

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3851807号  
(P3851807)

(45) 発行日 平成18年11月29日(2006.11.29)

(24) 登録日 平成18年9月8日(2006.9.8)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 8 1 V  
**GO 1 N 33/531 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 8 3  
 GO 1 N 33/531 B

請求項の数 23 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2001-341838 (P2001-341838)	(73) 特許権者	000231394
(22) 出願日	平成13年11月7日(2001.11.7)		アルフレッサファーマ株式会社
(65) 公開番号	特開2003-149244 (P2003-149244A)		大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号
(43) 公開日	平成15年5月21日(2003.5.21)	(74) 代理人	100104639
審査請求日	平成16年10月26日(2004.10.26)		弁理士 早坂 巧
		(72) 発明者	田中 睦
			大阪府高槻市東五百住町1-15-1-305
		(72) 発明者	榎本 昌泰
			大阪府高槻市奈佐原1-1-408-204
		(72) 発明者	土居 洋介
			大阪府寝屋川市点野5丁目29-7 インセナルド野岸603

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応におけるプロゾーン現象抑制方法及び免疫反応測定用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系及びポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤よりなる群より選ばれる1種又は2種以上の化合物よりなる、免疫反応測定用プロゾーン現象抑制剤。

【請求項2】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルカンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系の陰イオン性界面活性剤が高級アルキルエーテル硫酸エステル塩、又は、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムである請求項1に記載の免疫反応測定用プロゾーン現象抑制剤。

【請求項3】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系、アルキルナフタレンスルホン

10

20

酸ナトリウム塩系、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系及びポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤よりなる群より選ばれる1種又は2種以上の化合物を免疫反応におけるプロゾーン現象抑制剤として含有することを特徴とする、免疫反応測定用試薬。

【請求項4】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系又はアルカンスルホン酸ナトリウム塩系の界面活性剤を濃度0.03～4%、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系又はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の界面活性剤を濃度0.1～4%、又は、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の界面活性剤を濃度0.02～4%になる量で含有することを特徴とする、請求項3に記載の免疫反応測定用試薬。

10

【請求項5】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルカンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系の陰イオン性界面活性剤が高級アルキルエーテル硫酸エステル塩、又は、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムである請求項3又は4に記載の免疫反応測定用試薬。

20

【請求項6】

該免疫反応が、免疫凝集反応である、請求項3ないし5の何れかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項7】

該免疫反応が、金コロイド凝集反応である、請求項3ないし6の何れかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項8】

反応促進剤を更に含有することを特徴とする、請求項3ないし7の何れかに記載の免疫反応測定用試薬。

30

【請求項9】

反応促進剤が、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、プルラン、ポリビニルアルコール及びポリビニルピリドンよりなる群より選ばれるものである、請求項8に記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項10】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系及びポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤よりなる群より選ばれる1種又は2種以上の化合物を免疫反応用プロゾーン現象抑制剤として免疫反応液中に含有させることにより、免疫反応におけるプロゾーン現象を抑制して免疫反応を行わせることを特徴とする、免疫反応測定方法。

40

【請求項11】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系又はアルカンスルホン酸ナトリウム塩系の界面活性剤を濃度0.03～4%、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系又はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の界面活性剤を濃度0.1～4%、又は、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の界面活性剤を濃度0.02～4%で含有させる

50

ものである、請求項 10 に記載の免疫反応測定方法。

【請求項 12】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、アルカン  
スルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルカンスルホン酸ナトリウム、ポ  
リオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオ  
キシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系  
の陰イオン性界面活性剤が高級アルキルエーテル硫酸エステル塩、又は、ポリオキシエチ  
レンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオキシ  
エチレンアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムである請求項 10 又は 11 に記載の免  
疫反応測定方法。

10

【請求項 13】

免疫凝集反応測定法によるものである、請求項 10 ないし 12 に記載の免疫反応測定方法。

【請求項 14】

金コロイド凝集反応測定法によるものである、請求項 10 ないし 13 の何れかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 15】

反応液中に反応促進剤を更に含有させることを特徴とする、請求項 10 ないし 14 の何れかに記載の免疫反応測定方法。

20

【請求項 16】

反応促進剤が、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸、コンドロイチン硫酸、カル  
ボキシメチルセルロース、デキストラン、プルラン、ポリビニルアルコール及びポリビニ  
ルピリドンよりなる群より選ばれるものである、請求項 15 に記載の免疫反応測定方法。

【請求項 17】

免疫反応液中に、アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系、アルキルナ  
フタレンスルホン酸ナトリウム塩系、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系、ポリオキシエ  
チレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系及  
びポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活  
性剤よりなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上の化合物を含有させることを特徴とする、  
免疫測定法におけるプロゾーン現象の抑制方法。

30

【請求項 18】

該免疫反応液中、アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系又はアルカン  
スルホン酸ナトリウム塩系の界面活性剤の濃度が 0.03 ~ 4 %、アルキルナフタレンス  
ルホン酸ナトリウム塩系、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系又はポリオキシエチ  
レンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の界面活性剤の濃度が 0.1 ~ 4 %、又  
は、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の界面活性剤の濃度が 0.  
02 ~ 4 % である、請求項 17 に記載の、免疫測定法におけるプロゾーン現象の抑制方法  
。

40

【請求項 19】

アルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアル  
キルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリ  
ウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、アルカン  
スルホン酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がアルカンスルホン酸ナトリウム、ポ  
リオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオ  
キシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系  
の陰イオン性界面活性剤が高級アルキルエーテル硫酸エステル塩、又は、ポリオキシエチ  
レンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系の陰イオン性界面活性剤がポリオキシ  
エチレンアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムである請求項 17 又は 18 に記載の、

50

プロゾーン現象の抑制方法。

## 【請求項 2 0】

該免疫測定法が免疫凝集反応測定法によるものである、請求項 1 7 ないし 1 9 に記載の、免疫測定法におけるプロゾーン現象の抑制方法。

## 【請求項 2 1】

該免疫測定法が金コロイド凝集反応測定法によるものである、請求項 1 7 ないし 2 0 の何れかに記載の免疫測定法におけるプロゾーン現象の抑制方法。

## 【請求項 2 2】

該免疫反応液中に反応促進剤を更に含有させることを特徴とする、請求項 1 7 ないし 2 1 の何れかに記載の、免疫測定法におけるプロゾーン現象の抑制方法。

10

## 【請求項 2 3】

反応促進剤が、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、プルラン、ポリビニルアルコール及びポリビニルピリドンよりなる群より選ばれるものである、請求項 2 2 に記載の、免疫測定法におけるプロゾーン現象の抑制方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は免疫凝集反応や免疫沈降反応等の免疫反応において、被測定物質を広濃度範囲にわたって測定しようとする際に障害となるプロゾーン現象を抑制する薬剤及び方法、これを利用した免疫測定方法、及び免疫反応測定用試薬に関する。

20

## 【0 0 0 2】

## 【従来の技術】

近年、臨床検査等の分野における各種検査では、自動化及び測定時間の短縮が図られている。それら検査において、免疫反応を利用する測定方法が、生体試料中の微量物質を測定するために広く用いられている。免疫測定方法には、R I A 法、E I A 法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法、イムノクロマト法等多くの方法があるが、その中でもラテックス凝集法や金属コロイド凝集法は反応液の分離や洗浄を行わないため、自動化に適している。

## 【0 0 0 3】

従来、生体試料中の被測定物質を免疫測定する際、非イオン性、陰イオン性、陽イオン性または両性界面活性剤を免疫反応液中に添加することにより、被測定物質である抗原（又は抗体）の低濃度領域において測定感度及び測定精度を改良できることが知られていた（特開昭 5 8 - 1 8 7 8 0 2 号公報）。一方、免疫沈降反応や免疫凝集反応などの免疫反応において、等量域より抗原（又は抗体）が過剰に存在する場合、沈降物や凝集塊が生成しにくくなって沈降物量が却って減少する現象（「プロゾーン（prozone）現象」という。）が知られている。このため、生体試料中の被測定物質である抗原（又は抗体）が免疫反応液中に高濃度に存在する場合等、ラテックスや金属コロイド等不溶性担体粒子に結合させた抗体（又は抗原）に比して抗原（又は抗体）が過剰に存在する場合、ラテックス凝集法や金属コロイド凝集法で測定するとプロゾーン現象のために測定値が却って小さくなり、このため測定に全く信頼が置けなくなる場合があった。

30

40

## 【0 0 0 4】

このような問題を改善する方法としては、硫酸塩類および必要に応じてポリエチレングリコールを含有させた免疫学的凝集反応試薬（特開平 1 1 - 3 4 4 4 9 2 号公報）、又は特定量のジカルボン酸を含有させた免疫学的凝集反応試薬（特開平 1 1 - 3 4 4 4 9 4 号公報）を用いる測定法等が提案されている。

## 【0 0 0 5】

しかしながら、これらの方法では、プロゾーン現象を幾らかは抑制できるものの、ラテックス凝集法や金属コロイド凝集法等の、自動化に適したホモジニアス測定系に用いるには、抑制効果が不十分であり、プロゾーン現象の抑制のための新たな技術が切望されていた

50

。

## 【 0 0 0 6 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、上記背景のもとで、プロゾーン現象を十分に抑制し、免疫反応液中に被測定物質である抗原（又は抗体）が不溶性担体粒子に結合させた抗体（又は抗原）に比して過剰に含まれていても適切な測定値が得られるようにし、それにより、低濃度から高濃度まで、広い濃度範囲にわたる被測定物質の測定を可能にする方法、これに用いるプロゾーン現象抑制剤、またこれを用いた免疫反応測定用試薬、免疫反応測定方法及びプロゾーン現象の抑制方法を提供することを目的とする。

## 【 0 0 0 7 】

## 【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、免疫測定においてプロゾーン現象を抑制する新たな技術を求めて検討した結果、被測定物質を含む免疫反応液中に、各種の界面活性剤のうちスルホン酸塩型又は硫酸エステル塩型の陰イオン性界面活性剤を含有させれば、意外にもプロゾーン現象を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は、硫酸エステル塩系及びスルホン酸塩系の陰イオン性界面活性剤よりなる群より選ばれる1種又は2種以上の化合物よりなる、免疫反応測定用プロゾーン現象抑制剤を提供する。ここに、硫酸エステル塩系及びスルホン酸塩系の陰イオン性界面活性剤の好ましい例としては、アルキル硫酸エステル塩系、アルキルベンゼンスルホン酸塩系、アルキルナフタレンスルホン酸塩系、アルキルジフェニルエーテルスルホン酸塩系、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩系、ポリオキシエチレンアルキルアリル硫酸エステル塩系及びアルカンスルホン酸塩系の陰イオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 0 9 】

また本発明は、これらの化合物を免疫反応におけるプロゾーン現象抑制剤として含有することを特徴とする、免疫反応測定用試薬をも提供する。該免疫反応測定用試薬は、該プロゾーン現象抑制剤を、免疫反応液中の該プロゾーン現象抑制剤の濃度が0.008～4%になる量で含有するものであることが好ましい。該免疫反応測定用試薬は、更に好ましくは金コロイド凝集反応によるものである。該免疫反応測定用試薬は、反応促進剤を含有す

## 【 0 0 1 0 】

また本発明は、上記免疫反応測定用プロゾーン現象抑制剤を含有する反応液中で免疫反応を行うことにより、免疫反応におけるプロゾーン現象を抑制して免疫反応を行わせることを特徴とする、免疫反応測定方法をも提供する。該免疫反応測定方法においては、上記免疫反応測定用プロゾーン現象抑制剤の含有量を0.008～4%とすることが好ましい。また、本発明における該免疫反応測定方法は、免疫凝集反応測定法によるものの場合特に効果的であり、金コロイド凝集反応測定法は、特に好ましい免疫反応凝集測定法の一例である。また、反応液中に反応促進剤を含有させることが更に好ましい。

## 【 0 0 1 1 】

本発明はまた、免疫反応液中に、硫酸エステル塩系及びスルホン酸塩系の陰イオン性界面活性剤よりなる群より選ばれる1種又は2種以上の化合物を含有させることを特徴とする、免疫測定法におけるプロゾーン現象抑制方法をも提供する。ここに、硫酸エステル塩系及びスルホン酸塩系の陰イオン性界面活性剤の好ましい例としては、アルキル硫酸エステル塩系、アルキルベンゼンスルホン酸塩系、アルキルナフタレンスルホン酸塩系、アルキルジフェニルエーテルスルホン酸塩系、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩系、ポリオキシエチレンアルキルアリル硫酸エステル塩系及びアルカンスルホン酸塩系の陰イオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。該プロゾーン現象抑制方法において、該免疫反応液中の該化合物の濃度は、好ましくは0.008～4%である。本発明における該プロゾーン現象抑制方法は、免疫凝集反応測定法において特に効果的であり

10

20

30

40

50

、金コロイド凝集反応測定法は、特に好ましい免疫凝集反応測定法の一例である。また、反応液中に反応促進剤を含有させることが更に好ましい。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のプロゾーン現象抑制剤としては、公知のスルホン酸塩型または硫酸エステル塩型の陰イオン性界面活性剤の中から適宜選択して使用でき、特にアルキルフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム塩系〔例：ペレックスSSH；花王（株）、エレミノールMON2；三洋化成工業（株）〕、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩系〔例：ペレックスNBL；花王（株）〕、アルカンスルホン酸ナトリウム塩系〔例右：ラテムルPS；花王（株）〕、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム塩系〔例：エマールE70C；花王（株）〕、高級アルキルエーテル硫酸エステル塩系〔例：サンデットENM；三洋化成工業（株）〕、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩系〔例：サンデットEN；三洋化成工業（株）〕、アルキル硫酸エステル塩系、アルキルベンゼンスルホン酸系、ポリオキシエチレンアルキルアリル硫酸塩系の陰イオン性界面活性剤が好ましい。

10

【0013】

本発明のプロゾーン現象抑制剤は、免疫測定法に用いられる試薬中に添加して使用することができる。本発明の免疫反応測定用試薬は、プロゾーン現象抑制剤を用いること以外は、公知の免疫測定法で通常用いられる試薬を使用することで足りる。

【0014】

免疫反応液中のこれら陰イオン性界面活性剤の濃度は0.008～4%（本発明において重量%を表す。）であり、好ましくは0.008～1%、更に好ましくは0.016～0.4%である。

20

【0015】

更に免疫反応測定用試薬に反応促進剤を配合することにより、プロゾーン現象を抑制したまま測定感度を高めることができる。反応促進剤としては、測定感度を上昇させるものであれば何れのものでもよく、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、プルラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピリドン等が挙げられるが、これらに限られない。

【0016】

例えば、ポリエチレングリコールは、公知のポリエチレングリコールのうちから適宜選択して使用できる。その平均分子量は1000～50000で、好ましくは4000～20000である。測定時の免疫反応液中のポリエチレングリコール濃度には、反応促進効果を発揮させる上で特に明確な上限はないが、通常0.01～5.0%、好ましくは0.1～3.0%、特に好ましくは0.2～2.0%になるように、免疫反応測定用試薬に配合すればよい。

30

【0017】

また、本発明は、免疫反応測定用試薬に非イオン性界面活性剤を配合することを妨げるものではない。非イオン性界面活性剤を配合する場合、公知の非イオン性界面活性剤の中から適宜選択すればよい。特に好ましいのは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル系、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル系、ソルビタン脂肪酸エステル系、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル系、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル系、グリセリン脂肪酸エステル系、ポリオキシエチレンアルキルアミン系、アルキルアルカノールアミド系の非イオン性界面活性剤である。非イオン性界面活性剤を配合する場合、測定時の免疫反応液中の濃度が0.001～3.0%、好ましくは0.02～2.0%になるように免疫反応測定用試薬に配合すればよい。

40

【0018】

本発明の免疫反応測定用試薬を使用するのに特に適した免疫測定法は、免疫凝集反応を伴うものである。それらのうち、特に好ましいのは、ラテックス凝集法及び金属コロイド凝

50

集法である。金属コロイド凝集法で用いられる金属コロイドとしては、金、銀、セレン等のコロイドがあり、何れでもよいが、利用しやすいという点からは、金コロイドが好ましい。

#### 【0019】

例えば、抗原（又は抗体）である被測定物質を測定する場合、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法では、被測定物質である抗原（又は抗体）に対応する抗体（又は抗原）を、担体のラテックスや金属コロイドにあらかじめ結合させておく。その測定例として、金コロイド凝集法の場合、あらかじめ金コロイドと結合させた標識抗体（又は標識抗原）が、被測定物質である抗原（又は抗体）を介して凝集する。その際に生じる色差（色調変化）を光学的に測定し、抗原量または抗体量を測定する。

10

#### 【0020】

本発明の免疫反応測定試薬にて測定される被測定物質としては、タンパク質、脂質、糖類があり、それには例えば、各種抗原、抗体、レセプター、酵素などが含まれる。具体的にはC反応性タンパク（CRP）、繊維素分解産物（FDP）、ヘモグロビン、ヘモグロビンA1c、 $\alpha$ -フェトプロテイン（AFP）、シスタチンC、癌胎児性抗原（CEA）、CA19-9、前立腺特異抗原（PSA）、ペプシノーゲンIおよびII、コラーゲン、血清アミロイドA（SAA）、フェリチン、トランスフェリン、 $\alpha$ 1-マイクログロブリン、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、 $\alpha$ 2-マイクログロブリン、 $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン（ACT）、ミオグロビンなどの血液中タンパク質や、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヘリコバクターピロリ、およびこれらに対する抗体などの、感染症に関する抗原や抗体などが挙げられる。本発明によれば、免疫測定反応におけるプロゾン現象、取り分け抗原過剰によるプロゾン現象が抑制され、これら被測定物質を、広い濃度範囲にわたって測定することができる。

20

#### 【0021】

本発明において、免疫反応を過度に酸性又はアルカリ性の条件下で行うことは好ましくない。反応液のpHとしては4.5～9.5の範囲とするのがよく、より好ましいのは5.5～8.5の範囲である。pHの維持のためには適当な緩衝剤、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、コハク酸緩衝液、あるいはグリシルグリシン、MES（2-（N-モノホリノ）エタンスルホン酸）、HEPES（N-2-ヒドロキシエチル-ピペラジン-N'-エタンスルホン酸）、TES（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）、PIPES（ピペラジン-1,4-ビス（2-エタンスルホン酸））、DIPSO（3-（N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ）-2-ヒドロキシエチルプロパンスルホン酸）、Tricine（トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン）、TAPS（N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸）等のグッド緩衝液が好適に用いられる。緩衝剤の使用濃度としては、測定時の免疫反応液中における濃度が5～1000mMになるように、免疫反応測定用試薬に配合すればよく、より好ましくは20～500mMの範囲になるようにすればよい。

30

#### 【0022】

なお、本発明の免疫反应用試薬中には、動物血清、 $\alpha$ -グロブリン、ヒトIgGやIgMに対する特異抗体、アルブミン、またはそれらの変性物や分解物、塩化ナトリウムやその他の無機塩類、糖類、アミノ酸類、EDTA等のキレート剤、DTT等のSH試薬、アジ化ナトリウム等を配合してもよい。これらの物質は、通常この分野で使用される濃度範囲で含まれてよい。

40

#### 【0023】

##### 【作用】

本発明の試薬を用いれば、試料中に被測定物質である抗原（又は抗体）が高濃度に存在するなど、ラテックスや金属コロイド等不溶性担体粒子に結合させた抗体（又は抗原）に比して過剰量の抗原（又は抗体）が存在している場合でも、プロゾン現象を抑制することができ、試料の希釈等により抗原と抗体の濃度バランスを調節し直すことなしに、広い濃度範囲での被測定物質の免疫反応測定が可能となる。

50

## 【 0 0 2 4 】

## 【実施例】

以下、典型的な実施例として金コロイド凝集反応に基づいて本発明を更に具体的に説明するが、本発明がこれらによって限定されることは意図しない。

なお、実施例において以下の陰イオン性界面活性剤を使用した。

- ・ペレックス S S H : アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム (花王 (株))
- ・ペレックス N B L : アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム (花王 (株))
- ・ラテムル P S : アルカンスルホン酸ナトリウム (花王 (株))
- ・エマール E 7 0 C : ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム (花王 (株)) 10
- ・エレミノール M O N 2 : アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム (三洋化成工業 (株))
- ・サンデット E N M : 高級アルキルエーテル硫酸エステル塩 (三洋化成工業 (株))
- ・サンデット E N : ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステルナトリウム塩 (三洋化成工業 (株))

## 【 0 0 2 5 】

## &lt; 参考例 1 &gt; 金コロイド液の調製

9 5 の蒸留水 1 L に 1 0 % 塩化金酸溶液 2 m L を攪拌しながら加え、1 分後に 2 % クエン酸ナトリウム溶液 1 0 m L を加え、さらに 2 0 分間攪拌した後 3 0 に冷却した。冷却後、0 . 1 M 炭酸カリウム溶液で p H 7 . 1 に調整した。 20

## 【 0 0 2 6 】

## &lt; 参考例 2 &gt; 抗シスタチン C 抗体結合金コロイド試薬の調製

抗シスタチン C 抗体 (ダコ・ジャパン株式会社) を、0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 1 0 m M H E P E S p H 7 . 1 で希釈して 5 0 μ g / m L の濃度に調整した。この液 1 0 0 m L を上記参考例 1 で調製した金コロイド液約 1 L に加え、冷蔵条件下で 2 時間攪拌した。次いでこれに 5 . 4 6 % マンニトール、0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む、1 0 m M H E P E S p H 7 . 1 を 1 1 0 m L 添加し、3 7 で 9 0 分攪拌した。8 , 0 0 0 回転で 4 0 分遠心し、上清を除去した後、3 % マンニトール、0 . 1 % B S A 及び 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む、5 m M H E P E S p H 7 . 5 ( A 溶液) を約 1 L 加え、抗体結合金コロイドを分散させた後、8 , 0 0 0 回転で 4 0 分遠心し、上清を除去し、A 溶液で抗体結合金コロイドを分散させ全量を 1 6 0 m L とし、抗シスタチン C 抗体結合金コロイド試薬を調製した。 30

## 【 0 0 2 7 】

## &lt; 参考例 3 &gt; 抗 A F P 抗体結合金コロイド試薬の調製

抗 A F P 抗体 (ダコ・ジャパン株式会社) を、0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 1 0 m M H E P E S p H 7 . 1 で希釈して 5 0 μ g / m L の濃度に調整した。この液 1 0 0 m L を上記参考例 1 で調製した金コロイド液約 1 L に加え、冷蔵条件下で 2 時間攪拌した。次いでこれに 5 . 4 6 % マンニトール、0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む、1 0 m M H E P E S p H 7 . 1 を 1 1 0 m L 添加し、3 7 で 9 0 分攪拌した。8 , 0 0 0 回転で 4 0 分遠心し、上清を除去した後、3 % マンニトール、0 . 1 % B S A 及び 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む、5 m M H E P E S p H 7 . 5 ( A 溶液) を約 1 L 加え、抗体結合金コロイドを分散させた後、8 , 0 0 0 回転で 4 0 分遠心し、上清を除去し、A 溶液で抗体結合金コロイドを分散させ全量を 1 6 0 m L とし、抗 A F P 抗体結合金コロイド試薬を調製した。 40

## 【 0 0 2 8 】

## &lt; 実施例 1 &gt;

0 ~ 5 0 μ g / m L の濃度のシスタチン C を含む血清 3 μ L に、0 . 2 % E D T A ・ 2 N a 及び 1 % N a C l を含む 0 . 2 M の M E S 緩衝液 ( p H 6 . 0 ) に、下記の何れかの陰イオン性界面活性剤を、それぞれ示した濃度で添加することにより、又は何れの陰イオン 50

性界面活性剤も添加せずに、調製した各 R 1 試薬溶液を 240  $\mu$ L 加えた。

ペレックスSSH・・・0.03% (図1)

ペレックスNBL・・・0.1% (図1)

ラテムルPS・・・0.03% (図1)

エマールE70C・・・0.05% (図2)

エレミノールMON2・・・0.03% (図2)

ラテムルS-180A・・・0.1% (図2)

サンデットENM・・・0.2% (図3)

サンデットEN・・・0.2% (図3)

次いで、37 で5分後に、R 2 試薬溶液として参考例2で調製した抗シスタチンC抗体結合金コロイド溶液を60  $\mu$ L 添加し、37 で反応させ、日立7150型自動分析装置により27ポイントと50ポイントにおける吸光度差(主波長546nm副波長660nm)を測定した。その結果を図1、2及び3に示す。図から明らかなように、これらの陰イオン性界面活性剤を添加して製した何れの反応液においても、プロゾン現象は認められなかった。これに対して陰イオン性界面活性剤無添加の反応液では、プロゾン現象が起こるのが認められた。

【0029】

<実施例2>

免疫反応液に非イオン性界面活性剤を添加して、プロゾン現象の抑制効果の有無を、陰イオン性界面活性剤ペレックスSSH添加の場合と比較した。非イオン性界面活性剤としてTritonX100、Tween80及びレオドール-TW?L120を用い、それらの何れかを濃度0.2%で含有する、0.2%EDTA・2Na及び1%NaClを含む0.2MのMES緩衝液(pH6.0)を各R1試薬溶液とし、それを用いて実施例1と同様にシスタチンCを測定した。同時に、ペレックスSSHを0.03%の濃度になるように添加した、0.2%EDTA・2Na及び1%NaClを含む0.2MのMES緩衝液(pH6.0)をR1試薬溶液とし、それを用いて実施例1と同様にシスタチンCを測定した。その結果を図4に示す。図から明らかなように、非イオン性界面活性剤には、プロゾン現象の抑制効果は認められなかった。

【0030】

<実施例3>

特開平11-344492号には、硫酸塩によるプロゾン現象の抑制効果が記載されている。そこで、硫酸ナトリウムを添加した免疫反応液を調製し、プロゾン現象の抑制効果につき、硫酸エステル基を含む陰イオン性界面活性剤ペレックスSSHを添加した免疫反応液と比較した。硫酸ナトリウムをそれぞれ0、2.0、5.0又は9.0%の濃度で含有させた、0.2%EDTA・2Na及び1%NaClを含む0.2MのMES緩衝液(pH6.0)をR1試薬溶液とし、これらを用いて実施例1と同様にシスタチンCを測定した。同時に、ペレックスSSHを0.03%の濃度になるように添加した、0.2%EDTA・2Na及び1%NaClを含む0.2MのMES緩衝液(pH6.0)をR1試薬溶液とし、これを用いて実施例1と同様にシスタチンCを測定した。結果を図5に示す。図より明らかなどおり、硫酸ナトリウム添加では、シスタチンCの高濃度50  $\mu$ g/mLにおける測定値が、シスタチンC濃度4  $\mu$ g/mLにおける測定値を下回っており、プロゾン現象は全く解消されていなかった。これに対し、ペレックスSSH0.03%添加では、シスタチンCの高濃度50  $\mu$ g/mLにおける測定値がこれより低濃度域における測定値を下回ることがなく、プロゾン現象は完全に解消された。

【0031】

<実施例4>

ペレックスSSH又はエマールE70Cを0、0.01、0.02又は0.03%の濃度になるように添加した、0.2%EDTA・2Na及び1%NaClを含む0.2MのMES緩衝液(pH6.0)をR1試薬溶液とし、これらを用いて実施例1と同様にシスタチンCを測定した。その結果を図6、7に示す。図6より明らかなどおり、ペレックスS

10

20

30

40

50

SHの濃度0.01%を添加した場合、シスタチンCの高濃度50 $\mu$ g/mLにおける測定値が、無添加の場合に比して上昇することが認められた。ペレックスSSHの濃度0.03%の添加では、シスタチンCの高濃度50 $\mu$ g/mLにおける測定値が、それより低濃度域におけるシスタチンCの測定値を下回ることがなく、プロゾン現象は完全に解消された。

【0032】

図7のエマルE70C添加においても、濃度0.01%の添加でシスタチンCの高濃度50 $\mu$ g/mLにおける測定値が無添加の場合に比して上昇することが認められた。エマルE70Cの濃度0.02%の添加では、シスタチンCの高濃度50 $\mu$ g/mLにおける測定値が、それより低濃度域におけるシスタチンCの測定値を下回ることがなく、プロ

10

【0033】

これらのことから、ペレックスSSH又はエマルE70Cには、0.01%の低濃度でもプロゾン現象の抑制効果があることが判る。

【0034】

<実施例5>

非イオン性界面活性剤共存下での陰イオン性界面活性剤のプロゾン現象抑制効果について検討した。非イオン性界面活性剤としてTween80を0.2%の濃度になるように添加した、0.2%EDTA $\cdot$ 2Na及び1%NaClを含む0.2MのMES緩衝液(pH6.0)に、陰イオン性界面活性剤としてペレックスNBLを濃度がそれぞれ0.0.2、0.3、0.4、0.5%になるように添加し、R1試薬溶液とした。これらを用いて実施例1と同様にシスタチンCを測定した。その結果を図8に示す。ペレックスNBLの濃度0.3%で、シスタチンCの高濃度50 $\mu$ g/mLにおける測定値が、それより低濃度領域のシスタチンCの測定値を下回ることがなく、プロゾン現象は完全に解消された。ペレックスNBLの濃度を0.3%より高めると、全体的に測定値の低下が認められるが、プロゾン現象は抑制されたままであった。このことから、陰イオン性界面活性剤を非イオン性界面活性剤と共に用いても、陰イオン性界面活性剤のプロゾン現象抑制効果は損なわれないことが判る。

20

【0035】

<実施例6>

実施例5においてペレックスNBLの濃度を0.5%になるように添加したとき、シスタチンCの測定値は全体的に著しく低下した(図5)。そこで、反応促進剤共存下での陰イオン性界面活性剤のプロゾン現象の抑制効果について検討した。反応促進剤としてポリエチレングリコール20000を用い、濃度がそれぞれ0.0.5、0.75、1.0又は1.25%になるように、実施例5のペレックスNBLを0.5%含有するR1試薬溶液に添加して、実施例1と同様にシスタチンCを測定した。同時に、ペレックスNBL無添加のR1試薬溶液に0.5%になるようにポリエチレングリコール20000を添加して、実施例1と同様にシスタチンCを測定した。結果を図9に示す。ペレックスNBL無添加のR1試薬溶液にポリエチレングリコール20000を添加した場合、ポリエチレングリコールによる反応促進効果により測定値は上昇するが、シスタチンCの全濃度域で単

30

40

【0036】

<実施例7>

50

陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を、シスタチンC以外の測定試薬であるAFP測定試薬について検討した。0～250 μg/mLの濃度のAFPを含む血清3 μLに、0.2% Triton X100、0.2% EDTA・2Na及び1% NaClを含む、0.2MのMES緩衝液(pH6.0)をR1試薬溶液として240 μL加えた。次いで37℃で5分後に、R2試薬溶液として参考例3で調製した抗AFP抗体結合金コロイド溶液を60 μL添加し、37℃で反応させ、日立7150型自動分析装置により27ポイントと50ポイントにおける吸光度差(主波長546 nm副波長660 nm)を測定した。前記R1試薬溶液に、陰イオン性界面活性剤としてペレックスSSHを0.1%濃度で添加し、同様にしてAFPを測定し、陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果について検討した。結果を図10に示す。AFP測定試薬においても、陰イオン性界面活性剤ペレックスSSH添加により、プロゾーン現象の抑制効果が認められた。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を示すグラフ(シスタチンC)。

【図2】 陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を示すグラフ(シスタチンC)。

【図3】 陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を示すグラフ(シスタチンC)。

【図4】 非イオン性界面活性剤添加でのプロゾーン現象を示すグラフ(シスタチンC)。

20

【図5】 プロゾーン現象抑制における硫酸ナトリウムと陰イオン性界面活性剤との比較を示すグラフ(シスタチンC)。

【図6】 ペレックスSSHの濃度とプロゾーン現象抑制効果との関係を示すグラフ(シスタチンC)。

【図7】 エマール70Cの濃度とプロゾーン現象抑制効果との関係を示すグラフ(シスタチンC)。

【図8】 非イオン性界面活性剤共存下での陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を示すグラフ(シスタチンC)。

【図9】 非イオン性界面活性剤及び反応促進剤の共存下での陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を示すグラフ(シスタチンC)。

30

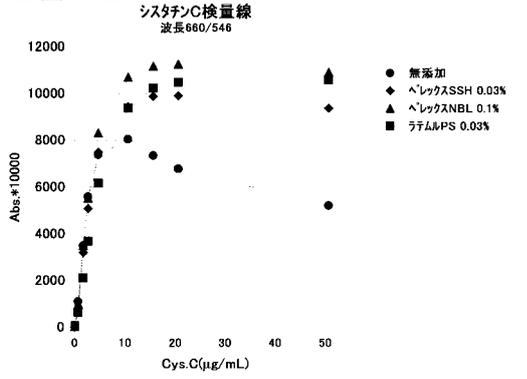
【図10】 陰イオン性界面活性剤のプロゾーン現象抑制効果を示すグラフ(AFP)。

【符号の説明】

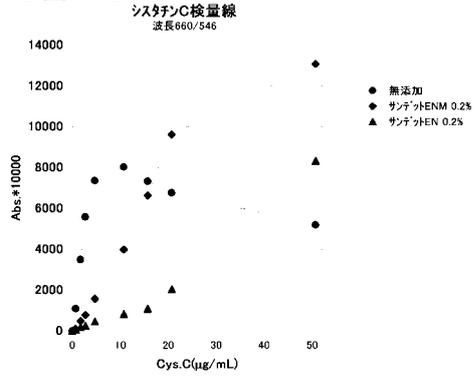
$Abs * 1000 = \text{吸光度} \times 1000$

$Cys \cdot C = \text{シスタチンC}$

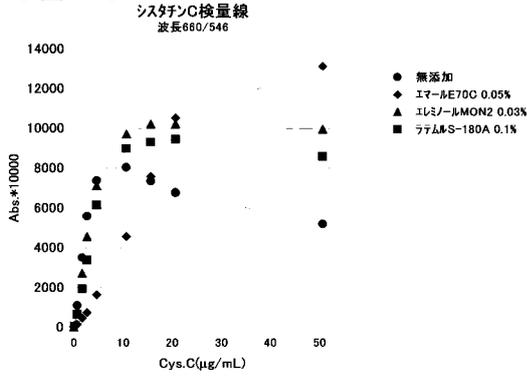
【 図 1 】



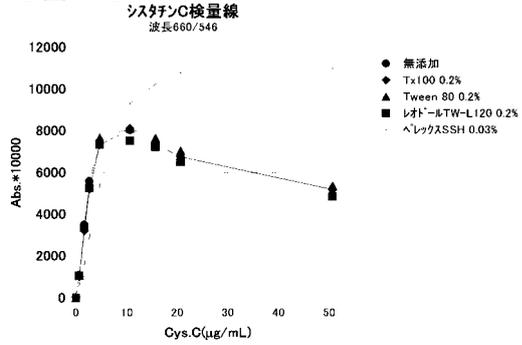
【 図 3 】



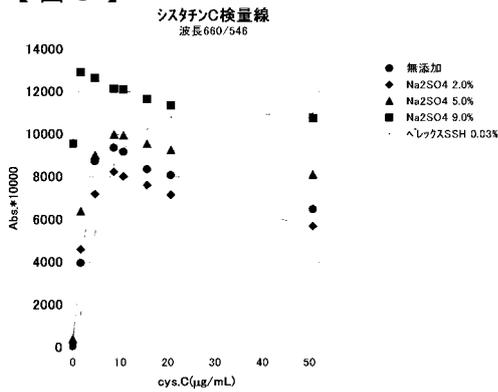
【 図 2 】



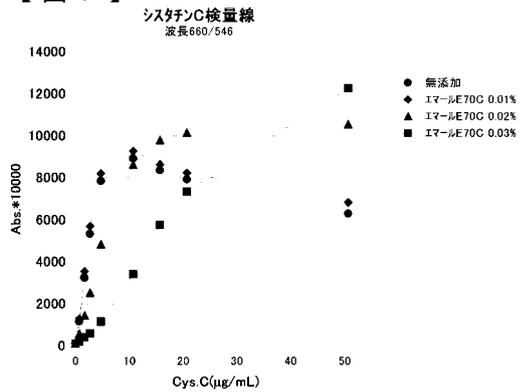
【 図 4 】



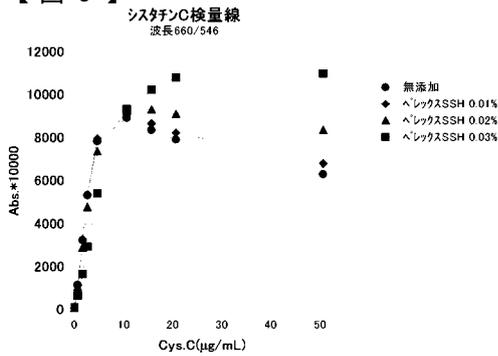
【 図 5 】



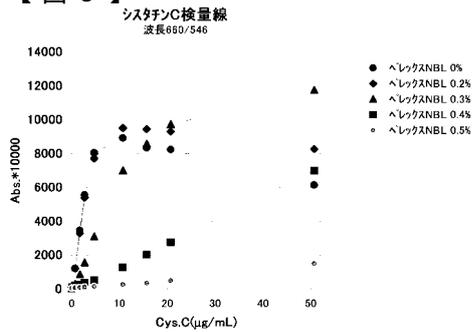
【 図 7 】



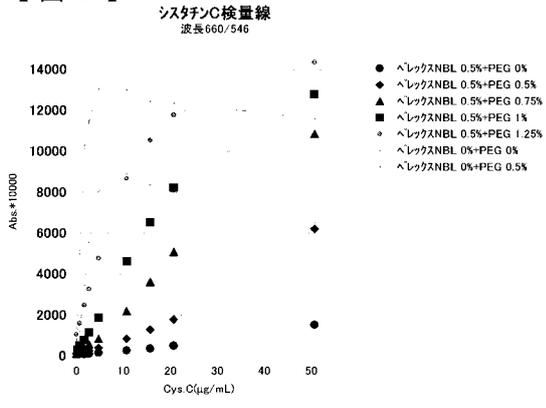
【 図 6 】



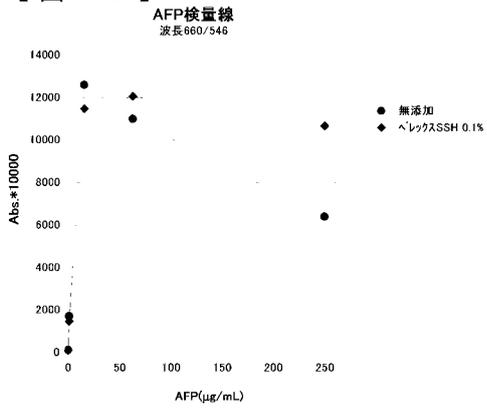
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平07-012813(JP,A)  
特開昭64-069954(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
G01N 33/48-33/98