法で非特異反応抑制剤を調製した後、(1-2) 緩衝液 (第1試薬) の調製において、非特異反応抑制剤を 10 重量% となるように添加した以外は実施例1と同様にして、緩衝液 (第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬 (第2試薬) を調製した。

50

【0047】

(実施例5)

(1-1) 非特異反応抑制剤の調製

平均粒子径が $0.05\ \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0 mLにエタノールを3 mL入れ、室温で30分間攪拌した。次いで、BSAを5.0重量%含有するPBSを、56 で10分間熱変性させたもの30 mLを添加し、室温にて120分間攪拌した後、30,000 rpmで遠心分離することにより洗浄した。得られた沈殿物にリン酸塩濃度25 mMのPBSを10 mL添加し、ラテックス粒子を懸濁させ、非特異反応抑制剤を調製した。

【0048】

上述の方法を用いて、非特異反応抑制剤を調製した以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0049】

(比較例1)

(1-2) 緩衝液(第1試薬)の調製において、非特異反応抑制剤を添加しなかった以外は、実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)及び脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0050】

(比較例2)

(1-2) 緩衝液(第1試薬)の調製において、1.0 (W/V)%濃度でプルラン(林原社製)、1.0 (W/V)% BSAを含有するPBS(pH6.5,リン酸塩濃度25 mM)に、0.9 (W/V)%塩化ナトリウムと0.1 (W/V)%アジ化ナトリウムを添加した緩衝液に、BSAを5.0重量%含有するPBSを、56 で10分間熱変性させたものを添加することにより、緩衝液(第1試薬)を調製した以外は、実施例1と同様にして緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0051】

(比較例3)

(1-1) 非特異反応抑制剤の調製

平均粒子径が $0.05\ \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0 mLに、BSAを5.0重量%含有したPBSを30 mL添加し、室温にて120分間攪拌した後、30,000 rpmで遠心分離することにより洗浄した。得られた沈殿物にリン酸塩濃度25 mMのPBSを10 mL添加し、ラテックス粒子を懸濁させ、非特異反応抑制剤を調製した。

【0052】

上述の方法を用いて、非特異反応抑制剤を調製した以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0053】

(比較例4)

(1-1) 非特異反応抑制剤の調製

平均粒子径が $0.05\ \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0 mLに、BSAを5.0重量%含有するPBSを、56 で10分間熱変性させたもの30 mLを添加し、室温にて120分間攪拌した後、30,000 rpmで遠心分離することにより洗浄した。得られた沈殿物にリン酸塩濃度25 mMのPBSを10 mL添加し、ラテックス粒子を懸濁させ、非特異反応抑制剤を調製した。

【0054】

上述の方法を用いて、非特異反応抑制剤を調製した以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0055】

(評価)

実施例1~5及び比較例1~4で得られた緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス

10

20

30

40

50

試薬（第2試薬）について、以下の方法で評価した。

梅毒陰性血清 $20\ \mu\text{l}$ に、緩衝液（第1試薬） $180\ \mu\text{l}$ を混合し、 37°C で5分間保持した後、脂質抗原感作ラテックス試薬（第2試薬） $60\ \mu\text{l}$ を添加攪拌し、測定波長 $700\ \text{nm}$ で添加後1分間及び5分間の吸光度変化を、日立7170型生化学自動分析機を用いて測定した。そして、得られた吸光度変化から、予め作成した検量線に基づき測定値を求めた。

検量線は既知濃度の標準品を同一条件で測定し、濃度と吸光度変化量の関係を求めることにより作成した。判定基準は、測定値が $1.0\ \text{RU}$ 未満の場合を陰性とし、 $1.0\ \text{RU}$ 以上の場合は、実際は陰性であるにもかかわらず、何らかの物質と反応して誤判定されたものと考えられることから、偽陽性とした。結果を表1に示す。

【0056】

【表 1】

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4
不溶性担体の 粒子径 (μm)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	-	-	0.05	0.05
有機溶媒の種類	エタノール	エタノール	エタノール	エタノール	エタノール	-	-	-	-
有機溶媒の含有量 ($(\text{W}/\text{V})\%$)	10	40	10	40	10	-	-	-	-
熱変性BSA	なし	なし	なし	なし	あり	なし	あり	なし	あり
非特異反応抑制剤 添加量 (重量%)	5	5	10	10	5	-	-	5	5
測定値	0.8	0.5	0.2	0.2	0.1	7.3	5.3	2.6	1.1
判定結果	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	偽陽性	偽陽性	偽陽性	偽陽性

10

20

30

40

【0057】

表 1 に示すように、実施例 1 ~ 5 は、陰性を示しているのに対し、比較例 1、2 は偽陽性を示していることから、非特異反応抑制剤を添加することにより、非特異反応を効果的に抑制できることが分かる。また、比較例 3、4 は偽陽性を示していることから、非特異反応抑制剤の調製において、有機溶媒を添加しない場合は、十分に非特異反応を抑制することができないことが分かる。

更に、実施例 1 ~ 5 の結果から、有機溶媒添加量の増加や BSA の熱変性によって、非特異反応抑制効果をより向上させることが可能となることが分かる。

50

【0058】

(実施例6)

実施例1の(1-1)非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が $0.22\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0mLを用いた以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0059】

(実施例7)

実施例1の(1-1)非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が $0.15\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0mLを用いた以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

10

【0060】

(実施例8)

実施例1の(1-1)非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が $0.05\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0mLを用いた以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0061】

(比較例5)

実施例1の(1-1)非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が $0.40\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0mLを用いた以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

20

【0062】

(評価)

実施例6~8及び比較例5で得られた緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)について、以下の方法で評価した。

7種類の梅毒陰性血清 $20\mu\text{l}$ に、緩衝液(第1試薬) $180\mu\text{l}$ を混合し、 37°C で5分間保持した後、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬) $60\mu\text{l}$ を添加攪拌し、測定波長 700nm で添加後1分間及び5分間の吸光度変化を、日立7170型生化学自動分析機を用いて測定した。そして、得られた吸光度変化から、予め作成した検量線に基づき測定値を求めた。判定基準は、測定値が 1.0RU 未満の場合を陰性とし、 1.0RU 以上の場合を偽陽性とした。結果を表2に示す。

30

【0063】

【表 2】

(検体No.)		実施例6	実施例7	実施例8	比較例5
不溶性担体の 粒子径(μm)		0.22	0.15	0.05	0.40
有機溶媒の種類		エタノール	エタノール	エタノール	エタノール
有機溶媒の含有量 (W/V%)		10	10	10	10
熱変性BSA		なし	なし	なし	なし
非特異反応抑制剤 添加量(重量%)		5	5	5	5
評価 (上段;測定値、 下段;判定結果)	1	0	0	0	3.91
		陰性	陰性	陰性	偽陽性
	2	0	0	0	3.5
		陰性	陰性	陰性	偽陽性
	3	0	0	0	1.54
		陰性	陰性	陰性	偽陽性
	4	0	0	0	6.35
		陰性	陰性	陰性	偽陽性
	5	0	0	0	2.51
		陰性	陰性	陰性	偽陽性
	6	0.32	0.11	0	6.51
		陰性	陰性	陰性	偽陽性
	7	0.61	0.53	0.32	4.48
		陰性	陰性	陰性	偽陽性

10

20

30

40

50

【0064】

表 2 に示すように、実施例 6 ~ 8 のように、第 2 試薬のラテックス粒子よりも小さい平均粒子径を有するポリスチレンラテックスを用いた場合は、陰性を示すが、比較例 5 のように、第 2 試薬のラテックス粒子と同じ平均粒子径を有するポリスチレンラテックスを用いた場合は、偽陽性となり、非特異反応抑制効果が不十分であった。

【0065】

(実施例 9)

実施例 1 の (1 - 1) 非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が 0.05 μm のポリスチレンラテックス (固形分 10 重量%、積水化学工業社製) 1.0 mL に、エタノール 3 mL の代わりに、プロパノール 3 mL を添加した以外は実施例 1 と同様の方法で非特異反応抑制剤を調製した後、(1 - 2) 緩衝液 (第 1 試薬) の調製において、非特異反応抑制剤を 10 重量% となるように添加した以外は実施例 1 と同様にして、緩衝液 (第 1 試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬 (第 2 試薬) を調製した。

【0066】

(実施例 10)

実施例 1 の (1 - 1) 非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が 0.05 μm のポリスチレンラテックス (固形分 10 重量%、積水化学工業社製) 1.0 mL に、エタノール 3 mL の代わりに、プロパノール 6 mL を添加した以外は実施例 1 と同様にして、緩衝液 (第 1 試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬 (第 2 試薬) を調製した。

【0067】

(実施例 11)

実施例1の(1-1)非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が0.05 μ mのポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0mLに、エタノール3mLの代わりに、プロパノール6mLを添加した以外は実施例1と同様の方法で非特異反応抑制剤を調製した後、(1-2)緩衝液(第1試薬)の調製において、非特異反応抑制剤を10重量%となるように添加した以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0068】

(実施例12)

(1)非特異反応抑制剤の調製

実施例1の(1-1)非特異反応抑制剤の調製において、平均粒子径が0.05 μ mのポリスチレンラテックス(固形分10重量%、積水化学工業社製)1.0mLに、エタノール3mLの代わりに、メタノール3mLを添加した以外は実施例1と同様の方法で非特異反応抑制剤を調製した後、(1-2)緩衝液(第1試薬)の調製において、非特異反応抑制剤を10重量%となるように添加した以外は実施例1と同様にして、緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)を調製した。

【0069】

(評価)

実施例9~12で得られた緩衝液(第1試薬)、脂質抗原感作ラテックス試薬(第2試薬)について、上述した実施例1~5及び比較例1~4の場合と同様の方法で評価した。結果を表3に示した。

【0070】

【表3】

	実施例9	実施例10	実施例11	実施例12
不溶性担体の粒子径(μ m)	0.05	0.05	0.05	0.05
有機溶媒の種類	プロパノール	プロパノール	プロパノール	メタノール
有機溶媒の含有量((W/V)%)	10	10	5	5
熱変性BSA	なし	なし	なし	なし
非特異反応抑制剤添加量(重量%)	5	5	5	10
測定値	0.8	0.8	0.3	0.2
判定結果	陰性	陰性	陰性	陰性

【0071】

表3に示すように、非特異反応抑制剤の調製において、エタノール以外の有機溶媒を用いた場合であっても、顕著な非特異反応抑制効果が見られた。

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明によれば、免疫測定を行う場合に生じる非特異反応を効果的に抑制し、高い検出感度を実現することが可能な非特異反応抑制剤、免疫測定試薬、及び、免疫測定方法を提供することができる。

【手続補正書】

【提出日】平成17年12月14日(2005.12.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

このような非特異反応が起こる理由は明らかではないが、原因の1つとして、血清中に含まれる補体等の因子の影響が考えられている。また、不溶性担体に測定物質に対する抗原を固定化する際に変成した抗体のFc部分に、被検液中のリウマチ因子が反応し、非特異凝集を惹起する場合や、不溶性担体を懸濁させる緩衝液に、不活性なタンパク質（ウシ血清アルブミン等）を安定剤として添加する際に、使用する試薬のグレードによって、不純物が多く含まれていたり、ある種のタンパク質分解酵素が含まれていたりする場合には、正・負の誤差を含めて、正確な測定ができない場合が多かった。

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 33/543 5 8 1 C

