

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4733335号
(P4733335)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 M
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 J
GO 1 N 33/545	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/545	B
		GO 1 N 33/577	B

請求項の数 22 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2002-523622 (P2002-523622)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月28日(2001.8.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2001/007385
 (87) 国際公開番号 W02002/018953
 (87) 国際公開日 平成14年3月7日(2002.3.7)
 審査請求日 平成20年6月19日(2008.6.19)
 (31) 優先権主張番号 特願2000-259964 (P2000-259964)
 (32) 優先日 平成12年8月29日(2000.8.29)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000162478
 協和メデックス株式会社
 東京都中央区晴海一丁目8番10号
 (73) 特許権者 000004341
 日油株式会社
 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
 (73) 特許権者 598080484
 株式会社テイエフビー
 東京都豊島区西池袋一丁目18番2号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 重信 香代子
 日本国静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地
 600番1 協和メデックス株式会社 協
 和メデックス研究所内

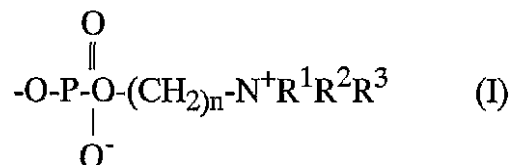
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 再現性良好な凝集イムノアッセイ法及び試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、式(I)
 (化学式1)



(式中、nは1～6の整数、R¹、R²及びR³は、同一又は異なって、水素、炭素数1～6の置換又は非置換アルキルを示す。)で表される基を有する化合物を用いることを特徴とする凝集イムノアッセイ法。

【請求項2】

式(I)で表される基を有する化合物が、式(I)で表される基を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項1記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項3】

式(I)で表される基を有する化合物が、式(I)で表される基を有する単量体と、該式(I)で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる化合

物であることを特徴とする請求項 1 記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 4】

式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 3 記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 5】

ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸 - n - ブチルであることを特徴とする請求項 4 記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 6】

式 (I) で表される基を有する単量体が、式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 2 ~ 5 のいずれか記載の凝集イムノアッセイ法。

10

【請求項 7】

式 (I) で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 8】

式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体が、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであることを特徴とする請求項 6 記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 9】

抗体が抗ヘモグロビン A 1 c モノクローナル抗体である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 10】

抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなる請求項 1 ~ 9 のいずれかの凝集イムノアッセイ法。

20

【請求項 11】

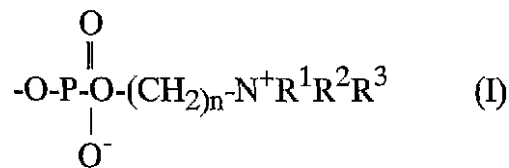
不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスである請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項 12】

抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法に用いる、式 (I)

(化学式 2)

30



(式中、n は 1 ~ 6 の整数、R¹、R² 及び R³ は、同一又は異なって、水素、炭素数 1 ~ 6 の置換又は非置換アルキルを示す。) で表される基を有する化合物を含有することを特徴とする免疫測定試薬。

【請求項 13】

式 (I) で表される基を有する化合物が、式 (I) で表される基を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項 12 記載の免疫測定試薬。

40

【請求項 14】

式 (I) で表される基を有する化合物が、式 (I) で表される基を有する単量体と、該式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項 12 記載の免疫測定試薬。

【請求項 15】

式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 14 記載の免疫測定試薬。

【請求項 16】

ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸 - n - ブチルであることを特徴とする請求項 1

50

5 記載の免疫測定試薬。

【請求項 17】

式 (I) で表される基を有する単量体が、式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項 13 ~ 16 のいずれか記載の免疫測定試薬。

【請求項 18】

式 (I) で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項 12 ~ 17 のいずれか記載の免疫測定試薬。

【請求項 19】

式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体が、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンである請求項 17 記載の免疫測定試薬。

10

【請求項 20】

抗体が抗ヘモグロビン A1c モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 12 ~ 19 のいずれか記載の免疫測定試薬。

【請求項 21】

抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなることを特徴とする請求項 12 ~ 20 のいずれか記載の免疫測定試薬。

【請求項 22】

不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスであることを特徴とする請求項 12 ~ 21 のいずれか記載の免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】

20

技術分野

本発明は、生体試料などの水溶性媒体中の抗原性物質を、凝集反応を利用して免疫学的に測定する凝集イムノアッセイ法や、それに用いる免疫測定試薬に関する。

背景技術

近年、病院、検査センター等において、人手不足、コスト削減、あるいは多量の検体処理等の点から、臨床検査等の諸検査の自動化、測定時間の短縮化が図られている。このような自動化に適した方法として、不溶性担体粒子の凝集反応を利用して抗原性物質を定量する凝集イムノアッセイ法が注目されている。例えば、特開平 7 - 35752 号公報には、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法が記載されている。しかし、不溶性担体粒子と、抗原又は抗体とが凝集反応を起こす際の凝集の不均一化によって、再現性良く反応を起こさせることが難しく、特に、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法においては、抗体の不溶性担体粒子への直接結合等の問題もあり、さらなる再現性の向上が求められていた。

30

本発明の課題は、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、凝集を安定化・均一化させ、非特異的吸着を防止し、再現性を改善する方法やそれに用いる免疫測定試薬を提供することにある。

40

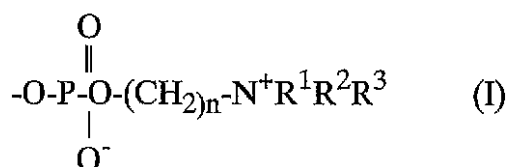
発明の開示

発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、ホスホリルコリン類似基を有する化合物が、抗原抗体反応による担体粒子の凝集を促進、均一化する作用を有することを見出し、この作用によって凝集イムノアッセイにおける凝集量の安定化・均一化と再現性の改善が達成されることを確認し、本発明を完成するに至った。

50

すなわち本発明は、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、式(I) (式中、nは1~6の整数、R¹、R²及びR³は、同一又は異なって、水素、炭素数1~6の置換又は非置換アルキルを示す。)で表される基を有する化合物を用いることを特徴とする凝集イムノアッセイ法(請求項1)や、式(I)で表される基を有する化合物が、式(I)で表される基を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項1記載の凝集イムノアッセイ法(請求項2)や、式(I)で表される基を有する化合物が、式(I)で表される基を有する単量体と、該式(I)で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項1記載の凝集イムノアッセイ法(請求項3)や、式(I)で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項3記載の凝集イムノアッセイ法(請求項4)や、ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸-n-ブチルであることを特徴とする請求項4記載の凝集イムノアッセイ法(請求項5)や、式(I)で表される基を有する単量体が、式(I)で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項2~5のいずれか記載の凝集イムノアッセイ法(請求項6)や、式(I)で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項1~6のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法(請求項7)や、式(I)で表される基とビニル基を有する単量体が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであることを特徴とする請求項6記載の凝集イムノアッセイ法(請求項8)や、抗体が抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体である請求項1~8のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法(請求項9)や、抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなる請求項1~9のいずれかの凝集イムノアッセイ法(請求項10)や、不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスである請求項1~10のいずれかに記載の凝集イムノアッセイ法(請求項11)に関する。

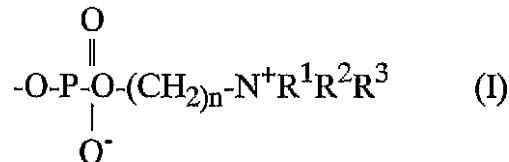
(化学式1)



また、本発明は、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法に用いる、式(I) (式中、nは1~6の整数、R¹、R²及びR³は、同一又は異なって、水素、炭素数1~6の置換又は非置換アルキルを示す。)で表される基を有する化合物を含有することを特徴とする免疫測定試薬(請求項12)や、式(I)で表される基を有する化合物が、式(I)で表される基を有する単量体を重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項12記載の免疫測定試薬(請求項13)や、式(I)で表される基を有する化合物が、式(I)で表される基を有する単量体と、該式(I)で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる化合物であることを特徴とする請求項12記載の免疫測定試薬(請求項14)や、式(I)で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体が、ビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項14記載の免疫測定試薬(請求項15)や、ビニル基を有する単量体が、メタクリル酸-n-ブチルであることを特徴とする請求項15記載の免疫測定試薬(請求項16)や、式(I)で表される基を有する単量体が、式(I)で表される基とビニル基を有する単量体であることを特徴とする請求項13~16のいずれか記載の免疫測定試薬(請求項17)や、式(I)で表される基が、ホスホリルコリン基であることを特徴とする請求項12~17のいずれか記載の免疫測定試薬(請求項18)や、式(I)で表される基とビニル基を有する単量体が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンである請求項17記

載の免疫測定試薬（請求項 19）や、抗体が抗ヘモグロビン A 1 c モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 12 ~ 19 のいずれか記載の免疫測定試薬（請求項 20）や、抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体からなることを特徴とする請求項 12 ~ 20 のいずれか記載の免疫測定試薬（請求項 21）や、不溶性担体が、ポリスチレン系ラテックスであることを特徴とする請求項 12 ~ 21 のいずれか記載の免疫測定試薬（請求項 22）に関する。

（化学式 2）



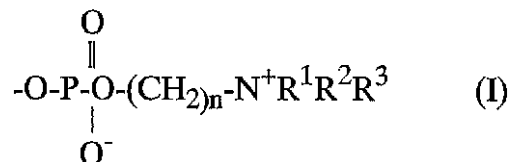
10

発明を実施するための最良の形態

本発明の凝集イムノアッセイ法としては、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法において、以下に示す式（I）（式中、n は 1 ~ 6 の整数、R¹、R² 及び R³ は、同一又は異なって、水素、炭素数 1 ~ 6 の置換又は非置換アルキルを示す。）で表される基を有する化合物を用いる方法であれば特に制限されるものではなく、また、本発明の免疫測定試薬としては、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法に用いる、式（I）で表されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を含有するものであれば特に制限されるものではないが、ここで結合とは、物理吸着、化学結合の両方を意味する。

20

（化学式 3）



30

上記本発明における不溶性担体粒子としては、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態で被検試料中の抗原性物質を結合させることができる不溶性粒子であれば特に制限されるものではなく、例えば特公昭 58 - 11575 号公報等に記載されている従来公知の有機高分子物質の微粒子や、無機酸化物の微粒子や、あるいは核となるこれらの物質の表面を有機物等で表面処理した微粒子を挙げることができ、具体的には、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、（メタ）アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成樹脂（ラテックス）；ニトロセルロース、セルロース、メチルセルロース等のセルロース誘導体；金属、セラミック、ガラス、シリコンラバー等の無機物を例示することができ、これらの中でもポリスチレン系の合成高分子、特に、電荷を与える為に成分としてアクリル酸系のモノマーやスルホン酸をもつモノマーなどを共重合したポリスチレン系の合成高分子が好ましい。

40

上記のように本発明においては、不溶性担体粒子として、ポリスチレンラテックス等のラテックス粒子が特に好ましく用いられる。例えばポリスチレンラテックス等の表面の疎水性が強いラテックスを用いると、タンパク質やペプチドの吸着をスムーズにすることができる。また、ソープフリーによって得られるポリスチレン粒子は、表面の負電荷同士の反発に基づき、界面活性剤なしでも安定に存在できるので特に好ましく用いることができる。その他、種々の変性ラテックス（例えば、カルボン酸変性ラテックス）、磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス）等を必要に応じて用いることもできる。

定量的にイムノアッセイを行う場合、通常は、不溶性担体粒子の大きさの均一性、表面状

50

態の制御、内部構造の選択などが高度の次元で要求されるが、このような試薬向けの良好なラテックス等の不溶性担体粒子は、市販品の中から選択して用いることが可能である。また、不溶性担体粒子の形状としては、特に制限されるものではないが、例えば、球状等を挙げることができ、球状の場合の粒子系としては、例えば平均粒径 $0.03 \sim 0.8 \mu\text{m}$ が好ましく、平均粒径 $0.06 \sim 0.2 \mu\text{m}$ がより好ましい。そして、本発明における不溶性担体粒子の反応液中の濃度としては特に制限されるものではないが、例えば、 $0.001 \sim 10$ 重量%、好ましくは $0.005 \sim 5$ 重量%、より好ましくは $0.01 \sim 2$ 重量%の濃度で使用する事が、不溶性担体粒子の凝集反応をより安定化・均一化することができるので好ましい。

上記本発明の式 (I) で表される基を有する化合物としては、式 (I) 中の n が $1 \sim 6$ の整数であって、 R^1 、 R^2 及び R^3 が同一又は異なってもよく、水素、炭素数 $1 \sim 6$ の置換又は非置換アルキルを示す式 (I) で表される基を有する化合物であれば特に制限されるものではなく、式 (I) における R^1 、 R^2 及び R^3 のアルキル部分としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル等を挙げることができる。また、置換アルキルの置換基としては、置換数 $1 \sim 3$ の、例えばヒドロキシ、アリル等を挙げることができ、アリルとしては、ベンジル、ナフチル等を例示することができる。

また、式 (I) で表される基を有する化合物としては、式 (I) で表される基を有する単量体、好ましくは式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体を重合させて得られる化合物や、式 (I) で表される基を有する単量体、好ましくは式 (I) で表される基とビニル基を有する単量体と、かかる式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる化合物を挙げることができる。また、式 (I) で表される基を有する単量体と重合可能な他の単量体としてはビニル基を有する単量体が好ましい。本発明における式 (I) で表される基としてはホスホリルコリン基 (以下、PC基と略する) を好適に例示することができ、したがって、本発明における式 (I) で表される基を有する化合物としては、PC基を有する化合物が好ましい。また、PC基を有する化合物としては特に制限されるものではないが、PC基を有する単量体、好ましくはPC基とビニル基を有する単量体を重合させて得られる高分子化合物や、PC基を有する単量体、好ましくはPC基とビニル基を有する単量体と、かかるPC基を有する単量体と重合可能な他の単量体とを重合させて得られる高分子化合物が好ましい。

上記PC基とビニル基を有する単量体としては特に制限がないが、例えば、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (以下、MPCと略す)、2-(メタ)アクリロイルオキシエトキシエチルホスホリルコリン、6-(メタ)アクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-(メタ)アクリロイルオキシエトキシノニルホスホリルコリン、アリルホスホリルコリン、ブテニルホスホリルコリン、ヘキセニルホスホリルコリン、オクテニルホスホリルコリン、デセニルホスホリルコリン等を具体的に挙げることができる。また、これら単量体は、例えば、特開昭54-6325号公報、特開昭58-154591号公報等に示された公知の方法によって製造することができる。

前記のPC基を有する単量体と重合可能な他の単量体、好ましくはビニル基を有する他の単量体としては、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)アクリル酸イソブチル、(メタ)アクリル酸ペンチル、(メタ)アクリル酸ヘキシル、(メタ)アクリル酸ヘブチル、(メタ)アクリル酸オクチル、(メタ)アクリル酸トリデシル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等の(メタ)アクリル酸エステル；(メタ)アクリレート；スチレン、 α -メチルスチレン、メチル核置換スチレン、クロロ核置換スチレン等のスチレン系単量体；塩化ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、プロピレン、イソブチレン等の置換又は非置換炭化水素系単量体；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体；エチルビニルエーテル、 n -ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；ジエチルイタコネート、ジ- n -ブチルイタコネート等を挙げることができるが、これらの中でも、メタクリル酸エステ

10

20

30

40

50

ル、スチレン等が好ましく、特にメタクリル酸 - n - ブチル (以下、BMAと略す) が好ましい。

PC基含有重合体を調製するには、前記PC基を有する単量体を含む重合成分を、例えば重合開始剤を用いたラジカル重合等の通常の重合方法により重合させることにより得ることができる。また、重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤であれば特に限定されるものではなく、2, 2 - アゾビス - (2 - メチルプロピオノアミジン) 二塩塩、4, 4 - アゾビス - (4 - シアノ吉草酸)、2, 2 - アゾビス - (2 - (5 - メチル - 2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン二塩酸塩、2, 2 - アゾビスイソブチルアミド二水和物、2, 2 - アゾビスイソブチロニトリル、過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム、過酸化ベンゾイル、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、t - ブチルペルオキシシ - 2 - エチルヘキサノエート、t - ブチルペルオキシピバレート、t - ブチルペルオキシジイソブチレート、過酸化ラウロイル、アゾビスイソブチロニトリル、2, 2 - アゾビス (2, 4 - ジメチルパレロニトリル)、t - ブチルペルオキネオデカノエートや、これらの混合物等を好適に例示することができる。特に、前記MPCを単独重合させる際、あるいはMPCとビニル基を有するBMA等の他の単量体とを重合させる際には、重合性などの点からして重合開始剤として2, 2 - アゾビスイソブチロニトリル (以下、AIBNと略す) を用いることが好ましい。

これら重合開始剤の使用量は特に制限されるものではないが、用いる全単量体100重量部に対して0.01~10重量部が好ましく、0.1~5重量部が特に好ましい。また、重合条件は、好ましくは30~80、特に好ましくは40~70において2~72時間重合させるのが望ましい。この際、重合反応をより円滑に行なうために溶媒を用いてもよく、かかる溶媒としては、水、メタノール、エタノール、プロパノール、t - ブタノール、ベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、クロロホルムや、これらの混合物等を挙げることができる。特に、前記MPCを単独重合させる際、あるいはMPCとビニル基を有する他の単量体とを重合させる際には、溶解性、重合性などから水、エタノールを用いることが特に好ましい。得られた重合体の精製は、再沈殿法、透析法、限外濾過法など一般的な精製方法により行うことができる。

また、PC基含有重合体中のPC基含有割合は、PC基含有重合体に対し、1~100モル%、特に5~10モル%が好ましい。含有割合が1モル%未満の場合には、非特異的吸着を防止することが困難になるので好ましくない。またPC基含有重合体は、重合温度、重合開始剤使用量、重合度調整剤の使用等によっても異なるが、数平均分子量(Mn)100~1,000,000、特に1,000~500,000の重合体が好ましい。本発明のPC基を有する化合物の反応液中の濃度としては特に制限されるものではないが、0.0001~10%が好ましく、0.001~5%がより好ましく、0.01~1%が特に好ましい。0.0001%未満では、再現性の改善効果が弱く、また、10%以上では泡立ちが激しく、気泡による測定誤差を招く恐れがあり好ましくない。そして、PC基を有する化合物としては特に限定されるものではないが、MPCの単独重合体あるいは、MPCとBMAの共重合体が特に好ましい。

本発明において凝集イムノアッセイ法とは、抗原又は抗体を実質的に結合していない状態にある不溶性担体粒子に対して、被検試料中の抗原性物質を結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体又は抗体複合体を結合させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる方法をいうが、本発明において使用する抗体又は抗体複合体が、不溶性担体粒子に結合された抗原性物質のみならず、未結合の抗原性物質とも反応し測定値に影響を与えるようなときは、被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に結合させた後に該不溶性担体を洗浄して未結合の抗原性物質を除去する方法、不溶性担体粒子に結合される抗原性物質の比率を高くする方法、また不溶性担体粒子に結合された抗原性物質とは反応するが、液相中の抗原性物質と実質的に反応しない抗体又は抗体複合体を使用する方法等を用いることができる。

本発明において、不溶性担体粒子は緩衝液等の水性媒体中に懸濁させた、いわゆるラテックスとして通常用いられる。かかる緩衝液調製用の緩衝剤としては、例えば、リン酸、炭

10

20

30

40

50

酸、有機酸緩衝剤の他、グッド緩衝剤と呼ばれるものを使用することができる。これらを含む液のpHを調節する酸類としては通常の塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸の他、酢酸等の有機酸を用いることができ、またpHを調節するアルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化アンモニウムなどを用いることができる。また、本発明においては、検体中の脂質の可溶化に効果のある界面活性剤も使用することができ、特にポリオキシエチレングリコール基を持ったノニオン系界面活性剤やその他カチオン系、アニオン系の界面活性剤も必要に応じて使用することができる。

本発明の凝集イムノアッセイ法の測定対象である被検試料中の抗原性物質としては、不溶性担体への結合が可能で、且つ該抗原性物質に対応するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が入手あるいは調製可能であるものが好ましいが、上記ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体調製の容易性の点からは、上記抗原性物質は分子量10,000以上の蛋白質、糖蛋白質等の物質であることが好ましい。かかる被検試料中の抗原性物質としては、血液試料中のヘモグロビンA1c(以下、HbA1cと略す)を好適に例示することができる。また、本発明における抗原性物質に特異的に結合する抗体としては、ポリクローナル抗体及び/又はモノクローナル抗体を用いることができるが、モノクローナル抗体は、KoeHLer & MilSteinらの報告した細胞融合法(Nature、256、495~497、1975)により得ることができる。そして、上記HbA1cに対応する抗体としては、抗HbA1cモノクローナル抗体を例示することができる。

ところで、ELISA法で選別して得たハイブリドーマ細胞の産生するモノクローナル抗体の中に、ラジオイムノアッセイ(RIA)のように、抗原と抗体とを液相中で反応させるアッセイ系では反応しないという抗体が存在することはよく知られているが、本発明の凝集イムノアッセイ法においては、このようなモノクローナル抗体を用いることは、液相中の抗原性物質とは反応せず、不溶性担体粒子に固相化された抗原性物質と特異的に反応させることが可能となる点で好ましい。

本発明による凝集イムノアッセイ法においては、抗原性物質をラテックス等の不溶性担体粒子に結合させた後、モノクローナル抗体を反応させてもラテックス等の不溶性担体粒子が凝集しない可能性が考えられるが、そのような場合でも、抗体複合体を用いて凝集を起こさせることが可能である。すなわち、かかるモノクローナル抗体と、これに選択的に反応する第二抗体とを反応させてモノクローナル抗体複合体をあらかじめ形成させ、かかる抗体複合体をラテックス等の不溶性担体粒子に吸着した抗原性物質と反応させることにより、ラテックス等の不溶性担体粒子同士を凝集させることができる。上記の他に、抗体複合体を形成する方法としては、ビオチン標識したモノクローナル抗体にアビジンを加えて複合体とする方法や、例えば抗体を酵素標識する際に用いられる化学結合による方法を挙げることができる。

不溶性担体粒子に結合させた抗原性物質に、該抗原性物質に特異的な抗体又は抗体複合体を反応させることにより、不溶性担体の選択的な凝集を起こすことができる本発明によれば、免疫測定試薬の製造が単純、容易であるため、保存安定性の高い免疫測定試薬とすることができる。すなわち、ラテックス等の不溶性担体粒子に抗原や抗体が実質的に結合されていないため、該不溶性担体粒子として市販の未結合ラテックス粒子等の不溶性担体粒子をそのまま使用することが可能となる。更に抗体についても必ずしも精製品である必要はなく、また試薬が単純なため保存安定性を高く保つことが可能となる。

また、被検試料中の抗原性物質を、水性媒体中でラテックス等の不溶性担体粒子に結合・吸着させた後、該抗原性物質に対して特異的に結合する抗体又は抗体複合体をホスホリルコリン基等の式(I)で表される基を有する化合物を含有する水性媒体中で結合させたものを用いる場合、上記ラテックス等からなる不溶性担体粒子を凝集させ、凝集の程度を測定する際に用いる上記水性媒体としては、上記抗体又は抗体複合体のラテックス等からなる不溶性担体粒子への非特異的吸着・結合を防止しうるのが好ましく、かかる抗体又は抗体複合体の不溶性担体への吸着・結合を防止しうる水性媒体としては、ツイーン(Tween)20等の界面活性剤を0.1~0.3%程度含んでいる水性媒体を具体的に例示することができる。

10

20

30

40

50

本発明の凝集反応を行う容器としては特に限定されないが、この種の凝集反応に通常用いられる例えばポリスチレン製試験管等のチューブ状の容器を用いることができる。また、多数検体の同時処理が容易な点を考慮すれば、複数のウエルを有するELISA用プレート（例えば、ナルジェヌンクインターナショナル社製96-ウエルELISA用プレート「NUNC-IMMUNO PLATE」等）を用いることが可能である。そして、光学的手法によるラテックス等不溶性担体粒子の凝集の測定を容易とする点からは、実質的に透明な容器を用いて反応を行うことが好ましく、また、自動分析機を利用してラテックス等の不溶性担体粒子の凝集を測定する場合には、通常は、該分析機中の反応槽中で凝集反応を行わせることとなる。

不溶性担体粒子の凝集の程度を測定する方法としては、特に制限されるものではなく、例えば、凝集を定性的ないし半定量的に測定する場合には、既知の試料の濁度の程度との比較から、上記不溶性担体粒子の凝集の程度を目視によって判定することができる（例えば、凝集の少ないものは透明感がある）。一方、該凝集を定量的に測定する場合は、例えば光学的に測定することが簡便性の点から好ましい。かかるラテックス等からなる不溶性担体粒子の凝集の光学的測定法としては、公知の光学的測定法が利用可能であり、具体的には、凝集塊の形成を濁度の増加として捉えるいわゆる比濁法、凝集塊の形成を粒度分布ないし平均粒径の変化として捉える粒度分布による測定法、凝集塊の形成による前方散乱光の変化を積分球を用いて測定し、透過光強度との比を測定する積分球濁度法等の種々の光学的測定法を利用することができ、また、これらの測定法のそれぞれについて、速度試験（レートアッセイ；異なる時点で少なくとも2つの測定値を得て、これらの時点間における該測定値の増加分、すなわち増加速度に基づき凝集の程度を求める）と、終点試験（エンドポイントアッセイ；通常反応の終点と考えられる特定の時点で1つの測定値を得て、この測定値に基づき凝集の程度を求める）を用いることもできるが、測定の簡便さ、迅速性の点からは、比濁法を用いた速度試験を行うことが好ましい。

不溶性担体粒子の凝集の光学的測定においては、ラテックス等からなる不溶性担体粒子の平均粒径が0.04～0.8ミクロン程度の範囲では、400～1400nm程度の波長の光を用いて測定することが好ましい。

前記本発明の免疫測定試薬としては、目的の抗原性物質を測定する試薬とホスホリルコリン基等の式（I）で表される基を有する化合物を含有するものであれば、その試薬構成は特に制限されるものでなく、例えば不溶性担体粒子、緩衝剤、試料中の抗原に結合する抗体及び式（I）で表される基を有する化合物を含有し、必要に応じて界面活性剤、防腐剤、試料中の抗原に結合する抗体に結合する抗体等を含有する試薬キットを挙げることができ、特に、不溶性担体粒子及び緩衝剤を含む第一試薬と、式（I）で表される基を有する化合物及び抗原に結合する抗体を含む第二試薬からなる試薬キットを具体的に例示することができ、かかる試薬キットにおける第一試薬及び第二試薬には、必要に応じてさらに界面活性剤、防腐剤、試料中の抗原に結合する抗体、該抗体に結合する抗体複合体形成用抗体等を含有しておくこともできる。

（実施例）

以下、本発明を実施例、比較例、参考例により、更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は、かかる実施例等により何ら制限を受けるものではない。

実施例1

下記組成の試薬を調製した。

[R1試薬]

HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH7.8） 4.77g/L

ラテックス粒子（粒径0.0775μm、積水化学社製）

0.033重量%/L

NaN₃（関東化学社製） 0.1g/L

[R2試薬]

HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH7.0） 4.77g/L

塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15g/L

ポリマー 2 (参考例 2 で製造)	2 g / L	
NaN ₃ (関東化学社製)	0.1 g / L	
抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体 (製造例 1)		
0.025 g (IgG 換算) / L		
抗マウスIgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)		
0.025 g (IgG 換算) / L		
実施例 2		
下記組成の試薬を調製した。		
[R 1 試薬]		
HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8)	4.77 g / L	10
ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)		
0.033 重量% / L		
NaN ₃ (関東化学社製)	0.1 g / L	
[R 2 試薬]		
HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0)	4.77 g / L	
塩化ナトリウム (和光純薬社製)	1.5 g / L	
ポリマー 3 (参考例 3 で製造)	2 g / L	
NaN ₃ (関東化学社製)	0.1 g / L	
抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体		20
0.025 g (IgG 換算) / L		
抗マウスIgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)		
0.025 g (IgG 換算) / L		
比較例 1		
実施例 1 におけるポリマー 2 や実施例 2 におけるポリマー 3 に代えてツイーン 20 を含む 下記組成の試薬を調製した。		
[R 1 試薬]		
HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8)	4.77 g / L	
ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)		
0.033 重量% / L		
NaN ₃ (関東化学社製)	0.1 g / L	30
[R 2 試薬]		
HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0)	4.77 g / L	
塩化ナトリウム (和光純薬社製)	1.5 g / L	
ツイーン 20 (和光純薬社製)	2 g / L	
NaN ₃ (関東化学社製)	0.1 g / L	
抗ヒトHbA1c マウスモノクローナル抗体		40
0.025 g (IgG 換算) / L		
抗マウスIgG ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)		
0.025 g (IgG 換算) / L		
比較例 2		
実施例 1 におけるポリマー 2 や実施例 2 におけるポリマー 3 に代えてブリッジ 30 を含む 下記組成の試薬を調製した。		
[R 1 試薬]		
HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8)	4.77 g / L	
ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)		
0.033 重量% / L		
NaN ₃ (関東化学社製)	0.1 g / L	
[R 2 試薬]		
HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0)	4.77 g / L	
塩化ナトリウム (和光純薬社製)	1.5 g / L	50

ブリッジ30 (シグマ社製) 2 g / L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L
 抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体
 0.025 g (IgG換算) / L
 抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)
 0.025 g (IgG換算) / L

比較例3

実施例1におけるポリマー2や実施例2におけるポリマー3に代えてブリッジ56を含む下記組成の試薬を調製した。

[R1試薬]

HEPES緩衝剤 (同仁化学社製、pH7.8) 4.77 g / L
 ラテックス粒子 (粒径0.0775 μm、積水化学社製)
 0.033重量% / L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

[R2試薬]

HEPES緩衝剤 (同仁化学社製、pH7.0) 4.77 g / L
 塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g / L
 ブリッジ56 (シグマ社製) 2 g / L
 NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

0.025 g (IgG換算) / L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025 g (IgG換算) / L

実施例3

人血液をEDTA採血管 (ベノジエクト真空採血管テルモ社製) で採血後、2時間放置して沈殿した血球層10 μLをとり、精製水1 mLで希釈して、これを-20℃で凍結保存し使用直前に融解したものを検体とし、実施例1、実施例2、比較例1、比較例2及び比較例3でそれぞれ作製したR1試薬とR2試薬を用いてHbA1c濃度の測定を行った。また、検量線は、自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723GHbV (東ソー社製) による測定でHbA1c値が、0.0%、4.2%、7.7%、11.3%、14.8%であった標準検体を開封直後の試薬を用いて作成した。検体中のHbA1cの測定は、R1試薬溶液240 μLに上記調製した検体を8.0 μL添加し、37℃、5分間反応させた後、R2試薬溶液80 μLを添加し、37℃5分後に2ポイントエンド法 (測光ポイント16-34)、主波長450 nm、副波長800 nmで吸光度変化量を、日立自動分析装置7170型を使用して行い、検量線より求めた。この操作を繰り返し、合計10回づつ測定し、平均値、標準偏差、及び同時再現性 [(標準偏差 × 100) / 平均] を求めた。結果を表1に示す。表1から、本発明の実施例1及び実施例2においては、比較例1~3と比べ、凝集量が安定化し、再現性の改善が認められる。

10

20

30

(表 1)

測定回数	実施例 1	実施例 2	比較例 1	比較例 2	比較例 3
1	6.3	6.3	6.3	6.3	6.5
2	6.4	6.3	6.4	6.4	6.4
3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.1
4	6.3	6.3	6.4	6.2	6.3
5	6.3	6.3	6.3	6.6	6.2
6	6.4	6.4	6.5	6.5	6.4
7	6.3	6.3	6.2	6.2	6.5
8	6.3	6.3	6.2	6.2	6.3
9	6.3	6.3	6.3	6.3	6.4
10	6.3	6.3	6.4	6.2	6.4
平均	6.3	6.3	6.3	6.3	6.4
標準偏差	0.040	0.030	0.090	0.133	0.120
同時再現性	0.63%	0.48%	1.42%	2.10%	1.90%

実施例 4

下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g / L

ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)

0.033 重量% / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

ポリマー 4 (参考例 4 で製造) 1 g / L

[R 2 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g / L

塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g / L

ツイーン 20 (和光純薬社製) 2 g / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

抗ヒト Hb A 1 c マウスモノクローナル抗体

0.025 g (IgG 換算) / L

抗マウス Ig G ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025 g (IgG 換算) / L

実施例 5

下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.8) 4.77 g / L

ラテックス粒子 (粒径 0.0775 μm、積水化学社製)

0.033 重量% / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

ポリマー 5 (参考例 5 で製造) 1 g / L

[R 2 試薬]

HEPES 緩衝剤 (同仁化学社製、pH 7.0) 4.77 g / L

塩化ナトリウム (和光純薬社製) 15 g / L

ツイーン 20 (和光純薬社製) 2 g / L

NaN₃ (関東化学社製) 0.1 g / L

抗ヒト Hb A 1 c マウスモノクローナル抗体

0.025 g (IgG 換算) / L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）
0.025g（IgG換算）/L

実施例6

下記組成の試薬を調製した。

[R1試薬]

HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH7.8） 4.77g/L

ラテックス粒子（粒径0.0775μm、積水化学社製）

0.033重量%/L

NaN₃（関東化学社製） 0.1g/L

ポリマー1（参考例1で製造） 0.002g/L

10

[R2試薬]

HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH7.0） 4.77g/L

塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15g/L

ツイーン20（和光純薬社製） 2g/L

NaN₃（関東化学社製） 0.1g/L

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

0.025g（IgG換算）/L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）

0.025g（IgG換算）/L

比較例4

20

実施例4におけるポリマー4や実施例5におけるポリマー5や実施例6におけるポリマー1を含まない下記組成の試薬を調製した。

[R1試薬]

HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH7.8） 4.77g/L

ラテックス粒子（粒径0.0775μm、積水化学社製）

0.033重量%/L

NaN₃（関東化学社製） 0.1g/L

[R2試薬]

HEPES緩衝剤（同仁化学社製、pH7.0） 4.77g/L

塩化ナトリウム（和光純薬社製） 15g/L

ツイーン20（和光純薬社製） 2g/L

NaN₃（関東化学社製） 0.1g/L

30

抗ヒトHbA1cマウスモノクローナル抗体

0.025g（IgG換算）/L

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）

0.025g（IgG換算）/L

実施例7

人血液をEDTA採血管（ベノジェクト真空採血管テルモ社製）で採血後、2時間放置して沈殿した血球層10μLをとり、精製水1mLで希釈して、これを-20℃で凍結保存し使用直前に融解したものを検体とし、実施例4～実施例6、比較例4で作製したR1試薬とR2試薬をそれぞれ用いて、HbA1c濃度の測定を実施例3と同様に行った。結果を表2に示す。表2から、本発明の実施例4～実施例6においては、比較例4と比べ、凝集量が安定化し、再現性の改善が認められる。

40

(表 2)

測定回数	実施例 4	実施例 5	実施例 6	比較例 4
1	6.3	6.3	6.3	6.5
2	6.3	6.3	6.4	6.3
3	6.3	6.2	6.2	6.3
4	6.3	6.3	6.3	6.1
5	6.3	6.3	6.2	6.2
6	6.3	6.2	6.3	6.4
7	6.3	6.3	6.3	6.3
8	6.3	6.3	6.3	6.4
9	6.2	6.3	6.3	6.3
10	6.3	6.3	6.3	6.2
平均	6.3	6.3	6.3	6.3
標準偏差	0.030	0.040	0.054	0.110
同時再現性	0.48%	0.64%	0.86%	1.74%

10

実施例 8

下記組成の試薬を調製した。

[R 1 (ラテックス) 溶液の調製]

H E P E S 緩衝剤 (同仁化学社製、p H 7 . 8) 4 . 7 7 g / L

ラテックス (粒径 0 . 0 7 7 5 μ m、積水化学社製)

0 . 0 3 3 重量 % / L

N a N ₃ (関東化学社製) 0 . 1 g / L

ポリマー 4 (参考例 4 で製造) 2 g / L

[R 2 (抗体) 溶液の調製]

H E P E S 緩衝剤 (同仁化学社製、p H 7 . 0) 4 . 7 7 g / L

塩化ナトリウム (和光純薬社製) 1 5 g / L

ツイーン 2 0 (和光純薬社製) 2 g / L

N a N ₃ (関東化学社製) 0 . 1 g / L

抗ヒト H b A 1 c マウスモノクローナル抗体

0 . 0 2 5 g (I g G 換算) / L

抗マウス I g G ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0 . 0 2 5 g (I g G 換算) / L

実施例 9

下記組成の試薬を調製した。

[R 1 試薬]

H E P E S 緩衝剤 (同仁化学社製、p H 7 . 8) 4 . 7 7 g / L

ラテックス (粒径 0 . 0 7 7 5 μ m、積水化学社製)

0 . 0 3 3 重量 % / L

N a N ₃ (関東化学社製) 0 . 1 g / L

ポリマー 4 (参考例 4 で製造) 5 g / L

[R 2 試薬]

H E P E S 緩衝剤 (同仁化学社製、p H 7 . 0) 4 . 7 7 g / L

塩化ナトリウム (和光純薬社製) 1 5 g / L

ツイーン 2 0 (和光純薬社製) 2 g / L

N a N ₃ (関東化学社製) 0 . 1 g / L

抗ヒト H b A 1 c マウスモノクローナル抗体

0 . 0 2 5 g (I g G 換算) / L

20

30

40

50

抗マウス I g G ヤギポリクローナル抗体 (和光純薬社製)

0.025 g (I g G 換算) / L

実施例 10

人血液を EDTA 採血管 (ベノジェクト真空採血管テルモ社製) で採血後、2 時間放置して沈殿した血球層 10 μ L をとり、精製水で全量を 1 mL としたものを検体 1 とした。また、人血液を EDTA 採血管 (ベノジェクト真空採血管テルモ社製) で採血後、2 時間放置して得られた上澄み液 4 μ L と、沈殿した血球層 10 μ L をとり、精製水で全量を 1 mL としたものを検体 2 とした。これら検体と実施例 4、実施例 8、実施例 9 及び比較例 4 で作製した R 1 試薬と R 2 試薬をそれぞれ用いて、Hb A 1 c 濃度の測定を実施例 3 と同様に行った。各検体についての 3 回の測定結果を結果を表 3 に示す。表 3 から、本発明の実施例 4、実施例 8 及び実施例 9、特にポリマー含量が多い実施例 8 及び実施例 9 においては、比較例 4 と比べ、検体に血漿成分が混入した検体 2 においても凝集量が安定化し、再現性の改善が認められる。

(表 3)

試薬	検体 1	検体 2
実施例 4	6.6	6.1
実施例 8	6.7	6.5
実施例 9	6.7	6.7
比較例 4	6.6	5.1

参考例 1 (ポリマー 1 の合成)

MPC (日本油脂社製) 35.7 g、BMA (和光純薬工業社製) 4.3 g をエタノール 160 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60 で重合開始剤 AIBN (和光純薬工業社製) 0.82 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC 0.8 モル、BMA 0.2 モルの比率からなる共重合体 (ポリマー 1) の粉末を得た。このポリマー 1 の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (以下、GPC と略す) により分析した結果、重量平均分子量 153,000 であった。なお、分析条件はリン酸バッファー (pH 7.4、20 mM) を溶離液とし、ポリエチレングリコールを標準物質とし、UV (210 nm) 及び屈折率にて検出した (参考例 2 ~ 5 も同じ)。

参考例 2 (ポリマー 2 の合成)

MPC 20.3 g、BMA 9.75 g をエタノール 120 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60 で AIBN 0.35 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC 0.5 モル、BMA 0.5 モルの比率からなる共重合体 (ポリマー 2) の粉末を得た。このポリマー 2 の分子量を GPC により分析した結果、重量平均分子量 224,000 であった。

参考例 3 (ポリマー 3 の合成)

MPC 14.1 g、BMA 15.9 g をエタノール 120 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60 で AIBN 0.35 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、MPC 0.3 モル、BMA 0.7 モルの比率からなる共重合体 (ポリマー 3) の粉末を得た。このポリマー 3 の分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) により分析した結果、重量平均分子量 130,000 であった。

参考例 4 (ポリマー 4 の合成)

MPC 50.0 g をエタノール 160 g に溶解し、4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹込んだ後、60 で AIBN 0.24 g を加えて 8 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で

真空乾燥を行って、MPCのホモポリマー（ポリマー4）の粉末を得た。このポリマー4の分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）により分析した結果、重量平均分子量529,000であった。

参考例5（ポリマー5の合成）

MPC30.0gをエタノール120gに溶解し、4つ口フラスコに入れ、30分間窒素を吹込んだ後、60℃でAIBN0.48gを加えて8時間重合反応させた。重合液を3Lのジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48時間室温で真空乾燥を行って、MPCのホモポリマー（ポリマー5）の粉末を得た。このポリマー5の分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）により分析した結果、重量平均分子量183,000であった。

10

参考例6（ヘモグロビンA1c鎖N末端のグリコペプチドエピトープに対するモノクローナル抗体の作製）

特開平7-35752号公報記載の製造例1の記載に従って、ヘモグロビン鎖のN末端アミノ酸配列に相当するペプチドVal-His-Leu-Thr-Pro-Cysを合成し、N末端アミノ酸残基であるValのα-アミノ基にグルコースを非酵素的に結合させて、グリコペプチドを合成し、更にスペーサーを介してキャリアー蛋白に結合させ、それを免疫原とすることにより、常法により、HbA1cと反応し、HbA0と反応しないモノクローナル抗体を得た。該モノクローナル抗体は、遊離のHbA1cとは反応せず、不溶性担体粒子に結合したHbA1cと反応する抗体であった。

産業上の利用可能性

20

Pc基等の式（I）で表される基を有する化合物を用いる本発明によると、ラテックス等からなる不溶性担体粒子を用いた免疫凝集反応が安定化・均一化し、再現性の良い測定結果を得ることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 首藤 健志郎

日本国茨城県つくば市花畑三丁目7番1号

(72)発明者 榊 秀次郎

日本国茨城県つくば市梅園二丁目15番5号

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開昭62-218865(JP,A)

特開昭61-274261(JP,A)

特開平 8-101196(JP,A)

特開昭52-123295(JP,A)

特開昭54-26327(JP,A)

特開昭61-159166(JP,A)

特開昭62-259063(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/543

G01N 33/53

G01N 33/545

G01N 33/577

专利名称(译)	凝集免疫测定方法和试剂具有良好的重现性		
公开(公告)号	JP4733335B2	公开(公告)日	2011-07-27
申请号	JP2002523622	申请日	2001-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社 日本油脂株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社 日本油脂株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社 日油株式会社 株式会社ティエフビー		
[标]发明人	重信香代子 首藤健志郎 榊秀次郎		
发明人	重信 香代子 首藤 健志郎 榊 秀次郎		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/577 C08F220/60 C08F230/02 G01N33/72		
CPC分类号	C08F220/60 C08F230/02 G01N33/54313 G01N33/545 G01N33/721 Y10S435/81 Y10S435/961		
FI分类号	G01N33/543.501.M G01N33/543.581.J G01N33/53.S G01N33/545.B G01N33/577.B		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	2000259964 2000-08-29 JP		
其他公开文献	JPWO2002018953A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种凝集免疫测定法，其中不溶性载体颗粒如胶乳的凝集是稳定和均匀的，以提供良好的再现性，及其试剂。在凝集免疫测定中，其包括使样品中的抗原物质与基本上既不携带抗原也不携带抗体的不溶性载体颗粒结合，并允许与抗原物质特异性反应的抗体或抗体复合物与抗原物质结合，得到选择性凝集不溶性载体颗粒，通过聚合具有磷酰胆碱基和乙烯基的2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱等单体制备的均聚物，或通过聚合具有磷酰胆碱基和乙烯基的单体制备的共聚物，使用具有乙烯基的单体如甲基丙烯酸正丁酯。

