

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7096482号  
(P7096482)

(45)発行日 令和4年7月6日(2022.7.6)

(24)登録日 令和4年6月28日(2022.6.28)

(51)国際特許分類	F I			
G 0 1 N 33/543(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 8 1 J		
G 0 1 N 33/545(2006.01)	G 0 1 N 33/545	B		

請求項の数 3 (全9頁)

(21)出願番号	特願2018-29231(P2018-29231)	(73)特許権者	000224123 藤倉化成株式会社 東京都板橋区蓮根三丁目20番7号
(22)出願日	平成30年2月21日(2018.2.21)	(74)代理人	100103160 弁理士 志村 光春
(65)公開番号	特開2019-101011(P2019-101011 A)	(72)発明者	北 善紀 埼玉県久喜市桜田5丁目13番1号 藤 倉化成株式会社 開発研究所内
(43)公開日	令和1年6月24日(2019.6.24)	審査官	小澤 理
審査請求日	令和3年1月22日(2021.1.22)		
(31)優先権主張番号	特願2017-233056(P2017-233056)		
(32)優先日	平成29年12月5日(2017.12.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 感作された不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬の劣化防止手段

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

感作された不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬中に、試薬の1 - 30質量%のベタインを共存させることにより、当該不溶性担体粒子の凍結融解に伴う非特異的な凝集を防止する、免疫測定試薬の劣化防止方法。

## 【請求項2】

免疫測定試薬は、凝集法による免疫測定試薬である、請求項1に記載の劣化防止方法。

## 【請求項3】

不溶性担体粒子は、ラテックス粒子である、請求項1又は2に記載の劣化防止方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬の劣化防止手段に関する発明である。本発明に依ると、感作された不溶性担体粒子に関して、凍結・融解のプロセスに伴う不溶性担体粒子同士の非特異的な凝集による液状態様試薬の劣化を防止することができる。代表的な不溶性担体粒子として、ラテックス粒子がある。

## 【背景技術】

## 【0002】

現在、ラテックス粒子等の不溶性担体粒子を用いる免疫測定試薬は、種々の臨床検査項目において用いられている。

## 【 0 0 0 3 】

例えば、ラテックス凝集法を用いる免疫測定試薬では、液相中において抗原又は抗体を感作させたラテックス、あるいは、未感作のラテックスを用い、抗体又は抗原を検出する測定系を形成する。免疫複合体の形成によりラテックス粒子が凝集する性質に基づき、凝集の程度を目視により確認するか、濁度の増加を吸光度又は散乱光強度の光学的な変化として測定を行うことができる。

## 【 0 0 0 4 】

ラテックス凝集法は、操作が簡便であり、自動分析装置にも比較的容易に適用でき、現在盛んに用いられている検査方式の一つである。

## 【 0 0 0 5 】

ラテックス粒子等の不溶性担体粒子を用いる免疫測定試薬は、販売時には凍結乾燥状態であったとしても、用時には不溶性担体粒子の分散液として用いられる。従って、予め分散液の態様であることが現場での取扱いの簡便性の観点から好適である。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 文献 】 W O 2 0 1 4 / 1 3 2 8 3 3 国際公開パンフレット

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 7 】

上記の分散液の態様のラテックス粒子等の不溶性担体粒子液を用いる免疫測定試薬（以下、液状態様試薬ともいう）は、2 - 8 の適切な冷蔵環境で保存され、通常、凍結劣化は起こり難い。しかしながら、輸送時や温度制御が不十分な冷蔵設備では、過冷却や局所冷却により液状態様試薬の全部又は一部が凍結し、それが融解する際に不溶性担体粒子同士が非特異的に凝集してしまうことが問題となっている。このような非特異的な凝集が起こると試薬の反応性が変わってしまい、肝心の測定値の正確性が損なわれ、誤った診断結果に繋がることになり好ましくない。

## 【 0 0 0 8 】

液状態様試薬における凍結劣化の防止対策として、一般的にはグリセリンやエチレングリコール等の不凍アルコール、トレハロース等の糖類の添加が行われていたが、いずれも効果は不十分であった。近年では、ベタイン（トリメチルグリシン：以下、用語としてベタインを用いる）を5 - 30質量%添加することで、効果的に未感作ラテックス試薬における凍結劣化を防止する方法が報告されている（特許文献1）。感作ラテックス試薬は、ラテックス粒子の表面に付着している抗原又は抗体により一様な表面性状をしておらず、また表面の荷電状態も不均一な為、未感作ラテックス試薬に比べて凍結劣化の防止が難しいと推測される。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明者らは、感作されたラテックス粒子等の不溶性担体粒子に対するベタインの上記の劣化防止性能について検討を行った。その結果、驚くべきことに、従来知られている未感作のラテックス粒子のみならず、感作された上記不溶性担体粒子に関しても優れた劣化防止性能を、しかも比較的low濃度のベタインの使用であっても実現可能であることを見出した。

## 【 0 0 1 0 】

本発明では、第1に、溶媒中に、感作された不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬において、試薬の0.1 - 30質量%のベタイン（トリメチルグリシン）を含有することを特徴とする、免疫測定試薬（以下、本発明の免疫測定試薬ともいう）を提供する。

## 【 0 0 1 1 】

第2に、感作された不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬中に、試薬の0.1 - 30質量%のベタインを共存させることにより、当該不溶性担体粒子の非特異的な凝集を防止す

10

20

30

40

50

る、免疫測定試薬の劣化防止方法（以下、本発明の劣化防止方法ともいう）を提供する。

【0012】

なお、本発明において「感作」とは、不溶性担体粒子において抗原又は抗体を付着させる行為又は付着された状態であり、「担持」と同意義である。

【0013】

上記本発明の免疫測定試薬と、本発明の劣化防止方法についての概要を説明する。

【0014】

不溶性担体粒子は、免疫測定試薬として用いることが可能であれば限定されず、例えば、ラテックス粒子、シリカ粒子、金コロイド粒子等の無機粒子；ゼラチン粒子、赤血球等が挙げられる。これらの中でも、ラテックス粒子が特に代表的な不溶性担体粒子である。

10

【0015】

ラテックスは、ポリマーエマルジョンとも呼ばれ、ポリマーが水等の水性溶媒に分散したものであり、当該水性溶媒が連続相となり、真球又は球に近い形のポリマー粒子が不連続相としてなるものである。ラテックス粒子とは、このラテックスの不連続相をなすポリマー粒子のことである。本明細書では、ラテックス粒子を含む総体的な表現として「ラテックス」を用いる場合もある。

【0016】

ラテックスの種類は、上記のように免疫測定試薬として用いることができるものであれば限定されない。例えば、ポリスチレンラテックス、極低カルボン酸変性ラテックス、親水基局在化ラテックス等の物理吸着用ラテックス；カルボン酸変性ラテックス、アミノ変性ラテックス、ヒドロキシ変性ラテックス、グリシジル変性ラテックス、アルデヒド変性ラテックス、アミド変性ラテックス等の化学結合用ラテックス；各種の着色ラテックス；高比重ポリスチレンラテックス等の血液凝集反应用ラテックス；磁性ラテックス等が挙げられる。

20

【0017】

上記のように、感作された不溶性担体粒子とは、不溶性担体粒子表面に何らかの物質が感作されている不溶性担体粒子であり、具体的には、免疫測定に必要な抗原抗体反応を惹起するための、抗体又は抗原が感作されている不溶性担体粒子である。当該抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよく、さらに、所望する抗原との抗原抗体反応を惹起することができる限り、免疫グロブリン分子の全部であっても、一部であってもよい。当該抗原は、所望する抗体と、抗原抗体反応により結合するものであれば特に限定されない。未感作の不溶性担体粒子とは、このような抗体又は抗原が感作されていない不溶性担体粒子である。

30

【0018】

水性溶媒は、水を主体とする溶媒であり、水、あるいは各種の緩衝液等が挙げられる。ベタインは、常法により合成可能であり、市販品を用いることも可能である。免疫測定試薬の態様は、感作された不溶性担体粒子を用いており、かつ、免疫測定時以外の当該粒子の凝集が免疫測定値に悪影響を与えるものである限り、特に限定されないが、不溶性担体粒子の凝集を抗原抗体反応の指標とする「凝集法」であることが好適である。凝集法としては、スライドテスト法、光学測定法、マイクロタイター法、フィルター分離法等が挙げられる。凝集法以外の手法としては、サンドイッチ法、イムノクロマト法、ウエスタンブロット法等が挙げられる。免疫測定の標識も、ラジオアイソトープ、蛍光物質、着色物質、発色酵素、ビオチン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【発明の効果】

【0019】

本発明により、免疫測定試薬において用いられるラテックス等の感作された不溶性担体粒子液の凍結・融解に伴う非特異的な凝集による当該試薬の劣化手段が、「免疫測定試薬」と「免疫測定試薬の劣化防止方法」として提供される。本発明の劣化防止成分であるベタインは、不溶性担体粒子が未感作である場合でも、比較的少量の配合であっても、不溶性担体粒子の凍結・融解に伴う非特異的な凝集を防止して、免疫測定試薬の劣化を防止する

50

ことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1-1】凍結・融解の回数(0, 1, 3, 6, 10回)に対する感作ラテックス試薬における非特異的なラテックス粒子の凝集を、「添加剤無し」(a)、及び、「ベタイン添加」(bは、0.1質量%ベタイン、cは、0.3質量%ベタイン、dは、1質量%ベタイン)として検討した結果を示す図面である。

【図1-2】上記図1-1の続きとして、図中eは、3質量%ベタイン、fは、5質量%ベタイン、gは、7質量%ベタイン、hは、10質量%ベタインの場合である。

【図1-3】上記図1-1の続きとして、図中iは、15質量%ベタイン、jは、20質量%ベタイン、kは、25質量%ベタイン、lは、30質量%ベタインの場合である。

10

【発明を実施するための形態】

【0021】

[免疫測定試薬]

本発明の免疫測定試薬における劣化防止成分は、上述のようにベタイン(トリメチルグリシン)であり、劣化防止の対象となる不溶性担体粒子は、「感作された不溶性担体粒子」である。

【0022】

試薬中のベタインの濃度の下限は試薬の0.1質量%であり、好ましくは同1質量%であり、さらに好ましくは同3質量%であり、最も好ましくは同5質量%である。ベタインを試薬の0.1質量%とすることにより劣化防止効果が認められ、同1質量%、3質量%、5質量%と、試薬中のベタイン量を増加させるにつれて、用量依存的にベタインによる劣化防止効果を向上させることができる。

20

【0023】

試薬中のベタイン濃度の上限は、特に限定されず、試薬の30質量%であっても、試薬においてベタインによる劣化防止効果が発揮されるが、好ましくは試薬の20質量%であり、さらに好ましくは同15質量%であり、最も好ましくは同10質量%である。ベタイン量が試薬の10質量%を超えても、ベタイン量の増加に見合った劣化防止効果の向上は認められず、却ってベタイン量の増加に従って反応性の低下傾向が認められる。

【0024】

従って、試薬中のベタイン濃度は、試薬の0.1-30質量%であり、さらに配合下限を引き上げて、同1-30質量%、3-30質量%、5-30質量%と、これらの配合下限量の増加につれてより好ましいものとなる。さらに試薬中のベタイン濃度の上限を好適量である試薬の20質量%、すなわち同0.1-20質量%とすることが好ましく、配合下限を引き上げて、同1-20質量%、3-20質量%、5-20質量%と、これらの配合下限量の増加につれて、より好ましいものとなる。さらに試薬中のベタイン濃度の上限をさらなる好適量である試薬の15質量%、すなわち同0.1-15質量%とすることが好ましく、配合下限を引き上げて、同1-15質量%、3-15質量%、5-15質量%と、これらの配合下限量の増加につれてより好ましいものとなる。さらに試薬中のベタイン濃度の上限を最適上限量である試薬の10質量%、すなわち同0.1-10質量%とすることが好ましく、配合下限を引き上げて、同1-10質量%、3-10質量%、5-10質量%と、これらの配合下限量の増加につれてより好ましいものとなる。劣化防止効果の十分な発揮、反応性の確認、及びコストの抑制、を勘案した、試薬中のベタイン濃度の最適範囲は、試薬の5-10質量%である。

30

40

【0025】

本発明の免疫測定試薬の水溶性溶媒としては、上記のように水又は各種の緩衝液が挙げられ、当該緩衝液としては、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、BSA、アラビアゴム、界面活性剤、コリン、キレート剤、防腐剤等の添加剤も、本発明の効果を実質的に損なわない質的、量的な限度で添加を行うことができる。当該水性溶媒のpHは抗原抗体反応に支障が無い範囲、具

50

体的には4 - 9程度が好ましく、特に好ましくは6 - 9程度である。

【0026】

不溶性担体粒子の平均粒子径は、免疫測定試薬に用いることができる限り特に限定されない。例えば、ラテックス粒子であれば、概ね0.01 - 1 μmの平均粒子径から広く粒子径を選択することが可能である。

【0027】

試薬中の「感作された不溶性担体粒子」の含有量は、当該不溶性担体粒子を含有する免疫測定用試薬の態様、例えば、不溶性担体粒子自体の種類、試薬の企画、等に応じて自由に選択することができる。

【0028】

「感作された不溶性担体粒子」は、感作された抗原又は抗体の結合方式、例えば、ラテックス粒子であれば、物理吸着又は化学結合はいずれであってもよい。また、感作抗原は、標的の体内抗体に応じて自由に選択することが可能である。例えば、梅毒抗原、ストレプトリジンO等が感作抗原として挙げられるが、全くこれらには限定されない。感作抗体は、捕捉する標的抗原に応じて自由に選択することができる。さらに、感作抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよく、グロブリン分子は、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEのいずれのクラスであってもよく、サブクラスも限定されず、さらにこれらのグロブリン分子の全部であっても一部のみの断片であってもよい。

【0029】

[劣化防止方法]

本発明の劣化防止方法における、感作された不溶性担体粒子を含有する免疫測定試薬中における、上記のベタインの共存は、免疫測定試薬を作成する工程のいずれかの段階で、ベタインを試薬中に添加することにより行うことができる。このベタインの添加は、感作された不溶性担体粒子の添加に先立っていても、その後であってもよい。

【0030】

試薬に対するベタインの添加量の下限は試薬の0.1質量%であり、好ましくは同1質量%であり、さらに好ましくは同3質量%であり、最も好ましくは同5質量%である。ベタインを試薬の0.1質量%添加することにより劣化防止効果が認められ、同1質量%、3質量%、5質量%と、試薬へのベタイン添加量を増加させるにつれて、用量依存的にベタインによる劣化防止効果を向上させることができる。

【0031】

試薬に対するベタインの添加量の上限は、特に限定されず、試薬の30質量%であっても、試薬においてベタインによる劣化防止効果が発揮されるが、好ましくは試薬の20質量%であり、さらに好ましくは同15質量%であり、最も好ましくは同10質量%である。ベタイン添加量が試薬の10質量%を超えても、ベタイン量の増加に見合った劣化防止効果の向上は認められず、却ってベタイン添加量の増加に従って反応性の低下傾向が認められる。

【0032】

従って、試薬へのベタインの添加量は、試薬の0.1 - 30質量%であり、さらに添加量の下限を引き上げて、同1 - 30質量%、3 - 30質量%、5 - 30質量%と、添加下限量の増加につれてより好ましいものとなる。さらに試薬へのベタイン添加量の上限を好適量である試薬の20質量%、すなわち同0.1 - 20質量%とすることが好ましく、添加量の下限を引き上げて、同1 - 20質量%、3 - 20質量%、5 - 20質量%と、添加下限量の増加につれて、より好ましいものとなる。さらに試薬へのベタイン添加量の上限をさらなる好適量である試薬の15質量%、すなわち同0.1 - 15質量%とすることが好ましく、添加量の下限を引き上げて、同1 - 15質量%、3 - 15質量%、5 - 15質量%と、添加下限量の増加につれてより好ましいものとなる。さらに試薬へのベタインの添加量の上限を最適上限量である試薬の10質量%、すなわち同0.1 - 10質量%とすることが好ましく、試薬の添加量の下限を引き上げて、同1 - 10質量%、3 - 10質量%

10

20

30

40

50

、5 - 10 質量%と、これらの添加下限量の増加につれてより好ましいものとなる。劣化防止効果の十分な発揮、反応性の確認、及びコストの抑制、を勘案した、試薬へのベタイン添加量の最適範囲は、試薬の5 - 10 質量%である。

【0033】

本発明の劣化防止方法が施された免疫測定試薬では、凍結・融解のプロセスにおける感作された不溶性担体粒子の不特異吸着が抑止され、これにより当該免疫測定試薬の劣化防止を行うことができる。

【0034】

このようにして作成される免疫測定試薬が、本発明の免疫測定試薬である。

【実施例】

【0035】

以下、本発明の具体例としての実施例を記載する。なお、「%」は特に断らない限り、配合対象に対する質量%である。

【0036】

[実施例1] 感作ラテックスにおける検討

<第1試薬(検体希釈液)の調製>

50 mM グリシンを含む緩衝液に、0.15 mol/L となるように塩化ナトリウムを添加し、水酸化ナトリウム水溶液でpHを9.0となるように、検体希釈液を調製した。

【0037】

<第2試薬(抗体感作ラテックス分散液)の調製>

50 mM ホウ酸緩衝液 20 mL に、抗ヒトLp(a)ヤギポリクローナル抗体(トリナビオリアクティブス社製)を100 mg 添加して、さらに未感作のポリスチレンラテックス粒子(平均粒子径0.12 μm: 藤倉化成社製)の10%ラテックス分散液を12.5 mL 混合し、超音波装置VCX750(SONIC & MATERIALS INC.)を用いて、氷冷下で超音波処理を1分間行った。その後、5%BSA水溶液を7 mL 添加し、50 で30分間攪拌した。その後、2000 Gで20分間遠心し、上澄みを除いた後、10 mmol/L HEPESと共に、(1)ベタイン未添加(比較例)、(2)ベタイン(比較例: 和光純薬工業社製)を、0.1%、0.3%、1%、3%、5%、7%、10%、15%、20%、25%、30%添加し、それぞれの系に上記感作のポリスチレンラテックス粒子(平均粒子径0.12 μm: 藤倉化成社製)を、0.3%となるように添加し、抗体感作ラテックス分散液8種類を調製した。

【0038】

<第1試薬と第2試薬を用いた凍結・融解による検量線の変動確認>

第2試薬を、それぞれ0 - 10回、上記の要領で凍結・融解を行い、凍結・融解回数による各試料の検量線を確認した。検量線は、Lp(a)値が0 mg/dL、15 mg/dL、30 mg/dL、60 mg/dL、100 mg/dLに調製された、精製Lp(a)を検体として用いて、当該検体量2.1 μLに対して第1試薬を210 μL混合し、37で5分間反応させた後、これに第2試薬を70 μL添加して、5分間における吸光度の変化量を測定することで行った。測定機器は、日立自動分析装置7180を用い、主波長600 nmの2ポイントエンド法で行った。結果を図1[図1-1(ベタイン未添加、ベタイン0.1%、0.3%、1%添加)、図1-2(ベタイン3%、5%、7%、10%添加)、及び、図1-3(ベタイン15%、20%、25%、30%添加)]に示す。図1-3のベタインの多量添加の結果を検討すると、いずれの添加条件でも凍結融解による反応性の変化は認められなかったが、ベタインの添加量に依存して反応性の低下が認められた。具体的には、ベタイン10%添加に対して、15%添加では10 - 25%程度の反応性の低下が認められ、30%添加では20 - 30%程度の反応性の低下が認められた。

【0039】

この結果より、ベタインを0.1 - 30 質量%添加することにより、感作ラテックス粒子の凍結・融解による非特異的な凝集を抑制できることが明らかになった。この非特異的な凝集の抑制に対する添加量は、反応性も勘案すると、ベタイン1 - 20 質量%添加におい

10

20

30

40

50

て好ましく、3 - 15 質量% 添加においてさらに好ましく、5 - 10 質量% において最も好ましかった。上記のようにベタインの添加量が10 質量% を超えても、添加量の増加に見合った効果の向上は期待できないことが明らかになり、ベタインの多量添加による反応性に対する抑制が認められた。

【産業上の利用可能性】

【0040】

本発明の免疫測定試薬ないし本発明の劣化防止方法が施された免疫測定試薬は、液状態様試薬が凍結するような過酷な保存環境や輸送時の不安定な温度制御下であっても、ラテックス粒子等の不溶性担体粒子が感作された場合の非特異的な凝集が抑制され、検出性能を劣化させずに保存が可能となることにより、免疫測定試薬の保存や輸送の便宜に著しく貢献する。

10

20

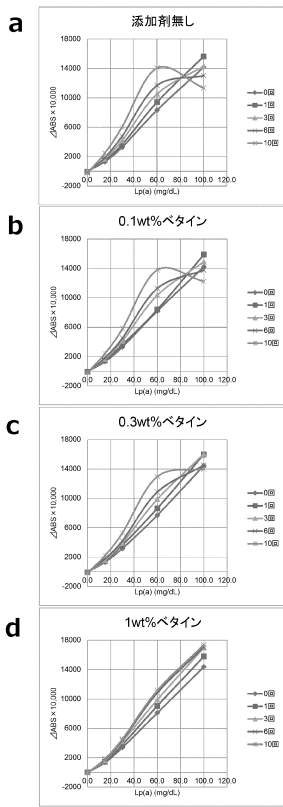
30

40

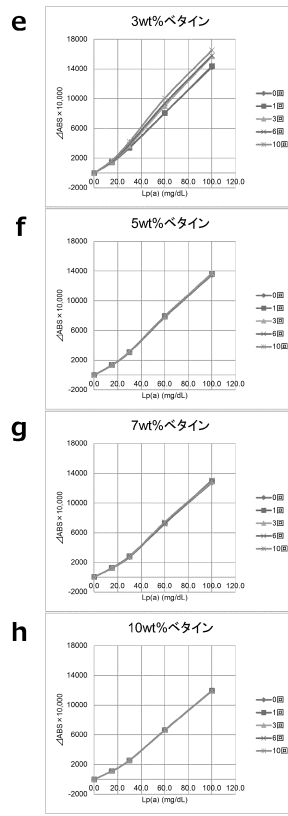
50

【図面】

【図 1 - 1】



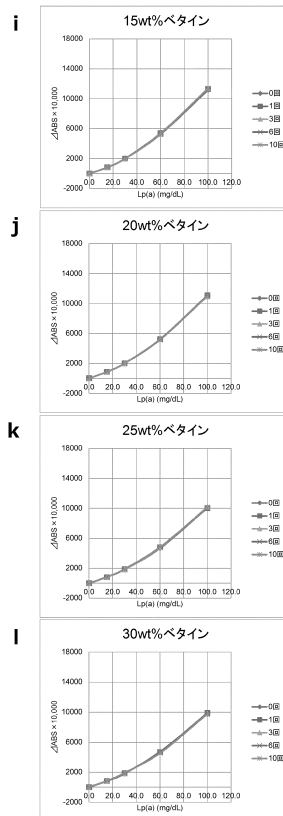
【図 1 - 2】



10

20

【図 1 - 3】



30

40

50

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2007/074860(WO, A1)  
国際公開第2014/132833(WO, A1)  
特開2000-258419(JP, A)  
特開2010-156576(JP, A)  
欧州特許出願公開第00808906(EP, A1)  
WANG, W. et al. , Ultrastable core-shell structured nanoparticles directly made from zwitter ionic polymers , Chemical Communications , 2014年 , Vol.50 , p.15030-15033
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)  
G01N 33/53  
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)