

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4515733号  
(P4515733)

(45) 発行日 平成22年8月4日(2010.8.4)

(24) 登録日 平成22年5月21日(2010.5.21)

(51) Int.Cl.

F 1

**GO 1 N 33/493 (2006.01)**

**GO 1 N 33/543 (2006.01)**

**GO 1 N 33/53 (2006.01)**

**GO 1 N 33/553 (2006.01)**

GO 1 N 33/493 A

GO 1 N 33/543 583

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/553

請求項の数 1 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-323607 (P2003-323607)  
 (22) 出願日 平成15年9月16日 (2003.9.16)  
 (65) 公開番号 特開2005-91111 (P2005-91111A)  
 (43) 公開日 平成17年4月7日 (2005.4.7)  
 審査請求日 平成18年9月8日 (2006.9.8)

(73) 特許権者 303036670  
 合同酒精株式会社  
 東京都中央区銀座6丁目2番10号  
 (74) 代理人 110000084  
 特許業務法人アルガ特許事務所  
 (74) 代理人 100068700  
 弁理士 有賀 三幸  
 (74) 代理人 100077562  
 弁理士 高野 登志雄  
 (74) 代理人 100096736  
 弁理士 中嶋 俊夫  
 (74) 代理人 100117156  
 弁理士 村田 正樹  
 (74) 代理人 100111028  
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】尿中総ヘモグロビン定量試薬

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

尿試料に第1試薬を反応させ、次いでヘモグロビンに対する抗体を結合させた金コロイド粒子担体を含有する第2試薬を反応させる金コロイド粒子凝集法による尿中総ヘモグロビンの定量的免疫分析法であって、

第1試薬にポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(付加モル数5～20)またはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル(付加モル数5～20)0.01～0.5重量%を含有させ、第1試薬又は第2試薬のどちらか一方、あるいは第1試薬と第2試薬の両方に平均分子量4,000～25,000のポリオキシエチレングリコール1～10重量%を含有させることを特徴とする尿中総ヘモグロビンの定量的免疫分析法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、金コロイド粒子凝集法を用いる尿中総ヘモグロビンの定量試薬に関する。さらに詳しくは、尿中の赤血球を迅速にかつ完全に溶解させ、尿中の微量な総ヘモグロビンを精度良く定量する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

腎尿路系の疾患による血尿では、尿中に赤血球とヘモグロビンが混在している場合が多い。従来より、肉眼的には判断できない微量な血尿の検査法としては、試験紙による潜血

20

反応（試験紙法）と顕微鏡による沈渣有形成分検査が一般的である。しかしながら、試験紙法は、簡便に尿中のヘモグロビンを定性判定できるが、混在する赤血球は斑点状の呈色となり、機器判定では低めに判定されるという問題点があった。また、試験紙法はヘモグロビンのペルオキシダーゼ様活性による酸化還元反応を反応原理とするため、アスコルビン酸などの尿中に存在する還元物質や、ミオグロビンなどのペルオキシダーゼ様活性を有する他の物質の影響を受けやすく、特異性が低いという問題もあった。

#### 【0003】

そこで、特異性を高めるために、抗原抗体反応を利用した尿中ヘモグロビン測定方法が試みられている（非特許文献1）。すなわち、抗ヘモグロビン抗体を感作させたポリスチレンラテックスを用いた粒子凝集法で尿試料を分析した結果、アスコルビン酸やミオグロビンの影響を受けることなく尿中のヘモグロビンを特異的に定性判定できることが記載されている。しかしながら、尿中に赤血球が混在する尿検体の場合はこれを検出できず、陰性結果となるという問題点があった。

10

#### 【0004】

一方、赤血球が混在する尿を-80で凍結し、再融解した尿試料について、抗ヘモグロビン抗体を感作させたポリスチレンラテックス法で分析すると、尿中の総ヘモグロビン量を正確に定量できることが開示されている（非特許文献2）。しかしながら、凍結に際して、尿試料にヘモグロビン安定化試薬を加える必要があること、さらに-80という超低温での凍結処理と再融解操作に多大な時間と労力、設備を必要とするという問題があった。

20

#### 【0005】

特許文献1や特許文献2には、生体試料中に存在する赤血球を溶血させるために、フローサイトメトリー用試薬等に界面活性剤が使用されている。しかしながら、粒子凝集法を用いる定量的免疫分析において反応系に界面活性剤が存在すると、界面活性剤の種類によつては、分析対象となる抗原や試薬中の抗体が変性して全く反応が起こらないという現象を引き起こす。さらに、タンパク質変性作用が穏やかな界面活性剤であっても、粒子凝集を抑制するため、反応性が著しく低下し、試料中に微量に存在する抗原を精度良く測定できないという問題があった。

#### 【0006】

【特許文献1】特開平06-109725号公報

30

【特許文献2】特開平09-329596号公報

【非特許文献1】臨床検査 vol.39 969-973頁 1992年

【非特許文献2】臨床病理 vol.51 403-408頁 2003年

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

本発明は、赤血球が混在する尿試料中の総ヘモグロビン定量における、上記の問題点を解決し、前処理を必要とせずに尿中の微量な総ヘモグロビンを簡便かつ精度良く定量する試薬の提供を目的とするものである。

#### 【課題を解決するための手段】

40

#### 【0008】

本発明は、金コロイド粒子凝集法による尿中総ヘモグロビンの定量的免疫分析において、尿中に混在する赤血球を溶血させる界面活性剤と、粒子凝集反応を促進させて反応性を高める高分子重合体を試薬中に予め含有させることを特徴とするものである。

#### 【0009】

すなわち、臨床検査に用いられている汎用自動分析装置で広く採用されている2種類の試薬を用いる反応系において、本発明の定量分析試薬は、第1試薬に界面活性剤を含有させ、第1試薬又は第2試薬のどちらか一方、あるいは第1試薬と第2試薬の両方に所定の濃度で高分子重合体を含有させることで、上記課題を解決する。

#### 【発明の効果】

50

## 【0010】

本発明の定量分析試薬によれば、赤血球が混在する尿試料の微量な総ヘモグロビン量でも、特別な前処理を必要とせずに、特異的に簡便かつ精度よく定量することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0011】

本発明に用いる試薬は、赤血球を溶血させる作用を有する界面活性剤を含有する第1試薬、並びにヘモグロビンに対する抗体を結合させた金コロイド粒子担体を含有する第2試薬から構成される。他方の必須成分である粒子凝集反応を促進する高分子重合体は、第1試薬又は第2試薬のどちらか一方、あるいは第1試薬と第2試薬の両方に所定の濃度で含有させる。

10

## 【0012】

本発明に用いる界面活性剤としては、赤血球を溶血させる作用を有するポリオキシエチレン系の非イオン性界面活性剤を使用することができる。例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数5～20）またはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（付加モル数5～20）等が挙げられる。特にポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数10）またはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（付加モル数10）の使用が好適である。また、以上を組み合わせることも可能である。これらの界面活性剤の含有量は、0.01～0.5重量%である。

## 【0013】

また、本発明に用いる高分子重合体としては、反応を促進する作用を有する平均分子量4,000～25,000のポリエチレングリコールが使用できる。高分子重合体の含有量は、1～10重量%である。

20

さらに、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム緩衝液やグッド緩衝液等を使用すると、一定のpHを維持するために、好都合である。

## 【0014】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0015】

（試薬の作製）0.2重量%ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数10）、6重量%ポリエチレングリコール6000（平均分子量6,000）、0.1重量%アジ化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液（pH6.8）を第1試薬とした。

30

## 【0016】

フレンスらによる（Nature Phys.Sci., Vol.241, p20-22 (1973)）に記載された方法により、塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元し、金コロイド液を調製した。特開平2-141665号公報に記載の抗ヒトヘモグロビン・マウスモノクローナル抗体を金コロイド液1mLあたり6μg添加した後、0.5mLの1%ウシ血清アルブミン溶液を加えた。次いで、10,000rpm、10分間遠心分離することにより暗赤色沈殿である抗体結合金コロイドを回収し、1%ウシ血清アルブミンを含む0.05Mリン酸緩衝液（pH6.5）に、波長540nmにおける吸光度が2.4になるように懸濁し、第2試薬とした。

40

## 【実施例2】

## 【0017】

（測定）ヘパリン採血したヒト血液を生理食塩水で100倍に希釈してヒト赤血球浮遊液を調製した。生理食塩水でさらに1,000、2,000、4,000倍希釈したものを作成したものを非溶血試料として測定した。測定には、汎用自動分析装置（（株）日立製作所製7070形自動分析装置）を用いた。反応系は、試料：5μl、第1試薬：130μl、第2試薬：140μlとし、反応開始直後と5分後の吸光度差を主波長546nm、副波長700nmで測定した。また、実験に先立ち、標準ヘモグロビンとして合同酒精（株）製キヤ

50

リブレーター 2010 を用いて、同一の条件で吸光度差を測定し、ヘモグロビン濃度と吸光度差の関係を示す検量線を作成した。この検量線から、試料中のヘモグロビン濃度を算出した。

比較例 1 として、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数 10）を添加していない第 1 試薬を使用した。また、本発明の定量性を確認するために、ヒト赤血球浮遊液を蒸留水で同様の倍率に希釈し、完全に溶血させた試料の測定も行った。その結果を図 1 に示した。

本発明の試薬を用いると、赤血球が混在する試料の総ヘモグロビン濃度を正確に分析することができた。一方、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数 10）を添加しない試薬を用いた場合は、著しく低いヘモグロビン測定値となり、定量できなかつた。  
10

#### 【0018】

ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（付加モル数 10）のかわりに、試験紙に溶血剤として広く用いられている界面活性剤の 0.2 重量% ラウリル硫酸ナトリウムを添加した第 1 試薬を使用した場合は、全く反応が見られなくなり、測定することができなかつた。

#### 【実施例 3】

#### 【0019】

（試薬の作製） 0.05 重量% ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（付加モル数 10）、3 重量% ポリエチレングリコール 20000（平均分子量 20,000）、0.1 重量% アジ化ナトリウムを含む 0.02 M ピペラジン-N,N'-ビス2-エタンスルホン酸緩衝液（pH 6.8）を第 1 試薬とした。第 2 試薬は実施例 1 と同じものを使用した。  
20

#### 【実施例 4】

#### 【0020】

（測定）赤血球が混在した尿を試料として、10 回測定を繰り返した。実施例 2 と同様に、測定には、汎用自動分析装置（（株）日立製作所製 7070 形自動分析装置）を用いた。反応系は、試料：5 μl、第 1 試薬：130 μl、第 2 試薬：140 μl とし、反応開始直後と 5 分後の吸光度差を主波長 546 nm、副波長 700 nm で測定した。標準ヘモグロビンにより作製した検量線から、試料中のヘモグロビン濃度（ng/mL）を算出した。  
30

ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（付加モル数 10）を添加していない第 1 試薬を使用した測定結果を比較例 2、ポリエチレングリコール 20000 を添加していない第 1 試薬を使用した測定結果を比較例 3 として、表 1 に結果を示した。

#### 【0021】

【表1】

測定回数	本発明 (ng/mL)	比較例2 (ng/mL)	比較例3 (ng/mL)
1	1543	487	1620
2	1470	496	1407
3	1475	484	1481
4	1551	507	1258
5	1462	490	1288
6	1559	532	1273
7	1443	517	1467
8	1511	500	1803
9	1477	506	1393
10	1491	503	1555
平均値	1498	502	1455
標準偏差	40.6	14.5	171.6
変動率(%)	2.7	2.9	11.8

## 【0022】

本発明の試薬を用いると、実際に赤血球が混在する尿検体を分析した場合にも、総ヘモグロビン濃度を再現性良く分析することができた。一方、界面活性剤を添加しない試薬を用いた比較例2では、著しく低いヘモグロビン測定値となり定量性がなかった。また、高分子重合体を添加しない比較例3では、反応に伴う吸光度差が著しく低下し、ヘモグロビン測定値のばらつきを示す変動率が大きくなつた。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0023】

本試薬は、汎用自動分析装置に適用できるので、集団検診など、大量の検体を処理する場合に、処理能力が向上し、省力化や効率化が期待できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0024】

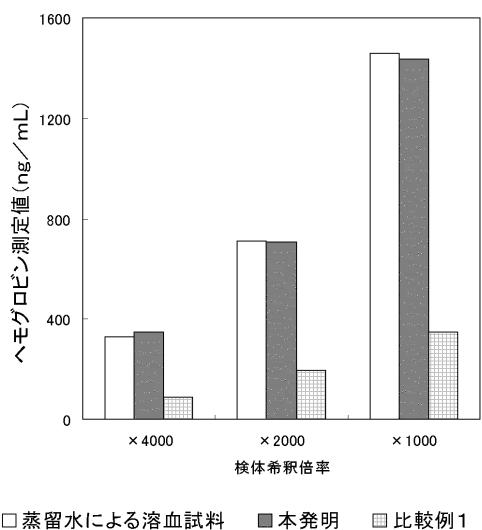
## 【図1】本発明の効果(実施例2, 比較例1)

10

20

30

【図1】



---

フロントページの続き

(72)発明者 近藤 英彦

松戸市上本郷字仲原250 合同酒精株式会社酵素医薬品研究所内

(72)発明者 石田 尚彦

松戸市上本郷字仲原250 合同酒精株式会社酵素医薬品研究所内

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開2001-021564(JP,A)

特開平11-248711(JP,A)

特開平10-132824(JP,A)

特開2000-146974(JP,A)

特開2003-149244(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/493 - 33/553

专利名称(译)	尿总血红蛋白定量试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP4515733B2</a>	公开(公告)日	2010-08-04
申请号	JP2003323607	申请日	2003-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	合同酒精株式会社		
申请(专利权)人(译)	合同酒精株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	合同酒精株式会社		
[标]发明人	近藤英彦 石田尚彦		
发明人	近藤 英彦 石田 尚彦		
IPC分类号	G01N33/493 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/553		
FI分类号	G01N33/493.A G01N33/543.583 G01N33/53.D G01N33/553		
F-TERM分类号	2G045/AA15 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB51 2G045/DA51 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/GC10		
代理人(译)	村田正树		
其他公开文献	JP2005091111A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫测定试剂，能够定量，轻松，精确地测定与红细胞混合的尿样中的总血红蛋白，无需特殊和特殊的预处理。解决方案：在本发明的定量分析试剂中，在试剂中预先加入用于溶解混入尿液中的红细胞的表面活性剂和用于促进颗粒聚集反应的聚合物，用于尿液中总血红蛋白的定量免疫测定。金胶体颗粒絮凝法。由于该试剂适用于多功能自动分析仪，因此当在组检查中处理大量样本时，处理能力得到增强，并且预期可以提高劳动力和效率。Ž

