

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6931673号
(P6931673)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(51) Int. Cl. F I
 G O 1 N 33/531 (2006.01) G O 1 N 33/531 B
 G O 1 N 33/543 (2006.01) G O 1 N 33/543 5 8 1 D

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2019-97577 (P2019-97577)	(73) 特許権者	000003296 デンカ株式会社 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
(22) 出願日	令和1年5月24日(2019.5.24)	(74) 代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(62) 分割の表示	特願2014-207750 (P2014-207750) の分割	(72) 発明者	加納 まゆみ 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デ ンカ生研株式会社鏡田工場内
原出願日	平成26年10月9日(2014.10.9)	(72) 発明者	橋 律子 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デ ンカ生研株式会社鏡田工場内
(65) 公開番号	特開2019-138919 (P2019-138919A)	審査官	北条 弥作子
(43) 公開日	令和1年8月22日(2019.8.22)		
審査請求日	令和1年6月20日(2019.6.20)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫分析方法及び試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤（ポリオキシエチレンラウリルエーテルを除く）の存在下で抗原抗体反応及び/又は測定を行う、特異性が向上するラテックス凝集免疫分析方法。

【請求項2】

前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤のHLBが15～19の非イオン性界面活性剤である請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤が存在する反応系及び/又は測定系における該ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤の濃度が0.0001～1%である請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

抗原抗体反応の開始から測定完了までを前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤の存在下で行う請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

請求項1記載の方法に使用される特異性が向上するラテックス凝集免疫分析試薬であって、アルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤（ポリオキシエチレンラウリルエーテルを除く）を含むことを特徴とする免疫分析試薬。

【請求項 6】

前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤のHLBが15～19である請求項5記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫分析方法及びそのための試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫分析方法は、血清、血漿、尿、便、髄液等の臨床検査で広く用いられ、近年、簡便・迅速に測定を行うことができることから、反応から測定までを一括して自動で行う自動分析装置が汎用されている。

10

【0003】

免疫分析方法は抗原抗体反応を利用した測定法で特異性が高い測定法であることが知られている。しかし試料によっては擬陽性または擬陰性などの非特異反応が起こる問題があった。例えば、抗体を認識して反応する因子が試料中に存在する場合があります、このような場合には試料中に測定しようとする抗原が存在しなくても陽性の測定値になる、また一方で試料中の抗原抗体反応を妨害する因子が存在する場合があります、このような場合は試料中に測定しようとする抗原が存在しても陰性の測定値になるなど、真値とは異なった測定値を示すという問題があった。

20

【0004】

非特異反応を抑制する手法としてヒトIgM自然抗体や、スルホン基又はその塩を有する芳香族モノマーが重合されたポリマーを添加することが知られていた（特許文献1、2参照）。しかし、これらの添加剤では不十分なことがあり、特に低濃度域での非特異反応抑制は困難な状態だった。更に高感度にした試薬においては、抗体の反応性を向上しているために非特異反応が起きやすい状況だった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許4065600号公報

30

【特許文献2】特許4580180号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、免疫分析において、抗原を高感度でかつ正確に測定することができる免疫分析方法及びそのための試薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本願発明者は、鋭意研究の結果、免疫分析においてアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を存在させることにより、高感度な測定であっても、容易に非特異反応を抑制できることを見出した。

40

【0008】

すなわち、本発明は、以下の1)～9)に係るものである。

1) アルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤（ポリオキシエチレンラウリルエーテルを除く）の存在下で抗原抗体反応及び/又は測定を行う、特異性が向上するラテックス凝集免疫分析方法。

2) 前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤のHLBが15～19の非イオン性界面活性剤である1)の方法。

3) 前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤が存在する反応系及び/又は測定系における該ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤の濃度が0.0001～

50

1%である1)又は2)の方法。

4) 抗原抗体反応の開始から測定完了までを前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤の存在下で行う1)~3)のいずれかに記載の方法。

5) 1)の方法に使用される、特異性が向上するラテックス凝集免疫分析試薬であって、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤(ポリオキシエチレンラウリルエーテルを除く)を含むことを特徴とする免疫分析試薬。

6) 前記ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤のHLBが15~19である5)の試薬。

【発明の効果】

10

【0009】

本発明の方法によれば、反応及び/又は測定系にアルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を存在させるという簡易な手段により、高感度な免疫分析においても非特異反応を効果的に抑制することができ、免疫分析において、抗原を正確に測定でき特異性が向上する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】下記実施例及び比較例において作成した検量線(キャリブレーションカーブ)を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0011】

以下、本発明の方法について説明する。なお、本明細書中の「%」は特に断りがない限り質量基準(w/v%)を意味する。

【0012】

本発明の免疫分析方法は、検体中の被測定物質に対し免疫的に反応する免疫分析試薬を用いて、抗原抗体反応を行い、得られた反応物を測定する免疫分析方法において、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤の存在下で反応及び/又は測定を行うことを特徴とするものである。

【0013】

免疫分析の手法自体は周知である。本発明の方法が適用される免疫分析方法とは、公知のいかなる免疫分析方法であってもよいが、中でも免疫凝集法が好ましく、特に不溶性担体粒子としてラテックス粒子を用いるラテックス凝集法が好ましい。免疫凝集法において感作粒子の凝集を検出する方法は周知であり、本発明においても、感作粒子の凝集による吸光度又は光散乱等を検出する方法等の周知の方法が使用可能である。例えば、免疫比濁法(TIA法、ラテックス凝集法)、比色法、RPLA法、CL法及びイムノクロマト法等が挙げられ、感度が高く定量精度が良い比濁法及び比色法が好適に用いられる。

30

【0014】

当該免疫分析方法の態様としては、用いる不溶性担体粒子は特に限定されず、免疫分析試薬に従来用いられている周知のものであってよい。例えば、ポリエチレンやポリスチレン等のラテックス粒子、アルミナ粒子、シリカ粒子、金コロイド、磁性粒子等の粒子が挙げられる。これらの不溶性担体の中ではラテックス粒子、特にポリスチレンラテックス粒子が好適に用いられる。免疫凝集法は、抗原或いは抗体を感作した感作粒子の凝集を光学的に検出する方法として周知であり、検出には比濁法又は比色法が好適に用いられる。例えば、セル外部より可視光から近赤外域の光、例えば通常300~1000nm、好ましくは500~900nmの光を照射し、吸光度変化又は散乱光の強度変化を検出することにより、当該感作粒子の凝集の程度が測定される。ラテックス粒子として特にポリスチレンラテックス粒子が好適に用いられる。ラテックス粒子のサイズは特に限定されないが、粒径は30~600nmであることが好ましい。

40

【0015】

上記したラテックス粒子に、測定すべき抗原と免疫的に反応する抗体若しくはその抗原

50

結合性断片を固定化する。固定化の方法も周知であり、物理吸着又は共有結合等の周知の方法により行われる。得られた感作粒子の懸濁液と被検試料とを混合すると、被検試料中に含まれる被測定物質（抗原）によって感作粒子が凝集され、感作粒子懸濁液の吸光度が変化する。この吸光度の変化量（エンドポイント法）又は変化率（レート法）を測定する。測定すべき抗原を種々の既知濃度で含む複数の標準試料を準備し、それらについて上記方法により吸光度の変化量又は変化率を測定する。標準試料中の測定すべき抗原の濃度を横軸、測定された吸光度の変化量又は変化率を縦軸にプロットして検量線を描く。未知の被検試料についても同じ方法により吸光度の変化量又は変化率を測定し、測定結果を上記検量線に当てはめることにより、被検試料中の抗原を定量することができる。

【 0 0 1 6 】

なお、このような免疫凝集法を行う自動装置が種々市販されており、市販の免疫凝集法用自動装置を用いて、容易、簡便に行うことができる。

【 0 0 1 7 】

本発明における免疫分析による被測定物質としては、免疫分析により測定可能な物質であれば何ら限定されないが、被測定物質が抗原の場合、例えばCRP（C-反応性蛋白質）、前立腺特異抗原、フェリチン、 α -2マイクログロブリン、ミオグロビン、ヘモグロビン、アルブミン、クレアチニン等のタンパク質マーカー、IgG、IgA、IgM等の免疫グロブリン、各種腫瘍マーカー、LDL、HDL、TG等のリポ蛋白、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、RSウイルス（RSV）、ライノウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、HAV、HBs、HCV、HIV、EBV等のウイルス抗原、クラミジア・トラコマティス、溶連菌、百日咳菌、ヘリコバクター・ピロリ、レプトスピラ、トレポネーマ・パリダム、トキソプラズマ・ゴンディ、ボレリア、レジオネラ属菌、炭疽菌、MRSA等の細菌抗原、細菌等が産生する毒素、マイコプラズマ脂質抗原、ヒト絨毛製ゴナドトロピン等のペプチドホルモン、ステロイドホルモン等のステロイド、エピネフリンやモルヒネ等の生理活性アミン類、ビタミンB類等のビタミン類、プロスタグランジン類、テトラサイクリン等の抗生物質、農薬、環境ホルモン等が挙げられるがこれらに限定されるものではない。好ましい例として、CRP、前立腺特異抗原、フェリチン、 α -2マイクログロブリン及びヘモグロビン等の抗原が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

被測定物質が抗体の場合、上記のタンパク質マーカー、各種腫瘍マーカー、リポ蛋白、ウイルス抗原、細菌抗原、細菌等が産生する毒素、ペプチドホルモン、ステロイド、生理活性アミン類、ビタミン類、抗生物質、農薬、環境ホルモン等の抗原と特異的に反応する抗体等が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

免疫分析に用いられる検体は、被測定物質を含むものであれば特に限定されないが、血液、血清、血漿、尿、便、唾液、組織液、髄液、ぬぐい液等の体液等又はその希釈物が挙げられ、血液、血清、血漿、尿、便、髄液又はこれらの希釈物が好ましい。

【 0 0 2 0 】

上記の通り、本発明の方法では、反応系及び/又は測定系において、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤が存在する状態下で抗原抗体反応及び/又は測定を行うことを特徴としている。ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤のHLBは特に限定されないが、15~19が好ましい。

【 0 0 2 1 】

本発明の方法において、当該アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤は、抗原抗体反応の開始から抗原抗体反応量の検出・定量が終了するまでのいずれかの段階でアルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤が反応及び/又は測定系（「反応・測定系」とも称する）内に含まれていればよいが、抗原抗体反応の開始から検出・定量までの間に亘って含まれていることが好ましい。従って、アルキル基の炭素原子数が8~14個であ

10

20

30

40

50

るポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤は、抗原抗体反応の開始前又は開始と同時に反応系内に添加するのが好ましい。具体的には、検体を希釈する際に添加してもよいし、抗体又は抗原と検体とを混合する際に添加してもよい。

【0022】

また、免疫分析に用いる各種試薬に予めアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を含有させることでもよく、本発明は斯かるアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を含有した免疫分析試薬を提供するものでもある。ここで、免疫分析に用いる各種試薬としては、例えば、検体希釈液、抗体/抗原希釈液、固相化抗体/抗原、感作粒子懸濁液、洗浄液、酵素液、基質液、検量線作成用の被検物質標準液等が挙げられ、アルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を含有した免疫分析試薬としては、これらの試薬にアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を添加したもの、例えば、検体を希釈する緩衝液や、抗体又は抗原を含む試薬等にアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を含有させたものが挙げられる。

10

【0023】

また、例えば、抗体又は抗原を固定化(感作)したラテックス粒子(感作粒子)を含む免疫凝集試薬にアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を含有させておくことができる。この場合、免疫分析試薬中の感作粒子の濃度は、特に限定されないが、0.01～0.5%であることが好ましい。感作粒子浮遊液中の抗体量及び抗原量は常法どおりであってよく、特に限定されないが、例えば抗体感作ラテックスの場合、抗体量はラテックス浮遊液中に0.01～2.0mg/mLとするのが好ましい。

20

【0024】

ポリカルボン酸型界面活性剤の反応・測定系内における濃度は、非特異反応抑制の点から、好ましくは0.0001～1%であり、さらに好ましくは0.001～0.5%である。したがって、免疫分析試薬に予めアルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を含有させる場合には、反応及び/又は測定系内での濃度が上記の濃度になるように免疫分析試薬に含有させればよい。

【0025】

免疫分析に用いられるブランク試料は、被測定物質を含み得ないものであれば特に限定されないが、精製水、生理食塩液、緩衝液、陰性検体又はその希釈物が好ましい。

30

【0026】

後記実施例に記載されるように、アルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を反応及び/又は測定系内に存在させた場合、非特異反応が抑制される。そして、特異性は、アルキル基の炭素原子数が8～14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を存在させない場合に比べて、優位に向上する。したがって、本発明の方法を用いることにより、特に非特異反応が起きやすい高感度化した試薬においては、従来よりも試薬性能を向上することが可能になる。

【実施例】

40

【0027】

以下、本発明を実施例及び比較例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0028】

実施例1～6、比較例1

(1) 試薬の調製

フェリチンに対する抗体を用いて、以下の通りに免疫凝集法による測定試薬を調製した。

i) 抗フェリチン抗体を平均粒径300nmのポリスチレンラテックス浮遊液1mLに対し0.03mg担持させてなる感作粒子を、緩衝液(トリス、pH8.0)に0.04

50

%となるように懸濁し、ラテックス浮遊液を調製した。

ii) 緩衝液(トリス、pH 8.5)に、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤(「エマルゲン1118S-70」(商品名、花王株式会社から市販)、HLB16.4)を添加し、下記の試薬A~Fを調製した(実施例1~6)。比較例1として、何も添加しない試薬Gを調製した。

【0029】

【表1】

例	試薬	添加剤(濃度)
実施例1	A	+ポリオキシエチレンアルキルエーテル0.005%
実施例2	B	+ポリオキシエチレンアルキルエーテル0.01%
実施例3	C	+ポリオキシエチレンアルキルエーテル0.05%
実施例4	D	+ポリオキシエチレンアルキルエーテル0.1%
実施例5	E	+ポリオキシエチレンアルキルエーテル0.5%
実施例6	F	+ポリオキシエチレンアルキルエーテル1%
比較例1	G	なし

10

【0030】

(2) 自動分析装置による測定

自動分析装置は日立社7180型自動分析装置によりエンドポイント法で自動測定を行った。

20

前述の試薬A~Gを用いて、非特異反応を起こすことで知られている偽陽性2検体及び正常1検体の測定を行った。検体溶液15.0μLに試薬A~Gの上記で調製した緩衝液100μLを添加し、この混合液を37で攪拌混合した。5分間放置後、ラテックス浮遊液100μLを添加し、更に37で攪拌混合した。約5分間の凝集反応を吸光度変化量として測定し、検量線より各検体のフェリチン濃度を算出した。

【0031】

(3) 既存試薬との感度比較

上記実施例1~6及び比較例1の測定感度と、非特異反応が抑制されていることがわかっている既存の市販ラテックス試薬であるFER-ラテックスX2「生研」CN(デンカ生研)(以下、「既存試薬」と)との感度の比較を行った。結果を図1示す。

30

【0032】

図1に示されるように、実施例1~6及び比較例1の方法では、既存試薬を用いた方法と比較して、同じフェリチン濃度であれば吸光度変化量が大きくなっており、実施例1~5及び比較例1の方法の方が測定感度が高いことがわかる。

【0033】

(4) 偽陽性検体の測定値皮革

上記実施例1~6と比較例1の測定結果を比較した。結果を表2に示す。

【0034】

【表2】

試薬	A	B	C	D	E	F	G
偽陽性検体1	43	38	34	28	27	26	48
偽陽性検体2	33	28	24	18	15	15	36
正常検体1	11	11	11	12	10	14	11

40

(単位: ng/mL)

【0035】

既実施例1~6の測定結果と、比較例1の測定結果を比べると、高感度化した免疫分析方法において、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキル

50

エーテル界面活性剤を添加することで、非特異反応が抑制され、正常検体の測定結果は変動せずに偽陽性検体の測定値が低下することが示された。

【0036】

実施例7、8、比較例2、3

(1) 試薬の調製

フェリチンに対する抗体を用いて、以下の通りに免疫凝集法による測定試薬を調製した。

i) 抗フェリチン抗体を平均粒径300nmのポリスチレンラテックス浮遊液1mLに対し0.03mg担持させてなる感作粒子を、緩衝液(トリス、pH8.0)に0.04%となるように懸濁し、ラテックス浮遊液を調製した。

ii) 緩衝液(トリス、pH8.5)に、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤(「エマルゲン1118S-70」(商品名、花王株式会社から市販)、HLB16.4)及びヒトIgM自然抗体を添加し、下記の試薬H(実施例7)、試薬I(実施例8)を調製した。比較例2として何も添加しない試薬J、ヒトIgM自然抗体のみを添加した試薬Kを調製した。

【0037】

【表3】

例	試薬	添加剤(濃度)	
		ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤	ヒトIgM自然抗体
実施例7	H	0.1%	0mg/mL
実施例8	I	0.1%	1mg/mL
比較例2	J	0%	0mg/mL
比較例3	K	0%	1mg/mL

【0038】

(2) 自動分析装置による測定

前述の試薬H~Kを用いて、非特異反応を起こすことで知られている偽陽性2検体の測定を行った。検体溶液15.0μLに試薬H~Kの上記で調製した緩衝液100μLを添加し、この混合液を37℃で攪拌混合した。5分間放置後、ラテックス浮遊液100μLを添加し、更に37℃で攪拌混合した。約5分間の凝集反応を吸光度変化量として測定し、検量線より各検体のフェリチン濃度を算出した。

【0039】

(4) 既存試薬との比較

上記実施例7、8と比較例2、3の測定結果を比較した。結果を表4に示す。

【0040】

【表4】

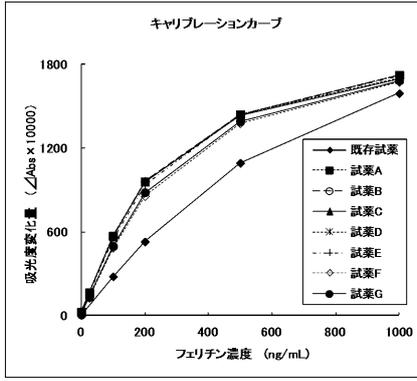
試薬	H	I	J	K
偽陽性検体1	29	32	42	51
偽陽性検体2	21	19	32	38

(単位: ng/mL)

【0041】

実施例7、8の測定結果と、比較例2、3の測定結果を比べると、高感度化した免疫分析方法において、非特異反応抑制することで知られているヒト自然IgM抗体では非特異反応が抑制できず、アルキル基の炭素原子数が8~14個であるポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤を添加することで、非特異反応が抑制され、偽陽性検体の測定結果が低下することが示された。

【 図 1 】



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2010/021399(WO, A1)

特開2006-071574(JP, A)

特開2014-167439(JP, A)

特開2013-140035(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/531