

(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2006-153590

(P2006-153590A)

(43) 公開日 平成18年6月15日(2006.6.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D	
	GO 1 N 33/543 5 8 1 H	
	GO 1 N 33/543 5 8 7	

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2004-342883 (P2004-342883)	(71) 出願人	390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(22) 出願日	平成16年11月26日(2004.11.26)	(74) 代理人	100088867 弁理士 西野 卓嗣
		(72) 発明者	倉本 優子 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	宮地 峰輝 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法及び試薬キット

(57) 【要約】

【課題】 検体として精製が不十分な血清を用いても、正確に生体試料中の測定対象成分を測定できる試薬キットを提供する

【解決手段】 凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼを含む第一試薬と、生体試料中の測定対象成分に対する抗原又は抗体を感作させた担体粒子を含む第二試薬と、を備えた試薬キットを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料中の測定対象成分を抗原抗体反応に基づいて免疫学的に測定する方法において、前記生体試料に凝固促進作用及び／又は抗線溶作用を有するプロテアーゼを添加した後、前記測定対象成分に対する抗原又は抗体を感作した担体粒子を前記生体試料に添加して前記測定対象成分を測定することを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項 2】

前記プロテアーゼがトロンピンである請求項 1 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 3】

抗原抗体反応によって凝集した担体粒子に光を照射することにより得られる光学的情報に基づいて前記測定対象成分を測定する請求項 1 又は 2 の何れかに記載の免疫学的測定方法。 10

【請求項 4】

凝固促進作用及び／又は抗線溶作用を有するプロテアーゼを含む第一試薬と、生体試料中の測定対象成分に対する抗原又は抗体を感作した担体粒子を含む第二試薬と、を備えた試薬キット。

【請求項 5】

前記プロテアーゼがトロンピンである請求項 4 記載の試薬キット。

【請求項 6】

前記第一試薬が緩衝剤をさらに含む請求項 4 記載の試薬キット。 20

【請求項 7】

前記第一試薬の pH が 6.0 ~ 8.5 である請求項 6 記載の試薬キット。

【請求項 8】

前記生体試料が血漿又は血清である請求項 4 記載の試薬キット。

【請求項 9】

前記測定対象成分が抗リン脂質抗体を含む請求項 4 記載の試薬キット。

【請求項 10】

前記担体粒子に脂質抗原を感作することを特徴とする請求項 4 記載の試薬キット。

【請求項 11】

前記脂質抗原がカルジオライピン及びフォスファチジルコリンを含む請求項 10 記載の試薬キット。 30

【請求項 12】

前記脂質抗原がさらにコレステロールを含む請求項 11 記載の試薬キット。

【請求項 13】

前記フォスファチジルコリンと前記カルジオライピンとの質量比の値が 2 ~ 15 である請求項 11 記載の試薬キット。

【請求項 14】

前記コレステロールと前記カルジオライピンとの質量比の値が 6 以下である請求項 12 記載の試薬キット。

【請求項 15】

前記担体粒子に感作した前記抗原又は抗体の総質量と前記担体粒子の質量との比が、1000 : 30 ~ 1000 : 95 である請求項 4 記載の試薬キット。 40

【請求項 16】

前記第一試薬が、前記担体粒子よりも粒径の小さい小径粒子をさらに含み、前記小径粒子にフォスファチジルコリンが感作されている請求項 4 記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体試料中の測定対象成分を免疫学的に測定する方法及び該方法に用いられる試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

従来から、生体内に病原体などの非自己物質が侵入しているかどうかを診断するための方法の一つに、免疫学的測定方法がある。該方法は、生体内に侵入した非自己物質又は該非自己物質に対して産生された抗体を抗原抗体反応に基づいて測定する方法である。該方法を用いて診断できる感染症の一例として、梅毒を挙げることができる。梅毒はトレポネマ・パリダム (*Treponema pallidum*) というバクテリアが生体内に侵入することによって起こる慢性感染性疾患である。梅毒の診断方法のひとつに、血清中の脂質抗原に対する抗体 (抗リン脂質抗体) を測定する方法がある (脂質抗原試験; S T S)。S T Sでは、該病原生物と交叉抗原性を有するカルジオライピンなどの脂質抗原に対する抗体を測定対象成分とする。

10

【0003】

S T Sにより抗リン脂質抗体を測定する際に用いられる試薬として、抗リン脂質抗体測定試薬が知られている (例えば、特許文献1)。脂質抗原を感作したラテックス粒子を含む該抗リン脂質抗体測定試薬を血清に添加することによって、ラテックス粒子表面に感作された脂質抗原と血清中の抗リン脂質抗体とが、抗原抗体反応を起こし、血清中の抗リン脂質抗体量に応じてラテックス粒子が凝集する。このラテックス粒子の凝集に基づいて抗リン脂質抗体量を測定する。

20

【0004】

特許文献1記載の抗リン脂質抗体測定試薬による測定の検体として用いられる血清は、例えば高速凝固タイププラスチック真空採血管 (極東製薬工業製) などを用いて、血液から精製することができる。該採血管によると、血液中の血球などの成分を凝固させ、分離することによって血液から血清が精製される。

近年では検査の迅速化は重要な課題の一つであるが、上記採血管を用いて短時間で凝固反応を行った場合、十分に精製された血清を得られず、このような血清が検体として検査に用いられることがある。精製が不十分な血清は凝固因子を含み、凝固因子を含む血清を検体として用いると、正確に抗リン脂質抗体量を測定できないことがあった。

30

【特許文献1】特開2001-242171号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、検体として精製が不十分で凝固因子を含む血清を用いても、正確に生体試料中の測定対象成分を測定できる免疫学的測定方法及び試薬キットを提供することである。

【課題を解決するための手段及び発明の効果】

【0006】

本発明は、第一の観点から、生体試料中の測定対象成分を抗原抗体反応に基づいて免疫学的に測定する方法において、前記生体試料に凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼを添加した後、前記測定対象成分に対する抗原又は抗体を感作した担体粒子を前記生体試料に添加して前記測定対象成分を測定することを特徴とする免疫学的測定方法を提供する。

40

【0007】

本発明の第一の観点による免疫学的測定方法によると、生体試料に凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼを添加することによって非特異反応を抑制することができるため、精製が不十分で凝固因子を含む血清を検体として用いても正確に生体試料中の測定対象成分を測定できる。

【0008】

本発明は、第二の観点から、凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼ

50

を含む第一試薬と、生体試料中の測定対象成分に対する抗原又は抗体を感作させた担体粒子を含む第二試薬と、を備えた試薬キットを提供する。

【0009】

本発明の第二の観点による試薬キットによると、第一試薬の凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼの作用によって、後の生体試料と第二試薬との混合の際に起こる非特異反応を抑制することができるため、精製が不十分で凝固因子を含む血清を検体として用いても正確に生体試料中の測定対象成分を測定できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の実施形態の試薬キットは第一試薬及び第二試薬を具備する。以下に、第一試薬、第二試薬、及びこれらを用いた免疫学的測定方法について説明する。なお、本実施形態では検体として血漿、血清など生体から採取した試料を用いることができる。

【0011】

第一試薬には、凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼが含まれる。該プロテアーゼは、生体試料と後述する第二試薬との反応前に生体試料中の凝固因子を反応系から除外し、非特異反応を抑制する目的で第一試薬に添加される。この非特異反応は、血漿や精製が不十分な血清などの生体試料と第二試薬とを混合した時に起こり、血漿や精製が不十分な血清などに含まれる凝固因子が原因であると考えられる。非特異反応が起こると、生体試料中の抗リン脂質抗体量に関わらず後述の第二試薬中の担体粒子が凝集してしまい、正確な抗リン脂質抗体測定を行うことができなくなる。

凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するプロテアーゼとしては、トロンピン、パトロキソピン、ヘモコアグラーゼなどが挙げられる。本実施形態ではこれらプロテアーゼから選択される一種又は二種以上のプロテアーゼを含む第一試薬を用いることができる。上記プロテアーゼの由来は凝固促進作用及び/又は抗線溶作用を有するものであれば特に限定されない。例えばトロンピンとしてはヒト、ウシ、ウマ、ヤギ由来のものなどを使用することができる。パトロキソピンやヘモコアグラーゼとしてはBothrops属由来のものなどを使用することができる。また、これらプロテアーゼは遺伝子操作によって得られたものであってもよい。第一試薬に含有させるプロテアーゼの溶媒としては、精製水などを用いることができる。

【0012】

また、フォスファチジルコリンを感作した小径粒子(以下、フォスファチジルコリン感作小径粒子とする)を第一試薬に含有させてもよい。小径粒子は、例えばラテックス近赤外比濁法などの粒子凝集法で一般的に使用されるラテックス粒子を用いることができる。小径粒子の粒径は、凝集度の測定に影響を及ぼさなければ特に制限されない。後述の第二試薬に含まれる担体粒子よりも小さい粒径を有する小径粒子が凝集度の測定に影響を与えないため特に好ましい。

フォスファチジルコリンを感作した小径粒子を第一試薬に含有させることにより、フォスファチジルコリンと反応して測定を妨害する生体試料中の成分を、第二試薬添加前に反応系から除外することができ、フォスファチジルコリン由来の非特異反応を効果的に抑制することができる。

【0013】

また、第一試薬に緩衝液を添加して、緩衝能を持たせてもよい。緩衝液は、検体と試薬との反応が最適な条件下で行われるようにpHを調整するものである。緩衝液は第一試薬のpHが6.5~8.0となるようにその種類や量を選択することが好ましい。緩衝液の種類は特に限定されず、公知の緩衝液、例えばリン酸塩緩衝液、グッド緩衝液などを使用することができる。

【0014】

また、第一試薬に緩衝液を含有させるのではなく、第一試薬とは別に緩衝液を試薬キットに具備してもよい。この場合、フォスファチジルコリン感作小径粒子は、第一試薬及び/又は緩衝液に含有させることができる。

10

20

30

40

50

【0015】

第二試薬には、脂質抗原を感作した担体粒子が含まれる。担体粒子に感作する脂質抗原としては、例えばカルジオライピン、フォスファチジルコリン及びコレステロールが挙げられる。脂質抗原は、本発明の目的を達成するものであればその由来は特に限定されず、市販されているものを用いることができる。また、担体粒子として、ラテックス粒子を用いることが好ましい。凝集した粒子数を計数するためには、ラテックス粒子の粒径が均一であることが好ましく、この点では種々のモノマーを重合又は共重合させることによって得られる合成高分子が好適である。該モノマーとしては、重合性不飽和芳香族類（例えば、スチレン、クロルスチレン、 α -メチルスチレン、ジビニルベンゼン、ビニルトルエンなど）、重合性不飽和カルボン酸類（例えば、(メタ)アクリル酸、イタコン酸、マレイン酸、フマル酸など）、重合性カルボン酸エステル類（例えば、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸-n-ブチル、(メタ)アクリル酸-2-ヒドロキシエチル、(メタ)アクリル酸グリシジル、エチレングリコール-ジ-(メタ)アクリル酸エステル、(メタ)アクリル酸トリプロモフェニルなど）、不飽和カルボン酸アミド類（例えば、(メタ)アクリロニトリル、(メタ)アクロレイン、(メタ)アクリルアミド、N-メチロール(メタ)アクリルアミド、メチレンビス(メタ)アクリルアミド、ブタジエン、イソプレン、酢酸ビニル、ビニルピリジン、N-ビニルピロリドン、塩化ビニル、塩化ビニリデン、臭化ビニルなど）、重合性不飽和ニトリル類、ハロゲン化ビニル類、共役ジエン類などを例示することができ、これらのうち一種又は二種以上を用いることができる。また、本実施形態では担体粒子としてスチレンを重合させること

10

20

【0016】

第二試薬の調製に際しては、先ずカルジオライピン、フォスファチジルコリン及びコレステロールを有機溶媒に溶解させて抗原液を作成する。使用する有機溶媒は、メタノール、エタノールなどが好適に使用される。使用する各脂質抗原の質量に関しては、フォスファチジルコリンとカルジオライピンの質量比の値（フォスファチジルコリンの質量/カルジオライピンの質量）が2~15、好ましくは2~10、コレステロールとカルジオライピンの質量比の値（コレステロールの質量/カルジオライピンの質量）が6以下、好ましくは2~6である。また、担体粒子の質量と脂質抗原の総質量との比が1000:30~1000:95となることが好ましい。

30

【0017】

抗原液をスターラーなどで攪拌しながら、担体粒子を添加して混合する。この抗原液と担体粒子との混合液を攪拌しながらさらに有機溶媒を添加する。有機溶媒としては、エタノールやメタノールなどを用いることができる。また、この有機溶媒には、チオシアン酸イオン、過塩素酸イオン、硝酸イオン、臭素イオンや塩素イオンのようなカオトロピックイオンを含有させることもできる。カオトロピックイオンとしては、抗リン脂質抗体との反応性を向上させられるので、チオシアン酸イオンが特に好ましい。第二試薬中のカオトロピックイオンの濃度は、30~500mMの範囲で使用でき、100~300mMが好ましい。

40

【0018】

次に、脂質抗原を含む抗原液と担体粒子と有機溶媒とを混合して調製した抗原混合液を常温下（好ましくは20~25度）に一定時間静置し、脂質抗原を担体粒子表面に感作する。

【0019】

なお、本実施形態では第二試薬に含まれる担体粒子に、脂質抗原としてカルジオライピン、フォスファチジルコリン、及びコレステロールを感作しているが、担体粒子にコレステロールを感作せず、カルジオライピン及びフォスファチジルコリンのみを感作してもよい。

【0020】

50

前述の抗原混合液を遠心分離して上清を除去した後、ポリビニルアルコール（以下、PVAとする）溶液などを添加してブロッキング処理を行うことが好ましい。この場合、PVA溶液を添加してから超音波処理などを行って担体粒子を分散させる。その後この抗原混合液を常温下（好ましくは20～25度）で一定時間スターラーなどで攪拌することにより、ブロッキング処理を行う。

ブロッキング処理とは抗原を感作した担体粒子をPVAなどによって被覆する処理のことである。この処理を行うことにより、感作する抗原以外の物質が担体粒子に吸着するのを妨げることができる。

ブロッキング処理には平均重合度が100～10000、好ましくは200～3000、醜化度は50mol%以上、好ましくは70mol%以上のPVAを使用することができる。 10

またPVAのPVA溶液中の濃度は、0.01～20%、好ましくは0.05～10%に調整される。

【0021】

ブロッキング処理終了後、抗原混合液を遠心分離して上清を除去し、さらに分散剤を含む分散溶液を添加することが好ましい。この場合、分散溶液を添加した後に超音波処理などを行って担体粒子を分散させ、本実施形態の試薬キットに具備される第二試薬を得ることができる。分散剤は第二試薬中での担体粒子の分散安定性を確保するために用いられ、このような性質を有するものであればその種類は特に限定されず、市販されているものを用いることができる。 20

【0022】

上記のようにして得られた第一試薬および第二試薬を生体試料に添加し、生体試料中の測定対象成分を測定する。

以下、その測定方法を説明する。

【0023】

まず、生体試料と第一試薬とを混合させ、所定の時間経過した後に、さらに第二試薬を添加して反応させ、反応混合液を調製する。反応温度は、20～50、反応時間は15秒～20分である。所定時間反応させた後、反応混合液の凝集度を測定する。

【0024】

反応混合液の凝集を検出する手段としては、目視で判定する方法、反応混合液の吸光度の変化を測定する方法、カウンティングイムノアッセイ法（以下、CIA法とする）など、公知の測定法を用いることができる。 30

【0025】

ここで、CIA法による凝集度測定について説明する。

抗原又は抗体を感作した担体粒子と測定対象成分とを反応させると、測定対象成分の量に応じて担体粒子複数個が凝集する。凝集した担体粒子及び凝集しなかった担体粒子の一つ一つの大きさをフローサイトメータによって弁別し、これらをカウントする。凝集していない担体粒子のカウント数をM（Monomer）、2個以上の担体粒子が凝集したもののカウント数をP（Polymer）、MとPとの和をT（Total）とし、P/Tを凝集度として算出する。 40

【0026】

本実施形態では、凝集度の測定は次のようにして行うことができる。まず、生体試料と第一試薬と第二試薬とを混合した反応混合液を希釈し、カウントに適切な担体粒子濃度に調整する。ついで、フローセルの中に形成されたシース液の層流中に、希釈された反応混合液を少しずつ押し出すと、担体粒子は一列になって、フローセルの中央を通過する。フローセルを通過する担体粒子に対し、フローセルに垂直な方向からレーザダイオードなどで光を照射する。光を照射された担体粒子から散乱した散乱光がフォトダイオードなどの受光素子によって受光される。

【0027】

散乱光が受光素子によって受光されると、散乱光の強度に応じた電気パルスが検出され 50

る。この電気パルスは光を照射された担体粒子が、凝集せず一個のとき、凝集して二個のとき、或いは凝集して三個のとき、など担体粒子の凝集状態に応じた大きさとなる。

【0028】

この電気パルスをその大きさを弁別してカウントし、P/Tを求め、これを凝集度とする。

上述のCIA法を用いた一連の操作は、分析装置によって自動的に行うことができる（例えば、免疫凝集測定装置PAMIAシリーズ（シスメックス製）を用いることができる）。

【0029】

（実施例）

1. 反応緩衝液の調製

<フォスファチジルコリン感作小径粒子懸濁液の調製>

反応緩衝液の調製に先立ち、フォスファチジルコリン感作小径粒子懸濁液を調製した。小径粒子は粒径0.1 μmのポリスチレンラテックス粒子を用いた。

フォスファチジルコリン100 mg/mlのエタノール溶液を150 μlとり、ボルテクスミキサで攪拌しながら小径ポリスチレンラテックス懸濁液（濃度10 w/v%、粒径0.1 μm；積水化学工業社製）1.5 mlと混合した。

この混合液をボルテクスミキサで攪拌しながら、300 mMチオシアン酸ナトリウム及び0.15 w/v%塩化ナトリウムを含む水溶液3.35 mlに添加した。引き続き、25の恒温水槽中で一時間静置した後、15000 gで約1時間遠心分離を行い、上清を除去して小径ポリスチレンラテックス粒子の沈さを得た。ここに、0.067 w/v% PVA（重合度500、鹸化度88.0 ± 1.5 mol%；クラレ製）、13 w/v%硫酸アンモニウム、0.1 w/v% 3,3-ジメチルグルタル酸、0.08 w/v% トリスヒドロキシメチルアミノメタン、及び0.07 w/v% 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールを含むPVA溶液（pH 8.0）を5 ml添加し、超音波処理により小径ポリスチレンラテックス粒子を分散させ、25の恒温水槽中に約一時間静置し、これをフォスファチジルコリン感作小径粒子懸濁液とした。

【0030】

<反応緩衝液の調製>

本実施例では、トロンビン濃度の異なる6種類の反応緩衝液a～fを調製した。

まず、反応緩衝液aを調製した。精製水に0.16 w/v% 3,3-ジメチルグルタル酸、0.12 w/v% トリスヒドロキシメチルアミノメタン、0.10 w/v% 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、0.1 w/v% アジ化ナトリウム、0.58 w/v% 塩化ナトリウム、1 w/v% ウシ血清アルブミン、及び上述の2 w/v% フォスファチジルコリン感作小径ポリスチレンラテックス粒子懸濁液を添加して反応緩衝液aを調製した。反応緩衝液aにはトロンビンは含まれていない。

次に、反応緩衝液b～fを調製した。反応緩衝液b～fは、反応緩衝液aの調製の際にウシ由来トロンビン（以下、単にトロンビンという）（伊藤ハム製）をさらに加えたものである。トロンビンの濃度はそれぞれ、反応緩衝液bが5 U/ml、反応緩衝液cが10 U/ml、反応緩衝液dが15 U/ml、反応緩衝液eが20 U/ml、反応緩衝液fが25 U/mlである。

反応緩衝液a～fのpHは8.0に調整された。

【0031】

2. ラテックス試薬の調製

本実施例では、担体粒子として粒径0.7 μmのポリスチレンラテックス粒子を用いた。

カルジオライピン（ウシ心筋由来；シグマ社製）1.0 mg/mlのエタノール溶液250 μl、フォスファチジルコリン（鶏卵由来；シグマ社製）10 mg/mlのエタノール溶液250 μl、及びコレステロール（ブタ肝臓由来；シグマ社製）6 mg/mlのエタノール溶液250 μlを混合して抗原液とした。

10

20

30

40

50

該抗原液を攪拌しながら、ポリスチレンラテックス粒子を含む懸濁液（10 w / v %、粒径 0.7 μ m；積水化学工業製）500 μ l を添加して混合し、ボルテックスミキサで攪拌しながら、300 mM チオシアン酸ナトリウム（ナカラitekus 製）及び 0.15 w / v % 塩化ナトリウムを含む水溶液 8.75 ml に添加した。引き続き、25 の恒温水槽中で約一時間静置した後、12000 g、4 で約30分間遠心分離を行い、上清を除去して、抗原を感作されたポリスチレンラテックス粒子の沈さを得た。

【0032】

次に、ブロッキング処理を行った。得られたポリスチレンラテックス粒子の沈さに、0.067 w / v % PVA（重合度 500、鹼化度 88.0 \pm 1.5 mol %；クラレ製）、1.3 w / v % 硫酸アンモニウム、0.1 w / v % 3,3-ジメチルグルタル酸、0.08 w / v % トリスヒドロキシメチルアミノメタン、及び 0.07 w / v % 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールを含む PVA 溶液（pH 8.0）10 ml を添加し、超音波処理によりポリスチレンラテックス粒子を PVA 溶液中に分散させ、25 の恒温水槽中で約一時間静置した後、12000 g、4 で約30分間遠心分離を行い、上清を除去して、ブロッキングされたポリスチレンラテックス粒子の沈さを得た。ここに分散溶液（2.3 w / v % グリセリン、0.61 w / v % トリスヒドロキシメチルアミノメタン、0.53 w / v % 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、0.05 w / v % アジ化ナトリウム、及び 0.01 w / v % PVA）10 ml を添加し、超音波処理によりポリスチレンラテックス粒子を分散溶液中に分散させ、これを本実施例で用いるラテックス試薬とした。

【0033】

3. 抗リン脂質抗体の測定

上述の試薬を用いて検体中の抗リン脂質抗体を測定した結果を以下に示す。

本実施例では、トロンピンを含まない試薬を用いて検体中の抗リン脂質抗体を測定した場合（反応緩衝液 a 及びラテックス試薬を用いた場合）と、トロンピンを含む試薬を用いて検体中の抗リン脂質抗体を測定した場合（第一試薬 b ~ f の何れか及びラテックス試薬を用いた場合）との測定値を比較し、トロンピンを用いることによって抗リン脂質抗体測定の際にどのような効果が得られるかを確認した。

【0034】

検体として、コントロール試料 C0 ~ C3 と S T S 陰性血漿試料 1 ~ 3 とを用いた。

C0 はランリーム S T S（シスメックス製）に具備されている検体希釈液であり、抗リン脂質抗体は含まれていない。C1 ~ C3 はそれぞれランリーム S T S に具備されている S T S キャリブレータ 1 ~ 3 であり、抗リン脂質抗体が所定の濃度で含まれている。C2 の抗リン脂質抗体濃度は C1 の抗リン脂質抗体濃度よりも高く、C3 の抗リン脂質抗体濃度は C2 の抗リン脂質抗体濃度よりも高い。検体の凝集度が C1 の凝集度以上の場合は S T S 陽性、C1 の凝集度未満の場合は S T S 陰性と判定される。つまり、C0 は S T S 陰性、C1 は S T S 陰性と S T S 陽性との境界値となり、C2 及び C3 は S T S 陽性となる。なお、C0 ~ C3 のいずれの試料にも凝固因子は含まれていない。

本実施例では、トロンピンが非特異反応を抑制することを確認するために、精製が不十分な血清よりも多くの凝固因子を含有する血漿を検体として用いた。S T S 陰性血漿 1 ~ 3 は抗リン脂質抗体を含まず、ヒト由来である。

【0035】

本実施例では C I A 法によって凝集度測定を行った。測定には免疫凝集測定装置 P A M I A - 50（シスメックス製）を用いた。

測定に際し、先ず検体 10 μ l を反応緩衝液 80 μ l と混合した。約 80 秒経過後、ラテックス試薬 10 μ l を添加して反応混合液を作成し、凝集反応を開始させた。約 30 秒後、約 19 μ l の反応混合液を 960 μ l のシース液に加えて約 51 倍に希釈した。希釈された反応混合液を、P A M I A - 50 の光学検出部に導入し、凝集度 P / T（%）を測定した。

【0036】

10

20

30

40

50

表 1 には、上述の試薬を用いて測定した C 0 ~ C 3 及び S T S 陰性血漿 1 ~ 3 の凝集度 (%) を、反応緩衝液 a ~ f のそれぞれについて示した。S T S 陰性血漿 1 ~ 3 の凝集度の値の後に示される (+) は S T S 陽性であることを示し、(-) は S T S 陰性であることを示す。

【 0 0 3 7 】

【 表 1 】

	反応緩衝液a	反応緩衝液b	反応緩衝液c	反応緩衝液d	反応緩衝液e	反応緩衝液f
トロンビン添加濃度	0 U/mL	5 U/mL	10 U/mL	15 U/mL	20 U/mL	25 U/mL
コントロール試料C0	0.45	0.48	0.46	0.51	0.49	0.50
コントロール試料C1	5.43	5.01	5.08	4.70	4.87	5.58
コントロール試料C2	12.40	12.36	12.49	12.05	11.87	12.21
コントロール試料C3	19.39	19.72	19.87	19.33	19.82	21.02
STS陰性血漿1	37.53 (+)	0.74 (-)	0.49 (-)	0.49 (-)	0.50 (-)	0.51 (-)
STS陰性血漿2	47.76 (+)	0.52 (-)	0.54 (-)	0.56 (-)	0.45 (-)	0.57 (-)
STS陰性血漿3	46.50 (+)	0.61 (-)	0.51 (-)	0.57 (-)	0.63 (-)	0.57 (-)

10

【 0 0 3 8 】

表 1 に示される C 0 の測定結果より、反応緩衝液 a を用いたときの凝集度と、反応緩衝液 b ~ f の何れかを用いたときの凝集度とが非常に近似していることが分かる。C 1 , C 2 , 及び C 3 の測定結果にも同様のことが言える。これは、トロンビンを添加してもトロンビンが抗リン脂質抗体とポリスチレンラテックス粒子に感作した脂質抗原との抗原抗体反応を妨げることなく、正確な測定値が得られるということを示している。

20

【 0 0 3 9 】

表 1 より、反応緩衝液 a を用いた場合は S T S 陰性血漿 1 ~ 3 の凝集度が、コントロール C 1 の凝集度 (5 . 4 3 %) よりも高い値を示していることが分かる。これは、S T S 陰性血漿中の凝固因子により非特異反応が起こり、ポリスチレンラテックス粒子が凝集したため抗リン脂質抗体が存在しないにも関わらず S T S 陽性を示したと考えられる。

【 0 0 4 0 】

一方、反応緩衝液 b ~ f の何れかを用いた場合、全ての S T S 陰性血漿 1 ~ 3 の凝集度が、コントロール C 1 の凝集度よりも低い値となり、S T S 陰性を示した。この測定結果は、トロンビンを添加することにより、S T S 陰性血漿中の凝固因子が原因で起こると考えられる非特異反応を抑制することができ、検体中の抗リン脂質抗体を正確に測定できたことを示す。

30

【 0 0 4 1 】

以上の結果より、本発明の実施形態による試薬を用いることによって、凝固因子を含む生体試料を検体として用いても正確に凝集度を測定することができた。精製が不十分な血清は血漿よりも凝固因子の含有量が少ないため、精製が不十分な血清を検体として用いても本発明の実施形態による試薬を用いれば正確に凝集度を測定することができると考えられる。

40

专利名称(译)	免疫学测定方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2006153590A	公开(公告)日	2006-06-15
申请号	JP2004342883	申请日	2004-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	倉本優子 宮地峰輝		
发明人	倉本 優子 宮地 峰輝		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/543.581.D G01N33/543.581.H G01N33/543.587		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够精确测量生物样品中待测量的目标成分的试剂盒，即使使用纯度不足的血清作为样品。第一试剂，其包含具有促凝血作用和/或抗纤维蛋白溶解作用的蛋白酶，和第二试剂，其包含对生物样品中待测组分的抗原或抗体敏感的载体颗粒。提供提供的试剂盒。

	反応緩衝液a)	反応緩衝液b)	反応緩衝液c)	反応緩衝液d)	反応緩衝液e)	反応緩衝液f)
トロンビン添加濃度	0 U/mL	5 U/mL	10 U/mL	15 U/mL	20 U/mL	25 U/mL
コントロール試料C0	0.45	0.48	0.46	0.51	0.49	0.50
コントロール試料C1	5.43	5.01	5.08	4.70	4.87	5.58
コントロール試料C2	12.40	12.36	12.49	12.05	11.87	12.21
コントロール試料C3	19.39	19.72	19.87	19.33	19.82	21.02
STS陰性血漿1	37.53 (+)	0.74 (-)	0.49 (-)	0.49 (-)	0.50 (-)	0.51 (-)
STS陰性血漿2	47.76 (+)	0.52 (-)	0.54 (-)	0.56 (-)	0.45 (-)	0.57 (-)
STS陰性血漿3	46.50 (+)	0.61 (-)	0.51 (-)	0.57 (-)	0.63 (-)	0.57 (-)