

(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2015-184125

(P2015-184125A)

(43) 公開日 平成27年10月22日(2015. 10. 22)

(51) Int.Cl.

GO 1 N 33/531 (2006.01)

F I

GO 1 N 33/531

テーマコード (参考)

B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2014-60384 (P2014-60384)
(22) 出願日 平成26年3月24日 (2014. 3. 24)

(71) 出願人 000003300
東ソー株式会社
山口県周南市開成町4560番地
(72) 発明者 鈴木 久也
神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ
ー株式会社 東京研究センター内

(54) 【発明の名称】 非特異的反応を抑制した免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】 免疫学的測定法で生じる非特異的反応を抑制する方法を提供することである。

【解決手段】 試料中の抗原又は抗体を測定する免疫学的測定法において、抗原と抗体が反応する際に、リジン、アルギニン又はヒスチジン等の塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩又は塩基性アミノ酸の割合が10%以上のペプチドもしくは蛋白質（例えば塩基性アミノ酸のポリマー、ヒストン又はプロタミン）を共存させることで、非特異的反応を抑制する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中の抗原又は抗体を測定する免疫学的測定法において、抗原と抗体が反応する際に、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩又は塩基性アミノ酸の割合が 10 % 以上のペプチドもしくは蛋白質を共存させることを特徴とする方法。

【請求項 2】

塩基性アミノ酸がリジン、アルギニン又はヒスチジンである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

塩基性アミノ酸塩がリジン塩酸塩、アルギニン塩酸塩又はヒスチジン塩酸塩である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

塩基性アミノ酸の割合が 10 % 以上のペプチドまたは蛋白質が、塩基性アミノ酸のポリマー、ヒストン又はプロタミンである請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、試料中の抗体あるいは抗原を測定する免疫学的測定方法において、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩又は塩基性アミノ酸の割合が 10 % 以上のペプチドもしくは蛋白質を共存させることを特徴とする方法に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

免疫学的測定法は、測定対象物の分析、測定、定量、検出などとして利用されており特に臨床検査薬として広く医療現場で使用されている。この免疫学的測定法は、抗原とその抗原に対する抗体との間の抗原抗体反応を利用するものであるが、その検知、検出を容易にするため様々な手法が開発されてきている。具体的に免疫学的測定法としてはラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、凝集反応免疫測定法などが開発されてきて、現在広く利用されている。

【0003】

この抗原抗体反応にあずかる抗体あるいは抗原は、不溶性の担体に結合されたり、検出可能な方法で標識することが多い。例えば不溶性の担体としてアガロース、ニトロセルロース、デキストランなどの生体由来高分子あるいは天然物由来高分子、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリアクリルアミドなどのアクリル樹脂、テフロン（登録商標）、ポリアセタールなどの合成高分子、ガラス、シリカゲル、アルミナ、セラミック、カーボン、硫酸マグネシウムなどの無機質材料などからなる微粒子、ビーズ、マイクロプレート、マイクロタイターウェル、マイクロチューブ、ストリップ、メンブレン、ゲルなどがあげられる。不溶性担体に固定された抗原または抗体と、分析試料中の抗体又は抗原等とを特異的に結合反応せしめ、特異的に結合した分析対象物である抗体又は抗原を検知することがなされる。検出可能な方法としては、 ^{125}I 、 ^3H などの放射性物質、西洋わさびペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素、フルオレッセインなどの蛍光物質、金コロイド、セレンコロイドなどの発光又は発色物質などで標識された抗原あるいは抗体が試薬として用いられている。

【0004】

このような免疫学的測定法が、臨床検査薬として広く医療現場で使用されているが、B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスのなど感染の有無を確認するためのHBs抗原やHCV抗体の検出や、腫瘍マーカーによる癌の診断などにおいて、カットオフ値を基準にして判断する場合は、測定値が乖離値を示すことは医療現場において致命的な問題である。

【0005】

このような乖離値は、免疫学的測定法に用いられる抗原あるいは抗体と測定サンプル中の成分間で起こる非特異的な反応によるものであり、従来、不溶性担体の表面や標識抗体

10

20

30

40

50

の遊離結合部位をブロックするためのブロッキング剤を使用することが提案されているが、十分ではないため、非特異的反応に起因する乖離値を無くすることが強く求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

先に述べたように免疫学的測定法は、医療現場では広く使われている反面、非特異的反応に起因する乖離値によって判断を誤ることもある。特にHCV抗体、HBs抗体、TP (Treponema pallidum) 抗体のような感染症抗体の検出に用いられるイムノアッセイでは天然抗原だけではなくリコンビナント抗原を用いられる例が多く、不溶性担体に固定された抗原と分析対象の抗体以外の抗体との非特異的に結合反応が起こることがある。過去には、非特異的な相互作用を最少にするために、不溶性担体の表面や標識抗体の遊離結合部位をブロックするためのブロッキング剤として、ウシ血清アルブミン、カゼイン、ゼラチン等のたんぱく質、Triton X-100、Tween 20などの界面活性剤を用いたりする手法が使用されていた。しかしながら、依然、非特異的反応はイムノアッセイ技術における問題として残っている。本発明の目的は、イムノアッセイで生じる非特異的反応を抑制する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、鋭意検討した結果、試料中の抗体あるいは抗原を検出するための免疫測定において、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩または塩基性アミノ酸を多く含むペプチドあるいは蛋白質を添加することによって、非特異的反応を抑制しうることを見出し、本発明に到達した。

【0008】

即ち本発明は以下の通りである。

(1) 試料中の抗原又は抗体を測定する免疫学的測定法において、抗原と抗体が反応する際に、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩又は塩基性アミノ酸の割合が10%以上のペプチドもしくは蛋白質を共存させることを特徴とする方法。

(2) 塩基性アミノ酸がリジン、アルギニン又はヒスチジンである(1)に記載の方法。

(3) 塩基性アミノ酸塩がリジン塩酸塩、アルギニン塩酸塩又はヒスチジン塩酸塩である(1)に記載の方法。

(4) 塩基性アミノ酸の割合が10%以上のペプチドまたは蛋白質が、塩基性アミノ酸のポリマー、ヒストン又はプロタミンである(1)に記載の方法。

【0009】

以下に本発明を更に詳細に説明する。

【0010】

本発明において、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩又は塩基性アミノ酸の割合が10%以上のペプチドもしくは蛋白質(以下、非特異的反応抑制剤ともいう)は一般に市販で入手可能であり、単独または組み合わせて使用することができる。本発明に用いられる非特異的反応抑制剤の量は、免疫反応液中に好ましくは0.1から10w/v%、さらに好ましくは0.5から5w/v%である。

【0011】

塩基性アミノ酸としては特に限定はないが、好ましくはリジン、アルギニン又はヒスチジンである。また塩基性アミノ酸塩としては特に限定はなく、塩酸塩、硝酸塩、硫酸塩等が用いられるが、好ましくは塩酸塩である。塩基性アミノ酸の割合が10%以上のペプチドまたは蛋白質とは、塩基性アミノ酸の含有量が高いペプチド又は蛋白質を意味し、例えば塩基性アミノ酸のポリマー、ヒストン又はプロタミン等があげられる。

【0012】

本発明では、標識を用いることができる。標識としては、例えば酵素、蛍光物質、ラジオアイソトープなどいずれでも効果がある。また、直接これらの物質を検出に用いる物質

10

20

30

40

50

に標識せず、ビオチン-アビジン等を利用して間接的に標識してもよい。抗原に結合した標識物質を検出することは、例えば、公知の酵素免疫測定法（E I A、E L I S A）、放射免疫測定法（R I A）、蛍光免疫測定法（F I A）又は発光免疫測定法（L I A）等により行うことができる。

【0013】

本発明においては、不溶性担体を用いることができる。不溶性担体に関しては、よく知られているガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、デキストランなどの物質からなるビーズ、チューブ、プレート、磁性微粒子など用いることができ、反応後にB/F分離可能な担体が好ましく、その材質などは問わない。また、不溶性担体と抗体（あるいはレセプター、結合蛋白質）との結合は、物理的結合あるいは化学的に中間体を介した結合等、B/F分離時に結合能が失われない方法が好ましい。

10

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸塩および塩基性アミノ酸を多く含むペプチドあるいは塩基性アミノ酸を多く含む蛋白類を共存させるという簡便な操作で、いわゆるブロッキング剤を用いなくても免疫学的測定で生じる非特異的免疫反応を抑制することが可能となる。本発明に用いられる非特異的反応抑制剤は一般に市販で入手可能であり、また良く知られている材料であり、単独または組み合わせて使用することができる。

【実施例】

【0015】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は本実施例により限定されるものではない。

20

【0016】

実施例1

免疫測定装置としてA I A-1800自動免疫測定装置（東ソー社製）を用い、1ステップ競合法によりTP抗体の測定を行った。具体的には、まず3種類のTP抗原（15 kDa, 17 kDa, 47 kDa）を固定化したフェライト含有エチレン酢酸ビニルコポリマービーズおよび一次反応液（1% BSA 200 mM HEPES緩衝液（pH 7））を反応カップに分注して凍結乾燥し、試薬Aを作製した。さらに同一条件で一次反応液に0.1、1.0、5.0、10 w/v % リジン塩酸塩、又は5.0 w/v % アルギニン塩酸塩を添加した試薬Bから試薬Fを作製した。

30

【0017】

測定は最初に試薬A～Fの反応カップに試験試料（血清）と凍結乾燥物の溶解液とを同時に添加し、37℃にて攪拌しながら10分間反応させた。その後、未反応物をB/F分離により除去し、アルカリ性フォスファターゼにて標識された抗ヒトイムノグロブリンマウスモノクローナル抗体（東ソー・エイアイエイ社製）を含む二次反応液（1% BSAを含む50 mM リン酸緩衝液（pH 7））を分注し、37℃にて攪拌しながら10分間反応させた。その後、未反応物をB/F分離により除去し、4-メチルウンベリフェリルリン酸塩を含む基質溶液を添加した。TP抗体を介してTP抗原に結合したアルカリ性フォスファターゼ標識抗ヒトイムノグロブリンマウスモノクローナル抗体によって生成される単位時間当たりの4-メチルウンベリフェロンの生成（nM/秒）を蛍光測定した。本生成度はアルカリ性フォスファターゼ量に比例し、蛍光の強さによって試験試料中のTP抗体の濃度を知ることができる。

40

【0018】

検体中のTP抗体濃度は、あらかじめTP抗体標準品を用いて検量線を作成させた上で求めた。TP抗体の測定結果の判定は、1.0 COI（カットオフインデックス）以上を陽性（+）、1.0 COI未滿を陰性として判断した。

【0019】

作製された試薬A～試薬Fを用いて3例のTP抗体陰性検体と3例のTP抗体陽性検体を測定した。TP抗体陰性検体は、梅毒の病歴がない供血者から採取したものである。

50

【0020】

表1は、TP抗体陰性および陽性検体を測定した結果である。表1からわかるように、試薬Aで測定すると1.0 COI以上の値を示していた偽陽性検体が、試薬Bで低くなり、試薬Cから試薬Eは1.0 COI未満の値を示すようになり、リジン濃度が5w/v%以上（試薬D、E）で0 COI付近に収束していた。1次反応液にリジン塩酸塩を添加していくことで陰性検体中の成分による非特異的反応が小さくなり偽陽性検体なくなった。また試薬Fでも非特異的反応が低くなる傾向がみられた。同濃度（1w/v%）を添加している試薬Cほどは低下しなかったが、アルギニン塩酸塩を添加しても効果があった。

【0021】

一方、TP抗体陽性検体では試薬Aから試薬Fは同様の値を示しており、1次反応液に塩基性アミノ酸を添加しても陽性検体の反応性が低下することはなくTP抗体を測定することができていた。

【0022】

以上の試薬Aから試薬Fによる結果から判断すると、塩基性アミノ酸がTP抗体陰性検体の非特異的反応を回避していることは明らかである。特にリジン塩酸塩の効果が高いことがわかった。

【0023】

【表1】

	試薬A		試薬B		試薬C		試薬D		試薬E		試薬F	
リジン塩酸塩	0		0.1		1		5		10		0	
アルギニン塩酸塩	0		0		0		0		0		1	
	(Index)	判定	(Index)	判定	(Index)	判定	(Index)	判定	(Index)	判定	(Index)	判定
Nega Sample 1	2.5	+	2.5	+	0.8	—	0.2	—	0.3	—	0.9	—
Nega Sample 2	1.4	+	0.9	—	0.8	—	0.7	—	0.7	—	0.8	—
Nega Sample 3	1.3	+	1.1	+	0.9	—	0.3	—	0.3	—	1.0	+
Posi Sample 4	2.0	+	2.0	+	2.0	+	2.1	+	2.1	+	2.1	+
Posi Sample 5	11.4	+	11.4	+	11.3	+	10.8	+	10.8	+	10.7	+
Posi Sample 6	30.4	+	30.3	+	29.6	+	25.7	+	24.4	+	28.2	+

実施例2

実施例1で作製された試薬Aと試薬Dを用いて13例のTP抗体陰性検体と8例のTP抗体陽性検体を測定した。TP抗体陰性検体は、梅毒の病歴がない供血者から採取したものである。

【0024】

表2は、TP抗体陰性検体13例を測定した結果である。表2からわかるように、試薬Aで測定すると1.0 COI以上の値を示していた偽陽性検体が、試薬Dでは1.0 COI未満の値を示すようになり、全体的にばらついていた値が0 COI付近に収束していることがわかる。1次反応液にリジン塩酸塩を添加したことで、陰性検体中の成分による非特異的反応が非常に小さくなり偽陽性検体なくなっている。

【0025】

表3は、TP抗体陽性検体8例を測定した結果である。試薬A、試薬Dどちらも同様の値を示しており、1次反応液にリジン塩酸塩を添加しても陽性検体の反応性が低下することなくTP抗体を測定することができていた。

【0026】

以上の試薬Aと試薬Dによる結果から判断すると、塩基性アミノ酸がTP抗体陰性検体の非特異的反応を回避していることは明らかである。

【0027】

【表 2】

	試薬A		試薬D	
	(Index)	判定	(Index)	判定
Nega Sample 7	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 8	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 9	2.1	+	0.1	-
Nega Sample 10	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 11	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 12	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 13	2.5	+	0.1	-
Nega Sample 14	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 15	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 16	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 17	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 18	0.1	-	0.1	-
Nega Sample 19	0.5	-	0.1	-

10

20

【0028】

【表 3】

	試薬A		試薬D	
	(Index)	判定	(Index)	判定
Posi Sample 20	6.3	+	8.8	+
Posi Sample 21	6.3	+	5.4	+
Posi Sample 22	13	+	11.9	+
Posi Sample 23	8.2	+	7.6	+
Posi Sample 24	24.3	+	27.3	+
Posi Sample 25	14.3	+	12.5	+
Posi Sample 26	9.1	+	9.6	+
Posi Sample 27	48.1	+	51.7	+

30

40

专利名称(译)	免疫学测量方法抑制非特异性反应		
公开(公告)号	JP2015184125A	公开(公告)日	2015-10-22
申请号	JP2014060384	申请日	2014-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	鈴木久也		
发明人	鈴木 久也		
IPC分类号	G01N33/531		
FI分类号	G01N33/531.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 要解决的问题：提供一种抑制免疫测定方法中产生的非特异性反应的方法。在用于测量样品中的抗原或抗体的免疫测定中，当抗原与抗体反应时，碱性氨基酸如赖氨酸，精氨酸或组氨酸，碱性氨基酸盐或碱性氨基酸的比例。10%或更多的肽或蛋白质（例如，碱性氨基酸，组蛋白或鱼精蛋白的聚合物）共存会抑制非特异性反应。[选择图]无	(21) 出願番号	特願2014-60384 (P2014-60384)	(71) 出願人	000003300
	(22) 出願日	平成26年3月24日 (2014. 3. 24)	(72) 発明者	鈴木 久也 神奈川県横浜市早川2743番地1 東ソー株式会社 東京研究センター内