

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001－281247
(P2001－281247A)

(43)公開日 平成13年10月10日(2001.10.10)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	B
33/53			33/53	S

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L（全 5 数）

(21)出願番号	特願2000－93269(P2000－93269)	(71)出願人	000002288 三洋化成工業株式会社 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(22)出願日	平成12年3月30日(2000.3.30)	(72)発明者	山崎 忠明 京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化 成工業株式会社内
		(72)発明者	黒川 祐人 京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化 成工業株式会社内

(54)【発明の名称】 抗原含有緩衝水溶液

(57)【要約】

【課題】 免疫測定用の抗原標準溶液中の抗原の失活を防止し、安定保存できる抗原含有緩衝水溶液を提供する。

【解決手段】 緩衝水溶液中の塩が、ハロゲン化アルカリ金属塩及び／又はその他の塩からなり、ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量が緩衝水溶液の単位容積当たり0～20ミリモル／リットルであることを特徴とする抗原含有緩衝水溶液を用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 緩衝水溶液中の塩が、ハロゲン化アルカリ金属塩及び／又はその他の塩からなり、ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量が緩衝水溶液の単位容積当たり0～20ミリモル／リットルであることを特徴とする抗原含有緩衝水溶液。

【請求項2】 抗原が、糖鎖抗原である請求項1記載の緩衝水溶液。

【請求項3】 抗原が、CA125である請求項1記載の緩衝水溶液。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか記載の緩衝水溶液を、抗原標準水溶液として用いる免疫測定用キット。

【請求項5】 請求項1～3のいずれか記載の緩衝水溶液を、抗原標準水溶液として用いる免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗原含有緩衝水溶液に関する。さらに詳しくは、免疫測定用の抗原標準水溶液中の抗原の失活を防止し、安定保存できる抗原含有緩衝水溶液に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、免疫測定において、抗原標準溶液中の抗原の失活を防止するために、①凍結乾燥等により水分を除去し固体状態で保存し、使用時に水溶液とする方法、②抗原含有水溶液に牛血清アルブミンや血清等のタンパク質及び塩化ナトリウムを添加する方法が知られている〔佐々木 實，免疫化学的同定法（第3版），東京化学同人，1993；石川榮治，超高感度酵素免疫測定法，学会出版センター，1993〕。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、①の方法は、保存安定性が良い反面、使用時に水溶液としなければならないため、操作が煩雑になり、また、濃度誤差が生じ、測定誤差が生じるという問題点がある。さらに、水溶液とした後は抗原が徐々に失活し濃度誤差が生じ、測定誤差が生じるという問題点がある。②の方法では、通常の抗原は、冷蔵（2～10℃）で1年間保存可能であるが、一部の抗原は冷蔵条件でも不安定なものであるという問題点がある。さらに、免疫測定を行う際に、室温では抗原が徐々に失活し測定誤差が生じるとい*40

<イオンクロマトグラフィー測定条件>

カチオン分析条件（アルカリ金属イオン）

- ・カラム : Shim-pack IC-C1（島津製作所製）
- ・移動相 : 5mM硝酸
- ・流速 : 1.3ml/min
- ・オープン温度 : 40℃

アニオン分析条件例（ハロゲンイオン）

- ・カラム : Shim-pack IC-A1（島津製作所製）
- ・移動相 : 2.5mMフタル酸及び2.4mMトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、1対1（容積比）混合水溶液

*う問題点がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、ハロゲン化アルカリ金属塩濃度を一定範囲内とすることで、水溶液中でも抗原の失活が少なく、長期間安定保存できる抗原含有緩衝水溶液を見出し、本発明に到達した。すなわち、本発明の抗原含有緩衝水溶液の特徴は、緩衝水溶液中の塩が、ハロゲン化アルカリ金属塩及び／又はその他の塩からなり、ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量が緩衝水溶液の単位容積当たり0～20ミリモル／リットルである点にある。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明において、ハロゲン化アルカリ金属塩及び／又はその他の塩からなる塩は、緩衝水溶液に、これらの塩を加えても良いが、これらの塩を加えないことが好ましい。すなわち、これらの塩の大部分は、緩衝水溶液の原料に起因するものであり、緩衝水溶液の調製に伴い、中和塩として混入してくるものである。

【0006】ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量は、緩衝水溶液の単位容積当たり、通常0～20ミリモル／リットル、好ましくは0～10ミリモル／リットル、さらに好ましくは0～5ミリモル／リットル、特に好ましくは0～1ミリモル／リットル、最も好ましくは0ミリモル／リットルである。この範囲を超えると抗原含有緩衝水溶液の保存安定性が低下する。すなわち、ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量が少ない程、抗原含有緩衝水溶液の保存安定性よく、中和塩及び不純物として混入するものを除き、水溶液中にハロゲン化アルカリ金属塩を添加しない方がよい。その他の塩の含有量は、緩衝水溶液の単位容積当たり、通常5～3,000ミリモル／リットルである。なお、ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量は、イオンクロマトグラフィー法によりハロゲンイオンとアルカリ金属イオンの定量を行い、化学量論的に形成し得るハロゲン化アルカリ金属塩のモル数を算出する。その他の塩の含有量も同様にして、算出することができる。

【0007】

- ・流速 : 1.3 ml/min
- ・オーブン温度 : 40°C

4

【0008】ハロゲン化アルカリ金属塩としては、ハロゲンとアルカリ金属とからなる塩であり、例えば、フッ化ナトリウム、塩化リチウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、臭化リチウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、ヨウ化リチウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム等が挙げられる。これらのうち、好ましくないものは塩化アルカリ金属塩であり、さらに好ましくないものは塩化カリウム及び塩化ナトリウム、特に好ましくないものは塩化ナトリウムである。

【0009】その他の塩としては、水溶性無機塩及び／又は水溶性有機塩であり、水溶性無機塩として、例えば、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等が挙げられる。また、水溶性有機塩として、例えば、シュウ酸水素カリウム、フタル酸水素カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、クエン酸ナトリウム、パルビタルナトリウム等が挙げられる。これらのうち好ましいものは、水溶性無機塩であり、さらに好ましくはリン酸二水素カリウム及びリン酸水素二ナトリウムである。

【00010】本発明の抗原含有緩衝水溶液のpHは、通常4.0～12.0、好ましくは6.0～9.0である。また、本発明の緩衝水溶液は、弱酸とその塩との混合水溶液、弱塩基とその塩との混合水溶液及び／又は両性電解質とその塩を必須の構成成分として含有してなるものである。弱酸としては、無機弱酸と有機弱酸が使用でき、無機弱酸としては、例えば、炭酸及びリン酸等が挙げられる。有機弱酸としては、例えば、フタル酸、クエン酸、β、β'-ジメチルグルタル酸、コハク酸、酢酸、マレイン酸、ホウ酸等が挙げられる。弱塩基として、例えば、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、グリシニアミド、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン等が挙げられる。

【0011】両性電解質としては、例えば、グリシン、ヒスチジン、2-(N-モノホリノ)エタンスルホン酸、2,2-ビス(ヒドロキシメチル)-2,2',2''-ニトリロトリエタノール、N-(2-アセトアミド)イミノ2酢酸、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、3-(N-モノホリノ)プロパンスルホン酸、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、アセトアミノグリシン、5,5-ジエチルパルビツル酸、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン、グリシルグリシン、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、N、

N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン、シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸、シクロヘキシルアミノプロパンスルホン酸等があげられる。これらのうち、好ましくは無機弱酸であり、さらに好ましくはリン酸である。

【0012】弱酸の塩は、弱酸に塩基を作用させて調製されるものであり、塩基としては、例えば、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等の水中で解離度の高い塩基が使用できる。これらのうち、好ましい塩基は、水酸化ナトリウムである。弱塩基の塩は、弱塩基に酸を作用させて調製されるものであり、酸としては、例えば、塩酸、硝酸、硫酸、次亜塩素酸等の水中で解離度の高い酸が使用できる。これらのうち、好ましい酸は、塩酸である。本発明の緩衝水溶液を目的のpHに微調整するため、上記の弱酸、弱塩基、酸及び／又は塩基を適宜組み合わせることができるが、緩衝水溶液中のハロゲン化アルカリ金属塩の含有量が0～20ミリモル/リットルとなるように調製する必要がある。なお、ハロゲン化アルカリ金属塩の好ましい含有量は、0～10ミリモル/リットル、さらに好ましくは0～5ミリモル/リットル、特に好ましくは0～1ミリモル/リットル、最も好ましくは0ミリモル/リットルである。

【0013】本発明において、抗原としては、例えば、糖鎖抗原、癌胎児性蛋白、血清蛋白、ホルモン、酵素、ウイルス等が使用できる。糖鎖抗原としては、例えば、CA125、CA19-9、CA50、KM01、DU-PAN-2、SLA2-6、シアリルSSEA-1、KM93、CSLEX、NCC-ST-439、CA72.4、STN、CA54/61、CA602、CA130及びCA15-3等が挙げられる。癌胎児性蛋白としては、例えば、α-フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、前立腺特異抗原(PSA)、CYFRP、SCC及びProGRP等が挙げられる。血清蛋白としては、例えば、β2-ミクログロブリン、フェリチン、免疫グロブリンE(IgE)、C反応性蛋白(CRP)、トロポニンT及びミオグロビン等が挙げられる。

【0014】ホルモンとしては、例えば、インスリン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、卵巣刺激ホルモン(FSH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、黄体形成ホルモン(LH)、プロラクチン及び副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)等が挙げられる。酵素としては、例えば、神経性特異エノラーゼ(NSE)等が挙げられる。ウイルスとしては、例えば、HBs、HBe、HCV及びHIV等が挙げられる。これらのうち好ましいものは糖鎖抗原であり、特に好ましいものはCA125である。含有量は、抗原の種類及び抗原標準溶液として用いられる免疫測定キットによって様々ではあるが、CA1

25の場合、緩衝水溶液の単位容積当たり、通常0～1000U/mlである。

【0015】本発明の緩衝水溶液には、他の成分としてタンパク質、防腐剤を添加することができる。タンパク質としては、アルブミン、カゼイン等が使用できる。アルブミンとしては、例えば、牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等が挙げられる。カゼインとしては、例えば、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 γ -カゼイン、 κ -カゼイン、 λ -カゼイン及び加水分解カゼイン等が挙げられる。これらのうち好ましくはアルブミンであり、特に好ましく牛血清アルブミンである。タンパク質を添加する場合、タンパク質の添加量は、緩衝水溶液の単位容積当たり、通常1～100mg/ml、好ましくは1～50mg/mlである。

【0016】防腐剤としては、例えば、アジ化ナトリウム、トルエン及びチモール等が挙げられる。このうち好ましくは、アジ化ナトリウムである。防腐剤を添加する場合、防腐剤の添加量は、緩衝水溶液の単位容積当たり、通常0.01～10mg/ml、好ましくは0.1

～5mg/mlである。

【0017】本発明の抗原含有緩衝水溶液は、公知の調整法で得ることができ、例えば、脱イオン水に各成分を添加し、均一に攪拌溶解する方法や緩衝水溶液を調製しておき、これに抗原を溶解する方法等が挙げられる。なお、抗原は室温以下で溶解することが望ましい。

【0018】本発明の緩衝水溶液は、酵素免疫測定方法、放射線免疫測定方法、免疫比濁方法等の公知の免疫測定方法 {例えば、佐々木 實、免疫化学的同定法(第3版)、東京化学同人、1993;石川榮治、超高感度 30 酵素免疫測定法、学会出版センター、1993} に好適に用いられ、さらに酵素免疫測定方法に好適に用いられる。特に免疫測定方法における抗原標準液として好適に用いられる。また、本発明の緩衝水溶液は、抗原測定用試薬、抗原含有標準液、検体希釈液等の構成からなる免疫測定用キットとして好適である。特に、免疫測定用キットの抗原標準溶液として好適に使用される。

【0019】

【実施例】以下、実施例により、本発明をさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。ハロゲン化アルカリ金属塩濃度は、上記のイオンクロマトグラフィー法(島津製作所製HIC-6A)にて測定した。

実施例1(CA125含有緩衝水溶液の調製)

リン酸1水素2ナトリウム12水和物5.15g、リン酸2水素カリウム0.76g及び牛血清アルブミン(Bayer社製)10.0gを脱イオン水に均一溶解し、合計1.0リットルとなるよう脱イオン水にて調整し、リン酸緩衝水溶液(pH7.2)を調製した。その後、このリン酸緩衝水溶液に、CA125(Fitzgerald社製)を添加し、CA125濃度が15U/m

1、120U/ml、480U/mlの各抗原含有緩衝水溶液をそれぞれ調製した。各抗原含有緩衝水溶液中のハロゲン化アルカリ金属塩は、検出されなかった(イオンクロマトグラフィー法による。定量限界1.4マイクロモル/リットル)。

【0020】実施例2

リン酸水素二ナトリウム12水和物5.15g、リン酸二水素カリウム(無水和物)0.76g及び牛血清アルブミン(Bayer社製)10.0gを脱イオン水に均一溶解し、合計1.0リットルとなるよう脱イオン水にて調整し、リン酸緩衝水溶液(pH7.2)を得た後、さらに、この緩衝水溶液に1M塩酸水溶液を8.5g添加し、pH6.5のリン酸緩衝水溶液を調製した。その後、このリン酸緩衝水溶液に、CA125(Fitzgerald社製)を添加し、CA125濃度が15U/ml、120U/ml、480U/mlの各抗原含有緩衝水溶液をそれぞれ調製した。イオンクロマトグラフィー法による各抗原含有緩衝水溶液中のハロゲン化アルカリ金属塩の含有量は、それぞれ8.5ミリモル/リットルであった。

【0021】比較例1

塩化ナトリウム1.0g、リン酸水素二ナトリウム12水和物5.15g、リン酸二水素カリウム(無水和物)0.76g及び牛血清アルブミン(Bayer社製)10.0gを脱イオン水に均一溶解し、合計1.0リットルとなるよう脱イオン水にて調整し、リン酸緩衝水溶液(pH7.2)を得た後、さらに、この緩衝水溶液に1M塩酸水溶液を8.5g添加し、pH6.5のリン酸緩衝水溶液を調製した。このリン酸緩衝水溶液に、CA125(Fitzgerald社製)を添加し、CA125濃度が15U/ml、120U/ml、480U/mlの各抗原含有緩衝水溶液をそれぞれ調製した。イオンクロマトグラフィー法によるハロゲン化アルカリ金属塩の含有量は、それぞれ25.5ミリモル/リットルであった。

【0022】比較例2

塩化ナトリウム8.5g、リン酸水素二ナトリウム12水和物5.15g、リン酸二水素カリウム(無水和物)0.76g及び牛血清アルブミン(Bayer社製)10.0gを脱イオン水に均一溶解し、合計1.0リットルとなるよう脱イオン水にて調整し、リン酸緩衝水溶液(pH7.2)を得た。このリン酸緩衝水溶液に、CA125(Fitzgerald社製)を添加し、CA125濃度が15U/ml、120U/ml、480U/mlの各抗原含有緩衝水溶液をそれぞれ調製した。イオンクロマトグラフィー法によるハロゲン化アルカリ金属塩の含有量は、それぞれ145ミリモル/リットルであった。

【0023】評価

実施例1及び2並びに比較例1及び2で調製したCA1

25含有緩衝水溶液（各濃度）を4℃と25℃とで保存し、作製時、6月後、1年後及び2年後のCA125濃度を、免疫測定用キット【スフィアライト CA125（三洋化成工業（株）製）】を用いて、自動化学発光酵素免疫分析装置【スフィアライト180（オリンパス光*

学工業（株）製）】で測定した。その結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

CA125含有緩衝水溶液の保存安定性

	ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量 *	保存温度 (°C)	CA125濃度 (U/ml)	測定値 (U/ml)			
				調製時	6月後	1年後	2年後
実施例 1	検出限界以下	4	15	15	15	15	15
			120	120	121	120	120
			480	480	480	479	480
		25	15	15	15	15	15
			120	120	120	119	120
			480	480	479	481	480
実施例 2	8.5	4	15	15	15	15	15
			120	120	121	120	120
			480	480	480	481	482
		25	15	15	15	15	15
			120	120	120	121	122
			480	480	481	482	485
比較例 1	25.5	4	15	15	15	16	17
			120	120	122	126	130
			480	480	486	504	522
		25	15	15	16	18	18
			120	120	127	132	135
			480	480	503	520	539
比較例 2	145	4	15	15	16	18	18
			120	120	128	134	136
			480	480	509	545	550
		25	15	15	17	18	19
			120	120	135	138	137
			480	480	542	550	550

*ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量の単位は、ミリモル／リットルである。

また、検出限界は、1.4マイクロモル／リットルである。

【0025】表1からわかるように、実施例1及び2の CA125含有緩衝水溶液は、4℃、25℃いずれも保存安定性が良好であった。これに対し、比較例1及び2は、4℃、25℃いずれもCA125含有緩衝水溶液中のCA125濃度が経日的に増加した。通常、抗原が経日変化を起こす場合は、失活により濃度が経日的に減少するが、比較例の場合は、濃度が経日的に増加している。これは、水溶液中でCA125の免疫反応性が変化し、見かけCA125濃度が上昇したためと推定される。

【0026】

【発明の効果】本発明の抗原含有緩衝水溶液は、抗原活性を安定に長期間維持することができるため、極めて高い精度と再現性で免疫測定ができる。さらに、従来行われていた凍結乾燥・抗原の溶解といった煩雑な調整操作が全く不必要となるのに加え、溶解の際に生じる濃度差による誤差の発生がなくなる。従って、本発明の抗原含有緩衝水溶液は、免疫測定における標準試薬等の長期の保存安定性を要求される用途に極めて好適である。

专利名称(译)	抗原含有缓冲水溶液		
公开(公告)号	JP2001281247A	公开(公告)日	2001-10-10
申请号	JP2000093269	申请日	2000-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	山崎忠明 黒川祐人		
发明人	山崎 忠明 黒川 祐人		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.S		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供含抗原的缓冲溶液，其能够防止抗原标准溶液中的抗原失活，用于免疫测定并稳定地储存。 溶液：缓冲水溶液中的盐由碱金属卤化物盐和/或另一种盐组成，卤化碱金属盐的含量为每单位体积缓冲水溶液0至20mmol /升使用含有特征抗原的缓冲溶液。

装置イスフィアライト180 (オリンパス光*)
CA125含有緩衝水溶液の保存安定性

	ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量 *	保存温度 (℃)	CA125濃度 (U/ml)	測定値 (U/ml)			
				調製時	6月後	1年後	2年後
実施例 1	検出限界以下	4	15	15	15	15	15
			120	120	121	120	120
			480	480	480	479	480
		25	15	15	15	15	15
			120	120	120	119	120
			480	480	479	481	480
実施例 2	8.5	4	15	15	15	15	15
			120	120	121	120	120
			480	480	480	481	482
		25	15	15	15	15	15
			120	120	120	121	122
			480	480	481	482	485
比較例 1	25.5	4	15	15	15	16	17
			120	120	122	126	130
			480	480	486	504	522
		25	15	15	16	18	18
			120	120	127	132	135
			480	480	503	520	539
比較例 2	145	4	15	15	16	18	18
			120	120	128	134	136
			480	480	509	545	550
		25	15	15	17	18	19
			120	120	135	138	137
			480	480	542	550	550

*ハロゲン化アルカリ金属塩の含有量の単位は、ミリモル／リットルである