

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/133452

発行日 平成26年7月28日(2014.7.28)

(43) 国際公開日 平成24年10月4日(2012.10.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	2 G O 5 8
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 M	
GO 1 N 35/10 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 D	
	GO 1 N 35/06 E	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

出願番号 特願2013-507636 (P2013-507636)	(71) 出願人 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
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/058001	
(22) 国際出願日 平成24年3月27日(2012.3.27)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-70872 (P2011-70872)	(74) 代理人 100090251 弁理士 森田 憲一
(32) 優先日 平成23年3月28日(2011.3.28)	(74) 代理人 100139594 弁理士 山口 健次郎
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 庄司 慶一 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学 メディエンス株式会社内
	(72) 発明者 横井 宏行 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学 メディエンス株式会社内
	Fターム(参考) 2G058 BA02 CC01 CC08 EA02 EA04 EA16 ED31 GA02
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全血検体の免疫測定方法および測定キット

(57) 【要約】

標的物質を含有する検体溶液と、第一の反応液と、第二の反応液とを用意し；分注手段を有する測定装置を使用して、検体溶液と第一反応液とを分注手段中に順次吸引した後；分注手段から一度に吐出することにより第二反応液と接触させ、第一反応液または第二反応液の少なくとも一方に含有されていた標的物質に特異的に反応する第一のパートナーと、標的物質との複合体を形成させ；形成された複合体を分析する；公知の標的物質の測定方法において、測定結果に負の影響を与える反応を抑制することのできる改良法を提供する。

前記改良法では、検体溶液の比重と、第一反応液の比重とが異なり、検体溶液と第一反応液とが重層された状態で、分注手段中に吸引される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的物質を含有する可能性のある検体またはその処理液と、第一の反応液と、第二の反応液とを用意し；

分注手段を有する測定装置を使用して、前記検体またはその処理液と、前記第一反応液とを、この順または逆の順に、分注手段中に順次吸引した後；

分注手段から一度に吐出することにより前記第二反応液と接触させ、第一反応液または第二反応液の少なくとも一方に含有されていた標的物質に特異的に反応する第一のパートナーと、標的物質との複合体を形成させ；

形成された前記複合体またはそれに由来する信号を分析する；

前記標的物質の測定方法において、

前記の検体またはその処理液の比重と、前記の第一反応液の比重とが異なり；

検体またはその処理液と第一反応液とが重層された状態で、分注手段中に吸引される；

ことを特徴とする、前記測定方法。

【請求項 2】

検体が全血である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第一反応液の比重が、検体またはその処理液の比重よりも大きく、検体またはその処理液と、第一反応液とを、この順に分注手段中に吸引する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第一反応液が、多価アルコール類、糖アルコール類、及び糖類から選んだ少なくとも一つの物質を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

第一反応液が、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジエチレングリコール、グリセロール、ペントース、ヘキソース、トリオース、テトロース、ヘプトース、シュクロース、トレハロース、イソトレハロース、コージビオース、ソホロース、ニゲロース、ラミナリビオース、マルトース、セロビオース、イソマルトース、ゲンチオビオース、ラクトース、ツラノース、マルツロース、パラチノース、ゲンチオピウロース、マンノピオース、メリビオース、メリビウロース、ネオラクトース、ガラクトスクロースシラピオースルチノース、ルチヌロースキシロピオース、プリメロース、オリゴ糖類、ラフィノース、メレジトース、及びマルトトリオースから選んだ少なくとも一つの物質を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 4 又は 5 に記載の物質が、それらの総量として、第一反応液に 10% 以上 30% 以下で含まれる、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

標的物質に特異的に反応する第一パートナーが抗体又は抗原である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

標的物質に特異的に反応する第一パートナーが第一反応液に含まれ、第一パートナーと異なる領域を認識して標的物質に特異的に反応する第二のパートナーが、第二反応液に含まれる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

標的物質に特異的に反応する第一パートナーおよび第二パートナーが、標識体で標識されたパートナー又は固相担体に固定されたパートナーである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

第一反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第一パートナーが、標識体で標識されたパートナーであり、第二反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第二パートナーが、固相担体に固定されたパートナーである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

第一反応液又は第二反応液の少なくとも一方に、標的物質との複合体の形成を抑制する、標的物質に特異的に反応する第三のパートナーを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

第一反応液および第二反応液に、標的物質に特異的に反応する前記の第三パートナーを含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

標的物質に特異的に反応する第三パートナーが抗体又は抗原である、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

分注手段がチップである、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一方に記載の方法。

【請求項 1 5】

第一の反応液と第二の反応液とを含み、第一反応液と第二反応液の少なくとも一方に、標的物質に特異的に反応する第一のパートナーを含む、分注手段を有する測定装置で使用するための、標的物質の測定キットであって、前記測定装置が、検体又はその処理液と前記の第一反応液とを、この順または逆の順に、分注手段内に順次吸引する工程を実施する装置であり、前記の検体またはその処理液の比重と、前記の第一反応液の比重とが異なる、前記キット。

【請求項 1 6】

第一反応液の比重が、検体またはその処理液の比重よりも大きい、請求項 1 5 に記載の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中に存在する標的物質（微量成分等）を対象とする測定方法及びキットに関する。特に、全血検体中に存在する標的物質（微量成分等）を対象とする免疫学的分析方法および免疫学的分析キットに関する。

【背景技術】

【0002】

生体試料中に存在する標的物質（微量成分等）の測定方法として、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定方法が多用されておりラジオイムノアッセイ（RIA）、エンザイムイムノアッセイ（ELISA）等が知られている。近年、サンプルとして血清、血漿が多く用いられているが、前処理の煩わしさから、全血をそのまま測定する方法が望まれてきている。しかし、全血検体は測定対象である微量成分等の他に不純物（標的外物質）が多く含まれているなどのために、血清検体や血漿検体を使用した条件と同様に行えない場合も多い。また、反応精度を高めるため、特許文献 1 のように、反応抑制剤（固相または、標識体に固定化された抗体と競合しうる遊離した抗体又はその抗体の断片）を反応中に存在させることで、プロゾーンの回避が可能となることなどが報告されている。このような場合、1 測定中に複数の反応物質が混在することとなり測定系の構築が難しい。

【0003】

また、簡便に複数の検体を試験可能な手段として、様々な全自動免疫測定装置が知られており、例えば、特許文献 2 のような複数同時測定可能な全自動測定装置が挙げられる。この全自動測定装置は、所定量の検体を所望の倍率に希釈する希釈ウェル、および、検体中の標的物質とこれと特異的に反応する物質とを反応させる反応ウェル、および、反応成分などを含有する収納ウェルを有するカートリッジに、標的物質を含有する検体を分注し、当該カートリッジ上で所望の倍率に検体を希釈し、希釈された検体中の標的物質とこれと特異的に反応する物質とを反応させ、反応生成物の量を測定することにより、検体中に含まれる希釈倍率が異なる複数種の標的物質を簡便に測定することができることが記載されている。また、吸引・吐出機構を有し、該機構を利用して分注操作を行い、測定を行うことが記載されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

一方、全血検体を対象とした測定方法としては、特許文献3のように全血検体中に含まれる成分の影響を回避するために界面活性剤を含有させる方法などが開示されている。しかし、前記分注手段を用いて全自動測定装置の様に、順次に各反応試薬等を分注して反応を行う測定法の場合に、同一検体の血漿と全血の値に乖離が起きることは知られておらず、このような問題を改善する方法は提案されていない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 4 - 1 9 1 3 3 2 号 公 報

【 特許文献 2 】 W O 2 0 0 1 / 0 8 4 1 5 2 号 公 開 パ ン フ レ ッ ト

【 特許文献 3 】 W O 2 0 0 2 / 0 7 3 2 0 3 号 公 開 パ ン フ レ ッ ト

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、後述の実施例で具体的に説明するが、標的物質を含む検体またはその処理液（以下、検体溶液と称する）と、本反応で形成される標的物質との免疫複合体を形成する、標的物質に特異的に反応するパートナー〔例えば、抗体（第一の反応液にアルカリホスファターゼで標識された抗体を含み、第二の反応液に磁性粒子に固定された抗体を含む）〕と、前記免疫複合体の形成を抑制することができる、標的物質に特異的に反応する遊離抗体（第一の反応液及び第二の反応液に添加）を使用する標的物質の測定方法において、全血検体を対象として、分注手段を有する全自動酵素免疫測定装置で測定を行う場合、該分注手段を用いて、標的物質を含む検体溶液を吸引し、続いて第一の反応液を吸引する際に、本反応で免疫複合体の形成を抑制するための反応抑制剤として反応する抗体が、全血検体中の標的物質と本反応前に反応が進行してしまうため、同一検体の血漿検体と全血検体の値に乖離が起きることに気がついた。

【 0 0 0 7 】

本発明はこの問題に鑑みてなされたものであり、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質を含む検体と、標的物質に特異的に反応するパートナーが、実質的に本反応時に反応を開始することができるように、測定結果に負の影響を与える反応を抑制す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 】

【 0 0 0 8 】

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、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質を含む検体溶液と、第一の反応液と、第二の反応液とを使用する標的物質の測定方法において、第一の反応液と第二の反応液の少なくとも一方に、本反応で形成される標的物質との複合体を形成する、標的物質に特異的に反応する第一のパートナーを含み、分注手段内の流路中で、標的物質を含む検体溶液と、第一の反応液とが異なる比重で存在することを特徴とする方法を使用することにより、本反応前に望まない反応が進行することを抑制し、同一検体の血漿検体と全血検体の値に乖離が起きないことを見出した。本発明はこの知見に基づいて、いずれの検体を使用しても簡便かつ正確に検体中の標的物質を測定する方法を完成させたものである。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

[1] 標的物質を含有する可能性のある検体またはその処理液と、第一の反応液と、第二の反応液とを用意し；

分注手段を有する測定装置を使用して、前記検体またはその処理液と、前記第一反応液とを、この順または逆の順に、分注手段中に順次吸引した後；

分注手段から一度に吐出することにより前記第二反応液と接触させ、第一反応液または第二反応液の少なくとも一方に含有されていた標的物質に特異的に反応する第一のパートナ

10

20

30

40

50

一と、標的物質との複合体を形成させ；
 形成された前記複合体またはそれに由来する信号を分析する；
 前記標的物質の測定方法において、
 前記の検体またはその処理液の比重と、前記の第一反応液の比重とが異なり；
 検体またはその処理液と第一反応液とが重層された状態で、分注手段中に吸引される；
 ことを特徴とする、前記測定方法。

[2] 検体が全血である、[1] の方法。

[3] 第一反応液の比重が、検体またはその処理液の比重よりも大きく、検体またはその処理液と、第一反応液とを、この順に分注手段中に吸引する、[1] 又は [2] の方法。

[4] 第一反応液が、多価アルコール類、糖アルコール類、及び糖類から選んだ少なくとも一つの物質を含む、[1] ~ [3] のいずれかの方法。

[5] 第一反応液が、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジエチレングリコール、グリセロール、ペントース、ヘキソース、トリオース、テトロース、ヘプトース、シクロロース、トレハロース、イソトレハロース、コージビオース、ソホロース、ニゲロース、ラミナリビオース、マルトース、セロビオース、イソマルトース、ゲンチオビオース、ラクトース、ツラノース、マルツロース、パラチノース、ゲンチオビウロース、マンノビオース、メリビオース、メリビウロース、ネオラクトース、ガラクトスクロースシラビオースルチノース、ルチヌロースキシロビオース、プリメロース、オリゴ糖類、ラフィノース、メレジトース、及びマルトトリオースから選んだ少なくとも一つの物質を含む、[4] の方法。

[6] [4] 又は [5] の物質が、それらの総量として、第一反応液に 10 % 以上 30 % 以下で含まれる、[4] 又は [5] の方法。

[7] 標的物質に特異的に反応する第一パートナーが抗体又は抗原である、[1] ~ [6] のいずれかの方法。

[8] 標的物質に特異的に反応する第一パートナーが第一反応液に含まれ、第一パートナーと異なる領域を認識して標的物質に特異的に反応する第二のパートナーが、第二反応液に含まれる、[1] ~ [7] のいずれかの方法。

[9] 標的物質に特異的に反応する第一パートナーおよび第二パートナーが、標識体で標識されたパートナー又は固相担体に固定されたパートナーである、[8] の方法。

[10] 第一反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第一パートナーが、標識体で標識されたパートナーであり、第二反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第二パートナーが、固相担体に固定されたパートナーである、[9] の方法。

[11] 第一反応液又は第二反応液の少なくとも一方に、標的物質との複合体の形成を抑制する、標的物質に特異的に反応する第三のパートナーを含む、[1] ~ [10] のいずれかの方法。

[12] 第一反応液および第二反応液に、標的物質に特異的に反応する前記の第三パートナーを含む、[11] の方法。

[13] 標的物質に特異的に反応する第三パートナーが抗体又は抗原である、[11] 又は [12] の方法。

[14] 分注手段がチップである、[1] ~ [13] のいずれかの方法。

[15] 第一の反応液と第二の反応液とを含み、第一反応液と第二反応液の少なくとも一方に、標的物質に特異的に反応する第一のパートナーを含む、分注手段を有する測定装置で使用するための、標的物質の測定キットであって、前記測定装置が、検体又はその処理液と前記の第一反応液とを、この順または逆の順に、分注手段内に順次吸引する工程を実施する装置であり、前記の検体またはその処理液の比重と、前記の第一反応液の比重とが異なる、前記キット。

[16] 第一反応液の比重が、検体またはその処理液の比重よりも大きい、[15] の測定キット。

【 0010 】

以下、本明細書において、「第一のパートナー」及び「第二のパートナー」とは、本反

10

20

30

40

50

応で形成される標的物質との複合体を形成する、標的物質に特異的に反応する物質の意味で使用し、「第三のパートナー」とは、本反応で形成される標的物質との複合体の形成を抑制する、標的物質に特異的に反応する物質の意味で使用する。

【発明の効果】

【0011】

本発明の方法を使用することにより、いずれの検体を使用しても簡便かつ正確に検体中の標的物質を測定することができる。特に、他種の検体と異なる性質を有する全血検体を使用する際にも、通常、比較対象となる血清検体や血漿検体の値と乖離無く標的物質を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】分注手段であるチップ(91)内に全血(検体溶液; 92)および第一反応液(標識抗体溶液; 93)を吸引した場合のチップ内の各溶液の状態を模式的に示す説明図である。(a)は、第一反応液が糖を含まない場合であり、(b)は、第一反応液が糖を含む場合である。

【図2】実施例で使用したカートリッジを模式的に示す平面図である。

【図3】第一試薬(標識抗体試薬)に糖(シュクロース)を含まない場合による全血測定値と血漿測定値の相関を示すグラフである。

【図4】図3に示す糖を含まない場合による全血測定値と血漿測定値の比を示すグラフである。

【図5】第一試薬(標識抗体試薬)に15%シュクロースを含む場合による全血測定値と血漿測定値の相関を示すグラフである。

【図6】図5に示す15%シュクロースを含む場合による全血測定値と血漿測定値の比を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

1. 自動測定装置及び測定法

本発明の方法は、分注機構を有する自動測定装置及び測定法であれば使用可能である。分注機構としては、特表平09-503060号のようなランダムアクセスで行う方法でも良いし、W02001/084152号のような画一的な操作によるものでも良い。測定法としては、公知の免疫学的測定方法を使用することができ、酵素化学発光法(CLEIA)や免疫学的比濁測定法などが挙げられる。酵素化学発光法(CLEIA)は、酵素免疫学的測定法(エンザイムイムノアッセイとも言う)(ELISA)としても使用される。高感度な分析方法のためには、サンドイッチELISA法が良く使用される。

【0014】

以下に本発明の測定方法及びキットに使用可能な公知の自動測定装置及び測定法の一態様を記載するが、これに限定されるものではない。

【0015】

測定用の自動測定装置は、少なくとも、測定用のカートリッジを収容するカートリッジ収容部、カートリッジ収容部に収容されるカートリッジに試薬および/または検体を分注する分注部、およびカートリッジ収容部に収容されるカートリッジ上の反応生成物を測定する測定部を備える。カートリッジ収容部は、測定用カートリッジを収容できるような構造とされる他は、通常のカートリッジ収容部と同様でよい。

【0016】

前記分注部は、試薬および/または検体の種類や性状に応じて、液体吸引・吐出機構等の通常の機構により構成される。ここで分注とは、カートリッジのウェルにカートリッジ外から試薬および/または検体を移すこと、ならびに、カートリッジ上の一つのウェルから他のウェルに試薬および/または検体を移すことの両方を包含する。

【0017】

前記測定部は、反応生成物の種類や性状に応じて、測光機構等の通常の機構により構成

10

20

30

40

50

される。

【0018】

前記測定用のカートリッジとしては、例えば、ウェル群を2ライン以上並設したカートリッジ、または、ウェル群を1ライン配置した単数のカートリッジ、または、それらのカートリッジを複数使用することができる。複数のカートリッジを用いて測定を行う場合には、一連の免疫反応を行う機構を複数個並設した装置で、検体の分注、検体の希釈、試薬の分注、B/F分離および測光等の工程を同時に並行駆動制御する機構を有する。このようにして、免疫測定法の場合においても、単一様式の分析工程のみを行う装置を用いて、分析項目が異なっても測定所要時間が大きく増加すること無く複数項目を同時に測定することができる。

10

【0019】

また、測定用カートリッジは、検体を分注する分注ウェル、所定量の検体を所望の倍率に希釈する希釈ウェル、検体中の標的物質とこれと特異的に反応する物質とを反応させる反応ウェル、反応ウェルに対応したB/F分離のための洗浄ウェル、検体中に含まれる標的物質の測定に必要な試薬を収納するための試薬収納ウェル、反応生成物の量を測定するための測定ウェル等を有している。測定ウェルとしては光学的に測定するためには測光ウェルが使用できる。また、同一の測定用カートリッジに上記のウェルを全て配置する必要はなく、使用する装置に合わせて選択できる。例えば、検体中に含まれる標的物質の測定に必要な試薬は、別の試薬供給カートリッジに収納することもできる。また、各ウェルはその目的のみに使用されるのではなく、例えば、分注ウェルは希釈ウェル、試薬収納ウェルは反応ウェルを兼ねることもできる。また、各々のウェルの数は適宜配置することができる。

20

【0020】

反応ウェルには、反応に関与する試薬の一部を収納することができる。試薬収納ウェルまたは反応ウェルに収納する試薬は一種でもよいし、収納した試薬が反応しない限り複数種でもよい。収納される試薬は液状（例えば溶液または懸濁液）であってもよいし、ウェルに注入される液に溶解または懸濁可能であれば固体状であってもよい。

【0021】

測定用カートリッジは、希釈液、標識体、洗浄液等の試薬および/または溶液等を充填しておく場合には、異物の混入および試薬等の蒸発・劣化を避けるためにその上部をアルミニウム箔、プラスチックフィルム等でシールして封入することが好ましい。特にアルミニウム箔のシールは自動測定装置の穿孔機構で自動的に簡便に開封できるので好ましい。また、試薬および/または溶液等を他のカートリッジに充填して、これを併用して測定を行う場合には、該カートリッジも封入することが好ましい。

30

【0022】

測定用カートリッジには、検体に関する情報、分析項目に関する情報、および、試薬管理情報等を記録したバーコードを印刷、貼付等により付してもよい。カートリッジにこのようなバーコードを付することにより、カートリッジのバーコードを認識し分析項目が自動的に選択される自動測定装置を用いれば、測定者はカートリッジを選ぶだけで1台の自動測定装置を用いて任意の分析項目を簡便に効率よく測定することができる。また、従来の通常の自動測定装置で行われているような分析項目の誤設定の大きな原因となっているワークシート操作を行う必要がなく、失敗無く、簡便に複数種の分析項目の測定が可能になる。またさらに、試薬の保存管理等も簡便である。

40

【0023】

測定用カートリッジを組み込んで用いる自動測定装置における、一つのウェルから所定量の液体を吸引し別のウェルに吐出する手段、ウェルの内容物を攪拌する手段、B/F分離を行う手段、反応生成物や標識体の量を測定する手段、反応生成物や標識体の量の測定結果から標的物質の量を算出する手段、カートリッジの温度を調節する手段、バーコードを認識する手段、複数のカートリッジの同時測定を行う手段などは、公知の手段を使用することができる。

50

【0024】

以下、好ましい態様の一例について、免疫測定法、さらに詳しくは、酵素化学発光法（CLEIA）を用いて測定を行う場合を例に挙げて説明する。

【0025】

好ましい態様のカートリッジは、検体中に存在する標的物質を自動的に定量する自動測定装置に組み込んで用いる自動測定用カートリッジであって、標的物質とこれと免疫学的に特異的に反応する物質との反応を行う反応ウェルと、反応に用いる試薬を充填するための複数の試薬収納ウェル、検体を分注する分注ウェル、検体の希釈を行う希釈ウェル、B/F分離を行うための洗浄ウェルおよび/または測光ウェルを有する。前記のとおり、試薬収納ウェルは反応ウェルをかねていてもよい。希釈ウェルには所定量の検体を所望の倍率に希釈する量の希釈液が充填してあり、複数の試薬収納ウェルには個別に、免疫学的に特異的な反応を行うための固相担体、標識された抗原または抗体、標識体量の測定を行うための試薬等が充填され、洗浄ウェルには、免疫複合体を洗浄するための洗浄液を充填して用いることが好ましい。カートリッジの試薬収納ウェルには、例えば、抗原または抗体の結合した固相担体（感作固相）を入れ、反応ウェルをかねることができる。

10

【0026】

固相担体としては、従来から免疫測定で用いられている、ポリスチレンビーズ、磁性粒子、ラテックス等を挙げることができる。さらには、固相担体をウェルに加え、ウェル内壁に抗体または抗原を固相化して用いることもできる。

【0027】

本態様で用いられる免疫測定法としては感度の点で有利な酵素化学発光法（CLEIA）が好ましく、また固相担体としては、酵素化学発光法（CLEIA）で必須なB/F分離が磁石によって簡便に行うことができる磁性粒子が好ましい。このB/F分離は、カートリッジ外部より永久磁石、電磁石等で磁場をあたえることによって行うことができ、また、特開平11-262678号公報にあるように分注系のピペットチップ等の吸引・吐出系側に配列された磁石によっても行うことができる。

20

【0028】

また、他の試薬収納ウェルには標識された抗原または抗体を加えて反応ウェルをかねることができる。標識体としては、例えば、酵素、放射性同位元素、発色物質、蛍光物質、発光物質、各種着色粒子を挙げることができるが、酵素化学発光法（CLEIA）においては酵素が好ましく用いられる。このような標識酵素の例としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコオキシダーゼ等が挙げられる。標識酵素の基質としては、各酵素に対応したものを用いればよく、例えば、アルカリホスファターゼに対しては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（AMPDP）やCDP-Star（登録商標）を用い、ペルオキシダーゼに対してはルミノール/過酸化水素を用い、ガラクトシダーゼに対してはアダマンチルメトキシフェニル-D-ガラクトシルジオキシセタン（AMPGD）を用いることができる。

30

【0029】

標識体の測定は、例えば、酵素化学発光法では、免疫複合体と標識酵素の基質を混合後、測光ウェルから直接、光電子増倍管等により行うことができる。また、酵素免疫法の場合は、酵素基質液と混合した後、測光ウェルの底部または側部から測定波長の測定光を照射し、測光ウェルを通過した透過光を測定することにより行うことができる。

40

【0030】

分注部は、分注手段内の流路である試薬および/または検体と接触する部分が交換可能なものであることが好ましい。分注手段として、試薬や検体を容易に吸引・吐出可能な先細りな形態が挙げられるが、具体的にはチップ等が挙げられる。この部分を測定毎に交換することにより、次の測定に用いるカートリッジの汚染を防止することが容易になるので好ましい。

【0031】

2. 本発明の測定法

50

本発明の測定法は、公知の自動分析装置や測定法を参照して行うことができる。以下に、本発明の主な特徴について詳細に説明する。

【0032】

本発明の測定法は、分注手段を有する測定装置を使用した場合に、標的物質を含む検体溶液と、標的物質に特異的に反応するパートナーが、実質的に本反応時に反応を開始することができるように、測定結果に負の影響を与える反応を抑制するという思想に基づくものである。

【0033】

具体的には、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質を含む検体溶液と、第一の反応液と、第二の反応液とを使用する標的物質の測定方法において、第一の反応液と第二の反応液の少なくとも一方に、本反応で形成される標的物質との複合体を形成する、標的物質に特異的に反応する第一のパートナーを含み、分注手段内の流路中で、標的物質を含む検体溶液と、第一の反応液とが異なる比重で存在させることができる。

10

【0034】

また、一般的な自動分析装置の場合、まず初めに検体を吸引することが多い。すなわち、標的物質を含む検体溶液を分注手段（例えば、チップ）で吸引する第一の工程、続いて第一の反応液を該分注手段で吸引する第二の工程を行うこととなる。そのような場合、図1(a)に示すとおり、検体溶液(92)の方が第一の反応液(93)よりも比重が重いと、例えば、チップ(91)の壁を伝って検体溶液が下降し、検体溶液と第一の反応液の接する面が大きくなり、本反応前に望まない反応が進行してしまう。検体と第一の反応液でどちらの比重を調節するかは、適宜選択することができるが、比重を重くすることの方が容易であるので、第一の反応液の比重を重くすることが好ましい。第一の反応液の比重を検体溶液よりも重くすることにより、分注手段の流路中で検体溶液の下層に第一の反応液が実質的に混合しない状態で重層させることが可能となり、本反応前に望まない反応が進行することができるので好ましい。

20

【0035】

本発明の検体は、標的物質を含むか又は含む可能性のあるものであればよく、例えば、全血、血清、血漿、尿などが挙げられる。

【0036】

特に検体が全血である場合は、検体溶液は通常、一般的な反応液よりも比重が大きいので、測定に影響がある望ましくない反応を引き起こしてしまうことが多い。よって、第一の反応液の比重を重くすることは、全血検体の場合には特に好ましい。また、血清検体や血漿検体などは、通常、一般的な希釈液と同程度の比重であるので、測定に影響が無い場合もあるが、高感度、高精度な測定を実施する場合には問題になる可能性があるため、全血検体以外の検体においても、第一の反応液の比重を検体溶液より重くすることが望ましい。また、様々な種類の検体を同時に測定する場合も多くあることから、第一の反応液の比重を検体溶液より重くすることが望ましい。

30

例えば、全血検体溶液の比重に対して、第一反応液の比重が0.05%~10%異なれば良く、好ましくは0.1%~7.5%、より好ましくは0.1%~3%異なれば良い。比重の測定は、公知の比重計等で容易に測定することができる。

40

【0037】

検体溶液及び第一の反応液が異なる比重であるように調製できれば、どのような物質を使用しても良いが、検体と第一の反応液と第二の反応液とに含まれる成分が本反応時に同時に混合され、且つ、測定に負の影響の無い物質を選択する必要がある。例えば、血球成分を破壊しない物質が好ましい。具体的には、多価アルコール類、糖アルコール類、糖類が挙げられる。多価アルコール類としては、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジエチレングリコール、糖アルコール類としては、グリセロールが挙げられる。また、糖類は、様々な検体や反応液の成分に影響を与えずに比重を高めることができるので特に好ましい。糖類としては、単糖類、二糖類、三糖類が挙げられる。単糖類の例は、ペントース、ヘキソース、トリオース、テトロース、ヘプトース、二糖類の例は、シュクロース

50

、トレハロース、イソトレハロース、コージビオース、ソホロース、ニゲロース、ラミナリビオース、マルトース、セロビオース、イソマルトース、ゲンチオビオース、ラクトース、ツラノース、マルツロース、パラチノース、ゲンチオビウロース、マンノビオース、メリビオース、メリビウロース、ネオラクトース、ガラクトスクロースシラビオースルチノース、ルチヌロースキシロビオース、プリメロース、三糖類の例は、オリゴ糖類、ラフィノース、メレジトース、マルトトリオースが挙げられる。中でも二糖類、三糖類が望ましく、特に好ましくはシュクロースを使用することができる。また、好適な使用濃度としては、各々の物質の性質に合わせて適宜設定することができるが、例えば、第一反応液又は第二反応液中にそれらの総量として、10%以上～30%以下、好ましくは10%以上～20%以下、より好ましくは10%以上～15%以下が望ましい。あるいは、別の態様として、15%以上30%以下が好ましい。

10

【0038】

測定の手順としては、標的物質を含む検体溶液を分注手段により吸引する第一の工程、更に第一の反応液を分注手段により吸引する第二の工程、前記検体溶液と前記第一の反応液とを反応ウェルに吐出して第二の反応液とを反応させる第三の工程、および、反応生成物の量を測定する第四の工程を含む。第一の工程の前に、標的物質を含有する検体を分注ウェルに分注する工程や検体を希釈ウェルで希釈する工程等を含むこともできる。また、第三の工程と第四の工程の間に、更に標的物質と特異的に結合する物質が結合した複合体をB/F分離する工程等を含むこともできる。

20

【0039】

検体の希釈倍率および希釈ウェルに充填される希釈液は、検体、標的物質、標的物質と特異的に反応する物質などの種類によって適宜選択される。希釈液は検体の前処理に必要な試薬を含んでいてもよく、この場合は、希釈ウェルにおいて、希釈および前処理が同時に行われる。

30

【0040】

検体の前処理に必要な試薬としては、酸、アルカリ、有機溶媒、タンパク質変性剤、界面活性剤等を挙げられる。これらの試薬を添加することにより、検体希釈工程で検体の前処理も行うこともできる。検体として全血を用いる場合には、全血には共雑物が多量に含まれることなどから、任意の界面活性剤等を添加することにより前処理を行うことが好ましい。このようにして検体の希釈と前処理を同時に行うことによって、検体として全血等を用いる場合でも、簡便に精度の高い測定を行うことが可能になり、例えば、緊急検査や医師・看護婦が行うポイントオブケアテストイング(POCT)等にも好適に用いられることができる。

40

【0041】

本発明の検体溶液とは、患者から採取された検体それ自体、あるいは、患者から採取された検体が前記希釈液で希釈及び/又は前処理された調製された検体溶液を意味する。

【0042】

本発明の標的物質としては、特に限定されず、該標的物質と特異的に反応するパートナーが存在するものであればよい。例えば、標的物質とこれと特異的に反応するパートナーとの組み合わせとしては、抗原と抗体、抗体と抗原、糖鎖とレクチン等が挙げられる。このように本発明において「特異的に反応する」とは、生化学的に特異的に結合することを意味し、標的物質および特異的に反応するパートナーは、基質のようにその結合の前後で物質の化学的性質が変化するものであってもよい。

50

【0043】

標的物質とこれと特異的に反応するパートナーとを反応させる工程、および、反応生成物の量を測定する工程の条件等は、標的物質とそれと特異的に反応するパートナーの組み合わせに応じて適宜選択される。例えば、酵素と基質との反応および反応生成物の量の測定は、酵素を基質と混合して酵素を基質に作用させ、反応生成物(基質の分解物)の量を測定することによって行うことができる。また、抗体と抗原との反応および反応生成物の量の測定は、抗体または抗原を、それに対する抗体または抗原の結合した固相担体および

50

標識体と混合して反応生成物（免疫複合体）を形成させ、洗浄によって免疫複合体から未反応の抗体または抗原および標識体を除去し（B/F分離）、免疫複合体の形成により固相に結合した標識体の量を測定することによって行うことができる。このように本発明において、「反応生成物の量を測定する」とは、反応生成物自体の量を直接測定するだけでなく、反応生成物の量に定量的に関連した物質の量又は信号を測定することも包含する。このようにして測定された反応生成物の量から検体中の標的物質の量を算出することができる。

【0044】

なお、複合体とは一般的に標的物質と特異的に反応するパートナーの結合による生成物を意味する。

10

【0045】

また、本発明においては、標的物質と特異的に反応するパートナーとの反応が、免疫学的反応であることが好ましい。すなわち、標的物質と特異的に反応するパートナーが抗体又は抗原であることが好ましい。免疫学的反応は、好ましくは、検体中の標的物質と免疫学的に特異的に反応する第一のパートナーとを反応させて第一の免疫複合体を形成させ、第一の免疫複合体をこれと免疫学的に特異的に反応する標識化した第二のパートナーとを反応させて第二の免疫複合体を形成させる反応である。更に好ましくは、標的物質が抗原、特異的に反応するパートナーが抗体であると良い。

【0046】

すなわち、本発明の標的物質に特異的に反応するパートナー（好ましくは、第一パートナー及び第二パートナーとの組合せ）とは、上記の標的物質の量として測定されるシグナルを発生する複合体を構成する物質を意味する。

20

【0047】

本発明における本反応とは、標的物質と、該標的物質に特異的に反応するパートナーが反応し、複合体を形成する反応を意味する。すなわち、標的物質と、標的物質の量として測定されるシグナルを発生する複合体を構成する物質との反応を意味する。

【0048】

また、実質的に本反応時に反応を開始するとは、測定結果に負の影響が無い程度に、本反応前に、該本反応に関わる物質が測定系に存在しており、本反応開始時に該本反応に関わる物質が会うことによって、本反応が開始されることを意味する。

30

【0049】

本発明の反応液とは、標的物質との反応を行う溶液であり、反応液には、本反応に必要な物質を含むことができる。本発明の反応液は少なくとも2つ以上使用する。

【0050】

本発明の標的物質に特異的に反応するパートナーは、第一の反応液と第二の反応液の少なくとも一方に含まれていれば良い。特に、1種類のパートナーを使用する際には好ましい。例えば、1種類の抗体を使用するラテックス凝集法の場合などが挙げられる。

【0051】

また、標的物質に特異的に反応する第一のパートナーが、第一の反応液及び第二の反応液に含まれていても良い。特に、2種類以上のパートナー、すなわち、第一パートナーと第二パートナーとの組合せを使用する際には好ましい。更に、第一の反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第一のパートナーと第二の反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第二のパートナーが、標的物質の異なる領域に反応する物質であると良い。例えば、2種類以上の抗体を使用するサンドイッチELISA法の場合などが挙げられる。

40

【0052】

また、標的物質に特異的に反応するパートナーが、標識体で標識されたパートナー又は固相担体に固定されたパートナーであっても良い。例えば、1種類の抗体をラテックスに固定して使用するラテックス凝集法の場合などが挙げられる。

【0053】

また、第一の反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第一のパートナーが標識体

50

で標識されたパートナーであり、第二の反応液に含まれる標的物質に特異的に反応する第二のパートナーが固相担体に固定されたパートナーであっても良い。例えば、片方の抗体を磁性粒子に固定し、もう一方の抗体を標識体で標識するサンドイッチELISA法の場合などが挙げられる。

【0054】

本発明の標的物質に特異的に反応する第三のパートナーとは、上記の標的物質の量として測定されるシグナルを発生する複合体の形成を抑制する物質を意味する。該複合体の形成を抑制し、該複合体を構成するもので無ければ、どのような物質でも良い。例えば、標的物質が抗原で、第一及び/又は第二のパートナーが抗体の場合、該抗原と該抗体の結合を競合的に阻害するものが挙げられる。該抗原と該抗体の結合を競合的に阻害する物質としては、該抗体と実質的に同じエピトープを有する抗体が挙げられる。

10

【0055】

具体的には、ある抗原に対して同一のエピトープを有する抗体を、一方は磁性粒子に固定し(標的物質に特異的に反応する第一のパートナー)、他方は遊離の抗体(標的物質に特異的に反応する第三のパートナー)として用意し、更に検出用に標識された上記のエピトープと異なる抗体(標的物質に特異的に反応する第二のパートナー)を用意し、それらのある抗原と共に本反応に供した場合、固定された抗体と遊離抗体は競合反応が起こり、測定に最適な条件で固定された抗体は該抗原と結合し、更に標識抗体が結合して、好適に標的物質の量を反映する該固定された抗体と該抗原と該標識抗体の免疫複合体が形成される。

20

【0056】

このような複合体の形成を抑制する第三のパートナーを使用する測定法の場合、本反応時に標的物質に特異的に反応する第一及び/又は第二のパートナー及び標的物質に特異的に反応する第三のパートナーが同時に標的物質と反応開始できることで、標的物質の測定の精度が高くなるため特に好ましい。

【0057】

具体的には、第一の反応液又は第二の反応液の少なくとも一方に、本反応で形成される標的物質との複合体の形成を抑制する、標的物質に特異的に反応する第三のパートナーを含むことができる。また、第一の反応液及び第二の反応液に、本反応で形成される標的物質との複合体の形成を抑制する、標的物質に特異的に反応する第三のパートナーを含むこともできる。

30

【0058】

シールされたカートリッジなどを使用する場合、装置の動きやチップがシールを破壊する衝撃などで、内容物の飛び散りや吸引不良が起こり、正確に反応液を吸引できないことがある。そのため、第一の反応液及び第二の反応液の両方に、本反応で形成される標的物質との複合体の形成を抑制する、標的物質に特異的に反応する第三のパートナーを含んでいた方が、本反応時の大きな組成の変更が生じることないので好ましい。

【0059】

3. 本発明のキット

本発明のキットは、本発明の測定方法に使用することができる。具体的には、標的物質を含む検体溶液と比重の異なる第一の反応液と、第二の反応液を含み、第一反応液と第二反応液の少なくとも一方に、標的物質に特異的に反応する第一のパートナーを含む。前記第一の反応液が前記検体溶液よりも比重が重い方が好ましい。

40

【0060】

4. 本発明の態様例

本発明の第一の態様としては、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質(抗原)を含む全血検体溶液と、第一の反応液と、ラテックスに固定された、抗原に特異的に反応する抗体を含む第二の反応液とを使用する、抗原の免疫学的比濁測定方法が挙げられる。具体的には、該検体溶液を分注手段で吸引する第一の工程、続いて該第一の反応液を該分注手段で吸引する第二の工程を行って該検体溶液の下層に該第一の反応液を重層させ、

50

その後、該分注手段で吸引した該検体溶液と該第一の反応液を、該第二の反応液に吐出して本反応を行った後、ラテックスの凝集を光学的に測定して抗原の量を測定することができる。

【0061】

本発明の第二の態様としては、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質（抗原）を含む全血検体溶液と、本反応の免疫複合体の生成を抑制する、抗原に特異的に反応する遊離の抗体を含む第一の反応液と、ラテックスに固定された、抗原に特異的に反応する抗体を含む第二の反応液とを使用する、抗原の免疫学的比濁測定方法が挙げられる。具体的には、該検体溶液を分注手段で吸引する第一の工程、続いて該第一の反応液を該分注手段で吸引する第二の工程を行って該検体溶液の下層に該第一の反応液を重層させ、その後、該分注手段で吸引した該検体溶液と該第一の反応液を、該第二の反応液に吐出して本反応を行った後、ラテックスの凝集を光学的に測定して抗原の量を測定することができる。本反応では、抗原に対し、固定抗体と遊離抗体が競合反応を起こしている。

10

【0062】

本発明の第三の態様としては、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質（抗原）を含む全血検体溶液と、アルカリホスファターゼで標識された抗体を含む第一の反応液と、磁性粒子に固定された、抗原に特異的に反応する抗体を含む第二の反応液とを使用する、抗原のサンドイッチELISA法が挙げられる。具体的には、該検体溶液を分注手段で吸引する第一の工程、続いて該第一の反応液を該分注手段で吸引する第二の工程を行って該検体溶液の下層に該第一の反応液を重層させ、その後、該分注手段で吸引した該検体溶液と該第一の反応液を、該第二の反応液に吐出して本反応を行った後、基質溶液を含む第三の反応液を添加し発光量を測定して抗原の量を測定することができる。

20

【0063】

本発明の第四の態様としては、分注手段を有する測定装置を使用して、標的物質（抗原）を含む全血検体溶液と；アルカリホスファターゼで標識された抗体と、本反応の免疫複合体の生成を抑制する抗原に特異的に反応する遊離の抗体とを含む第一の反応液と；磁性粒子に固定された抗原に特異的に反応する抗体を含む第二の反応液とを使用する、抗原のサンドイッチELISAが挙げられる。具体的には、該検体溶液を分注手段で吸引する第一の工程、続いて該第一の反応液を該分注手段で吸引する第二の工程を行って該検体溶液の下層に該第一の反応液を重層させ、その後、該分注手段で吸引した該検体溶液と該第一の反応液を、該第二の反応液に吐出して本反応を行った後、基質溶液を含む第三の反応液を添加し発光量を測定して抗原の量を測定することができる。本反応では、抗原に対し、固定抗体又は標識抗体と遊離抗体が競合反応を起こしている。

30

【実施例】

【0064】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明を単に例示するものに過ぎず、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。本発明の精神から離れることなく、いかなる変更、改良または改変を加えることができることは当業者には自明である。

【0065】

40

《実施例1》

《C反応性タンパク質（CRP）測定試薬の調製》

（1）検体の調製

検体として、全血検体と血漿検体を用意した。血漿検体は、全血検体を3000rpm、8、15分間遠心分離して得た同一検体から作製した。

【0066】

（2）磁性粒子溶液の調製

抗CRPモノクローナル抗体：CRP-1（イムノプロープ社製）を磁性粒子（2.4μm）に50mmol/LMES緩衝液（pH6.0）中で感作させた後、0.02%界面活性剤を含むトリス緩衝液（0.01mol/LpH8.0）で安定化させ、抗C

50

R P抗体結合磁性粒子を作製した。作製した磁性粒子は、抗C R Pモノクローナル抗体 (C R P - 1) 0 . 3 m g / m L を含むように 5 0 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 6 . 5) に懸濁して用いた。

【 0 0 6 7 】

(3) 標識抗体溶液の調製

抗C R Pモノクローナル抗体 : C R P - 4 (イムノプロープ社製) をマレイミド法でウシアルカリホスファターゼ (A L P) と結合させ、A L P 標識抗C R P抗体を作製した。作製した標識抗体は、1 5 % シュクロース及び抗C R Pモノクローナル抗体 (C R P - 1) 0 . 3 m g / m L を含む 2 0 m m o l / L M E S 緩衝液 (p H 6 . 0) に溶解して用いた。比較用の標識抗体溶液として、シュクロースを含まないものを同様に調製した。

10

【 0 0 6 8 】

(4) 洗浄液の調製

0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0 および 0 . 9 % N a C l を含む 1 0 m m o l / L M E S 緩衝液 (p H 6 . 5) を調製した。

【 0 0 6 9 】

(5) 希釈液の調製

1 % ウシ血清アルブミン (B S A) および 0 . 3 m o l / L N a C l を含む 0 . 1 m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 5) を調製した。

【 0 0 7 0 】

(6) 発光基質

発光基質は 0 . 4 m m o l / L C D P - S t a r 溶液 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社) を用いた。

20

【 0 0 7 1 】

上記で調製した試薬類は、図 2 に示したポリプロピレン (P P) で作製されたカートリッジに封入し、自動化学発光酵素免疫測定装置である P A T H F A S T (三菱化学メディアエンス社製) を用いて測定を行った。該カートリッジのサンプルウェル (1) 、標識抗体収納ウェル (2) 、洗浄ウェル 1 (3) 、洗浄ウェル 2 (4) 、洗浄ウェル 3 (5) 、磁性粒子収納ウェル (7) 、希釈液ウェル (1 1) 、基質ウェル (1 3) に上記調製例の (1) ~ (6) で調製した各試薬および溶液を充填後、各試薬収納ウェル上部をアルミニウム箔でシールした。充填位置および充填分量は次の通りであった。特に記載の無いウェルは空のウェルである。

30

【 0 0 7 2 】

サンプルウェル (1)	1 0 0 μ L
標識抗体収納ウェル (2)	8 5 μ L
洗浄ウェル 1 (3)	4 0 0 μ L
洗浄ウェル 2 (4)	4 0 0 μ L
洗浄ウェル 3 (5)	4 0 0 μ L
磁性粒子収納ウェル (7)	5 0 μ L
希釈液ウェル (1 1)	1 0 0 μ L
基質ウェル (1 3)	1 4 0 μ L

40

【 0 0 7 3 】

《 実施例 2 》

《 自動測定装置による測定手順 》

後述の比較例 1 及び実施例 3 では、6 連の吸引・吐出機構と 6 連の磁性粒子分離機構を備えた自動測定装置 (P A T H F A S T) を用いる、本実施例に記載の以下の工程に従い、実施例 1 で作製した試薬カートリッジを使用して検体中の C R P を測定した。

(1) 検体を実施例 1 で作製したカートリッジのサンプルウェル (1) に 1 0 0 μ L 分注する。

(2) 検体を分注した試薬カートリッジを自動測定装置にセットする。

(3) 自動測定装置をスタートさせる。

50

(4) 自動測定装置は試薬カートリッジに添付されたバーコードを読んで、CRPが測定対象であることを認識する。

(5) 試薬カートリッジ上部のアルミニウムシールを突起物で穿孔する。

(6) サンプルウェル(1)からサンプル50 μ Lを吸引し、次いで、希釈ウェル(11)から希釈液を50 μ L吸引し、空のウェル(14)に全量吐出する。さらに空のウェル(14)で吸引・吐出操作を繰り返すことによって第一段目希釈工程が行われる。

(7) 次いで、ウェル(14)からサンプルと希釈液の混合溶液50 μ Lを吸引し、標識抗体収納ウェル(2)から標識体50 μ Lを吸引した後、磁性粒子収納ウェル(7)で吐出し磁性粒子と混合し、37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させる。

(8) 磁性粒子収納ウェル(7)で磁石によって磁性粒子を分離する。

(9) 磁性粒子を洗浄ウェル(3)で洗浄後、永久磁石で磁性粒子を分離する。

(10) 上記(9)の操作を洗浄ウェル(4)、(5)についても行う。

(11) 次いで、基質ウェル(13)で吐出しCDP-Star溶液と混合し、37 $^{\circ}$ Cで1分間酵素反応後、測光ウェル上部から先電子増倍管(PMT)で発光量を測定する。

【0074】

《比較例1》

《同一検体からなる全血検体と血漿検体の測定 - 1》

実施例1で調製したシュクロースを含有しない試薬を用いて、全血検体と血漿検体を実施例2の方法に従い測定した。血漿検体は、全血検体を3000rpm、8、15分間遠心分離して得た同一検体から作製した。

【0075】

その結果を図3及び図4に示す。図3から明らかなように、測定系にシュクロースを添加しなかった場合、血漿検体測定値と全血検体測定値との相関性は、その傾きが0.8117となり、約20%の乖離が認められた。また、図4に血漿検体測定値と全血検体測定値の比(血漿検体測定値 \div 全血検体測定値)の結果を示す。図4からも明らかなように、本来なら求めた比が100%付近にあるべきものが、高濃度になるにつれ、その比が大きく広がっていることが確認された。

【0076】

そこで、その原因を検討したところ、全血検体の場合には、図1の(a)で示したように、標識抗体溶液が全血検体の間を上昇してしまい、反応が開始されてしまったことがわかった。更に、比重を確認したところ、血漿検体と標識抗体溶液の比重は殆ど変わらなかったが、全血検体の比重は1.053g/cm³、標識抗体溶液の比重は1.014g/cm³であった。全血検体に対する標識抗体溶液の比重は、約3.7%低いものであったが、反応に大きな影響を与える違いが生じていることがわかった。

【0077】

《実施例3》

《同一検体からなる全血検体と血漿検体の測定 - 2》

比較例1の結果から、比重が異なることが原因であることがわかったため、シュクロースを用いて標識抗体溶液の比重を重くし、全血検体と混じらない条件で改善できるか検討した。実施例1で調製したシュクロース含有試薬を用いること以外は、比較例1と同様の測定を行った。

【0078】

その結果を図5及び図6に示す。図5から明らかなように、測定系にシュクロースを添加した場合、血漿検体測定値と全血検体測定値との相関性は、その傾きが0.9528となりシュクロースを添加しない場合と比較して大幅に改善された。また、図6に血漿検体測定値と全血検体測定値の比(血漿検体測定値 \div 全血検体測定値)の結果を示す。図6からも明らかなように、求めた比が100%付近で推移していることが確認された。

【0079】

以上より、測定系にシュクロースを添加して比重を調節することによって、全血検体と血漿検体の測定値の乖離が無くなり、正確、且つ精度良く測定できることがわかった。

10

20

30

40

50

そこで、標識抗体溶液にシクロロースを添加して比重を調節した場合に、全血検体溶液との比重の差がどの程度あればよいかを検討した。

その結果、全血検体溶液の比重が約 1.053 g/cm^3 であった場合、検体溶液に最終濃度 5% シクロロースを添加すると、全血検体溶液に対する添加後の検体溶液の比重の変化は、約 2.18% 低く、最終濃度 10% シクロロースを添加すると約 0.96% 高く、最終濃度 15% シクロロースを添加すると約 1.5 ~ 2.56% 高く、最終濃度 20% シクロロースを添加すると約 7.5% 高かった。そこで、更に検討したところ、シクロロースを最終濃度 10% 以上添加すれば、上記と同様に全血検体と混じらずに、血漿検体測定値と全血検体測定値との相関性が得られることがわかった。

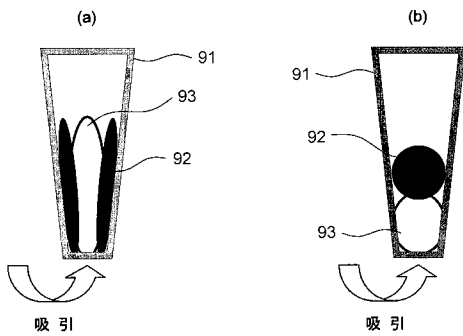
【産業上の利用可能性】

【0080】

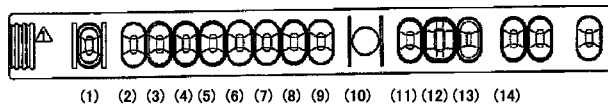
本発明によれば、本反応における反応を同時に開始することが可能となるため、検体中の標的物質を正確、且つ高精度に測定することが可能となる。更に、検体の種類に関わらず精度の高い測定が行えるため、簡便で誤使用の無い測定が可能となり、利用性の高い測定法と言える。

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

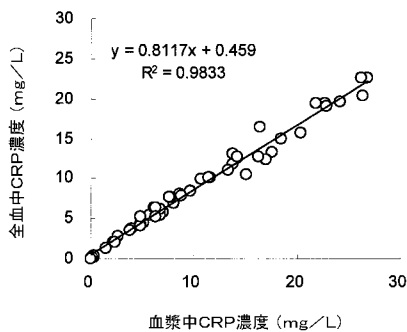
【図1】



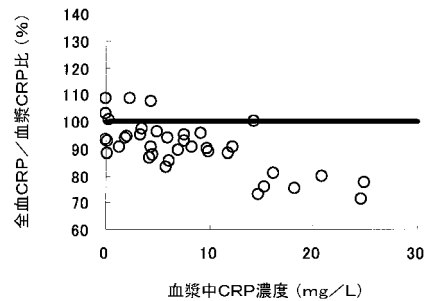
【図2】



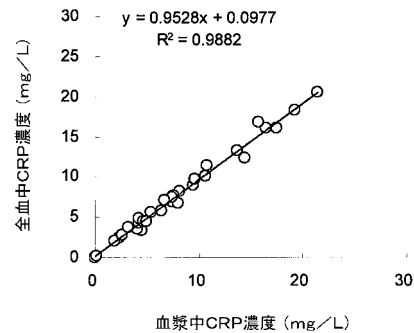
【図3】



【図4】



【図5】



- (2) 検体を分注した試薬カートリッジを自動測定装置にセットする。
- (3) 自動測定装置をスタートさせる。
- (4) 自動測定装置は試薬カートリッジに添付されたバーコードを読んで、CRPが測定対象であることを認識する。
- (5) 試薬カートリッジ上部のアルミニウムシールを突起物で穿孔する。
- (6) サンプルウェル(1)からサンプル50 μ Lを吸引し、次いで、希釈ウェル(11)から希釈液を50 μ L吸引し、空のウェル(14)に全量吐出する。さらに空のウェル(14)で吸引・吐出操作を繰り返すことによって第一段目希釈工程が行われる。
- (7) 次いで、ウェル(14)からサンプルと希釈液の混合溶液50 μ Lを吸引し、標識抗体収納ウェル(2)から標識体50 μ Lを吸引した後、磁性粒子収納ウェル(7)で吐出し磁性粒子と混合し、37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させる。
- (8) 磁性粒子収納ウェル(7)で磁石によって磁性粒子を分離する。
- (9) 磁性粒子を洗浄ウェル(3)で洗浄後、永久磁石で磁性粒子を分離する。
- (10) 上記(9)の操作を洗浄ウェル(4)、(5)についても行う。
- (11) 次いで、基質ウェル(13)で吐出しCDP-Star溶液と混合し、37 $^{\circ}$ Cで1分間酵素反応後、測光ウェル上部から光電子増倍管(PMT)で発光量を測定する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/058001
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/531(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/531, G01N33/543		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-146970 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 26 May 2000 (26.05.2000), claim 1; paragraph [0069]; fig. 1, 5 (Family: none)	1-16
A	JP 2004-191332 A (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.), 08 July 2004 (08.07.2004), claim 1 (Family: none)	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 April, 2012 (19.04.12)		Date of mailing of the international search report 01 May, 2012 (01.05.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/84152 A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 08 November 2001 (08.11.2001), examples & US 2003/0113235 A1 & EP 1291654 A1 & DE 60124705 D & AU 5265301 A & CN 1437707 A & ES 2275674 T	1-16
A	WO 02/073203 A1 (Mitsubishi Kagaku Medical, Inc.), 19 September 2002 (19.09.2002), examples & US 2004/0048397 A1 & EP 1376127 A1 & DE 60234821 D & HK 1066861 A & CN 1507566 A & ES 2340144 T	1-16
A	JP 2006-162466 A (Kyowa Medex Co., Ltd.), 22 June 2006 (22.06.2006), claim 1 (Family: none)	1-16
A	JP 08-201391 A (Olympus Corp.), 09 August 1996 (09.08.1996), paragraph [0028] (Family: none)	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/058001									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531, G01N33/543											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	JP 2000-146970 A (松下電器産業株式会社) 2000.05.26, 請求項1、【0069】、図1、図5 (ファミリーなし)	1-16									
A	JP 2004-191332 A (株式会社三菱化学ヤトロン) 2004.07.08, 請求項1 (ファミリーなし)	1-16									
A	WO 01/84152 A1 (三菱化学株式会社) 2001.11.08, 実施例 & US 2003/0113235 A1 & EP 1291654 A1 & DE 60124705 D & AU 5265301 A & CN 1437707 A & ES 2275674 T	1-16									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 19.04.2012		国際調査報告の発送日 01.05.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子	2J 3906								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/058001

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 02/073203 A1 (三菱化学メディカル株式会社) 2002.09.19, 実施例 & US 2004/0048397 A1 & EP 1376127 A1 & DE 60234821 D & HK 1066861 A & CN 1507566 A & ES 2340144 T	1-16
A	JP 2006-162466 A (協和メデックス株式会社) 2006.06.22, 請求項1 (ファミリーなし)	1-16
A	JP 08-201391 A (オリンパス株式会社) 1996.08.09, 【0028】 (ファミリーなし)	1-16

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于全血样品的免疫测定方法和测定试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2012133452A1	公开(公告)日	2014-07-28
申请号	JP2013507636	申请日	2012-03-27
[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		
[标]发明人	庄司慶一 横井宏行		
发明人	庄司 慶一 横井 宏行		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N35/10		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54333 G01N33/54393 G01N2333/4737		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.501.M G01N33/543.511.D G01N35/06.E		
F-TERM分类号	2G058/BA02 2G058/CC01 2G058/CC08 2G058/EA02 2G058/EA04 2G058/EA16 2G058/ED31 2G058/GA02		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	2011070872 2011-03-28 JP		
其他公开文献	JP5684899B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

制备包含目标物质的样品溶液，第一反应溶液和第二反应溶液；使用具有分配装置的测量装置分配样品溶液和第一反应溶液。在被依次吸入之后；通过从分配装置立即排出而与第二反应溶液接触，并且具体地与第一反应溶液和第二反应溶液中的至少一个中包含的目标物质反应。在第一配偶与目标物质之间形成络合物；分析形成的络合物；在已知的目标物质测定方法中，能够抑制对测定结果产生负面影响的反应的改善方法提供法律。在改进的方法中，样品溶液的比重和第一反应溶液的比重不同，并且样品溶液和第一反应溶液以分层的状态被吸入分配装置中。

【 図 5 】

