

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7166364号  
(P7166364)

(45)発行日 令和4年11月7日(2022.11.7)

(24)登録日 令和4年10月27日(2022.10.27)

(51)国際特許分類	F I		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	B	
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A	
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28		
請求項の数 18 (全24頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2020-570927(P2020-570927)	(73)特許権者	520192784
(86)(22)出願日	令和1年5月29日(2019.5.29)		シャメン・イノドックス・バイオテック
(65)公表番号	特表2021-527824(P2021-527824 A)		・カンパニー・リミテッド
(43)公表日	令和3年10月14日(2021.10.14)		中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2
(86)国際出願番号	PCT/CN2019/089015		2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・
(87)国際公開番号	WO2019/242474		ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、
(87)国際公開日	令和1年12月26日(2019.12.26)	(73)特許権者	519326323
審査請求日	令和3年2月8日(2021.2.8)		シャメン・ユニヴァーシティ
(31)優先権主張番号	201810634120.5		中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 0
(32)優先日	平成30年6月20日(2018.6.20)		5、シャメン、シミン・ディストリクト
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100110423
			弁理士 曾我 道治
		(74)代理人	100111648
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C反応性タンパク質を全域検出する方法及び対応するキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

C反応性タンパク質の全域検出のためのキットであって、  
第1抗体でコーティングされた0.5mg/mL~1mg/mLの磁性粒子、0.04% (W/V)~0.06% (W/V)の界面活性剤、及び8% (W/V)~12% (W/V)のスクロースを含み、その溶剤がpH=7.0~8.0を有するリン酸緩衝液であり、前記第1抗体のコーティング量は5µg~20µg/mg磁性粒子であり、前記界面活性剤はTween-20である、M試薬と、  
0.1M~1Mの濃度、pH=3.0~4.0を有するクエン酸溶液であって、試料処理溶液である、R1試薬と、

第2抗体でコーティングされたアクリジニウムエステル、0.5%~1%のカゼイン、及び0.5%~1%のウシ血清アルブミンを含み、その溶剤がpH=7.0~8.0を有するリン酸緩衝液であり、前記第2抗体のコーティング量は0.3µg~0.9µg/µgアクリジニウムエステルである、R2試薬と、

予備励起溶液及び励起溶液と、  
を含み、前記第1抗体及び前記第2抗体は、両者ともC反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であり、前記第1抗体及び前記第2抗体は異なるエピトープに対する抗体である、キット。

【請求項2】

C反応性タンパク質の全域検出のためのキットであって、

第1抗体のコーティング量が100ng/ウェル~500ng/ウェルであり、コーティング緩衝液はpH=7.0~8.0を有するリン酸緩衝液であり、ブロッキング溶液は、5%(W/V)~8%(W/V)のブロッキング血清又はブロッキングタンパク質及び0.02%(W/V)のアジ化ナトリウムを含む7.2~7.4のpHを有する50mMのリン酸緩衝液である、第1抗体でコーティングされた、平底プレート型の化学発光プレートと、

0.1M~1Mの濃度、pH=3~4を有するクエン酸溶液である試料処理溶液と、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで標識された第2抗体を含み、1mg/mLの第2抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで同じ割合で標識される標識量を有する、標識酵素溶液と、

発色溶液であって：前記第2抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼで標識される場合に、前記発色溶液は発色溶液A及び発色溶液Bを含み、前記発色溶液Aは、過酸化水素であって、前記発色溶液Aの配合：13.6gの酢酸ナトリウム、1.6gのクエン酸、0.3mlの30%の過酸化水素であり、蒸留水を配合して500mlとし、前記発色溶液Bは、o-フェニレンジアミンであって、前記発色溶液Bの配合：0.2gのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、0.95gのクエン酸、50mlのグリセロール、9.15gのテトラメチルベンジジンであり、蒸留水を配合して500mlとする；発色溶液と、を含み、前記第1抗体及び前記第2抗体は、両者ともC反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であり、前記第1抗体及び前記第2抗体は異なるエピトープに対する抗体である、キット。

#### 【請求項3】

前記化学発光プレートは96ウェル又は384ウェルプレートであり、前記第1抗体のコーティング量は、500ng/ウェルであり、前記ブロッキング血清は、仔ウシ血清である、請求項2に記載のキット。

#### 【請求項4】

前記クエン酸溶液のpHは、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整される、請求項1~3のいずれか一項に記載のキット。

#### 【請求項5】

前記クエン酸溶液のpHは、3.0~3.5である、請求項1~3のいずれか一項に記載のキット。

#### 【請求項6】

前記クエン酸溶液のpHは、3.2、3.3、3.4、又は3.5である、請求項5に記載のキット。

#### 【請求項7】

前記クエン酸溶液の濃度は、0.5mol/Lである、請求項1~3のいずれか一項に記載のキット。

#### 【請求項8】

前記予備励起溶液は、1%(W/V)の過酸化水素溶液であり、前記励起溶液は、1mol/Lの水酸化ナトリウム溶液である、請求項1に記載のキット。

#### 【請求項9】

前記第1抗体は、10C11であり、前記第2抗体は、14D9-2である、請求項1~8のいずれか一項に記載のキット。

#### 【請求項10】

前記M試薬を調製する方法は、前記第1抗体及び前記磁性粒子をpH=5.0~6.0を有する2-モルホリンエタンスルホン酸緩衝液中で混合し、25~37で1時間~3時間コーティングし、pH=8.0~9.0を有する0.1%(W/V)~0.5%(W/V)のウシ血清アルブミンリン酸緩衝液を添加して、1時間~3時間にわたり停止を行い、コーティングされた磁性粒子を分離し、pH=7.0~8.0を有するリン酸緩衝液中に分散させた後に、0.04%(W/V)~0.06%(W/V)の、Tween-20である界面活性剤及び8%(W/V)~12%(W/V)のスクロースを添加するこ

10

20

30

40

50

とで、前記M試薬を得ることを含み、

前記R2試薬を調製する方法は、前記第2抗体及びアクリジニウムエステルをpH = 8.0 ~ 9.0を有するリン酸緩衝液中で混合し、25 ~ 37 で1時間 ~ 3時間コーティングした後に、0.1% (W/V) ~ 0.5% (W/V)のウシ血清アルブミンを含むpH = 8.0 ~ 9.0を有するTris緩衝液を添加して、1時間 ~ 3時間にわたり停止を行い、ストック溶液を得て、前記ストック溶液をpH = 7.0 ~ 8.0を有するリン酸緩衝液で1:100 ~ 500に希釈することで、前記R2試薬を得ることを含み、請求項1に記載のキット。

【請求項11】

前記界面活性剤は、0.05% (W/V)のTween-20であり、10% (W/V)のスクロースが添加される、請求項10に記載のキット。

10

【請求項12】

前記化学発光プレートのコーティング源を調製する方法は、前記コーティングされる第1抗体を、コーティング緩衝液としてのpH = 7.0 ~ 8.0を有するリン酸緩衝液で100 ng / ウェル ~ 500 ng / ウェルに希釈し、前記化学発光プレートに1ウェル当たり100 µLを加え、37 で2時間又は4 で一晚インキュベートし、前記コーティング緩衝液を注ぎ出し、5% (W/V) ~ 8% (W/V)の仔ウシ血清及び0.02% (W/V)のアジ化ナトリウムを含む200 µLのブロッキング溶液を使用して、37 で2時間インキュベートし、前記ウェル内のその液体を注ぎ出し、前記化学発光プレートを乾燥させ、真空下にアルミニウムフィルムで密封し、乾燥した場所で4 にて貯蔵することを含み、

20

前記標識酵素溶液を調製する方法は、前記第2抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼとを1:1の比で混合して標識し、pH = 9.6を有する炭酸緩衝液中で透析し、前記炭酸緩衝液を4時間毎に三度にわたって交換し、酵素標識された第2抗体を収集してストック溶液とした後に、前記ストック溶液を市販の酵素希釈液で1:500に希釈することで、前記標識酵素溶液を得ることを含み、請求項2又は3に記載のキット。

【請求項13】

前記コーティングされる第1抗体が、コーティング緩衝液としてのpH = 7.0 ~ 8.0を有するリン酸緩衝液で500 ng / ウェルに希釈される、請求項12に記載のキット。

30

【請求項14】

請求項1に記載のキットを使用することにより実施される、C反応性タンパク質を全域検出する方法であって、

(1) 20 µLの試料を採取し、100 µLの前記R1試薬に添加して前記試料を処理する工程と、

(2) 次いで、50 µLの前記M試薬を添加し、一緒に15分間インキュベートする工程と、

(3) 工程(2)の後に、0.05% (W/V) ~ 0.08% (W/V)のTween-20を含むリン酸緩衝液で洗浄を行い、次いで、50 µLの前記R2試薬を添加して10分間インキュベートする工程と、

40

(4) 工程(3)の後に、0.05% (W/V) ~ 0.08% (W/V)のTween-20を含むリン酸緩衝液で洗浄を行い、100 µLの前記予備励起溶液を添加して、予備励起を行う工程と、

(5) 前記予備励起溶液を除去した後に、100 µLの前記励起溶液を添加して、励起及び検出を行う工程と、

を含み、方法。

【請求項15】

C反応性タンパク質の全域検出のためのキットの製造における試料処理溶液としてのクエン酸溶液の使用であって、前記クエン酸溶液は、0.1 M ~ 1 Mの濃度、pH = 3 ~ 4を有するクエン酸溶液である、使用。

50

**【請求項 16】**

前記クエン酸溶液のpHは、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整される、請求項15に記載の使用。

**【請求項 17】**

前記クエン酸溶液のpHは、3.0～3.5である、請求項15又は16に記載の使用。

**【請求項 18】**

前記クエン酸溶液のpHは、3.2、3.3、3.4、又は3.5である、請求項15又は16に記載の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

10

**【0001】**

本発明は、化学発光イムノアッセイの技術分野に属し、特に、C反応性タンパク質を全域検出する方法及び対応するキットに関する。

**【背景技術】****【0002】**

C反応性タンパク質(CRP)は、1930年にTillet及びFrancisによって発見された急性期反応タンパク質であり、このタンパク質はCa<sup>2+</sup>の存在下でストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)のC多糖類と反応して複合体を形成し得る。血清CRPは、IL-6、IL-2、及びTNFの刺激下で肝細胞によって合成され、炎症性の局所マクロファージも少量産生される。CRPは約115KDの分子量を有し、5つの同一の非グリコシル化ポリペプチドサブユニットからなり、各サブユニットは204個のアミノ酸を含み、これらのサブユニットは非共有結合によって接続されて環状五量体を形成し、この五量体タンパク質は、鎖間ジスルフィド結合により顕著な耐熱性及びタンパク質分解耐性を有する。

20

**【0003】**

CRPは体内に広く分布している。CRPは、血液に加えて、胸膜液、腹水、心膜液、及び関節液においても検出され得る。

**【0004】**

CRPは重要な急性反応タンパク質である。CRPは細菌感染の発生後6時間～8時間で増加し始め、24時間～48時間でピークに達する。感染が解消された後に、その含有量は急激に低下し、1週間以内に正常に戻る。

30

**【0005】**

CRPの臨床的利用は、主に細菌感染又はウイルス感染を特定するだけでなく、疾患の変化及び術後感染を監視し、抗生物質の有効性を動的に観察し、治療を指導及び監視するため等の第一選択指標として使用される。CRPはまた、心血管疾患、冠状動脈性心疾患、及び急性冠症候群にも関連しており、ここでは、患者のCRPのレベルは、しばしば著しく上昇し、レベルの上昇の程度は、冠状動脈閉塞の程度、冠状動脈性心疾患及び鬱血性心不全の終了事象の発生及び予後と有意に相関する。さらに、CRPはまた、心房細動の独立した予測因子でもあり、血清CRP濃度と高血圧との間には或る特定の相関がある。高血圧患者の収縮期血圧レベル及び拡張期血圧レベルは、血清CRP濃度の増加と共に高まる。

40

**【0006】**

現在、市場に出回るCRP検出法には、主に超高感度CRP(hsCRP)検出、従来のCRP検出、及び全域CRP検出が含まれる。超高感度CRP検出は、主に心血管事象の発生及び発症を診断及び予測するために使用されるのに対して、従来のCRP検出は、主に細菌感染、様々な炎症過程、組織壊死及び組織損傷(例えば、術後損傷)だけでなく、回復期間の間のスクリーニング、監視、疾患評価、及び有効性判断のために使用される。初期の従来のCRP検出法は、主に免疫散乱比濁法又は免疫透射比濁(immunoturbidity)法に基づき、5mg/Lを超える検出能を有するが、これらは高感度ではないため、心血管疾患のリスクを予測することは困難である。その後の研究開発に

50

より、免疫増強比濁法が得られ、その分析感度は大幅に向上し、検出下限は  $0.02 \text{ mg/L}$  に達し得る。低濃度のためのこの超高感度 CRP 検出は、超高感度 CRP 検出と呼ばれる。技術の継続的な革新及び改善により、化学発光検出法及び免疫蛍光検出法等の幾つかの検出法は、超高感度及び全域 CRP の検出線形性を一度に満たすことができる。検出の線幅は  $0.02 \text{ mg/L} \sim 100 \text{ mg/L}$  に達し得る。

【0007】

現在、全域 CRP 検出法では、通常、競合する遊離抗体の添加が使用される。例えば、特許文献 1 では、遊離モノクローナル抗体又はコーティング若しくは標識と競合し得る抗体の添加の使用について述べられている。しかしながら、そのような方法は、試薬安定性等の操作の困難性を高める。特許文献 2 は、酸破壊後にアルカリ中和を用いて全域検出の目的が達成される方法を開示しているが、その方法は依然として安定しておらず使いやすくない。したがって、当該技術分野では、全域 CRP 検出法を改善して、全域 CRP 検出法を安定した使いやすい検出方式で実現することが依然として求められている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】米国特許出願公開第 2014/0017712 号明細書  
中国特許出願公開第 105988003 号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

本発明の目的は、従来技術の不利点を克服して、C 反応性タンパク質を全域検出する安定した使いやすい方法及び対応するキットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の技術的な解決手段は、以下の通りである。

【0011】

一態様では、本発明は、C 反応性タンパク質の全域検出のためのキットであって、

第 1 抗体でコーティングされた  $0.5 \text{ mg/mL} \sim 1 \text{ mg/mL}$  の磁性粒子、 $0.04\% \text{ (W/V)} \sim 0.06\% \text{ (W/V)}$  の界面活性剤（前記界面活性剤は、任意に Tween-20 である）、及び  $8\% \text{ (W/V)} \sim 12\% \text{ (W/V)}$  のスクロースを含み、その溶剤が  $\text{pH} = 7.0 \sim 8.0$  を有するリン酸緩衝液であり、前記第 1 抗体のコーティング量は  $5 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g/mg}$  磁性粒子である、M 試薬と、

30

$0.1 \text{ M} \sim 1 \text{ M}$  の濃度、 $\text{pH} = 3.0 \sim 4.0$  を有するクエン酸溶液であって、試料処理溶液である R 1 試薬と、

第 2 抗体でコーティングされたアクリジニウムエステル、 $0.5\% \sim 1\%$  のカゼイン、及び  $0.5\% \sim 1\%$  のウシ血清アルブミンを含み、その溶剤が  $\text{pH} = 7.0 \sim 8.0$  を有するリン酸緩衝液であり、前記第 2 抗体のコーティング量は  $0.3 \mu\text{g} \sim 0.9 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  アクリジニウムエステルである、R 2 試薬と、

予備励起溶液及び励起溶液と、

40

を含み、前記第 1 抗体及び前記第 2 抗体は、両者とも C 反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であり、前記第 1 抗体及び前記第 2 抗体は異なるエピトープに対する抗体である、キットを提供する。

【0012】

別の態様では、本発明は、C 反応性タンパク質の全域検出のためのキットであって、

第 1 抗体のコーティング量が  $100 \text{ ng/ウェル} \sim 500 \text{ ng/ウェル}$ （任意に、 $500 \text{ ng/ウェル}$ ）であり、コーティング緩衝液は  $\text{pH} = 7.0 \sim 8.0$  を有するリン酸緩衝液であり、ブロッキング溶液は、 $5\% \text{ (W/V)} \sim 8\% \text{ (W/V)}$  のブロッキング血清又はブロッキングタンパク質（前記ブロッキング血清は、任意に仔ウシ血清である）及び  $0.02\% \text{ (W/V)}$  のアジ化ナトリウムを含む  $7.2 \sim 7.4$  の  $\text{pH}$  を有する  $50 \text{ mM}$

50

のリン酸緩衝液である、第1抗体でコーティングされた、プレート型発光プレート（任意に、96ウェル、384ウェル、又は他のプレート型発光プレート）を含む平底プレート型の化学発光プレートと、

0.1M～1Mの濃度、pH=3～4を有するクエン酸溶液である試料処理溶液と、

西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで標識された第2抗体を含み、1mg/mLの第2抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで同じ割合で標識される標識量を有する、標識酵素溶液と、

発色溶液であって：前記標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼである場合に、前記発色溶液は発色溶液A及び発色溶液Bを含み、前記発色溶液Aは、過酸化水素（任意に、前記発色溶液Aの配合：13.6gの酢酸ナトリウム、1.6gのクエン酸、0.3mLの30%の過酸化水素であり、蒸留水を配合して500mLとする）であり、前記発色溶液Bは、o-フェニレンジアミン（任意に、前記発色溶液Bの配合：0.2gのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、0.95gのクエン酸、50mLのグリセロール、9.15gのテトラメチルベンジジンであり、蒸留水を配合して500mLとする）であり；前記標識酵素が、アルカリホスファターゼである場合に、前記発色溶液は、市販の試薬である；発色溶液と、

を含み、前記第1抗体及び前記第2抗体は、両者ともC反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であり、前記第1抗体及び前記第2抗体は異なるエピトープに対する抗体である、キットを提供する。

【0013】

幾つかの実施の形態では、前記クエン酸溶液のpHは、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整され、好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、3.0～3.5であり、より好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、3.2、3.3、3.4、又は3.5である。

【0014】

他の実施の形態では、前記クエン酸の濃度は、0.5mol/Lである。

【0015】

幾つかの実施の形態では、前記予備励起溶液は、1%（W/V）の過酸化水素溶液であり、前記励起溶液は、1mol/Lの水酸化ナトリウム溶液であり、前記第1抗体は、10C11であり、前記第2抗体は、14D9-2である。

【0016】

更に他の実施の形態では、前記M試薬を調製する方法は、前記第1抗体及び前記磁性粒子をpH=5.0～6.0を有する2-モルホリンエタンスルホン酸緩衝液中で混合し、25～37で1時間～3時間コーティングし、pH=8.0～9.0を有する0.1%（W/V）～0.5%（W/V）のウシ血清アルブミンリン酸緩衝液を添加して、1時間～3時間にわたり停止を行い、コーティングされた磁性粒子を分離し、pH=7.0～8.0を有するリン酸緩衝液中に分散させた後に、0.04%（W/V）～0.06%（W/V）の界面活性剤（前記界面活性剤は、任意にTween-20であり、一実施の形態では、前記界面活性剤は、0.05%（W/V）のTween-20である）及び8%（W/V）～12%（W/V）のスクロース（任意に、10%（W/V）のスクロース）を添加することで、前記M試薬を得ることを含み、

前記R2試薬を調製する方法は、前記第2抗体及びアクリジニウムエステルをpH=8.0～9.0を有するリン酸緩衝液中で混合し、25～37で1時間～3時間コーティングした後に、0.1%（W/V）～0.5%（W/V）のウシ血清アルブミンを含むpH=8.0～9.0を有するTris緩衝液を添加して、1時間～3時間にわたり停止を行い、ストック溶液を得て、前記ストック溶液をpH=7.0～8.0を有するリン酸緩衝液で1:100～500に希釈することで、前記R2試薬を得ることを含む。

【0017】

他の実施の形態では、前記発光プレートのコーティング源を調製する方法は、前記コーティングされる第1抗体を、コーティング緩衝液としてのpH=7.0～8.0を有する

10

20

30

40

50

リン酸緩衝液で100 ng / ウェル ~ 500 ng / ウェル (任意に、500 ng / ウェル) に希釈し、前記発光プレートに1ウェル当たり100  $\mu$ Lを加え、37 °Cで2時間又は4 °Cで一晩インキュベートし、前記コーティング緩衝液を注ぎ出し、5% (W/V) ~ 8% (W/V) の仔ウシ血清及び0.02% (W/V) のアジ化ナトリウムを含む200  $\mu$ Lのブロッキング溶液を使用して、37 °Cで2時間インキュベートし、前記ウェル内のその液体を注ぎ出し、前記プレートを乾燥させ、真空下にアルミニウムフィルムで密封し、乾燥した場所で4 °Cにて貯蔵することを含み、

前記標識酵素溶液を調製する方法は、前記第2抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼとを1:1の比で混合して標識し、pH = 9.6を有する炭酸緩衝液中で透析し、前記透析緩衝液を4時間毎に三度にわたって交換し、酵素標識された第2抗体を収集してストック溶液とした後に、前記ストック溶液を市販の酵素希釈液で1:500に希釈することで、前記標識酵素溶液を得ることを含む。

10

#### 【0018】

更に別の態様では、本発明は、本発明のキットを使用することにより実施される、C反応性タンパク質を全域検出する方法であって、

(1) 20  $\mu$ Lの試料を採取し、100  $\mu$ Lの前記R1試薬に添加して前記試料を処理する工程と、

(2) 次いで、50  $\mu$ Lの前記M試薬を添加し、一緒に15分間インキュベートする工程と、

(3) 工程(2)の後に、0.05% (W/V) ~ 0.08% (W/V) のTween-20を含むリン酸緩衝液で洗浄を行い、次いで、50  $\mu$ Lの前記R2試薬を添加して10分間インキュベートする工程と、

20

(4) 工程(3)の後に、0.05% (W/V) ~ 0.08% (W/V) のTween-20を含むリン酸緩衝液で洗浄を行い、100  $\mu$ Lの前記予備励起溶液を添加して、予備励起を行う工程と、

(5) 前記予備励起溶液を除去した後に、100  $\mu$ Lの前記励起溶液を添加して、励起及び検出を行う工程と、

を含む、方法を提供する。

#### 【0019】

別の態様では、本発明は、C反応性タンパク質の全域検出のためのキットの製造における試料処理溶液としてのクエン酸溶液の使用を提供する。

30

#### 【0020】

幾つかの実施の形態では、前記クエン酸溶液は、0.1 M ~ 1 Mの濃度、pH = 3 ~ 4を有するクエン酸溶液であり、好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整され、より好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、3.0 ~ 3.5であり、より好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、3.2、3.3、3.4、又は3.5である。

#### 【0021】

一態様では、本発明は、C反応性タンパク質の全域検出(直接的化学発光、すなわち、磁性粒子化学発光法)のためのキットであって、以下の構成要素:

40

第1抗体でコーティングされた0.5 mg/mL ~ 1 mg/mLの磁性粒子、0.04% (W/V) ~ 0.06% (W/V) の界面活性剤(前記界面活性剤は、任意にTween-20である)、及び8% (W/V) ~ 12% (W/V) のスクロースを含み、その溶剤がpH = 7.0 ~ 8.0を有するリン酸緩衝液であり、前記第1抗体のコーティング量は5  $\mu$ g ~ 20  $\mu$ g / mg磁性粒子である、M試薬と、

0.1 M ~ 1 Mの濃度、pH = 3.0 ~ 4.0を有するクエン酸溶液であるR1試薬、つまり試料処理溶液と、

第2抗体でコーティングされたアクリジニウムエステル、0.5% ~ 1%のカゼイン、及び0.5% ~ 1%のウシ血清アルブミンを含み、その溶剤がpH = 7.0 ~ 8.0を有するリン酸緩衝液であり、前記第2抗体のコーティング量は0.3  $\mu$ g ~ 0.9  $\mu$ g /  $\mu$

50

g アクリジニウムエステルである、R 2 試薬と、

予備励起溶液及び励起溶液と、

を含み、前記第 1 抗体及び前記第 2 抗体は、両者とも C 反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であり、前記第 1 抗体及び前記第 2 抗体は異なるエピトープに対する抗体である、キットを提供する。

【0022】

アクリジン化合物の発光メカニズム：アルカリ性過酸化水素溶液中で、アクリジン化合物の分子は過酸化水素イオンによって攻撃されて不安定なペルオキシ化合物を形成し、この化合物は  $CO_2$  と電子的に励起された N - メチルアクリドンとに分解し、N - メチルアクリドンは、基底状態に戻る際に 430 nm の最大発光波長を有する光子を放出する。T r i t o n X - 100、T w e e n - 20、C T A C (ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド、陽イオン性界面活性剤) 等の界面活性剤は、発光を増強することができる。

10

【0023】

本発明の好ましい実施の形態では、R 1 試薬は、0.5 M のクエン酸溶液 (pH = 3 ~ 3.5) である。

【0024】

更に好ましくは、R 1 試薬の pH は、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整される。

【0025】

一実施の形態では、前記クエン酸溶液の pH は、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整される。好ましくは、前記クエン酸溶液の pH は、3.0 ~ 3.5 であり、より好ましくは、前記クエン酸溶液の pH は、3.2、3.3、3.4、又は 3.5 である。

20

【0026】

更に別の実施の形態では、前記クエン酸の濃度は、0.5 mol / L である。

【0027】

更に好ましくは、M 試薬は、0.05% の T w e e n - 20 及び 10% のスクロースを含有する。

【0028】

更に好ましくは、M 試薬を調製する方法は、第 1 抗体及び磁性粒子を pH = 5.0 ~ 6.0 を有する 2 - モルホリンエタンスルホン酸緩衝液中で混合し、25 ~ 37 で 1 時間 ~ 3 時間コーティングし、pH = 8.0 ~ 9.0 を有する 0.1% ~ 0.5% (W / V) のウシ血清アルブミンリン酸緩衝液を添加して、1 時間 ~ 3 時間にわたりコーティングを停止させ、コーティングされた磁性粒子を分離し、pH = 7.0 ~ 8.0 を有するリン酸緩衝液中に分散させた後に、T w e e n - 20 及びスクロースを添加することで、M 試薬を得ることを含む。

30

【0029】

更に好ましくは、R 2 試薬を調製する方法は、第 2 抗体及びアクリジニウムエステルを pH = 8.0 ~ 9.0 を有するリン酸緩衝液中で混合し、25 ~ 37 で 1 時間 ~ 3 時間コーティングした後に、0.1% ~ 0.5% (W / V) のウシ血清アルブミンを含む pH = 8.0 ~ 9.0 を有する T r i s 緩衝液を添加して、1 時間 ~ 3 時間にわたりコーティングを停止させて、ストック溶液を得た後に、ストック溶液を pH = 7.0 ~ 8.0 を有するリン酸緩衝液で 1 : 100 ~ 500 に希釈することで、R 2 試薬を得ることを含む。

40

【0030】

更に好ましくは、予備励起溶液は、1% (W / V) の過酸化水素溶液である。

【0031】

さらに、励起溶液は 1 mol / L の水酸化ナトリウム溶液である。

【0032】

別の態様では、本発明は、C 反応性タンパク質の全域検出 (酵素的化学発光、すなわち、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼプレート型の化学発光法) の

50



ためのキットであって、以下の構成要素：

第1抗体のコーティング量が100 ng/ウェル～500 ng/ウェル（任意に、500 ng/ウェル）であり、コーティング緩衝液はpH = 7.0～8.0を有するリン酸緩衝液であり、ブロッキング溶液は、5%（W/V）～8%（W/V）のブロッキング血清又はブロッキングタンパク質（前記ブロッキング血清は、任意に仔ウシ血清である）及び0.02%（W/V）のアジ化ナトリウムを含む7.2～7.4のpHを有する50 mMのリン酸緩衝液である、第1抗体でコーティングされた、プレート型発光プレート（任意に、96ウェル、384ウェル、又は他のプレート型発光プレート）を含む平底の化学発光プレートと、

0.1 M～1 Mの濃度、pH = 3～4を有するクエン酸溶液である試料処理溶液と、

西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで標識された第2抗体を含み、1 mg/mLの第2抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで同じ割合で標識される標識量を有する、標識酵素溶液と、

発色溶液であって：前記標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼである場合に、前記発色溶液は発色溶液A及び発色溶液Bを含み、前記発色溶液Aは、過酸化水素（13.6 gの酢酸ナトリウム、1.6 gのクエン酸、0.3 mLの30%の過酸化水素であり、蒸留水を配合して500 mLとする）であり、前記発色溶液Bは、o-フェニレンジアミン（前記発色溶液Bの配合：0.2 gのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、0.95 gのクエン酸、50 mLのグリセロール、9.15 gのテトラメチルベンジジンであり、蒸留水を配合して500 mLとする）であり；前記標識酵素が、アルカリホスファターゼである場合に、前記発色溶液は、市販の試薬（製品番号180309-01、Xiamen Boson Biotechnology Co., Ltd.社から購入）である；発色溶液と、

【0033】

検出：自動式化学発光分析装置（Yantai Add care Biotechnology Co., Ltd.社から購入）を使用して、発光値を読み取る。

【0034】

上述の第1抗体及び第2抗体は、両者ともC反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体である。

【0035】

本発明の好ましい実施の形態では、試料処理溶液は、3～3.5のpHを有する0.5 Mのクエン酸溶液である。

【0036】

更に好ましくは、試料処理溶液のpHは、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整される。

【0037】

一実施の形態では、前記クエン酸溶液のpHは、リン酸水素二ナトリウム十二水和物によって調整される。好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、3.0～3.5であり、より好ましくは、前記クエン酸溶液のpHは、3.2、3.3、3.4、又は3.5である。

【0038】

更に別の実施の形態では、前記クエン酸の濃度は、0.5 mol/Lである。

【0039】

更に好ましくは、第1抗体でコーティングされた平底型の化学発光プレートは、5%～8%の仔ウシ血清及び0.02%のアジ化ナトリウムを含む。

【0040】

更に好ましくは、第1抗体でコーティングされた平底型の化学発光プレートを作製する方法は、コーティングされる第1抗体を、コーティング緩衝液としてのpH = 7.0～8.0を有するリン酸緩衝液で5 µg/mLまで、すなわち500 ng/ウェルに希釈し、発光プレートに1ウェル当たり100 µLを加え、37 °Cで2時間又は4 °Cで一晩インキュベートし、コーティング緩衝液を注ぎ出し、200 µLのブロッキング溶液（5%（W

10

20

30

40

50

／V) ~ 8% (W/V) の仔ウシ血清及び 0.02% (W/V) のアジ化ナトリウム) を使用して、37 で2時間インキュベートし、ウェル内の液体を注ぎ出し、プレートを乾燥させ、真空下にアルミニウムフィルムで密封し、乾燥した場所で4 にて貯蔵することを含む。

【0041】

更に好ましくは、標識酵素溶液を調製する方法は、第2抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼとを1:1の比で混合して標識し、pH = 9.6を有する炭酸緩衝液中で透析し、透析緩衝液を4時間毎に三度にわたって交換し、酵素標識された第2抗体を収集してストック溶液とした後に、ストック溶液を市販の酵素希釈液で1:500に希釈することで、標識酵素溶液を得ることを含む。

10

【0042】

更に好ましくは、標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼである場合に、発色溶液Aは過酸化水素であり、発色溶液Bはo-フェニレンジアミンであり、標識酵素がアルカリホスファターゼである場合に、発色溶液は市販の試薬である。

【0043】

さらに、内容物は自動式化学発光分析装置によって直接測定される。

【0044】

本発明の有益な効果は、本発明のキットの検出範囲が、本発明のキットの反応過程の間に試料処理溶液(0.1M ~ 1Mの濃度、pH 3 ~ 4を有するクエン酸溶液)を一段階で加えた後に0.02mg/L ~ 100mg/Lであり得ることであり、こうして、該キットはC反応性タンパク質の全域検出の要件を満たすことができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】組み合わせ検出用の較正物質の曲線である、組み合わせられた用量反応曲線を示す図である。左の画像は10C11-7D9についての組み合わせられた用量反応曲線を表し、右の画像は10C11-14D9-2についての組み合わせられた用量反応曲線を表す。

【図2】試料値とバックグラウンド値との間の相関を評価する組み合わせ検出結果の相関分析を示す図である。左の画像は10C11-7D9についての組み合わせ検出結果の相関分析を表し、右の画像は10C11-14D9-2についての組み合わせ検出結果の相関分析を表す。

30

【発明を実施するための形態】

【0046】

本発明の技術的な解決手段を、以下で特定の実施形態によって更に例示して説明する。

【0047】

試薬は分析グレードであり、特段の指定がない限り、Xiamen Xuong Chemical Co., Ltd.社から購入した。

【0048】

一実施形態では、本発明のC反応性タンパク質の全域検出(直接的化学発光、すなわち、磁性粒子化学発光法)のためのキットは、以下の構成要素:

M試薬(第1抗体でコーティングされた0.8mg/mLの磁性粒子、0.05%のTween-20及び10%のスクロースを含み、その溶剤はpH = 7.5を有するリン酸緩衝液であり、ここで、第1抗体のコーティング量は12µg/µg磁性粒子であり、磁性粒子はThermo Fisher Scientific社から購入され、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>コアを有するナノスケールの超常磁性粒子であった。M試薬を調製する方法は、第1抗体及び磁性粒子をpH = 5.5を有する2-モルホリンエタンスルホン酸緩衝液中で混合し、32 で1時間~3時間コーティングし、0.3%のウシ血清アルブミンを含むpH = 8.5を有するリン酸緩衝溶液を添加して、2時間にわたりコーティングを停止させ、コーティングされた磁性粒子を分離し、pH = 7.5を有するリン酸緩衝溶液中に分散させた後に、Tween-20及びスクロースを添加することで、M試薬を得ることを含んでいた)と;

40

R1試薬(リン酸水素二ナトリウム十二水和物で調整された、pH = 3.2、0.5M

50

の濃度を有するクエン酸溶液)と;

R 2 試薬 (第 2 抗体でコーティングされたアクリジニウムエステル、0.8%のカゼイン、及び0.8%のウシ血清アルブミンを含み、その溶剤はpH = 7.5を有するリン酸緩衝液であり、第 2 抗体のコーティング量は $0.3 \mu\text{g} \sim 0.9 \mu\text{g} / \mu\text{g}$ アクリジニウムエステルであった。R 2 試薬を調製する方法は、第 2 抗体及びアクリジニウムエステルをpH = 8.5を有するリン酸緩衝液中で混合し、37 で1時間~3時間コーティングし、0.3%のウシ血清アルブミンを含むpH = 8.5を有するT r i s 緩衝溶液を添加して、2時間にわたりコーティングを停止させ、ストック溶液を得て、ストック溶液をpH = 7.5を有するリン酸緩衝液で1:300に希釈することで、R 2 試薬を得ることを含んでいた)と;

10

予備励起溶液 (1% (W/V) の過酸化水素溶液)と;

励起溶液 (1 mol/L の水酸化ナトリウム溶液)と;

を含み、上述の第 1 抗体及び第 2 抗体は、C 反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であった。第 1 抗体は 10 C 1 1 であり、第 2 抗体は 14 D 9 - 2 であり、その両者とも Xiamen Innova Biotech Co., Ltd. 社から購入した。

【0049】

C 反応性タンパク質の全域検出のための上記キットを使用する検出方法は、以下の工程:

(1) 20  $\mu\text{L}$  の試料 (試料は血清又は抗原標準曲線を作成するための標準 C 反応性タンパク質) を採取し、100  $\mu\text{L}$  の R 1 試薬に添加して試料を処理する工程と、

(2) 次いで、50  $\mu\text{L}$  の M 試薬を添加し、一緒に 15 分間インキュベートする工程と、

20

(3) 工程 (2) の後に、0.05% の T w e e n - 20 を含むリン酸緩衝液で洗浄を行い、次いで、50  $\mu\text{L}$  の R 2 試薬を添加して 10 分間インキュベートする工程と、

(4) 工程 (3) の後に、0.05% (W/V) ~ 0.08% (W/V) の T w e e n - 20 を含むリン酸緩衝液で洗浄を行い、100  $\mu\text{L}$  の予備励起溶液を添加して、予備励起を行う工程と、

(5) 予備励起溶液を除去し、100  $\mu\text{L}$  の励起溶液を添加して、励起及び検出を行う工程と、

を含んでいた。

【0050】

別の実施形態では、本発明の C 反応性タンパク質の全域検出 (酵素的化学発光、すなわち、西洋ワサビペルオキシダーゼプレート型の化学発光法) のためのキットは、以下の構成要素:

30

発光プレートのコーティング源 (luminescent plate coating source) (96 ウェルプレートの発光プレートを含み、ここで、第 1 抗体のコーティング量は、500 ng / ウェルであり、コーティング緩衝液は、pH = 7.5 を有するリン酸緩衝液であり、ブロッキング溶液は、6% の仔ウシ血清及び 0.02% のアジ化ナトリウムを含む 7.3 の pH を有する 50 mM のリン酸緩衝液であった。発光プレートのコーティング源を調製する方法は、第 1 抗体を、コーティング緩衝液としての pH = 7.5 を有するリン酸緩衝液で 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (すなわち、500 ng / ウェル) に希釈し、発光プレートに 1 ウェル当たり 100  $\mu\text{L}$  を加え、37 で 2 時間又は 4 で一晩インキュベートし、コーティング緩衝液を注ぎ出し、6% の仔ウシ血清及び 0.02% のアジ化ナトリウムを含む 200  $\mu\text{L}$  のブロッキング溶液を使用して、37 で 2 時間インキュベートし、ウェル内の液体を注ぎ出し、プレートを乾燥させ、真空下にアルミニウムフィルムで密封し、乾燥した場所で 4 にて貯蔵することを含んでいた)と;

40

試料処理溶液 (リン酸水素二ナトリウム十二水和物で調整された、pH = 3.2、0.5 M の濃度を有するクエン酸溶液である)と;

標識酵素溶液 (西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで標識された第 2 抗体を含み、1 mg / mL の第 2 抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼで同じ割合で標識される標識量を有する。標識酵素溶液を調製する方法は、第 2 抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼとを 1:1 の比で混

50

合して標識し、 $pH = 9.6$ の炭酸緩衝液中で透析し、透析緩衝液を4時間毎に1回、三度にわたって交換し、酵素標識第2抗体を収集してストック溶液を得た後に、ストック溶液を市販の酵素希釈液（カタログ番号ED-11、Beijing Yantai Biopharmaceutical Co., Ltd.社から購入）で1:500に希釈することで、標識酵素溶液を得ることを含んでいた）と；

発色溶液（標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼであった場合に、発色溶液Aは過酸化水素であり、発色溶液Bはo-フェニレンジアミンであり、標識酵素がアルカリホスファターゼであった場合に、発色溶液は購入した試薬（Xiamen Boson Biotechnology Co., Ltd.社から購入）であった）と；

を含んでいた。

10

#### 【0051】

検出：自動式化学発光分析装置（Yantai Add care Biotechnology Co., Ltd.社から購入）を使用して、発光値を読み取った。

#### 【0052】

上述の第1抗体及び第2抗体は、C反応性タンパク質と特異的に反応することができるモノクローナル抗体であった。第1抗体は10C11であり、第2抗体は14D9-2であり、その両者ともXiamen Innova Biotech Co., Ltd.社から購入した。

#### 【0053】

C反応性タンパク質の全域検出のための上述のキットを使用する検出方法は、以下の工程：

20

(1) 20  $\mu L$ の試料を採取し、100  $\mu L$ の試料処理溶液に添加して試料を処理する工程と、

(2) 次いで、発光プレートのコーティング源に添加し、一緒に37 で40分間インキュベートする工程と、

(3) 工程(2)の後に、0.05%のTween-20を含むリン酸緩衝液で洗浄を5回行い、発光プレートを乾くまで上下逆さまにし、次いで、100  $\mu L$ の標識酵素溶液を添加して37 で40分間インキュベートする工程と、

(4) 工程(3)の後に、0.05%のTween-20を含むリン酸緩衝液で洗浄を5回行い、発光プレートを乾くまで上下逆さまにし、標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼであった場合に、50  $\mu L$ の発色溶液A及び50  $\mu L$ の発色溶液Bを添加し、室温で5分間反応させ、標識酵素がアルカリホスファターゼであった場合に、100  $\mu L$ の発色溶液（Xiamen Boson Biotechnology Co., Ltd.社から購入）を添加し、室温で5分間反応させ、最後に、自動式化学発光分析装置を使用して、検出を実行して、発光値を読み取る工程と、

30

を含んでいた。

#### 【実施例】

#### 【0054】

##### 実施例1

種々のpH値の0.1Mのクエン酸及び0.1Mのグリシンを、それぞれ処理溶液として選択し、酵素イムノアッセイシステム（pH範囲は2~6であった）に添加して、勾配希釈されたC反応性タンパク質抗原を評価した。相対的なOD値を以下の表1及び表2に示した。

40

#### 【0055】

50

## 【表 1】

表 1：C 反応性タンパク質の検出に対する種々の pH 値を有する 0.1 M のクエン酸処理溶液の影響

濃度 (mg/L)	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6
100.00	0.4090	1.4410	3.7590	0.7350	1.0130
25.00	0.5760	1.3740	3.7620	1.0160	1.2900
6.25	0.1510	0.8930	3.7590	1.3460	1.5250
1.56	0.0430	0.3720	3.7760	2.4110	2.8010
0.39	0.0120	0.0960	3.0050	1.5960	3.2060
0.10	0.0060	0.0240	0.9480	0.8620	2.2130
0.02	0.0100	0.0110	0.2560	0.0640	0.2760

10

## 【0056】

## 【表 2】

表 2：C 反応性タンパク質の検出に対する種々の pH 値を有する 0.1 M のグリシン処理溶液の影響

濃度 (mg/L)	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6
100	3.7910	3.7500	2.6820	3.2820	1.7660
25	2.6980	3.5760	2.3680	2.9670	2.1690
6.25	0.5270	3.0060	2.5510	3.2550	2.3350
1.56	0.1100	0.6840	2.6910	3.3620	2.8260
0.39	0.0330	0.1780	1.1610	1.7100	1.8980
0.1	0.0190	0.0440	0.5440	0.7650	0.6870
0.02	0.0140	0.0150	0.1090	0.1850	0.0880

20

## 【0057】

表 1 及び表 2 は、処理溶液が種々の pH 値（リン酸水素二ナトリウム十二水和物で種々の pH 値に調整）を有する 0.1 M のクエン酸であった場合の、及び、処理溶液が種々の pH 値を有する 0.1 M のグリシンであった場合の、酵素イムノアッセイシステムにおける C 反応性タンパク質の全域検出の追跡抗原の検出結果を示した。それらの結果により、pH 3 ~ 4 の間で検出において明らかな傾向が存在するのに対して、他の pH 範囲は理想的ではないことが示された。表 1 及び表 2 から、処理溶液の処理 pH として pH 3 ~ 4 の範囲を選択した場合に、試料検出は高から低への傾向を示し、これは他の pH 範囲よりも優れていることが分かった。しかしながら、酵素イムノアッセイシステムの線幅は全域検出には十分ではなかったため、化学発光プラットフォームの探求のために最適な pH 範囲は 3 ~ 4 であると考えられ、後続の実験にはクエン酸を使用した。

30

## 【0058】

## 実施例 2

実施例 1 に基づいて、クエン酸濃度（0.1 M、0.5 M、1 M のクエン酸濃度）及び pH 範囲（pH 3 及び pH 3.5、pH 4）の改善及び調整を行った。酵素イムノアッセイシステムの相対的な線幅は比較的狭く、好ましい溶液を化学発光プラットフォームで調整した。種々のモル濃度及び pH 3 ~ 4 を有するクエン酸溶液を処理溶液として選択し、化学発光検出システム（すなわち、磁性粒子化学発光プラットフォーム）に添加して、勾配希釈された C 反応性タンパク質抗原を評価した。種々の pH 及び種々の濃度を有するクエン酸を使用することによって、勾配希釈された C 反応性タンパク質抗原を処理し、磁性粒子化学発光プラットフォーム又は酵素的な西洋ワサビペルオキシダーゼ化学発光プラットフォームを検出に使用して検出結果を得た。得られた結果を標準曲線とした。次に、（廈門中山附属医院（Xiamen Zhongshan Affiliated Hospital）及び西京医院（Xining

40

50

Hospital) から ) 収集された 18 個の臨床試料の相対発光強度を、個別に以下の表 3 及び表 4 に示した。

【 0 0 5 9 】

【表 3】

表 3 : C 反応性タンパク質の検出に対する種々の pH 値及び種々の濃度を有するクエン酸処理溶液の影響の相関 (磁性粒子化学発光システム)

クエン酸濃度 (mol/L)		0.1			0.5			1		
pH 値		3	3.5	4	3	3.5	4	3	3.5	4
中山医院 (Zhongshan Hospital) の血清シリ アル番号	バックグ ラウンド 値 (mg/L)	検出値 (mg/L)								
1257	46.70	58.17	50.68	19.67	38.70	49.77	96.64	65.72	73.63	163.59
1203	54.30	67.65	62.15	25.76	37.36	57.59	98.96	95.94	44.42	319.43
1444	170.00	106.50	120.46	37.40	87.46	137.30	189.87	273.05	209.85	79.81
1315	183.00	144.27	146.56	44.94	140.15	181.43	257.77	373.53	470.72	342.03
1432	136.00	78.22	89.66	22.38	76.33	102.71	132.89	182.84	200.50	88.86
1333	110.00	99.11	100.68	45.29	62.90	109.99	186.08	165.51	65.75	186.25
1478	70.30	46.69	56.99	10.28	41.24	47.21	83.52	65.98	132.74	152.31
1233	62.30	53.84	60.32	16.85	44.19	54.97	102.16	88.10	104.26	154.66
1207	84.80	97.89	75.66	17.15	79.43	69.73	113.89	107.25	120.61	91.72
1210	40.10	43.45	43.21	10.23	29.06	36.09	71.60	46.09	63.54	67.85
1231	36.90	60.52	59.45	45.53	37.01	49.67	99.61	77.69	17.84	193.95
1338	33.70	39.83	39.97	6.90	30.62	35.97	69.69	47.56	5.99	124.40
1223	24.20	30.60	32.36	3.34	23.25	31.46	82.90	40.27	6.61	72.51
1230	29.00	28.35	32.70	12.25	22.82	26.86	60.01	38.28	27.95	106.24
1349	16.80	19.46	24.65	8.17	15.58	19.75	56.57	29.44	12.92	88.97
1317	12.10	16.12	20.92	12.24	12.03	16.52	37.35	20.29	16.66	40.57
1316	5.40	9.94	6.74	12.49	6.26	7.82	19.74	18.29	23.27	2.77
1324	9.10	10.52	11.43	17.12	8.79	7.84	24.26	13.17	19.98	39.97
中山医院の 血清シリ アル番号	バックグ ラウンド 値 (Log10)	検出値 (Log10)								
1257	1.67	1.76	1.70	1.29	1.59	1.70	1.99	1.82	1.87	2.21
1203	1.73	1.83	1.79	1.41	1.57	1.76	2.00	1.98	1.65	2.50
1444	2.23	2.03	2.08	1.57	1.94	2.14	2.28	2.44	2.32	1.90
1315	2.26	2.16	2.17	1.65	2.15	2.26	2.41	2.57	2.67	2.53
1432	2.13	1.89	1.95	1.35	1.88	2.01	2.12	2.26	2.30	1.95
1333	2.04	2.00	2.00	1.66	1.80	2.04	2.27	2.22	1.82	2.27
1478	1.85	1.67	1.76	1.01	1.62	1.67	1.92	1.82	2.12	2.18
1233	1.79	1.73	1.78	1.23	1.65	1.74	2.01	1.94	2.02	2.19
1207	1.93	1.99	1.88	1.23	1.90	1.84	2.06	2.03	2.08	1.96
1210	1.60	1.64	1.64	1.01	1.46	1.56	1.85	1.66	1.80	1.83
1231	1.57	1.78	1.77	1.66	1.57	1.70	2.00	1.89	1.25	2.29
1338	1.53	1.60	1.60	0.84	1.49	1.56	1.84	1.68	0.78	2.09
1223	1.38	1.49	1.51	0.52	1.37	1.50	1.92	1.61	0.82	1.86
1230	1.46	1.45	1.51	1.09	1.36	1.43	1.78	1.58	1.45	2.03
1349	1.23	1.29	1.39	0.91	1.19	1.30	1.75	1.47	1.11	1.95
1317	1.08	1.21	1.32	1.09	1.08	1.22	1.57	1.31	1.22	1.61
1316	0.73	1.00	0.83	1.10	0.80	0.89	1.30	1.26	1.37	0.44
1324	0.96	1.02	1.06	1.23	0.94	0.89	1.38	1.12	1.30	1.60
r <sup>2</sup>		0.9304	0.9586	0.2907	0.9692	0.9615	0.9179	0.9251	0.5942	0.4972

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4 : C 反応性タンパク質の検出に対する種々の pH 値及び種々の濃度を有するクエン酸処理溶液の影響の相関 (酵素的な西洋ワサビペルオキシダーゼ化学発光システム)

クエン酸濃度(mol/L)		0.1			0.5			1		
pH 値		3	3.5	4	3	3.5	4	3	3.5	4
中山医院の血清シリアル番号	バックグラウンド値(mg/L)	検出値(mg/L)								
1242	20	27.77	139.53	37.45	37.13	17.22	140.83	82.22	92.16	9.14
1351	5	34.19	163.47	20.06	13.03	3.15	53.52	25.86	34.85	5.10
1402	3.8	15.56	89.20	21.63	9.55	3.51	37.49	24.61	31.38	1.56
1417	25.8	59.31	289.25	30.77	54.35	15.76	221.95	73.38	110.76	7.75
1408	33.2	59.31	348.65	43.69	66.34	24.84	136.92	133.23	151.15	10.03
1341	38.1	76.55	501.37	37.72	71.94	34.57	68.66	159.38	352.94	10.32
1255	45.7	64.17	234.53	42.15	83.93	39.37	137.79	195.34	231.96	11.19
1247	55.6	51.16	142.44	23.93	91.89	27.36	121.47	97.02	82.81	11.30
1276	62.3	82.81	302.86	22.94	94.97	55.71	92.95	206.66	386.77	12.87
1365	65.4	64.67	406.95	34.06	113.07	47.36	129.91	303.71	240.53	12.23
1404	140	104.87	405.49	87.16	209.22	73.61	132.60	239.11	264.62	15.46
1246	13.2	27.49	125.45	27.00	19.99	5.67	125.97	54.08	60.48	9.04
1239	14.6	42.23	125.20	21.44	20.84	8.52	130.21	52.57	123.92	6.15
1382	133	85.53	592.49	70.10	155.30	90.13	100.33	424.02	506.85	19.91
1393	136	83.84	444.01	32.82	211.47	69.50	92.66	163.08	187.86	18.68
1484	70.3	59.54	970.42	102.66	105.58	43.79	85.37	421.22	383.87	21.00
1277	18.4	32.57	91.97	56.87	29.44	12.78	168.98	110.16	115.56	8.94
1493	67.7	72.98	336.93	307.01	104.80	59.61	74.96	393.77	340.69	17.50
中山医院の血清シリアル番号	バックグラウンド値(Log10)	検出値(Log10)								
1242	1.30	1.44	2.14	1.57	1.57	1.24	2.15	1.91	1.96	0.96
1351	0.70	1.53	2.21	1.30	1.11	0.50	1.73	1.41	1.54	0.71
1402	0.58	1.19	1.95	1.34	0.98	0.54	1.57	1.39	1.50	0.19
1417	1.41	1.77	2.46	1.49	1.74	1.20	2.35	1.87	2.04	0.89
1408	1.52	1.77	2.54	1.64	1.82	1.40	2.14	2.12	2.18	1.00
1341	1.58	1.88	2.70	1.58	1.86	1.54	1.84	2.20	2.55	1.01
1255	1.66	1.81	2.37	1.62	1.92	1.60	2.14	2.29	2.37	1.05
1247	1.75	1.71	2.15	1.38	1.96	1.44	2.08	1.99	1.92	1.05
1276	1.79	1.92	2.48	1.36	1.98	1.75	1.97	2.32	2.59	1.11
1365	1.82	1.81	2.61	1.53	2.05	1.68	2.11	2.48	2.38	1.09
1404	2.15	2.02	2.61	1.94	2.32	1.87	2.12	2.38	2.42	1.19
1246	1.12	1.44	2.10	1.43	1.30	0.75	2.10	1.73	1.78	0.96
1239	1.16	1.63	2.10	1.33	1.32	0.93	2.11	1.72	2.09	0.79
1382	2.12	1.93	2.77	1.85	2.19	1.95	2.00	2.63	2.70	1.30
1393	2.13	1.92	2.65	1.52	2.33	1.84	1.97	2.21	2.27	1.27
1484	1.85	1.77	2.99	2.01	2.02	1.64	1.93	2.62	2.58	1.32
1277	1.26	1.51	1.96	1.75	1.47	1.11	2.23	2.04	2.06	0.95
1493	1.83	1.86	2.53	2.49	2.02	1.78	1.87	2.60	2.53	1.24
r <sup>2</sup>		0.7954	0.4898	0.2703	0.9759	0.9495	0.1002	0.8034	0.7264	0.8121

## 【 0 0 6 1 】

表 3 及び表 4 は、3、3.5、及び 4 の 3 つの pH 範囲に固定し、種々のクエン酸濃度 (0.1 M、0.5 M、及び 1 M) が使用される場合に、発光プラットフォームを使用して、全域 C 反応性タンパク質の追跡抗原を検出し、18 個の試料を評価することを示した。0.5 M の濃度及び pH 3 ~ 3.5 を有するクエン酸がより良好な結果を示すことが判明した。表 3 から、上記濃度及び pH の下では、血清間の相関は pH 3 から 3.5 の間で比較的良いであることが分かり、0.5 M のクエン酸が好ましく、0.5 M のクエン酸の場合に pH 3 ~ 3.5 の間で変動が比較的小さかったため、比較的安定しているとみなされた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

## 実施例 3

0.5 Mのクエン酸を選択して、pH濃度を更に最適化して精査した（pH 2.8～4）。種々のpHの0.5 Mのクエン酸を処理溶液として使用して、勾配希釈されたC反応性タンパク質抗原を処理し、磁性粒子化学発光プラットフォーム又は酵素的な西洋ワサビペルオキシダーゼ化学発光プラットフォームを検出に使用して、検出結果を得た後に、その結果を標準曲線とした。次いで、収集された18個の臨床試料を検出し、検出結果を表5及び表6に示した。

## 【 0 0 6 3 】

## 【表 5】

表5：C反応性タンパク質の検出に対する種々のpHを有する0.5 Mのクエン酸処理溶液の影響の相関（磁性粒子化学発光システム）

クエン酸濃度(mol/L)		0.5								
pH値		2.8	3.0	3.2	3.4	3.5	3.6	3.8	4	
中山医院の血清シリアル番号	バックグラウンド値(mg/L)	検出値(mg/L)								
	1257	46.70	41.51	38.70	34.66	34.23	49.77	39.04	39.02	96.64
	1203	54.30	52.57	37.36	42.20	37.53	57.59	51.86	47.60	98.96
	1444	170.00	98.97	87.46	86.84	72.81	137.30	78.51	64.71	189.87
	1315	183.00	180.00	140.15	136.04	110.94	181.43	113.01	81.42	257.77
	1432	136.00	75.33	76.33	72.26	66.97	102.71	74.05	58.84	132.89
	1333	110.00	78.86	62.90	63.58	58.17	109.99	69.18	62.38	186.08
	1478	70.30	51.60	41.24	39.64	39.12	47.21	40.94	44.16	83.52
	1233	62.30	44.84	44.19	41.87	43.44	54.97	45.01	39.10	102.16
	1207	84.80	101.81	79.43	71.45	55.36	69.73	54.71	46.83	113.89
	1210	40.10	29.66	29.06	27.17	26.77	36.09	37.45	36.37	71.60
	1231	36.90	45.18	37.01	38.04	33.17	49.67	39.54	42.19	99.61
	1338	33.70	32.44	30.62	27.45	26.63	35.97	38.25	34.35	69.69
	1223	24.20	23.28	23.25	21.48	22.13	31.46	20.15	37.00	82.90
	1230	29.00	25.81	22.82	20.91	26.46	26.86	29.64	34.47	60.01
	1349	16.80	15.64	15.58	16.75	17.43	19.75	23.79	30.96	56.57
	1317	12.10	10.63	12.03	13.21	15.00	16.52	21.95	23.37	37.35
	1316	5.40	5.91	6.26	7.11	8.13	7.82	11.94	13.43	19.74
1324	9.10	8.11	8.79	9.96	10.39	7.84	14.53	17.05	24.26	
中山医院の血清シリアル番号	バックグラウンド値(Log10)	検出値(Log10)								
	1257	1.67	1.62	1.59	1.54	1.53	1.70	1.59	1.59	1.99
	1203	1.73	1.72	1.57	1.63	1.57	1.76	1.71	1.68	2.00
	1444	2.23	2.00	1.94	1.94	1.86	2.14	1.89	1.81	2.28
	1315	2.26	2.26	2.15	2.13	2.05	2.26	2.05	1.91	2.41
	1432	2.13	1.88	1.88	1.86	1.83	2.01	1.87	1.77	2.12
	1333	2.04	1.90	1.80	1.80	1.76	2.04	1.84	1.80	2.27
	1478	1.85	1.71	1.62	1.60	1.59	1.67	1.61	1.65	1.92
	1233	1.79	1.65	1.65	1.62	1.64	1.74	1.65	1.59	2.01
	1207	1.93	2.01	1.90	1.85	1.74	1.84	1.74	1.67	2.06
	1210	1.60	1.47	1.46	1.43	1.43	1.56	1.57	1.56	1.85
	1231	1.57	1.65	1.57	1.58	1.52	1.70	1.60	1.63	2.00
	1338	1.53	1.51	1.49	1.44	1.43	1.56	1.58	1.54	1.84
	1223	1.38	1.37	1.37	1.33	1.35	1.50	1.30	1.57	1.92
	1230	1.46	1.41	1.36	1.32	1.42	1.43	1.47	1.54	1.78
	1349	1.23	1.19	1.19	1.22	1.24	1.30	1.38	1.49	1.75
	1317	1.08	1.03	1.08	1.12	1.18	1.22	1.34	1.37	1.57
	1316	0.73	0.77	0.80	0.85	0.91	0.89	1.08	1.13	1.30
1324	0.96	0.91	0.94	1.00	1.02	0.89	1.16	1.23	1.38	
r <sup>2</sup>		0.9547	0.9692	0.9672	0.9786	0.9615	0.9471	0.9319	0.9179	

10

20

30

40

50



【 0 0 6 4 】

【 表 6 】

表 6 : C 反応性タンパク質の検出に対する種々の pH を有する 0.5 M のクエン酸処理溶液の影響の相関 (酵素的な西洋ワサビペルオキシダーゼ化学発光システム)

クエン酸濃度 (mol/L)		0.5							
pH 値		2.8	3.0	3.2	3.4	3.5	3.6	3.8	4
中山医院の血清シリアル番号	バックグラウンド値 (mg/L)	検出値 (mg/L)							
1445	170	17.65	65.14	122.17	118.01	101.83	133.13	87.17	28.26
1449	140	18.45	58.83	120.32	138.13	139.69	137.80	113.82	22.61
1283	114	13.50	33.13	74.65	125.50	87.12	111.72	150.29	29.15
1238	114	18.20	53.46	94.57	157.07	130.74	136.98	174.20	28.40
1465	73.1	15.85	31.78	59.66	115.18	104.39	119.16	136.63	23.71
1366	65.4	8.13	23.87	45.86	83.41	54.86	58.97	86.38	22.05
1303	58.8	9.23	24.63	55.07	88.79	57.88	79.32	52.87	12.73
1487	52.2	5.90	15.02	33.21	73.56	58.32	83.29	105.08	30.43
1345	42.3	3.41	10.48	18.21	33.29	38.14	37.83	65.16	28.49
1454	33.2	3.67	13.92	25.27	54.27	38.88	43.03	57.80	36.47
1461	25.8	2.74	9.24	20.37	37.56	28.74	50.86	69.94	32.99
1394	18.8	3.07	11.64	20.62	42.19	26.63	33.52	82.36	33.42
1470	9.2	1.70	4.39	8.60	14.50	15.27	17.11	32.14	41.04
1407	8.1	0.39	1.94	7.01	8.82	6.54	7.64	10.36	37.76
1370	5.9	0.36	1.89	4.58	11.98	6.72	6.71	6.75	27.83
中山医院の血清シリアル番号	バックグラウンド値 (Log10)	検出値 (Log10)							
1445	2.23	1.25	1.81	2.09	2.07	2.01	2.12	1.94	1.45
1449	2.15	1.27	1.77	2.08	2.14	2.15	2.14	2.06	1.35
1283	2.06	1.13	1.52	1.87	2.10	1.94	2.05	2.18	1.46
1238	2.06	1.26	1.73	1.98	2.20	2.12	2.14	2.24	1.45
1465	1.86	1.20	1.50	1.78	2.06	2.02	2.08	2.14	1.37
1366	1.82	0.91	1.38	1.66	1.92	1.74	1.77	1.94	1.34
1303	1.77	0.97	1.39	1.74	1.95	1.76	1.90	1.72	1.10
1487	1.72	0.77	1.18	1.52	1.87	1.77	1.92	2.02	1.48
1345	1.63	0.53	1.02	1.26	1.52	1.58	1.58	1.81	1.45
1454	1.52	0.56	1.14	1.40	1.73	1.59	1.63	1.76	1.56
1461	1.41	0.44	0.97	1.31	1.57	1.46	1.71	1.84	1.52
1394	1.27	0.49	1.07	1.31	1.63	1.43	1.53	1.92	1.52
1470	0.96	0.23	0.64	0.93	1.16	1.18	1.23	1.51	1.61
1407	0.91	-0.41	0.29	0.85	0.95	0.82	0.88	1.02	1.58
1370	0.77	-0.44	0.28	0.66	1.08	0.83	0.83	0.83	1.44
r <sup>2</sup>		0.9206	0.9468	0.9591	0.9154	0.9401	0.9204	0.7299	0.2197

【 0 0 6 5 】

表 5 及び表 6 は、事前に調査された最適なクエン酸濃度が使用される場合に、pH 濃度を慎重に調査し、リン酸水素二ナトリウム十二水和物を選択して、種々の pH 値 (pH 2.8 ~ 4 を含む) を調整し、発光プラットフォームを使用して、全域 C 反応性タンパク質の追跡抗原を検出することを示した。pH (3.0 ~ 3.5) の試験試料がより良好な相関を示し、ここで、磁性粒子化学発光プラットフォームは、pH 3.4 で最良であり、最良の線形検出結果を示すことが判明した。

【 0 0 6 6 】

上記の pH 範囲で、表 5 の結果と組み合わせると、pH は 3.0 ~ 3.5 の範囲内であり、C 反応性タンパク質のシングル血清は 0.96 を上回る線形相関 r<sup>2</sup> を有し、最終的な好ましい条件は pH (3.4) を有する 0.5 M のクエン酸であり、18 個の血清試料の検出における相関は 0.97 を上回った。表 6 の結果から、酵素的な西洋ワサビペルオ

キシダーゼ発光プラットフォームは、pH 3.2 で最良の線形検出結果を示した。15 個の血清試料の相関は 0.959 を上回った。

【0067】

#### 実施例 4

最適化された検出システムを使用して、勾配希釈された C 反応性タンパク質抗原を検出して、標準曲線を作成し、その後に、収集された 47 個の臨床試料を検出し、標準曲線を介してそれらの濃度値を計算し、臨床的バックグラウンド値に対する相関評価を行い、結果を以下の表 7 に示した（磁性粒子化学発光プラットフォーム）：

【0068】

表 7

10

20

30

40

50

【表 7】

中山医院の 血清シリアル番号	バックグラウンド値 (mg/L)	Log10	検出値(mg/L)	Log10
1	10.59	1.02	10.99	1.04
2	16.95	1.23	14.88	1.17
3	107.75	2.03	112.29	2.05
4	23.77	1.38	16.99	1.23
5	11.88	1.07	12.97	1.11
6	37.34	1.57	27.23	1.44
7	14.8	1.17	15.41	1.19
8	65.23	1.81	71.81	1.86
9	64.93	1.81	49.28	1.69
10	135.45	2.13	225.39	2.35
11	38.85	1.59	25.73	1.41
12	81.04	1.91	102.13	2.01
13	37.34	1.57	21.58	1.33
14	15.4	1.19	11.87	1.07
15	10.88	1.04	12.81	1.11
16	15.09	1.18	16.10	1.21
17	6.65	0.82	6.85	0.84
18	9	0.95	8.20	0.91
19	69.29	1.84	40.24	1.60
20	85.55	1.93	90.29	1.96
21	9.42	0.97	10.08	1.00
22	14.11	1.15	15.54	1.19
23	33	1.52	23.67	1.37
24	50.97	1.71	35.66	1.55
25	28.42	1.45	28.40	1.45
西京医院の血清シ リアル番号				
1	1.5	0.18	2.11	0.32
2	1.32	0.12	2.29	0.36
3	4.24	0.63	5.57	0.75
4	0.285	-0.55	0.66	-0.18
5	0.737	-0.13	1.18	0.07
6	5.62	0.75	6.60	0.82
7	3.63	0.56	4.65	0.67
8	1.37	0.14	2.44	0.39
9	1.39	0.14	2.03	0.31
10	37	1.57	21.02	1.32
11	1.4	0.15	2.49	0.40
12	0.159	-0.80	0.34	-0.46
13	2.87	0.46	3.94	0.60
14	44.3	1.65	31.67	1.50
15	45	1.65	26.10	1.42
16	17.4	1.24	16.19	1.21
17	60.1	1.78	30.51	1.48
18	3.02	0.48	5.27	0.72
19	0.665	-0.18	1.33	0.12
20	15.4	1.19	12.34	1.09
21	0.381	-0.42	0.93	-0.03
22	1.81	0.26	2.87	0.46

## 【0069】

相関評価によって、これら2つの相関式は  $y = 0.8151x + 0.2179$  であり、相関係数  $r^2 = 0.9692$  であったことから、これら2つが良好な相関を有したことが示される。

## 【0070】

最適化された検出システムを使用して、勾配希釈されたC反応性タンパク質抗原を検出して、標準曲線を作成し、その後に、収集された73個の臨床試料を検出し、標準曲線を介してそれらの濃度値を計算し、臨床的バックグラウンド値に対する相関評価を行い、結果を以下の表8に示した(酵素的な西洋ワサビペルオキシダーゼ化学発光プラットフォーム

10

20

30

40

50

△) :

【 0 0 7 1 】

表 8

【表 8 - 1】

中山医院の 血清シリアル番号	バックグラウンド値 (mg/L)	Log10	検出値(mg/L)	Log10
1	20	1.30	32.42	1.51
2	5	0.70	5.37	0.73
3	3.8	0.58	5.90	0.77
4	22.8	1.36	46.23	1.66
5	25.8	1.41	40.60	1.61
6	33.2	1.52	53.73	1.73
7	38.1	1.58	67.42	1.83
8	45.7	1.66	73.19	1.86
9	62.3	1.79	89.68	1.95
10	65.4	1.82	74.84	1.87
11	140	2.15	155.47	2.19
12	110	2.04	140.33	2.15
13	13.2	1.12	12.42	1.09
14	14.6	1.16	22.56	1.35
15	133	2.12	176.93	2.25
16	45	1.65	93.78	1.97
17	65.4	1.82	111.15	2.05
18	70.3	1.85	92.69	1.97
19	18.4	1.26	27.67	1.44
20	67.7	1.83	82.16	1.91
21	170	2.23	203.55	2.31
22	170	2.23	228.36	2.36
23	140	2.15	216.73	2.34
24	182	2.26	555.17	2.74
25	41.7	1.62	60.82	1.78
26	43.1	1.63	57.47	1.76
27	33.2	1.52	44.20	1.65
28	42.3	1.63	48.68	1.69
29	31.3	1.50	42.16	1.62
30	86.1	1.94	179.86	2.25
31	58.8	1.77	100.40	2.00
32	39.6	1.60	59.01	1.77
33	21.8	1.34	46.29	1.67
34	41.7	1.62	59.99	1.78
35	33.3	1.52	73.34	1.87
36	58.6	1.77	104.54	2.02
37	57.8	1.76	76.28	1.88
38	29	1.46	43.97	1.64
39	39.6	1.60	32.97	1.52
40	30.2	1.48	38.47	1.59

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

西京医院の 血清シリアル番号				
1	58.6	1.77	110.22	2.04
2	26.3	1.42	28.64	1.46
3	24.2	1.38	22.55	1.35
4	5.6	0.75	7.98	0.90
5	7	0.85	9.95	1.00
6	9.1	0.96	10.88	1.04
7	7.8	0.89	10.32	1.01
8	6.9	0.84	7.85	0.89
9	6.5	0.81	10.58	1.02
10	12.1	1.08	19.77	1.30
11	16.8	1.23	25.96	1.41
12	42.3	1.63	50.42	1.70
13	114	2.06	179.29	2.25
14	6.9	0.84	5.40	0.73
15	17.1	1.23	21.13	1.32
16	58.6	1.77	102.90	2.01
17	213	2.33	418.66	2.62
18	20.3	1.31	35.05	1.54
19	170	2.23	196.84	2.29
20	140	2.15	187.56	2.27
21	114	2.06	152.75	2.18
22	114	2.06	144.88	2.16
23	77.9	1.89	185.85	2.27
24	73.1	1.86	97.58	1.99
25	65.4	1.82	71.60	1.85
26	58.8	1.77	81.52	1.91
27	52.2	1.72	48.59	1.69
28	33.2	1.52	34.49	1.54
29	25.8	1.41	37.18	1.57
30	18.8	1.27	30.58	1.49
31	9.2	0.96	12.20	1.09
32	8.1	0.91	7.77	0.89
33	5.9	0.77	5.73	0.76

10

20

30

## 【0072】

相関評価によって、これら2つの間の相関式は  $y = 1.056x + 0.0619$  であり、相関係数  $r^2 = 0.9506$  であったことから、これら2つが良好な相関を有したことが示される。

## 【0073】

## 実施例 5

最適化された検出システムと特許文献2の公開番号を有する特許出願で述べられた酸処理試薬とアルカリ中和試薬とを使用して、勾配希釈されたC反応性タンパク質抗原を検出して、標準曲線を作成し、その後、収集された48個の臨床試料を検出し、標準曲線を介してそれらの濃度値を計算し、臨床的バックグラウンド値に対して相関を評価し、これら2つの間の性能差を評価し、結果を図1及び図2に示した(磁性粒子化学発光プラットフォーム)。

40

## 【0074】

追跡抗原の線幅の比較において、2つの試薬は市場の需要(0.02 mg/L ~ 100 mg/L)を満たすことができ、2つの試薬は試料相関の評価において同等の性能を示した。

50

## 【 0 0 7 5 】

本発明のキットの検出範囲は、本発明のキットの反応過程において試料処理溶液（0.1 M ~ 1 Mの濃度、pH 3 ~ 4を有するクエン酸溶液）を一段階で加えた後に、0.02 mg / L ~ 100 mg / Lに達することができるため、該キットはC反応性タンパク質の全域検出の要件を満たすことが分かった。

## 【 0 0 7 6 】

上記は本発明の好ましい例であるにすぎず、本発明の実施範囲はそれに応じて限定され得ない。すなわち、本発明の範囲及び本明細書の内容に従って加えられた同等の変化及び変更は、依然として本発明が対象とする範囲内に含まれるべきである。

10

20

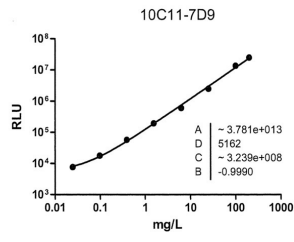
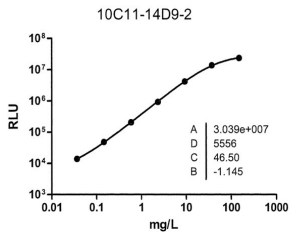
30

40

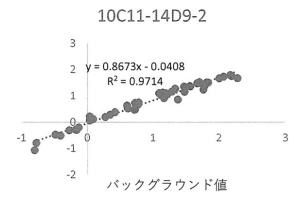
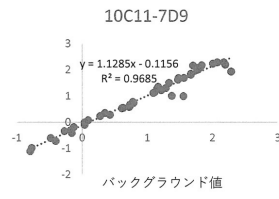
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I  
C 1 2 Q 1/42

- 弁理士 梶並 順  
(74)代理人 100122437  
弁理士 大宅 一宏  
(74)代理人 100209495  
弁理士 佐藤 さおり  
(72)発明者 チェン、ジミン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 ション、ジュンフェイ  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 シュ、ウェイリン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 ウェン、ズーシン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 ワン、ロン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 ジェン、シャオホン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 スン、シュドン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 2 2、シャメン、ハイチャン、シンヤン・ゾーン、シンユアン・ロード 1 2 4、フロア 2  
(72)発明者 ゲ、シェンシアン  
中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 0 5、シャメン、シミン・ディストリクト、シミンナン・ロード、ナンバー 4 2 2

審査官 小澤 理

- (56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 5 9 8 8 0 0 3 ( C N , A )  
特開 2 0 0 3 - 0 6 6 0 4 7 ( J P , A )  
中国特許出願公開第 1 0 3 9 4 1 0 1 7 ( C N , A )  
中国特許出願公開第 1 0 7 4 0 2 3 0 8 ( C N , A )  
国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 3 4 5 2 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 1  
C 1 2 Q 1 / 2 8  
C 1 2 Q 1 / 4 2