

(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 - 235465

(P2001 - 235465A)

(43)公開日 平成13年8月31日(2001.8.31)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	4 B 0 6 3
	1/28	1/28	
	1/44	1/44	
	1/60	1/60	

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 10数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 47758(P2000 - 47758)

(22)出願日 平成12年2月24日(2000.2.24)

(71)出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72)発明者 澤柳 豊治

千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭

和電工株式会社総合研究所内

(72)発明者 佐藤 元

千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭

和電工株式会社総合研究所内

(74)代理人 100094237

弁理士 矢口 平

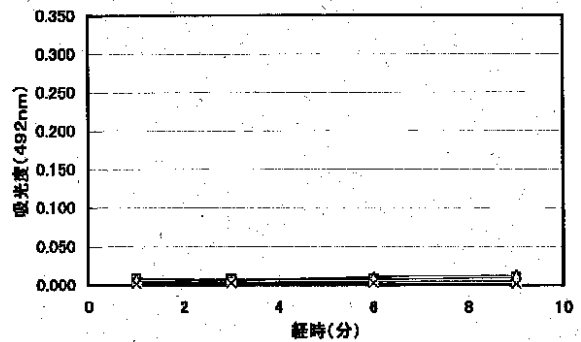
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体成分の測定方法

(57)【要約】

【課題】主として臨床検査分野での使用を目的とし、血清や尿等の生体成分中の特定成分を測定する際に、検体または測定試薬由来の不溶性物質による測定妨害を回避する方法の提供。

【解決手段】生体成分中の特定成分を測定する方法において、高分子化合物を添加することにより、不溶性物質による測定妨害を回避することを特徴とする生体成分の測定方法ならびに高分子化合物および検出試薬からなる臨床診断薬。



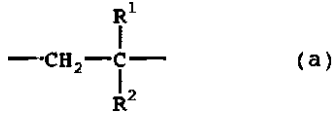
□	0.005%	ポリ(エセン- $\omega$ -マレイン酸)	分子量330,000
○	0.05%	ポリ(エセン- $\omega$ -マレイン酸)	分子量30,000
△	0.1%	ポリ(エセン- $\omega$ -マレイン酸)	分子量1,300
×	0.05%	ポリ(1-メトキシエセン- $\omega$ -マレイン酸)	

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】生体成分中の特定成分を測定する方法において、生体成分を含む試料に高分子化合物を添加することにより、不溶性物質による測定妨害を回避することを特徴とする生体成分の測定方法。

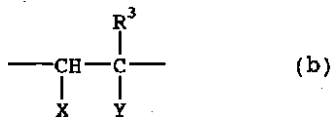
【請求項2】高分子化合物が、下記一般式(a)

【化1】



及び式(b)

【化2】



[式中、R<sup>1</sup>は水素原子、炭素数3以下のアルキル基、COOHを有する基、水酸基、アルコキシ基、脂肪族アルコールまたはアルコールの脂肪酸エステルであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は独立に水素原子またはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHを有する基であり、YはCOOH、SO<sub>3</sub>H、PO(OH)<sub>2</sub>を有する基またはそれらから誘導される基である。ただし、R<sup>1</sup>とYは同時にCOOHを有する基ではない。]のモノマー単位を有する請求項1に記載の生体成分の測定方法。

【請求項3】上記モノマー単位(a)と(b)の比率が、20:80~80:20である請求項2に記載の生体成分の測定方法。

【請求項4】高分子化合物の質量平均分子量が、1,000~500,000である請求項1ないし3のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項5】生体成分を含む試料に添加する高分子化合物の濃度が、0.0001~5%の範囲である請求項1ないし4のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項6】高分子化合物の添加された生体成分を含む試料において、pHが5~10の範囲で測定を行うことを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項7】モノマー単位(a)が、1-アルケンおよびその誘導体(但し、側鎖がアルキル基の場合炭素数は3以下)である請求項2ないし6のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項8】モノマー単位(b)が、マレイン酸、アクリル酸またはメタクリル酸である請求項2ないし7のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項9】リポ蛋白質分画、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸、酵素活性または血糖の測定を含む生化学検査に用いることを特徴とする請求項1ないし8のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項10】生化学検査が、リポ蛋白質分画の直接測定である請求項9に記載の生体成分の測定方法。

【請求項11】抗体、抗原もしくは受容体を用いる比口ウ法または比濁法、あるいは抗体、抗原または受容体を担持したラテックスを用いる比濁法を用いる免疫学的検査に用いることを特徴とする請求項1ないし8のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【請求項12】免疫学的検査が、比口ウを用いた抗原検査または抗体検査である請求項11に記載の生体成分の測定方法。

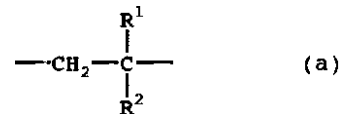
【請求項13】請求項1ないし12のいずれかに記載の生体成分の測定方法において、不溶性物質による測定妨害が、脂質、蛋白質または疎水性投与薬剤のいずれかひとつ以上起因するものである生体成分の測定方法。

【請求項14】不溶性物質による測定妨害が、検体または検出試薬中の蛋白質によるものである請求項13に記載の生体成分の測定方法。

【請求項15】不溶性物質による測定妨害が、検体または検出試薬中のイムノグロブリンによるものである請求項14に記載の生体成分の測定方法。

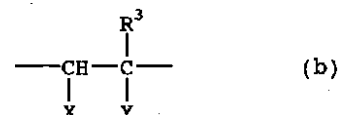
【請求項16】下記一般式(a)

【化3】



及び式(b)

【化4】



[式中、R<sup>1</sup>は水素原子、炭素数3以下のアルキル基、COOHを有する基、水酸基、アルコキシ基、脂肪族アルコールまたはアルコールの脂肪酸エステルであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は独立に水素原子またはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHを有する基であり、YはCOOH、SO<sub>3</sub>H、PO(OH)<sub>2</sub>を有する基またはそれらから誘導される基である。ただし、R<sup>1</sup>とYは同時にCOOHを有する基ではない。]のモノマー単位を有する高分子化合物、および検出試薬を含んでなる臨床診断用試薬。

【請求項17】高分子化合物が、1-アルケンおよびその誘導体(但し、側鎖がアルキル基の場合、炭素数は3以下)であるモノマー単位(a)と、マレイン酸、アクリル酸またはメタクリル酸であるモノマー単位(b)からなる水溶性高分子化合物の1種以上である請求項16に記載の臨床診断用試薬。

【請求項18】検出試薬として、少なくとも検出酵素、緩衝液、及び色素もしくは補酵素を含み、生化学検査

査に用いることを特徴とする請求項16または17に記載の臨床診断用試薬。

【請求項19】検出試薬として、少なくとも抗体、抗原または受容体、あるいは抗体、抗原または受容体を担持したラテックス、及び緩衝液を含み、免疫学的測定に用いることを特徴とする請求項16または17に記載の臨床診断用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は主として臨床検査分野での使用を目的とし、血清や尿等の生体成分中の特定成分を測定する際に、検体または測定試薬由来の不溶性物質による測定妨害を回避する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年自動分析装置を用いた生化学検査をはじめとする検体検査が多項目にわたり日常的に行われている。その際、血清や尿等の検体中の検査目的となる特定成分の検査値が、検査目的である特定成分以外の検体成分に影響され不正確な値をとることが問題となっている（新訂3版臨床検査研修ハンドブック 2 薬事日報社 P.324-331）。

【0003】中でも検体に含まれる血清蛋白質、脂質、投与薬剤等による混濁は、近年臨床検査分野で重要度を増している比色測定、比濁測定等の光学的測定の直接的な妨害要因であり、正確な測定に対して大きな障害となる。

【0004】蛋白質の測定妨害としては、血清蛋白分画に異常をきたした血清検体やイムノグロブリン高値検体では、測定時の濁度増加の問題（いわゆる膠質反応等の問題）がある（新訂3版臨床検査研修ハンドブック 2 薬事日報社 P.324、P.271及び日本臨床検査自動化学会誌 1998 vol.23 No4 P.319）。またリュウマトイド因子等の自己抗体も検体由来の濁度増加を起こし正確な測定を妨害する要因となる。同様に、高脂検体、抗生物質等の疎水性投与薬剤の混入した検体でも、検体と検出試薬との混合でしばしば混濁を起こし、正確な測定を妨害する。

【0005】濁りによる測定妨害を解決する従来技術は、比濁法や比ロウ法といった免疫学的測定に関しては以下に挙げる通り多数開示されている。例えば、免疫学的測定で検体蛋白質全般の影響を回避する方法としては、特公平02-21548号公報に、タンパク質消化剤を対象タンパク質の特定の抗原性を残す範囲で適度に作用させてその他タンパク質の干渉を排除する技術が開示されているが、対象タンパク質も同時に消化されるため検査の条件設定を予め行う必要があるなど実用性に問題がある。

【0006】また、リュウマチ因子等が起こす非特異的反応を抑制する方法として、特公昭63-38668号公報には免疫試薬に非特異的濁度増加の原因となるFc\*50

\*部分を除いたイムノグロブリン断片を用いる方法が、特開平09-49838号公報にはpHを限定して同様の影響を回避する技術について開示されているが、いずれもコストや使用条件が限定を受ける点などの問題がある。さらに上記の従来技術は、方法論からして免疫学的測定試薬のみに適用可能な技術であり、その他の診断試薬への汎用性が殆どない。

【0007】その他にも免疫学的測定における濁り防止技術として、特開昭59-43362号公報には、特定の界面活性剤で検体中の濁りを可溶化する技術、特開平8-233816号公報には、特定の界面活性剤で測定試薬に含まれる蛋白質の測定時における変性による濁りを防止する技術、第2684069号特許公報には、特定の有機化合物で検体中の夾雑蛋白、脂肪等による副反応を抑制する技術等が開示されている。しかし、これらの従来技術も基本的に免疫学的測定における濁り防止に関する技術であり、やはり汎用的に濁りの問題を解決する方法には至っていない。また、免疫学的測定における濁り防止技術を生化学試薬に応用するには様々な障害が考えられる。例えば、通常使用条件が厳格な酵素を多用する生化学試薬には、界面活性剤や有機化合物は酵素の活性や安定性に影響する場合があります使用に際し注意を要する。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、かかる状況に鑑みてなされたものであり、臨床検査分野において生体成分中の特定成分を測定する方法において、検体または試薬由来の濁りによる測定妨害の問題を包括的に解決する方法及び試薬を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記のような臨床検査の測定値に対して異常値を与える濁り成分の影響を包括的に取り除くべく鋭意研究を重ねた結果、特定の高分子化合物を共存させることにより、上記課題を解決することができることを見だし本発明を完成するに至った。

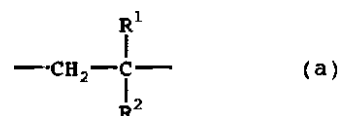
【0010】すなわち本発明は次の事項に関する。

[1] 生体成分中の特定成分を測定する方法において、生体成分を含む試料に高分子化合物を添加することにより、不溶性物質による測定妨害を回避することを特徴とする生体成分の測定方法。

[2] 高分子化合物が、下記一般式(a)

【0011】

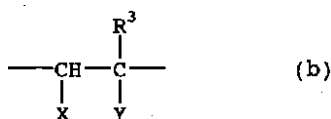
【化5】



及び式(b)

【0012】

【化6】



[式中、R<sup>1</sup>は水素原子、炭素数3以下のアルキル基、COOHを有する基、水酸基、アルコキシ基、脂肪族アルコールまたはアルコールの脂肪酸エステルであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は独立に水素原子またはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHを有する基であり、YはCOOH、SO<sub>3</sub>H、PO(OH)<sub>2</sub>を有する基またはそれらから誘導される基である。ただし、R<sup>1</sup>とYは同時にCOOHを有する基ではない。]のモノマー単位を有する上記[1]に記載の生体成分の測定方法。

【0013】[3]上記モノマー単位(a)と(b)の比率が、20:80~80:20である上記[2]に記載の生体成分の測定方法。

[4]高分子化合物の質量平均分子量が、1,000~500,000である上記[1]ないし[3]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

[5]生体成分を含む試料に添加する高分子化合物の濃度が、0.0001~5%の範囲である上記[1]ないし[4]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

[6]高分子化合物の添加された生体成分を含む試料において、pHが5~10の範囲で測定を行うことを特徴とする上記[1]ないし[5]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

【0014】[7]上記モノマー単位(a)が、1-アルケンおよびその誘導体(ただし、側鎖がアルキル基の場合炭素数は3以下)である上記[2]ないし[6]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

[8]上記モノマー単位(b)が、マレイン酸、アクリル酸またはメタクリル酸である[2]ないし[7]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

[9]リポ蛋白質分画、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸、酵素活性または血糖の測定を含む生化学検査に用いることを特徴とする上記[1]ないし[8]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

[10]生化学検査が、リポ蛋白質分画の直接測定である上記[9]に記載の生体成分の測定方法。

【0015】[11]抗体、抗原もしくは受容体を用いる比濁法または比濁法、あるいは抗体、抗原または受容体を担持したラテックスを用いる比濁法を含む免疫学的検査に用いることを特徴とする上記[1]ないし[8]のいずれかに記載の生体成分の測定方法。

[12]免疫学的検査が、比濁法を用いた抗原検査または抗体検査である上記[11]に記載の生体成分の測定方法。

[13]上記[1]ないし[12]のいずれかに記載の生体成分の測定方法において、不溶性物質による測定妨

\*害が、脂質、蛋白質または疎水性投与薬剤のいずれかひとつ以上に起因するものである生体成分の測定方法。

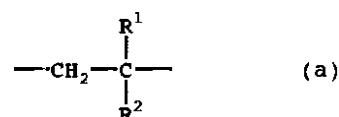
[14]不溶性物質による測定妨害が、検体または検出試薬中の蛋白質によるものである上記[13]に記載の生体成分の測定方法。

[15]不溶性物質による測定妨害が、検体または検出試薬中のイムノグロブリンによるものである上記[14]に記載の生体成分の測定方法。

【0016】[16]下記一般式(a)

【0017】

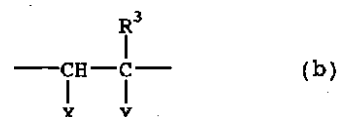
【化7】



及び式(b)

【0018】

【化8】



[式中、R<sup>1</sup>は水素原子、炭素数3以下のアルキル基、COOHを有する基、水酸基、アルコキシ基、脂肪族アルコールまたはアルコールの脂肪酸エステルであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は独立に水素原子またはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHを有する基であり、YはCOOH、SO<sub>3</sub>H、PO(OH)<sub>2</sub>を有する基またはそれらから誘導される基である。ただし、R<sup>1</sup>とYは同時にCOOHを有する基ではない。]のモノマー単位を有する高分子化合物、および検出試薬を含んでなる臨床診断用試薬。

[17]高分子化合物が、1-アルケンおよびその誘導体(但し、側鎖がアルキル基の場合炭素数は3以下)である(a)と、マレイン酸、アクリル酸またはメタクリル酸である(b)からなる水溶性高分子化合物の1種以上である上記[16]に記載の臨床診断用試薬。

[18]検出試薬として、少なくとも検出用酵素、緩衝液、及び色素もしくは補酵素を含み、生化学検査に用いることを特徴とする上記[16]または[17]に記載の臨床診断用試薬。

[19]検出試薬として、少なくとも抗体、抗原または受容体、あるいは抗体、抗原または受容体を担持したラテックス、及び緩衝液を含み、免疫学的測定に用いることを特徴とする上記[16]または[17]に記載の臨床診断用試薬。

【0019】

【発明の実施の形態】本発明は、測定時に検体と一緒に上記の水溶性高分子化合物を何らかの形で関与させる事により、検体または試薬中に含まれる蛋白質や脂質等に

よる濁りの妨害を包括的に回避するという優れた特徴を有する。本発明において、不溶性物質による測定妨害とは、検体あるいは検査試薬に由来する濁りにより、透過光、濁度、散乱光、蛍光等の光学的測定が妨害される場合をいう。

【0020】本発明の高分子化合物は、構造上親水性を適度に備え、標的とする蛋白質や脂質等を溶解するため、診断薬に使用した場合、蛋白質や脂質等による濁りの発生を回避するばかりでなく、本発明の高分子化合物自身、検体または試薬由来のタンパク質や脂質とも光学的測定を妨害する凝集塊を形成しないという優れた特徴を有する。また、本発明の高分子化合物は、臨床診断試薬で多用される酵素や抗体等の検出要素の働きにも影響しないという優れた特徴をも有する。

【0021】本発明の(a)及び(b)のモノマー単位を有する化合物は、1-アルケンおよびその誘導体であるモノマー単位(a)と、二重結合およびアニオン性基またはその誘導体を有するモノマー単位(b)から構成される水溶性高分子化合物である。

【0022】モノマー単位(a)の側鎖R<sup>1</sup>としては、水素原子または炭素数3以下のアルキル基、カルボキシル基、脂肪酸、水酸基、アルコキシ基、脂肪族アルコールあるいはアルコールの脂肪酸エステル等が用いられる。モノマー単位(a)の側鎖R<sup>2</sup>及びモノマー単位(b)の側鎖R<sup>3</sup>は独立に水素原子あるいはメチル基である。

【0023】また、モノマー単位(b)のXは水素原子、COOHまたは脂肪酸であり、YはCOOH、脂肪酸、SO<sub>3</sub>HまたはPO(OH)<sub>2</sub>を含む基、あるいはそれらから誘導される基であり、CONH<sub>2</sub>、CONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、H<sub>2</sub>OH、CONHNH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>COOH、COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、COOC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H、COOC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO(OH)<sub>2</sub>、CONHC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H、CH<sub>2</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SO<sub>3</sub>H等が挙げられる。

【0024】本発明に使用する高分子のモノマー単位(a)としては、側鎖R<sup>1</sup>がアルキル基の場合、エセン、プロペン、1-ブテン、1-ペンテン、1,1-ジメチルエセン(イソブチレン)、2-メチル-1-ブテン、2-メチル-1-ペンテン、炭素主鎖に直接カルボキシル基が結合したアクリル酸やメタクリル酸、炭素主鎖に直接脂肪酸が結合したCH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、炭素主鎖に直接水酸基が置換したヒドロキシエセン(ビニルアルコール)、炭素主鎖に直接アルコキシ基の結合したメトキシ-エセン、エトキシ-エセン、プロピオキシエセン-エセン、炭素主鎖に直接脂肪族アルコールが結合したCH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH、炭素主鎖に直接結合した水酸基または脂肪族アルコールの脂肪酸エステル等が挙げられる。

【0025】本発明に使用する高分子のモノマー単位(b)としては、マレイン酸、アクリル酸、メタクリル

酸、CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>COOH、CH(CH<sub>3</sub>)=CHCH<sub>2</sub>COOHやその酸アミドまたはエステル誘導体、あるいはエセンの-SO<sub>3</sub>H誘導体や-PO(OH)<sub>2</sub>誘導体等が挙げられる。上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する化合物としては、上記のモノマー単位(a)と(b)の共重合体を使用するが、モノマー単位が同一の場合の効果は低いいため、本発明において、上記モノマー単位(a)と(b)は互いに異なるモノマー単位を表す。

【0026】これらの中でも特に重要なマレイン酸の共重合体として、ポリ(エセン-co-マレイン酸)、ポリ(プロペン-co-マレイン酸)、ポリ(1-ブテン-co-マレイン酸)、ポリ(1-ペンテン-co-マレイン酸)、ポリ(1,1-ジメチルエセン-co-マレイン酸)、ポリ(2-メチル-1-ブテン-co-マレイン酸)、ポリ(2-メチル-1-ペンテン-co-マレイン酸)、ポリ(メトキシエセン-co-マレイン酸)、ポリ(エトキシエセン-co-マレイン酸)、ポリ(プロピオキシエセン-co-マレイン酸)、およびそれらの酸アミドまたはエステル類等が好ましく用いられる。

【0027】また、特に重要なアクリル酸の共重合体として、ポリ(エセン-co-アクリル酸)、ポリ(プロペン-co-アクリル酸)、ポリ(1-ブテン-co-アクリル酸)、ポリ(1-ペンテン-co-アクリル酸)、ポリ(1,1-ジメチルエセン-co-アクリル酸)、ポリ(2-メチル-1-ブテン-co-アクリル酸)、ポリ(2-メチル-1-ペンテン-co-アクリル酸)、ポリ(メトキシエセン-co-アクリル酸)、ポリ(エトキシエセン-co-アクリル酸)、ポリ(プロピオキシエセン-co-アクリル酸)、およびそれらの酸アミドまたはエステル類等が好ましく用いられる。

【0028】また、特に重要なメタクリル酸の共重合体として、ポリ(エセン-co-メタクリル酸)、ポリ(プロペン-co-メタクリル酸)、ポリ(1-ブテン-co-メタクリル酸)、ポリ(1-ペンテン-co-メタクリル酸)、ポリ(1,1-ジメチルエセン-co-メタクリル酸)、ポリ(2-メチル-1-ブテン-co-メタクリル酸)、ポリ(2-メチル-1-ペンテン-co-メタクリル酸)、ポリ(メトキシエセン-co-メタクリル酸)、ポリ(エトキシエセン-co-メタクリル酸)、ポリ(プロピオキシエセン-co-メタクリル酸)、およびそれらの酸アミドまたはエステル類等が好ましく用いられる。さらに、重要な脂肪酸誘導体同志の共重合体化合物としては、ポリ(アクリル酸-co-マレイン酸)、ポリ(メタクリル酸-co-マレイン酸)、ポリ(アクリル酸-co-メタクリル酸)およびそれらの酸アミドまたはエステル類等が好ましく用いられる。

【0029】また、上記共重合体化合物のモノマー単位

(a)と(b)は、適度な親水性と疎水性を持つ基を組み合わせればよく、その組み合わせが適切ならば濁度解消の効果も大きい。例えば交互共重合体で、(a)がアルキル側鎖を持つ1-ブテンの場合は疎水性の基として、(b)がマレイン酸の場合は親水性の基としての働きをより大きく担うが、(a)をヒドロキシエセンにした場合、(b)はアクリル酸の $\text{C}_3\text{H}_5\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{H}$ エステルが好ましい。

【0030】上記モノマー単位(a)と(b)の比率は、好ましくは20:80~80:20であるが、より好ましくは30:70~70:30であり、さらにより好ましくは40:60~60:40である。また、モノマー単位(a)と(b)以外の他のモノマー単位を含んでも構わない。モノマー単位(a)と(b)の比率が、上記範囲を外れた場合は、妨害回避効果が低下するため好ましくない。

【0031】液体クロマトグラフィーで測定した上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する高分子化合物の質量平均分子量は、1,000~500,000であり、好ましくは3,000~100,000、より好ましくは5,000~80,000である。高分子化合物の質量平均分子量が1,000未満では妨害回避効果が低下するため好ましくなく、また500,000を超えると溶液粘度を著しく上げるため実用上好ましくない。

【0032】上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する高分子化合物の使用濃度は、試料中の妨害物質濃度に依存するが、血清あるいは血漿に用いる場合には0.0001~5%がよく、好ましくは0.0003~2.5%である。高分子化合物の濃度が0.0001%未満の場合は十分な妨害回避効果が得られないため好ましくなく、5%を超えると酵素を用いる検出系では場合により酵素活性に影響する可能性があるため好ましくない。

【0033】本発明において、試料に上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する高分子化合物を接触させる際のpHは、5~10の範囲において行うが、本発明の高分子化合物の効果をより高めるためには6~9のpH範囲が好ましく、6~8がより好ましい。反応時のpHが5未満、あるいは10を超えた場合、現行の生化学検査においては検出系に酵素を用いるため、高分子との共存で酵素の安定性を低下させる可能性があるため好ましくない。

【0034】本発明において用いるpH緩衝剤には特に制限はなく、設定したpHに対応するpKaを持つ1~300mMのpH緩衝剤により調節することができる。用いるpH緩衝剤としては、2-モルフォリノエタンスルフォネート(MES)、N-(2-2ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルフォネート)(HEPES)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルフォネート)(PIPES)、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルフォネート(MOPS)、N-シク

ロヘキシル-2-アミノエタンスルフォネート(CHESS)等が例示できる。

【0035】また本発明においては、上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する高分子化合物の作用に影響しないものであれば任意の物質を共存させることができる。例えば、塩化ナトリウム、リン酸カリウム等の塩類、血清アルブミン等の蛋白質、アスコルビン酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼ、カタラーゼ等の酵素、色素原体等が挙げられる。さらに、上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する高分子化合物の作用に干渉しないものであれば、界面活性剤等を共存させることも可能である。

【0036】本発明が適用される測定項目としては特に限定はない。適用例としては、リポ蛋白質分画、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸、酵素活性、血糖等の生化学検査が挙げられるが、特にリポ蛋白質分画に好適に用いられる。

【0037】また、抗体、抗原または受容体を用いる比濁法または比濁法、もしくは抗体、抗原または受容体を担持したラテックス等を用いる比濁法等の免疫学的測定にも適用できる。免疫学的測定の測定項目としては、C反応性蛋白(CRP)検査、カンジダ抗原検査、ウイルス肝炎の抗原または抗体検査、ヘルペス、麻疹、風疹等のウイルス感染症関連検査、リュウマチ因子(RF)等の自己免疫疾患関連検査、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、インスリン等の内分泌関連検査等が挙げられるが、特にこれらに限定されない。

【0038】本発明が解決しようとする濁りの問題は、検体または試薬中に含まれる物質の持つ疎水性に起因すると考えられるが、測定妨害をおこす検体としては次のものが挙げられる。即ち、高脂検体、高イムノグロブリン検体、抗生物質等の疎水性投与薬剤の混入した検体は、検体と検出試薬との混合でしばしば混濁を起こすため、光学的な測定において正確な測定を妨害する要因となる。また、特に免疫学的測定で試薬に抗血清や抗体を用いる場合、検体由来のリュウマチ因子等の自己抗体も濁度増加を起こし正確な測定を妨害する要因となる。これらの濁度増加による妨害の解決には本発明が有用である。

【0039】本発明の臨床診断用試薬は、上記(a)及び(b)のモノマー単位を有する高分子化合物および検出試薬から構成される。リポ蛋白質分画、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸、血糖等の生化学検査に用いる検査試薬には一般に酵素法が用いられるが、本発明の高分子化合物は、検出に使われる酵素の活性に影響しないため、これらの生化学検査に用いる検査試薬に好適に用いられる。本発明の高分子化合物とともに用いられる生化学検査の検査試薬には、少なくとも検出用酵素、緩衝液、及び色素もしくは補酵素から構成される。さらに所望により界面活性剤、安定化剤、防腐剤等の他の薬

剤をを含まない。

【0040】また、酵素活性の測定を目的とする場合の検出試薬は、少なくとも前記高分子化合物、基質、緩衝液、及び色素もしくは補酵素から構成される。さらに所望により界面活性剤安定化剤、防腐剤等の他の薬剤を含んでいても構わない。さらに、本発明を免疫学的測定方法に応用する場合、例えば比濁法または比ロウ法に用いる場合には次の様にして用いる。

【0041】通常、比濁法または比ロウ法に用いる試薬は、抗体等を含む試液、または抗体等を担持したラテックス等を含む試液等から構成されるが、必要に応じて緩衝液も使用する。これに本発明を応用する場合、例えば緩衝液中に前記高分子化合物を添加して検体と予め接触させ、次いで抗体等または抗体等を担持したラテックスを含む試液と接触させて測定に供する。あるいは抗体等または抗体等を担持したラテックスを含む試液に本発明高分子と一緒に添加しておき直接検体に接触させて測定に供する。

【0042】

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

(製造例)市販のポリ(1, 1 - ジメチルエセン - alt - 無水マレイン酸) 10gを100mlの精製水に入れ、80 に加熱する。この水溶液を80 に加熱しながら、pHを8に保つ様に5N水酸化ナトリウム溶液を滴下して行き、70 で2時間加熱した。反応終了後、室温で18時間放置して、精製水を加え、8.0%の(a)及び(b)のモノマー単位を有する化合物を得た。

【0043】(実施例1および比較例1)本発明の高分子化合物(製造例1の高分子化合物と同様の方法で得た高分子化合物または市販の高分子化合物等)で、I g Mを多く含む検体による濁りの減少効果と効果の程度を検討した。本発明の高分子の効果を実施例1に示し、高分子化合物無添加および効果の低い場合を比較例1及び2に示す。

【0044】実施例1では 30mM MOPS緩衝液 300u lに各種高分子化合物を適宜添加した。I g Mを多く含む検体(I g M = 2712mg / d l) 3u lを添加して420nmの吸光度変化を経時的に測定して各種高分子化合物の効果を確認した。

【0045】比較例1では実施例1と同一の検体を用い同様に吸光度変化を経時的に測定した。高分子無添加の場合(30mM MOPS緩衝液)と、質量平均分子量700のポリ(エセン - co - マレイン酸)の場合を比較例1として示した。実施例1を図1および図2に、比較例1を図3に示す。結果、本発明の高分子化合物が蛋白質(I g M高値検体)による濁りの解消に効果があることがわかった。

【0046】

【図1】

【0047】

【図2】

【0048】

【図3】

【0049】(実施例2及び比較例2)本発明の高分子化合物を生化学試薬(HDLコレステロール測定試薬)に用いた場合、実施例2で本発明高分子の添加効果を、比較例2で本発明高分子無添加の場合の結果を評価した。

【0050】(HDLコレステロール測定試薬の組成)

第1試薬 - a (実施例2に使用)

0.05% ポリ(エセン - alt - マレイン酸)、

0.05% - サクロデキストリン サルフェート、

2mM MgSO<sub>4</sub>、1mM TOOS、5u / ml

1 アスコルビン酸オキシダーゼ、30mM MOPS

pH7.4

第1試薬 - b (比較例2に使用)

第1試薬 - aから、ポリ(エセン - alt - マレイン酸)を除いた試薬。

第2試薬(実施例2および比較例2に使用)

2u / ml PEG修飾コレステロールエステラーゼ、

4u / ml PEG修飾コレステロールオキシダーゼ、

5u / ml パーオキシダーゼ、1mM 4 - アミノアンチ

ピリン、30mM MOPS pH7.4

【0051】(HDL - コレステロールの測定方法)日立7070型自動分析装置(株式会社日立製作所製)を用いて、イムノグロブリン濃度の高い血清を含む被検試料のHDLコレステロールを測定した。37 において本発明の高分子化合物を含む第1試薬 - aまたは本発明の高分子化合物を含まない第1試薬 - bを添加して約5分間反応させる。次いで第2試薬を添加してさらに約5分間HDL - コレステロールを反応させ、吸光度変化(550nm / 700nm)を測定して、濃度既知のリポ蛋白質コレステロールキャリアクター(試料ブランク = 精製水)を用いて血清中のHDLコレステロール濃度を算出した。

【0052】対照法として、反応液体クロマトグラフィー法で同一血清のHDLコレステロールを定量した。Shodex(昭和電工株式会社登録商標)KW - 804カラム(昭和電工株式会社製)を用い、150mM燐酸緩衝液(pH7.0)を溶離液として血清中のリポ蛋白質を分離し、カラム出口に溶出液とコレステロール検出液を混合させる反応コイルを接続して、反応コイル中でカラム溶出液とコレステロール検出液混合物を45 で3分間反応させた後に、550nmの吸光度を測定することによってリポ蛋白質各分画のコレステロール量を測定した。

50 【0053】なお、コレステロール検出液はPseud

omonas属微生物由来のコレステロールエステラーゼ(10U/ml)、Pseudomonas属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ(10U/ml)、パーオキシダーゼ(20U/ml)、4-アミノアンチピリン(2mM)及びTOOS(2mM)を含む0.5% Triton X-100溶液であり、溶出液と1:1に混合するように反応コイルへの流入量を調節した。クロマトグラム中のピークは超遠心法によって分離したHDL、LDL、VLDL分画を用いて同定した。また、同法によるHDL-コレステロール値は検体への追加添加法により脂質、IgM等の影響を受けない事を予め確認した。結果、目視による観察/イムノグロブリン(IgM)高値検体では、本発明の高分子化合物を含む第1試薬-aを添加しても濁りを生じないが、本発明の高分子化合物を含まない第1試薬-bを添加すると明らかな濁りを生じた。

【0054】実施例2と比較例2におけるHDL-C測定値/自動分析と反応液体クロマトグラフィーでの測定結果をそれぞれ図4および図5に示す。横軸に検体中のIgMの濃度、縦軸に試薬測定値とHPLC測定値との

【0055】

【図4】

【0056】

【図5】

【0057】実施例2の本発明の高分子化合物を添加した系では、イムノグロブリンによる濁りがなく、測定値にも殆ど影響がないことがわかる。一方、比較例2の本発明の高分子化合物を添加しない系では、イムノグロブリンによる濁りを生じ、測定値も正の誤差が認められた。

\*【0058】(実施例3および比較例3)本発明の高分子化合物を免疫学的測定方法に適用した場合の実施例を示す。実施例3で本発明の高分子の添加効果を、比較例3に高分子無添加の場合の結果を示す。

【0059】(免疫試薬組成)

試薬A(実施例3に使用)

0.05% ポリ(1,1-ジメチルエセン-alt-マレイン酸)、0.5mg/ml 抗ヒトCRP抗体(ウサギ・ポリプロテインG精製品)、3% ポリエチレングリコール6,000、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7.8

試薬B(実施例3に使用)

試薬Aから抗ヒトCRP抗体を除いた試薬

試薬C(比較例3に使用)

0.5mg/ml 抗ヒトCRP抗体(ウサギ・ポリプロテインG精製品)、3% ポリエチレングリコール6,000、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7.8

試薬D(比較例3に使用)

試薬Cから抗ヒトCRP抗体を除いた試薬

【0060】(測定方法)マイクロプレートに高脂血清を含む検体5ulと試薬A~D300ulを別個に添加して5分後にそれぞれの412nmの吸光度を測定した。

【0061】実施例3と比較例3で、それぞれ抗体添加系と抗体無添加系における吸光度差を比較して、本発明高分子の効果を検討した。目視による血清の濁りを確認した結果を、表1に示す。

【0062】

【表1】

血清番号 (トリグリセリド濃度 mg/dl)	血清の濁り (目視)	実施例3			比較例3		
		吸光度(A412)		吸光度差	吸光度(A412)		吸光度差
		(試薬A)	(試薬B)	(A-B)	(試薬C)	(試薬D)	(C-D)
NO1 (28)	-	0.015	0.002	0.013	0.018	0.004	0.014
NO2 (266)	-	0.033	0.001	0.032	0.036	0.005	0.031
NO3 (589)	+	0.151	0.002	0.149	0.165	0.023	0.142
NO4 (844)	++	0.277	0.004	0.273	0.399	0.177	0.222
NO5 (1022)	+++	0.057	0.003	0.054	0.312	0.277	0.035
NO6 (1298)	+++	0.127	0.004	0.123	0.299	0.227	0.072

【0063】表1中の血清の濁りは、-が濁りなし、+~+++で濁りの程度を3段階で示した。実施例3の本発明の高分子化合物を添加した系では、抗体添加系では濁りを生じた事から抗原抗体反応が確認されたが、抗体無添加系では吸光度の上昇が殆どなく、本発明高分子添加により高脂検体の影響が回避されていることがわかる。一方、比較例3の本発明の高分子無添加の系では、抗体添加系と抗体無添加系共に濁りを生じ、抗体無添加系の吸光度上昇は明らかに検体由来の濁りであると考

えられる。

【0064】

【発明の効果】本発明の高分子化合物を用いた測定妨害を回避する方法により、臨床検査において測定誤差を生じる原因となる脂質や蛋白質等による濁りを防止して、より正確な測定値が得られるため、特に生化学的検査や免疫学的検査等の臨床診断分野に有用である。さらに本発明の臨床診断用試薬は、特に生化学的検査や免疫学的検査等の臨床診断分野に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明実施例1のIgMを多く含む検体に本発明の高分子化合物を用いた場合の吸光度の経時変化の一例を示すグラフである。

【図2】本発明実施例1のIgMを多く含む検体に本発明の高分子化合物を用いた場合の吸光度の経時変化の一例を示すグラフである。

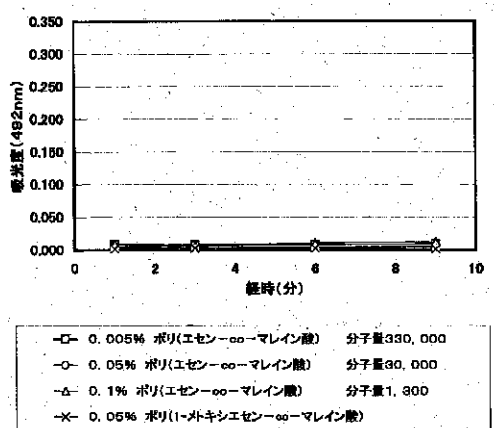
【図3】本発明比較例1のIgMを多く含む検体に本発

\*明の高分子化合物を用いない場合の吸光度の経時変化の一例を示すグラフである。

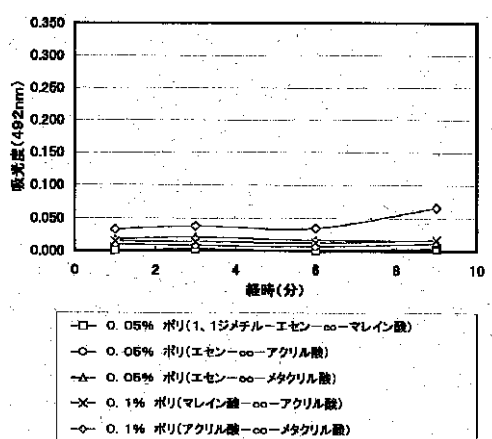
【図4】本発明実施例2の本発明の高分子化合物を用いた場合のHDL-C測定値と反応液体クロマトグラフィーでの測定値との相関を示すグラフである。

【図5】本発明比較例2の本発明の高分子化合物を用いない場合のHDL-C測定値と反応液体クロマトグラフィーでの測定値との相関を示すグラフである。

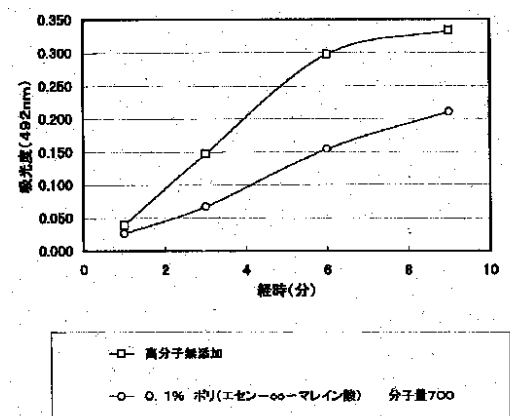
【図1】



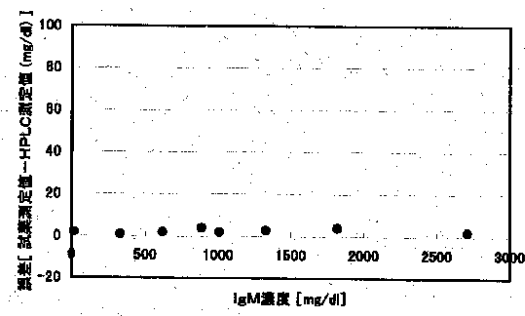
【図2】



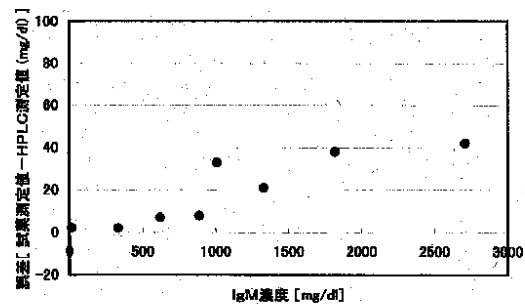
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

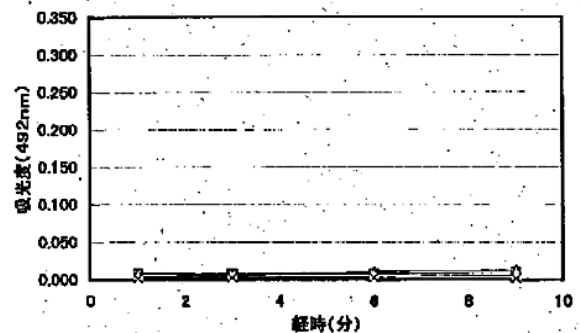
(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
G 0 1 N 33/531		G 0 1 N 33/531	B
33/543	5 8 1	33/543	5 8 1 H
	5 8 3		5 8 3

F タ-ム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA25 BA02 BA04  
 BA07 BB02 BB52 BB60 CA25  
 CB03 DA36 DA60 DA62 DA69  
 FA11 FB01 FB03 FB11 GC10  
 GC12  
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03  
 QQ76 QR02 QR03 QR12 QR48  
 QS02 QS33 QX01

专利名称(译)	测量生物成分的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001235465A</a>	公开(公告)日	2001-08-31
申请号	JP2000047758	申请日	2000-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	昭和电工株式会社		
申请(专利权)人(译)	昭和电工株式会社		
[标]发明人	澤柳豊治 佐藤元		
发明人	澤柳 豊治 佐藤 元		
IPC分类号	G01N33/48 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/44 C12Q1/60 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/48.A C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/44 C12Q1/60 G01N33/531.B G01N33/543.581.H G01N33/543.583		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/BA02 2G045/BA04 2G045/BA07 2G045/BB02 2G045/BB52 2G045/BB60 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/DA60 2G045/DA62 2G045/DA69 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/GC10 2G045/GC12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ76 4B063/QR02 4B063/QR03 4B063/QR12 4B063/QR48 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QX01		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：当血液，尿液等生物成分的特定成分被测量时，提供一种避免测量样品或来自测量试剂的不溶性物质的测量干扰的方法，主要用于临床提交审查。解决方案：在这种测量生物成分的方法中，可以通过添加高分子化合物来避免不溶物质的测量干扰，从而测量生物成分的特定成分，以及由高分子化合物和检测组成的临床诊断化学品获得试剂。



- 0.005% ポリ(エチレン-α-マレイン酸) 分子量330,000
- 0.05% ポリ(エチレン-α-マレイン酸) 分子量30,000
- △ 0.1% ポリ(エチレン-α-マレイン酸) 分子量1,300
- × 0.05% ポリ(1-メトキシエチレン-α-マレイン酸)