

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6668459号
(P6668459)

(45) 発行日 令和2年3月18日(2020.3.18)

(24) 登録日 令和2年2月28日(2020.2.28)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/531 (2006.01)

GO 1 N 33/531

B

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53

D

請求項の数 9 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2018-512041 (P2018-512041)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月12日(2017.4.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2017/014943
 (87) 国際公開番号 W02017/179611
 (87) 国際公開日 平成29年10月19日(2017.10.19)
 審査請求日 平成31年2月7日(2019.2.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2016-80660 (P2016-80660)
 (32) 優先日 平成28年4月13日(2016.4.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73) 特許権者 591122956
 株式会社 L S I メディエンス
 東京都千代田区内神田一丁目13番4号
 (74) 代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
 (72) 発明者 清水 隆平
 東京都千代田区内神田一丁目13番4号
 株式会社 L S I メディエンス内
 (72) 発明者 庄司 慶一
 東京都千代田区内神田一丁目13番4号
 株式会社 L S I メディエンス内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 硫酸化多糖類を用いた免疫学的測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 2】

生体試料中の測定対象物質の免疫学的測定において、抗凝固剤としてヘパリンを添加した血液試料を用いた場合の測定値と、血清を用いた場合の測定値との間の乖離を減少させる方法であって、測定対象物質と該測定対象物質に特異的に結合する抗体との免疫複合体の形成を硫酸化多糖類の存在下で行うことを特徴とする、前記方法。

【請求項 3】

前記硫酸化多糖類が、デキストラン硫酸、βシクロデキストリン硫酸である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記硫酸化多糖類を検体希釈液及び／又は抗体溶液に含有する、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記形成された免疫複合体を B / F 分離する工程を含む、請求項 2 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

測定対象物質に特異的に結合する第 1 抗体と第 2 抗体を接触させ、抗原抗体反応により形成された免疫複合体を測定する、請求項 2 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

測定対象物質が、可溶性インターロイキン 2 受容体、前立腺特異抗原である、請求項 2

10

20

～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 2 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法のための、測定対象物質に特異的に結合する抗体と、硫酸化多糖類を含有する緩衝液を含む、該測定対象物質測定キット。

【請求項 9】

前記抗体として、磁性粒子に担持された前記測定対象物質に特異的に結合する抗体を含む、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

測定対象物質が、可溶性インターロイキン 2 受容体、前立腺特異抗原である、請求項 8 又は 9 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、硫酸化多糖類を用いた異種被検試料間（特に、血清とヘパリン加血漿の間）の測定値乖離を抑制する免疫学的測定法およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

抗原抗体反応により光学的に測定する免疫学的測定法において、採取する採血管の違い、例えば、血清被検試料と血漿被検試料の測定値が乖離する現象が確認され問題になる場合がある。乖離の原因は測定対象項目により様々であり、これまでに知られている知見の一つには、血漿中に含まれるフィブリノーゲンの不溶化による血漿被検試料の測定値への影響が挙げられる。その影響を、界面活性剤を含む反応系に配位数 3 個以下のキレート剤を含ませることで回避する技術が知られている（特許文献 1）。

【0003】

また、例えば、種々の心筋トロポニンを評価するために、血液試料（血清、血漿または全血）が通常使用される。しかし、この選択は使用方法によって制限され得る。例えば、血清は心筋トロポニンの迅速な評価のための方法に不適切な生物学的試料であること、または全血は定量的アッセイの実施を困難にさせることが知られているからである。ヘパリン加血漿又はヘパリン加全血を用いて実施する免疫学的測定において、使用方法の性能が非常に高い場合でさえ、信頼性に乏しい結果がしばしば得られる。一般に、血漿中の心筋トロポニン濃度がさほど高くない場合に、この問題に遭遇する（非特許文献 1）。実際、血液試料中のヘパリンの存在が種々の免疫学的測定の間に干渉し測定結果に影響を与え、それによって医師の臨床診断を修飾し得ることが知られている。

【0004】

今までに心筋トロポニンアッセイで検体中の干渉物質の影響を回避する方法に関して、ヘパリン含有生物学的試料に対しヘキサジメトリンブロミド（ポリブレン）の存在下で実施されることを特徴とする免疫学的測定法が開示されている（特許文献 2）。

しかし、安定して臨床検体を測定するために、未だ十分なものでは無かった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特許第 5 1 8 9 0 6 7 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 1 0 - 1 0 7 3 6 3 号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】P. O. Collison et al., Ann. Clin. Biochem., (1995), 32, pp. 454 - 458

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

20

30

40

50

本発明者らは、後述する実施例でも詳述するが、免疫学的手法により生体試料（血清及びヘパリン加血漿）中の可溶性インターロイキン2受容体（以下、s I L - 2 Rと略する場合がある）を測定することを試みたところ、該生体試料から調製された測定用の被検試料（以下、検体と称する場合がある）の種類が異なることによって、測定値に違いが生じることに気がついた。

本発明は、生体試料中の測定対象物質（例えば、s I L - 2 R）を検出する場合に、一般的に多用される、異なる血液凝固阻害剤の使用による血清、ヘパリン加血漿といった被検試料の種類に関わらず、被検試料中の干渉物質の影響を受けることなく安定的で高精度な測定値を得ることができる測定方法及びキットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

【0008】

本発明者らは、上記のような現状に鑑みて鋭意検討を重ねた結果、血清及びヘパリン加血漿中のs I L - 2 Rを免疫学的に測定する方法において、反応液中に硫酸化多糖類が添加された条件下で、該s I L - 2 Rを測定することによって、被検試料の種類に関わらず、被検試料中の干渉物質の影響を受けることなく安定的で高精度な測定値を得ることを見出し、本発明を完成した。特に、硫酸基を持たない多糖類及び多糖類を持たず硫酸基を含む化合物を共存させた場合では上記のような効果は得られず、硫酸化多糖類を共存させた場合でないと上記の高い効果が得られないことは驚くべきことであった。また、B / F分離を行ったにも関わらず、硫酸化多糖類を共存させないと、被検試料中の干渉物質の影響を受けたことから、該干渉物質は、従来知られていたフィブリノーゲンの不溶化やヘモグロビンの影響等ではないと考えられた。

20

【0009】

よって、本発明は、以下のように例示できる。

[1] 生体試料中の測定対象物質を免疫学的に測定する方法において、測定対象物質と該測定対象物質に特異的に結合する抗体との免疫複合体の形成を硫酸化多糖類の存在下で行うことを特徴とする、該測定対象物質を測定する方法、

[2] 生体試料中の測定対象物質の免疫学的測定において、抗凝固剤としてヘパリンを添加した血液試料を用いた場合の測定値と、血清を用いた場合の測定値との間の乖離を減少させる方法であって、測定対象物質と該測定対象物質に特異的に結合する抗体との免疫複合体の形成を硫酸化多糖類の存在下で行うことを特徴とする、前記方法、

30

[3] 前記硫酸化多糖類が、デキストラン硫酸、βシクロデキストリン硫酸である、[1]又は[2]の方法、

[4] 前記硫酸化多糖類を検体希釈液及び／又は抗体溶液に含有する、[1]～[3]のいずれかの方法、

[5] 前記形成された免疫複合体をB / F分離する工程を含む、[1]～[4]のいずれかの方法、

[6] 測定対象物質に特異的に結合する第1抗体と第2抗体を接触させ、抗原抗体反応により形成された免疫複合体を測定する、[1]～[5]のいずれかの方法、

[7] 測定対象物質が、可溶性インターロイキン2受容体、前立腺特異抗原である、[1]～[6]のいずれかの方法、

40

[8] [1]～[7]のいずれかの方法のための、測定対象物質に特異的に結合する抗体と、硫酸化多糖類を含有する緩衝液を含む、該測定対象物質測定キット、

[9] 前記抗体として、磁性粒子に担持された前記測定対象物質に特異的に結合する抗体を含む、[8]のキット、

[10] 測定対象物質が、可溶性インターロイキン2受容体、前立腺特異抗原である、[8]又は[9]のキット。

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法、及び試薬キットを用いることにより、生体試料中の測定対象物質（例えば、s I L - 2 R）を、一般的に多用されている、被検試料（血清及びヘパリン加血漿）

50

の種類に関わらず、被検試料中の干渉物質の影響を受けることなく安定に精度よく測定することができる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明における生体試料とは、ヒト等から採取された測定対象物質（例えば、s I L - 2 R）を含む可能性がある試料である。生体試料としては、全血、血清、血漿などの血液試料などが挙げられるが、特に被検試料に、血清とヘパリン加血漿が含まれることが好ましい。

【0012】

本発明に使用可能な被検試料（検体）としては、前記生体試料から調製することができる測定用試料であれば良く、例えば、血液試料を対象とした場合には、血液凝固阻害剤を使用して得た全血、血清、血漿などの検体が挙げられる。血液凝固阻害剤としては、例えば、ヘパリン、E D T A、クエン酸等を用いることができる。これらは、好ましくは、ヒト等の測定対象から採血を行う際に、あらかじめ採血管等に添加して用いることができる。特に、血清及びヘパリン加血漿を並列して対象とする場合、本発明の効果が高いので好ましい。

【0013】

本発明で対象とする測定対象物質は、免疫測定法で測定可能な物質であれば特に制限は無い。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、ウィルス抗原、抗ウィルス抗体等が挙げられ、具体的には、可溶性インターロイキン2受容体（s I L - 2 R）、前立腺特異抗原（P S A）、B型肝炎ウィルス表面抗原（H B s A g）、C型肝炎ウィルス（H C V）抗体および抗原、ヒト免疫不全ウィルス（H I V）抗体、ヒトT細胞白血病ウィルス-1（H T L V - 1）抗体、梅毒トレポネーマ（T P）抗体等、各種心筋マーカー（クレアチンキナーゼ（C K M B）、ミオグロビン、トロポニン）、各種ホルモン類等が挙げられる。好ましくは、可溶性インターロイキン2受容体である。可溶性インターロイキン2受容体とは、主に免疫細胞であるT細胞の膜上に存在し、リガンドであるインターロイキン2と複合体を形成し、T細胞機能の活性化を促進するなど、免疫反応に関与している受容体である2）。インターロイキン2受容体は3種類サブタイプを持ち、その中のαサブユニットは細胞膜から単離し、血中に存在することが知られている。可溶性インターロイキン2受容体はインターロイキン2との結合性を保持することから、生体の免疫調節にも関与しているとされ、臨床現場では主に急性白血病のマーカーとして使用されている。

【0014】

本発明で使用可能な免疫学的測定法は、測定対象物質に特異的な抗体を使用する公知の方法であれば良い。例えば、免疫比濁法（T I A）、酵素免疫測定法（E I A）、放射免疫測定法（R I A）、ラテックス凝集反応法、蛍光免疫測定法、イムノクロマト法等が挙げられる。具体的には、反応液中で、被検試料中の測定対象物質と該測定対象物質に特異的な抗体との免疫複合体を形成させ、その形成されたことによるシグナルを適宜検出することで該測定対象物質の存在を検出する方法である。測定系によって使用する抗体は決定することができるが、高感度に定量的に測定する際には、2種類以上の抗体を使用するサンドイッチ免疫学的測定法（サンドイッチイムノアッセイ）を選択することができる。サンドイッチ免疫学的測定法の方法は、1以上の段階（2段階、3段階など）で実施してもよい。例えば、測定対象物質と、B / F分離用の不溶性担体に担持された該測定対象物質に特異的に結合する抗体との免疫複合体を形成させる工程、該免疫複合体をB / F分離する工程、分離された該免疫複合体を測定する工程を含む方法が挙げられる。

【0015】

例えば、生体試料中に含まれるs I L - 2 Rを測定対象物質として、これを測定する場合には、前述のように該生体試料から調製された検体を、更に検体希釈液で測定用検体として調製し、s I L - 2 Rに特異的に結合する抗体（第1抗体）を担持させた不溶性担体、および標識物質で標識化された第1抗体とは異なるs I L - 2 Rに特異的に結合する抗

10

20

30

40

50

体（第2抗体）とを混合して免疫複合体を形成させ、洗浄によって未反応の抗体および s I L - 2 R を除去（B / F 分離）した後、不溶性担体に結合した標識物質の量を測定することによって行うことができる。

【0016】

上記の不溶性担体は、当該技術において通常用いられるものを用いることができる。不溶性担体の材料としては、例えば、ラテックス、ゴム、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、スチレン - ブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、スチレン - メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン - エチレングリコールジメタクリレート共重合体、ポリビニリデンジフルオライド（P V D F）、シリコーンなどのポリマー材料；アガロース；ゼラチン；赤血球；シリカゲル、ガラス、不活性アルミナ、磁性体などの無機材料などが挙げられる。これらの1種又は2種以上を組み合わせてもよい。

10

【0017】

また、不溶性担体の形状としては、マイクロタイタープレート、試験管、ビーズ、粒子、ナノ粒子などが挙げられる。粒子としては、磁性粒子、ポリスチレンラテックスのような疎水性粒子、粒子表面にアミノ基、カルボキシル基などの親水基を有する共重合ラテックス粒子、赤血球、ゼラチン粒子などが挙げられる。中でも、迅速簡便な B / F 分離を実現する観点においては磁性粒子が特に好ましく、具体的には、例えば、四酸化三鉄（ Fe_3O_4 ）、三酸化二鉄（ Fe_2O_3 ）、種々のフェライト、鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属、コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金からなる微粒子等の磁性粒子が好ましく用いられる。また、これらの磁性粒子を、ポリスチレン等の高分子のラテックスや、ゼラチン、リボソーム等の内部に含まれる形で調製したり、表面に固定化したものを好ましく用いることができる。

20

【0018】

これらの不溶性担体に第1抗体を固定化させる方法は、当該技術において公知である。該固定化は、例えば物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、これらの組み合わせなどにより行うことができる。

【0019】

標識物質は、通常の免疫学的測定法において用い得る標識物質であれば特に限定されず、例えば、酵素、蛍光物質、放射性同位元素、不溶性粒状物質などが挙げられる。該標識用の酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼなどが上げられる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、グリーン蛍光タンパク質（G F P）、ルシフェリンなどが上げられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P などが挙げられる。

30

【0020】

また、標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質を用いて発光、蛍光又は発色反応を行うことにより、標識物質を測定できる。例えば、酵素がアルカリホスファターゼである場合、基質としては、C D P - s t a r（登録商標）（4 - クロロ - 3 - （メトキシスピロ { 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - （5 ' - クロロ）トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 ³ . 7] デカン } - 4 - イル）フェニルリン酸 2 ナトリウム）、C S P D（登録商標）（3 - （4 - メトキシスピロ { 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 - （5 ' - クロロ）トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 ³ . 7] デカン } - 4 - イル）フェニルリン酸 2 ナトリウム）、A M P P D（登録商標）（アダマンチルメトキシフェニルホスホリルジオキシセタン）、A P S - 5 などの化学発光基質；4 - メチルウンベリフェリルフォスフェート（4 - m e t h y l u m b e l l i f e r y l p h o s p h a t e）などの蛍光基質；p - ニトロフェニルホスフェート、B C I P（5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - リン酸）、N B T（4 - ニトロブルーテトラゾリウムクロリド）、I N T（ヨードニトロテトラゾリウム）などの発色基質を用いることができる。

40

【0021】

50

本発明において用いられる測定対象物質に特異的に結合する抗体は、当業者であれば公知のものを適宜選択して使用することができる。例えば、s I L - 2 R に特異的に結合する抗体は、s I L - 2 R のアミノ酸配列や立体構造等をエピトープとして認識するモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体であれば特に限定するものではないが、例えば、抗体 A M 9 2 . 3 (ピアース社製)、モノクローナル抗体 7 G 7 / B 6 (ピアース社製)、M A B 2 2 3 (R & D S y s t e m s 社製)、M A B 6 2 3 (R & D S y s t e m s 社製)、M A B 1 0 2 0 (R & D S y s t e m s 社製)、Y N R h I L 2 R (S A N T A C R U Z B I O T E C H N O L O G Y 社製)、I L 2 R . 1 (アブカム社製)、B - B 1 0 (L i f e t e c h n o l o g i e s 社製)、E P R 6 4 5 2 (G e n e t e x 社製)、O A P A 0 0 0 0 4 (A V I V A s y s t e m b i o l o g y 社製)、D M 2 5 4 - 0 5 (A c r i s a n t i b o d i e s 社製) 等が挙げられる。

10

【 0 0 2 2 】

これらの抗体は、公知の方法に従って、例えば、s I L - 2 R の場合には、ヒト T 細胞から精製した s I L - 2 R や、i n v i t r o で作製したリコンビナントの s I L - 2 R などを抗原とし、動物に免疫して作製し、更に、エピトープを決定することができる。エピトープとは、抗体が認識する最少の領域だけでなく、抗体が認識可能な領域として同定されたものを意味する。また、公知の方法で調製可能な F a b などの抗体フラグメントであってもよい。また、これらの抗体は、G e n w a y B i o t e c h 社、D i a c l o n e 社、S a n t a C r u z 社、R & D S y s t e m s 社、などから適宜購入することができる。

20

【 0 0 2 3 】

本発明の測定において、2 種類の抗体を使用する場合、生体試料中の測定対象物質 (例えば、s I L - 2 R) と免疫複合体を形成することが可能であれば、限定するものではないが、第 1 抗体と第 2 抗体が認識するエピトープが異なる方が好ましい。また、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体は適宜組み合わせで使用することができる。また、第 1 抗体および第 2 抗体は、それぞれ 1 種類に限定することなく 2 種類以上を併用することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明における硫酸化多糖類の添加は、上記の免疫学的測定法において、測定対象物質 (例えば、s I L - 2 R) と該測定対象物質 (例えば、s I L - 2 R) に特異的に結合する抗体の少なくとも第一回目の免疫複合体形成時 (反応液中) に存在するように行われれば良い。具体的には、免疫複合体形成時 (反応液中) に同時に添加されても良いが、複合体形成前 (前記抗体と前記測定対象物質含有検体が接触する前) に、検体に添加されても良い。

30

【 0 0 2 5 】

また、添加される硫酸化多糖類は、公知の緩衝液に溶解されて溶液として調製され得る。緩衝剤の他、単独で調製されても良いが、検体の前処理や、反応時に必要な公知の物質と共に調製されても良い。硫酸化多糖類は、前記のように、少なくとも免疫複合体形成時 (反応液中) に添加されていれば良いので、その際に存在させることが可能な緩衝液等に含有させることができる。免疫複合体形成時に存在させることが可能な緩衝液等とは、使用する測定法や装置によって適宜設定可能であるが、例えば、検体希釈液や、抗体溶液 (抗体固相粒子液や、標識抗体液など) などが挙げられる。また、複数の緩衝液に添加させても良い。

40

【 0 0 2 6 】

本発明における硫酸化多糖類としては、硫酸デキストラン、β シクロデキストリン硫酸、N - アセチルヘパリン (N A H)、N - アセチル - 脱 - O - 硫酸化 - ヘパリン (N A - d e - o - S H)、脱 - N - 硫酸化 - ヘパリン (D e - N S H)、脱 - N - 硫酸化 - アセチル化 - ヘパリン (D e - N S A H)、過ヨウ素 - 酸化ヘパリン (P O H)、化学的硫酸化ラミナリン (C S L)、化学的硫酸化アルギン酸 (C S A A)、化学的硫酸化ペクチン (C S P)、ヘパリン - 誘導オリゴ糖 (H D O)、ペントサンポリサルフェート (P P

50

S)、およびフコイダン等が挙げられる。好ましくは、硫酸デキストラン、 β シクロデキストリン硫酸が挙げられる。該物質が、反応液中でイオンとして存在できるように供給されればどのような形態で添加されても良いが、例えば、塩化硫酸化多糖類、臭化硫酸化多糖類等が挙げられ、具体的には、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化アンモニウム、臭化リチウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化マグネシウム、臭化アンモニウム等を共存させることが挙げられ、塩化ナトリウムが好ましい。

【0027】

本発明における硫酸化多糖類の濃度としては、前記免疫複合体形成時の濃度として、0.000004%より大きく、0.000004%以上、好ましくは0.00004%以上、より好ましくは0.0004%以上、より好ましくは0.004%以上、より好ましくは0.04%以上、より好ましくは0.01%以上、より好ましくは0.02%以上、また、1%以下、好ましくは0.4%以下、より好ましくは0.04%以下の範囲から適宜組み合わせで選択される。本発明では、生体試料中の硫酸化多糖類（例えば、ヘパリン加血漿中のヘパリン）の存在にかかわらず、反応液中の硫酸化多糖類が上記の濃度範囲となるように存在させておくものである。尚、反応液中の硫酸化多糖類をあまり高めると、抗原抗体反応が抑制（阻害）されて目的の測定が精度よく行なうことができなくなるので、注意が必要である。また、本発明に従って検体の種類に関係なく安定して高精度に生体試料中のsIL-2Rを測定するために、検体に含まれる測定対象物質（例えばsIL-2R）の量や使用する硫酸化多糖によって、添加する濃度を決定することは設計の範囲である。

例えば、デキストラン硫酸（分子量20,000）は0.000004%以上0.04%以下、デキストラン硫酸（分子量4,000）は0.0004%以上0.04%以下、 β シクロデキストリン硫酸塩は0.02%以上0.4%以下等が挙げられる。

【0028】

本発明における硫酸化多糖類の濃度や種類は、後述の実施例に示すように、ヘパリンを添加した血液試料（ヘパリン加血漿）と、それ以外の血液試料（血清）とを用いし、複数の異なる濃度の硫酸化多糖類の存在下で、各血液試料中の測定対象物質（例えばsIL-2R）を測定し、両試料の測定値が一致する硫酸化多糖類の濃度範囲を把握することにより、当業者であれば容易に決定することができる。すなわち、本発明における硫酸化多糖類の濃度や種類は、抗凝固剤としてヘパリンを添加した血液試料（ヘパリン加血漿）を用いた場合の測定値と、それ以外の血液試料（血清）を用いた場合の測定値とが一致する濃度範囲から選択することができる。測定値が一致するとは、具体的には、測定値（測定機器から提供された光学カウントや標準物質を用いて計算された濃度等）が、マイナス10%～プラス10%の間に入っていることを意味する。一般的に、この間に入っていれば、臨床的に有用であるとすることができる。

【0029】

本発明のキットは、本発明の方法を実施するために用いることができ、測定対象物質（例えば、sIL-2R）に特異的に結合する抗体と、硫酸化多糖類を含有する緩衝液を含む。

【0030】

測定対象物質に特異的に結合する抗体とは、前述した公知の抗体を使用することができるし、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであることもできる。また、心筋トロポニンへの特異的結合能を保持する抗体断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFvとして、キットに用いることもできる。

【0031】

更に、前記抗体は、そのままの状態でもキットに用いることもできるし、利用する免疫学的手法に基づいて、それに適した形態、例えば、ラテックス凝集免疫測定法を利用するのであれば、ラテックス担体に固定した状態で、磁性粒子などを利用した高感度測定法を利用するのであれば、磁性粒子に固定した状態で、イムノクロマトグラフ法などの基板を利

10

20

30

40

50

用する方法であれば、基板に固定した状態で、標識物質（例えば、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性同位体、ビオチン、アビジン）による標識の必要があれば、標識化した状態で、キットに用いることもできる。

【0032】

前記硫酸化多糖類を含む緩衝液としては、前述を参照すれば良いが、例えば、検体希釈液や抗体溶液（抗体固相粒子液や標識抗体液）などが挙げられる。好ましくは、検体希釈液として調製されていると良い。

【0033】

また、本発明のキットには、本発明のキットを使用する免疫学的測定法の実施手順に関する説明、キット自体の保存・取り扱いなどに関する注意事項などが記載された取扱説明書を含むことができる。

【実施例】

【0034】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0035】

《参考例1：可溶性インターロイキン2受容体測定用試薬の作製と測定》

参考例1-1：可溶性インターロイキン2受容体測定用試薬の作製と被検試料の調製

可溶性インターロイキン2受容体（sIL-2R）の測定用の試薬を作製した。

【0036】

・検体希釈液：0.1 mol/L HEPES（8.0）、0.15 mol/L NaCl、0.05% Tween 20を含む緩衝液を使用した。

【0037】

・第1抗体溶液：磁性ラテックス粒子（JSR社）にsIL-2Rを認識するマウスモノクローナル抗体（R&D Systems社製）を結合した磁性粒子溶液を用いた。

【0038】

・第2抗体溶液：sIL-2Rを認識する別のマウスモノクローナル抗体（R&D Systems社製）をマレイミド法によりアルカリホスファターゼ（ALP）標識した標識抗体溶液を用いた。

【0039】

・発光基質溶液：CDP-star（アプライドバイオシステム社製）を使用した。

【0040】

・B/F洗浄液：0.01 mol/L MOPS（7.5）、0.15 mol/L NaCl、0.05% Triton X-100を含む緩衝液を使用した。

【0041】

・被検試料（検体）は、常法に従って、健常人から取得した血清、ヘパリン加血漿を用いた。

【0042】

参考例1-2：可溶性インターロイキン2受容体測定用試薬による測定

全自動臨床検査システム（STACIA：LSIメディエンス社製）による測定

STACIA専用ボトルに、調製した検体希釈液、第1抗体溶液（磁性ラテックス試薬）、第2抗体溶液（酵素標識抗体試薬）をそれぞれ充填し、装置にセットした。以下、前記装置の運転方法に従い、測定した。

具体的には、検体 5 μL に検体希釈液 50 μL を加え、37 で 3.5 分間加温した後、第1抗体溶液（磁性ラテックス試薬）25 μL を加え、37 で 4.2 分間加温した。検体中の sIL-2R は第1抗体（磁性ラテックス）と反応し、磁性ラテックス-sIL-2R 複合体を形成した。次いで、第2抗体溶液（酵素標識抗体試薬）50 μL を加え、37 で 4.4 分間加温した。第2抗体溶液（ALP 標識抗体）を加えると、ALP 標識抗体は磁性ラテックス-sIL-2R 複合体と反応し、磁性ラテックス-sIL-2R-ALP 標識抗体複合体を形成した。洗浄によって未反応の抗体および sIL-2R を除

10

20

30

40

50

去 (B / F 分離) した後、発光基質液 1 0 0 μ L を加え、3 7 ° C で 2 . 7 分間反応後に発光量を測定した。C D P - S t a r を加えると、C D P - S t a r は複合体中の A L P により加水分解され発光する。検出は、光電子増倍管 (P M T) により検出される化学発光基質の発光カウントを測定結果とした。

【 0 0 4 3 】

《実施例 1 : 反応液への硫酸化多糖類又は硫酸基を持たない多糖類又は多糖類を持たず硫酸基を含む化合物の添加による s I L - 2 R の反応性への影響》

硫酸化多糖類又は硫酸基を持たない多糖類又は多糖類を持たず硫酸基を含む化合物を、反応液中に下記の濃度になるように検体希釈液に添加したこと以外は、参考例 1 に従って行った。

・硫酸化多糖類：デキストラン硫酸塩 (分子量 4 0 0 0) を、0 . 0 4 % になるように検体希釈液に添加した。β シクロデキストリン硫酸塩を、0 . 0 4 % になるように検体希釈液に添加した。

・硫酸基を持たない多糖類：デキストランを、0 . 0 4 % になるように検体希釈液に添加した。シクロデキストリンを、0 . 0 4 % になるように検体希釈液に添加した。

・多糖類を持たず硫酸基を含む化合物：C H A P S O を、0 . 0 4 % になるように検体希釈液に添加した。オクタン酸ナトリウムを、0 . 0 4 % になるように検体希釈液に添加した。それ以外は、参考例 1 に従って行った。

【 0 0 4 4 】

その結果を表 1 に示す。ヘパリン加血漿のカウントを血清のカウントで割った後 1 0 0 を掛けたものを、ヘパリン加血漿 / 血清として示した。添加無しの例だと、血清およびヘパリン加血漿とでは、可溶性インターロイキン 2 受容体の反応性が異なることがわかった。さらに、デキストラン硫酸塩 (分子量 4 0 0 0) や β シクロデキストリン硫酸塩などの、硫酸基を持つ多糖類 (硫酸化多糖類) では血清とヘパリン加血漿の反応性が一致する (ヘパリン加血漿 / 血清が 9 9 % あるいは 1 0 0 %) が、デキストランやシクロデキストリンなどの硫酸基を持たない多糖類、あるいは、C H A P S O やオクタン酸ナトリウムなどの多糖類を持たず硫酸基を含む化合物のみでは血清とヘパリン加血漿の反応性は一致しなかった (ヘパリン加血漿 / 血清が 1 3 0 % ~ 1 3 8 %) 。血清とヘパリン加血漿の反応性を一致させるには、硫酸基を持つ多糖類の添加が必要であることが示された。

【 0 0 4 5 】

【表 1】

	添加無し	デキストラン硫酸 (4,000)	β シクロ デキストリン 硫酸塩	デキストラン (2,000)	シクロ デキストリン	CHAPSO	オクタン酸 ナトリウム
血清試料 (count)	15544	21591	21328	16185	16156	15508	16224
ヘパリン加血漿試料 (count)	20779	21462	21310	21112	22316	20981	21349
ヘパリン加血漿 / 血清	134%	99%	100%	130%	138%	135%	132%

【 0 0 4 6 】

《実施例 2 : 反応液への各種硫酸化多糖類添加による可溶性インターロイキン 2 受容体の反応性への影響》

以下に記載すること以外は、参考例 1 の手法に従って行った。

・検体希釈液：0 . 1 m o l / L H E P E S (8 . 0) 、 0 . 1 5 m o l / L N a C l 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 、 0 . 4 m m o l / L エチレンジアミン四酢酸を含む緩衝液を使用した。

・デキストラン硫酸 (分子量 2 0 , 0 0 0) を、反応液中に各濃度 (0 . 0 0 0 0 0 0 4 、 0 . 0 0 0 0 0 4 、 0 . 0 0 0 0 4 、 0 . 0 0 0 4 、 0 . 0 0 4 、 0 . 0 4 %) になるように検体希釈液に添加した。

・デキストラン硫酸 (分子量 4 , 0 0 0) を、反応液中に各濃度 (0 . 0 0 0 0 0 4 、 0 . 0 0 0 0 4 、 0 . 0 0 0 4 、 0 . 0 0 4 、 0 . 0 4 %) になるように検体希釈液に添加

した。

- ・βシクロデキストリン硫酸塩を、反応液中に各濃度（0.004、0.01、0.02、0.04、0.08、0.2、0.4%）になるように検体希釈液に添加した。
- ・標準品：組み換えsIL-2Rを100000、40000、2500、500、0U/mLになるように希釈したものを用いた。希釈には0.05mol/L PBS（7.4）、0.05% Tween 20、0.1% BSA、0.05% アジ化ナトリウムを含む緩衝液を使用した。該標準品を使用し、公知の方法に従って、発光カウントから各濃度（U/mL）を算出した。

【0047】

その結果を表2に示す。ヘパリン加血漿の濃度を血清の濃度で割った後100を掛けたものを、ヘパリン加血漿/血清として示した。添加無しの例だと、血清およびヘパリン加血漿とでは、可溶性インターロイキン2受容体の反応性が異なることがわかった。

その結果、一致とみなす範囲をマイナス10%～プラス10%とすると、デキストラン硫酸塩（分子量20,000）は0.000004%以上、デキストラン硫酸（分子量4,000）は0.0004%以上、βシクロデキストリン硫酸塩は0.004%以上添加されることにより、血清およびヘパリン加血漿の可溶性インターロイキン2受容体の反応性が一致することが確認された。

【0048】

【表2】

デキストラン硫酸塩（分子量20,000）

硫酸化多糖濃度 (%)	0	0.000004%	0.00004%	0.0004%	0.004%	0.04%	0.04%
血清試料 (U/mL)	119	185	224	259	259	270	271
ヘパリン血漿試料 (U/mL)	142	223	223	247	252	266	267
ヘパリン血漿/血清	119%	121%	100%	95%	97%	99%	99%

デキストラン硫酸塩（分子量4,000）

硫酸化多糖濃度 (%)	0	0.000004%	0.00004%	0.0004%	0.004%	0.04%
血清試料 (U/mL)	119	175	176	217	259	262
ヘパリン血漿試料 (U/mL)	142	217	217	235	245	249
ヘパリン血漿/血清	119%	124%	123%	108%	95%	95%

βシクロデキストリン硫酸塩

硫酸化多糖濃度 (%)	0.000%	0.004%	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%	0.2%	0.4%
血清試料 (U/mL)	119	147	161	173	170	180	192	191
ヘパリン血漿試料 (U/mL)	142	149	174	175	168	162	174	189
ヘパリン血漿/血清	119%	101%	108%	101%	99%	90%	91%	99%

【0049】

《比較例1：反応液への硫酸基を持たない多糖類及び多糖類を持たず硫酸基を含む化合物の添加によるsIL-2Rの反応性への影響》

硫酸化多糖類と同様な反応性となるか、硫酸基を持たない多糖類及び多糖類を持たず硫酸基を含む化合物を、同時に反応液中添加して検討した。硫酸基を持たない多糖類及び多糖類を持たず硫酸基を含む化合物を、下記の濃度になるように検体希釈液に添加したこと以外は、参考例1に従って行った。

- ・多糖類を持たず硫酸基を含む化合物：NDSB-195、NDSB-201、NDSB-256を、それぞれ0.385mmol/L、3.85mmol/Lになるように検体希釈液に添加した。

- ・多糖類を持たず硫酸基を含む化合物及び硫酸基を持たない多糖類の混合：NDSB-1

95を3.85mmol/L、及び、デキストラン（分子量2000）を0.19%になるように検体希釈液に添加した。

【0050】

その結果を表3に示す。ヘパリン加血漿のカウントを血清のカウントで割った後100を掛けたものを、ヘパリン加血漿/血清として示した。その結果、多糖類を持たず硫酸基を含む化合物では血清とヘパリン加血漿の測定値が一致しないこと、更に、硫酸基を持たない多糖類を添加した状態においても測定値が一致しないことがわかった。

硫酸基を持たない多糖類及び多糖類を持たず硫酸基を含む化合物を共存させた場合では、実施例1、2の硫酸基を持つ多糖類のような効果は得られず、硫酸基を持つ多糖類を共存させた場合でないといこの高い効果が得られないことは、硫酸基と多糖類の存在によるものではないことから、意外な結果であった。

【0051】

【表3】

化合物	添加物無し	NDSB-195		NDSB-201		NDSB-256		NDSB-195 +デキストラン (2000)
濃度	—	3.85mM	0.385mM	3.85mM	0.385mM	3.85mM	0.385mM	3.85mM+0.19%
血清試料 (count)	5352	5476	5388	5317	5352	5390	5200	5822
ヘパリン加血漿試料 (count)	6619	6943	7173	6678	7143	7115	7055	7617
ヘパリン加血漿/血清	124%	127%	133%	126%	133%	132%	136%	131%

【0052】

《実施例3：反応液への硫酸化多糖類の添加によるtotal PSAの反応性への影響》

実施例3-1：total PSA測定用試薬の作製と被検試料の調製

total PSAの測定用の試薬を作製した。

【0053】

・検体希釈液：0.1mol/L HEPES(8.0)、0.15mol/L NaCl、0.05% Tween20を含む緩衝液を使用した。

【0054】

・第1抗体溶液：磁性ラテックス粒子（JSR社）にPSAを認識するマウスモノクローナル抗体（Biospacific社製）を結合した磁性粒子溶液を用いた。

【0055】

・第2抗体溶液：PSAを認識する別のマウスモノクローナル抗体（Biospacific社製）をマレイミド法によりアルカリホスファターゼ（ALP）標識した標識抗体溶液を用いた。

【0056】

・発光基質溶液：CDP-star（アプライドバイオシステム社製）を使用した。

【0057】

・B/F洗浄液：0.01mol/L MOPS(7.5)、0.15mol/L NaCl、0.05% Triton X-100を含む緩衝液を使用した。

【0058】

・βシクロデキストリン硫酸塩を、反応液中に各濃度（0.002、0.004、0.008、0.031%）になるように検体希釈液に添加した。

【0059】

・被検試料（検体）は、常法に従って、健常人から取得した血清、ヘパリン加血漿を用いた。

【0060】

・標準品：組み換えPSAを100、50、10、1、0ng/mLになるように希釈したものをを用いた。希釈には0.01mol/L MOPS(7.0)、0.15mol/L

L NaCl、0.05% Triton X、0.05% Proclin 300を含む緩衝液を使用した。該標準品を使用し、公知の方法に従って、発光カウントから各濃度 (ng/mL) を算出した。

【0061】

実施例3-2: total PSA測定用試薬による測定と結果

測定対象をtotal PSAとしたこと以外は、参考例1-2と同様に実施した。

その結果を表4に示す。ヘパリン加血漿の濃度を血清の濃度で割った後100を掛けたものを、ヘパリン加血漿/血清として示した。添加無しの例だと、血清およびヘパリン加血漿とでは、total PSAの反応性が異なることがわかった。さらに、一致とみなす範囲をマイナス10%~プラス10%とすると、βシクロデキストリン硫酸塩は0.002%以上添加されることにより、血清およびヘパリン加血漿のtotal PSAの反応性が一致することが確認された。

【0062】

【表4】

βシクロデキストリン硫酸塩

硫酸化多糖濃度 (%)	0.000%	0.031%	0.008%	0.004%	0.002%
血清試料 (ng/mL)	0.48	0.54	0.54	0.58	0.53
ヘパリン加血漿試料 (ng/mL)	0.56	0.58	0.58	0.59	0.54
ヘパリン加血漿/血清	116%	107%	106%	101%	103%

【産業上の利用可能性】

【0063】

本発明は、測定対象物質 (例えば、sIL-2R) を検出する場合に、特に一般的に使用検体の種類 (血清及びヘパリン加血漿) に関わらず、検体中の干渉物質の影響を受けることなく安定して高精度に測定結果を得ることができる。臨床検査は、簡便・迅速に測定される必要があり、検査室だけでなくPOCT分野等においても測定される。例えば、血液試料を対象とすると、様々な状況で測定され得る可能性を考慮すると、該試料の採取に用いられる容器は多岐にわたるため、得られた検体の種類に関わらず、特に一般的に使用される血清やヘパリン加血漿を使用する上で、安定して高精度に測定結果を得ることが可能となる本発明は特に有用である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変法や改良は本発明の範囲に含まれる。

フロントページの続き

(72)発明者 張 旭

東京都千代田区内神田一丁目13番4号 株式会社LSIメディエンス内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2013-152247(JP,A)

特開2009-53195(JP,A)

特表2002-502979(JP,A)

国際公開第2012/115221(WO,A1)

国際公開第2017/078119(WO,A1)

米国特許第4829009(US,A)

米国特許出願公開第2012/0045847(US,A1)

特開2014-149189(JP,A)

国際公開第2002/063302(WO,A1)

シーメンス・イムライズ IL-2RII, シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社, 2015年

デタミナーCL IL-2R, 協和メデックス株式会社, 2011年

DE JONGH R, The Effects of Anticoagulation and Processing on Assays of IL-6,sIL-6R,sIL-2R and Soluble Transferrin Receptor, Cytokine, 1997年, Vol.9 No.9, Page.696-701

COLLINSON P O, Rapid troponin T measurement in whole blood for detection of myocardial damage, Ann Clin Biochem, 1995年, Vol.32 No.5, Page.454-458

セルフリーN IL-2R, 協和メデックス株式会社, 2010年

高野良, 硫酸化多糖の化学修飾 硫酸化や脱硫酸化は多糖の機能にどのように関わるか?, 化学と生物, 1996年, Vol.34 No.9, Page.598-604

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/531

G01N 33/53

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	使用硫酸化多糖的免疫分析		
公开(公告)号	JP6668459B2	公开(公告)日	2020-03-18
申请号	JP2018512041	申请日	2017-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	有限公司的LSI Medience		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司的LSI Medience		
[标]发明人	清水隆平 庄司慶一 張旭		
发明人	清水 隆平 庄司 慶一 張 旭		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54333 G01N2400/18 G01N2400/22 G01N2400/40		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.D		
代理人(译)	山口健次郎 森田健一		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2016080660 2016-04-13 JP		
其他公开文献	JPWO2017179611A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一般而言，不管样本的类型如何，例如血清或含有不同抗凝剂的肝素化血浆，通常被广泛使用，当通过免疫学方法检测生物样品中的待测物质（例如sIL-2R）时，一种测量方法 本发明提供了一种能够不受样品中的干扰物质影响而稳定，高精度地获得的试剂盒。在硫酸多糖存在下，在待测物质和特异性结合待测物质的抗体之间形成免疫复合物。该试剂盒包含与待测物质特异性结合的抗体和含有硫酸化多糖的缓冲液。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6668459号 (P6668459)
(45) 発行日 令和2年3月18日 (2020.3.18)		(24) 登録日 令和2年2月28日 (2020.2.28)	
(51) Int. Cl.		F I	
G O 1 N 33/531 (2006.01)		G O 1 N 33/531	B
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N 33/53	D
請求項の数 9 (全 13 頁)			
(21) 出願番号 特願2018-512041 (P2018-512041)		(73) 特許権者 591122956	
(86) (22) 出願日 平成29年4月12日 (2017.4.12)		株式会社 L S I メディエンス	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2017/014943		東京都千代田区内神田一丁目13番4号	
(87) 国際公開番号 W02017/179611		(74) 代理人 100139594	
(87) 国際公開日 平成29年10月19日 (2017.10.19)		弁理士 山口 健次郎	
審査請求日 平成31年2月7日 (2019.2.7)		(74) 代理人 100090251	
(31) 優先権主張番号 特願2016-80660 (P2016-80660)		弁理士 森田 意一	
(32) 優先日 平成28年4月13日 (2016.4.13)		(72) 発明者 清水 隆平	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)		東京都千代田区内神田一丁目13番4号	
		株式会社 L S I メディエンス内	
		(72) 発明者 庄司 慶一	
		東京都千代田区内神田一丁目13番4号	
		株式会社 L S I メディエンス内	
最終頁に続く			
(54) 【発明の名称】 硫酸化多糖類を用いた免疫学的測定法			