

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2013年10月3日(03.10.2013)

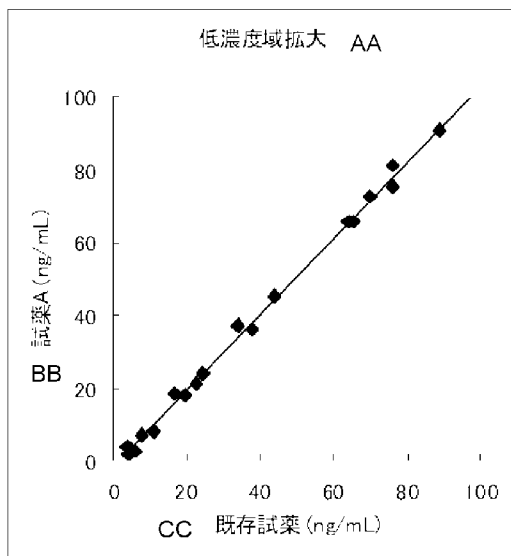


(10) 国際公開番号  
WO 2013/146977 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
  - (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/059180
  - (22) 国際出願日: 2013年3月28日(28.03.2013)
  - (25) 国際出願の言語: 日本語
  - (26) 国際公開の言語: 日本語
  - (30) 優先権データ:  
特願 2012-078449 2012年3月30日(30.03.2012) JP
  - (71) 出願人: デンカ生研株式会社 (DENKA SEIKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
  - (72) 発明者: 加納 まゆみ (KANO, Mayumi); 〒9591834 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 Niigata (JP). 橋 律子 (TACHIBANA, Ritsuko); 〒9591834 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 Niigata (JP). 飯塚 雅行 (IIZUKA, Masayuki); 〒9591834 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 Niigata (JP).
  - (74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 Tokyo (JP).
  - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, HU, ID, IL, IN, IS, 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, PA, 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, ZA, ZM, ZW.
  - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: IMMUNOLOGICAL ANALYSIS METHOD AND REAGENT

(54) 発明の名称: 免疫分析方法及び試薬



- AA Enlarged illustration of low concentration region
- BB Reagent A (ng/mL)
- CC Existing reagent (ng/mL)

(57) Abstract: Disclosed are: an immunological analysis method which can measure an antigen with high sensitivity and high accuracy; and a reagent for use in the method. In the immunological analysis method, an antigen-antibody reaction and/or a measurement is carried out in the presence of a polycarboxylic acid-type surfactant. The immunological analysis reagent for use in the method is characterized by comprising a polycarboxylic acid-type surfactant. By employing such a simple means that a polycarboxylic acid-type surfactant is allowed to exist in a reaction and/or measurement system, it becomes possible to inhibit a non-specific reaction effectively in a high-sensitivity immunological analysis, whereby an antigen can be measured accurately and specificity can be improved in an immunological analysis.

(57) 要約: 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が開示されている。免疫分析方法は、ポリカルボン酸型界面活性剤の存在下で抗原抗体反応及び/又は測定を行う。この方法に使用される免疫分析試薬は、ポリカルボン酸型界面活性剤を含むことを特徴とする。反応及び/又は測定系にポリカルボン酸型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。

WO 2013/146977 A1

## 明 細 書

**発明の名称**：免疫分析方法及び試薬

### 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。

[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。

[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

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、免疫分析においてポリカルボン酸型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。

[0008] すなわち、本発明は、以下の1)～9)に係るものである。

1) ポリカルボン酸型界面活性剤の存在下で抗原抗体反応及び／又は測定を行う免疫分析方法。

2) 前記ポリカルボン酸型界面活性剤が、(1)マレイン酸及び／若しくは無水マレイン酸又はその塩と、(2)ジイソブチレンとの共重合体である1)の方法。

3) 前記ポリカルボン酸型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カルボン酸型界面活性剤の濃度が0.001%～3%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カルボン酸型界面活性剤の存在下で行う1)～3)のいずれかの方法。

5) 免疫分析方法が、免疫凝集法である1)～4)のいずれかの方法。

6) 免疫凝集法がラテックス凝集法である5)の方法。

7) 1)の方法に使用される免疫分析試薬であって、ポリカルボン酸型界面活性剤を含むことを特徴とする免疫分析試薬。

8) 前記ポリカルボン酸型界面活性剤が、(1)マレイン酸及び／又は無水マレイン酸と、(2)ジイソブチレンとの共重合体である7)の試薬。

9) 免疫凝集法のための試薬をさらに含む、免疫凝集用試薬である請求項7)又は8)の試薬。

10) ラテックス凝集法のための試薬をさらに含む、ラテックス凝集用試薬である9)の試薬。

## 発明の効果

[0009] 本発明の方法によれば、反応及び／又は測定系にポリカルボン酸型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。

[図2]下記実施例の免疫分析方法と、非特異反応が抑制されることが知られている市販の試薬（既存試薬）を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図3]図2の低濃度域を拡大して示す。

[図4]下記比較例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図5]図4の低濃度域を拡大して示す。

[図6]下記比較例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図7]図6の低濃度域を拡大して示す。

[図8]下記比較例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図9]図8の低濃度域を拡大して示す。

[図10]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図11]図10の低濃度域を拡大して示す。

[図12]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図13]図12の低濃度域を拡大して示す。

[図14]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測

定結果の相関関係を示す。

[図15]図 1 4 の低濃度域を拡大して示す。

[図16]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図17]図 1 6 の低濃度域を拡大して示す。

[図18]下記比較例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図19]図 1 8 の低濃度域を拡大して示す。

[図20]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図21]図 2 0 の低濃度域を拡大して示す。

[図22]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図23]図 2 2 の低濃度域を拡大して示す。

[図24]下記実施例の免疫分析方法と、既存試薬を用いた免疫分析方法との測定結果の相関関係を示す。

[図25]図 2 4 の低濃度域を拡大して示す。

### **発明を実施するための形態**

[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、ポリカルボン酸型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（T I A法、ラテックス凝集法）、比色法、R P L A法、C L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。

[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。

[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。

[0016] 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。

[0017] 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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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、ポリカルボン酸型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。「ポリカルボン酸型界面活性剤」は、1分子中に複数のカルボキシル基若しくはその塩、及び／又は酸無水物基を持つ（酸無水物基の少なくとも一部は水中で加水分解してカルボキシル基を生じるので、水中では1分子中に複数のカルボキシル基を持つ）高分子から成る界面活性剤として知られている、陰イオン界面活性剤の一種であり、種々のものが公知で市販されており、工業的に使用されている。本発明では、いずれのポリカルボン酸型を用いることができるが、中でも(1)マレイン酸及び／若しくは無水マレイン酸と、(2)ジイソブチレンとの共重合体、並びに／又はその塩が好ましい。ここで、塩としては、特に限定されないが、ナトリウム塩が好ましい。このような共重合体又はその塩は、工業的に広く用いられており、市販もされているので、本発明においても市販品を好ましく利用することができる（下記実施例参照）。

[0021] ポリカルボン酸型界面活性剤の重量平均分子量は特に限定されないが、1000～5万程度のものが好ましい。

[0022] 本発明の方法において、当該ポリカルボン酸型界面活性剤は、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ポリカルボン酸型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、ポリカルボン酸型界面活性剤は、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。

[0023] また、免疫分析に用いる各種試薬に予めポリカルボン酸型界面活性剤を含有させることでもよく、本発明は斯かるポリカルボン酸型界面活性剤を含有

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、ポリカルボン酸型界面活性剤を含有した免疫分析試薬としては、これらの試薬にポリカルボン酸型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ポリカルボン酸型界面活性剤を含有させたものが挙げられる。

[0024] 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ポリカルボン酸型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。

[0025] 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0.001～3%であり、さらに好ましくは0.005～1%である。したがって、免疫分析試薬に予めポリカルボン酸型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。

[0026] 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。

[0027] 後記実施例に記載されるように、ポリカルボン酸型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、ポリカルボン酸型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。

[0028] 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。

[0029] 実施例 1、比較例 1～3

(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 300 nm のポリスチレンラテックス浮遊液 1 mL に対し 0.03 mg 担持させてなる感作粒子を、緩衝液 (トリス、pH 8.0) 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、pH 8.5) にポリカルボン酸型界面活性剤 (マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム) を添加し、下記の試薬 A を調製した (実施例 1)。比較例 1～3 として、何も添加しない、または他の添加剤を更に加えた試薬 B～D を調製した。

[0030] [表 1]

例	試薬	添加剤 (濃度)
実施例 1	A	+マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム*1 1.0%
比較例 1	B	なし
比較例 2	C	+正常ウサギグロブリン 3 g/L
比較例 3	D	+ポリスチレンスルホン酸ナトリウム*2 1.0%

\*1: ポリカルボン酸型界面活性剤 (陰イオン性界面活性剤) 「ポリスター O M」 (商品名、日油株式会社から市販)

\*2: 陰イオン性界面活性剤 「PS-5」 (商品名、東ソー株式会社から市販)

[0031] (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。

前述の試薬 A～D を用いて、非特異反応を起こすことで知られている RF 陽性検体を含む血清 24 検体の測定を行った。検体溶液 10.0 μL に試薬

A～Dの上記で調製した緩衝液100 $\mu$ Lを添加し、この混合液を37 $^{\circ}$ Cで攪拌混合した。5分間放置後、ラテックス浮遊液100 $\mu$ Lを添加し、更に37 $^{\circ}$ C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。

[0032] (3) 既存試薬との感度比較

上記実施例1及び比較例1～3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ーラテックスX2「生研」CN（デンカ生研）（以下、「既存試薬」）との感度の比較を行った。結果を図1示す。

[0033] 図1に示されるように、実施例1及び比較例1～3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及び比較例1～3の方法の法が測定感度が高いことがわかる。

[0034] (4) 既存試薬との特異性比較

上記実施例1及び比較例1～3の測定結果と、上記既存試薬を用いた方法との測定結果を比較した。結果を図2～9にそれぞれ示す。

[0035] 既存試薬は非特異反応が抑制されている試薬であることが知られている。実施例1の結果を示す図2及び図3と、各比較例の結果を示す図4～図9を比べると、高感度化した免疫分析方法において、ポリカルボン酸型界面活性剤を添加することで、非特異反応が抑制され、既存試薬を用いた場合の測定結果との相関が向上することが示された。特に低濃度領域にて向上することが示された。

[0036] 実施例2～5、比較例4

(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

、pH 8.0)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、pH 8.5)に、ポリカルボン酸型界面活性剤(マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム、「ポリスターOM」(商品名、日油株式会社から市販))を添加し、下記の試薬E~Hを調製した(実施例2~5)。比較例4として、何も添加しない試薬Iを調製した。

[0037] [表2]

例	試薬	添加剤(濃度)
実施例2	E	+マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム0.1%
実施例3	F	+マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム0.5%
実施例4	G	+マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム1.0%
実施例5	H	+マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム2.0%
比較例4	I	なし

[0038] (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。

前述の試薬E~Iを用いて、非特異反応を起こすことで知られているRF陽性検体を含む血清24検体の測定を行った。検体溶液10.0 $\mu$ Lに試薬E~Iの上記で調製した緩衝液100 $\mu$ Lを添加し、この混合液を37 $^{\circ}$ Cで攪拌混合した。5分間放置後、ラテックス浮遊液100 $\mu$ Lを添加し、更に37 $^{\circ}$ C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] (3) 既存試薬との比較

上記実施例2~5及び比較例4の測定結果と、上記既存試薬を用いた方法との測定結果を比較した。結果を図10~19にそれぞれ示す。

[0040] 既存試薬は非特異反応が抑制されている試薬であることが知られている。実施例2~5の結果を示す図10~図17と、比較例4の結果を示す図18~図19を比べると、高感度化した免疫分析方法において、ポリカルボン酸型界面活性剤を添加することで、非特異反応が抑制され、既存試薬を用いた場合の測定結果との相関が向上することが示された。特に低濃度領域にて向

上することが示された。

[0041] 実施例 6、7、比較例 5

(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 300 nm のポリスチレンラテックス浮遊液 1 mL に対し 0.03 mg 担持させてなる感作粒子を、緩衝液（トリス、pH 8.0）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、pH 8.5）に、ポリカルボン酸型界面活性剤を添加し、下記の試薬 J（実施例 6）、試薬 K（実施例 7）を調製した。比較例 5 として、何も添加しない試薬 L を調製した。

[0042] [表3]

例	試薬	添加剤（濃度）
実施例 6	J	+マレイン酸・ジイソブチレン共重合体ナトリウム*1 1.0%
実施例 7	K	+ポリカルボン酸型界面活性剤*2 1.0%
比較例 5	L	なし

\*1: ポリカルボン酸型界面活性剤（陰イオン性界面活性剤）「ポリスター O M」（商品名、日油株式会社から市販）

\*2: ポリカルボン酸型界面活性剤（商品名「デモール EP」、花王株式会社から市販）

[0043] (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。前述の試薬 J~L を用いて、非特異反応を起こすことで知られている RF 陽性検体を含む血清 24 検体の測定を行った。検体溶液 10.0  $\mu$ L に試薬 J~L の上記で調製した緩衝液 100  $\mu$ L を添加し、この混合液を 37°C で攪拌混合した。5 分間放置後、ラテックス浮遊液 100  $\mu$ L を添加し、更に 37°C 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。

[0044] (3) 既存試薬との比較

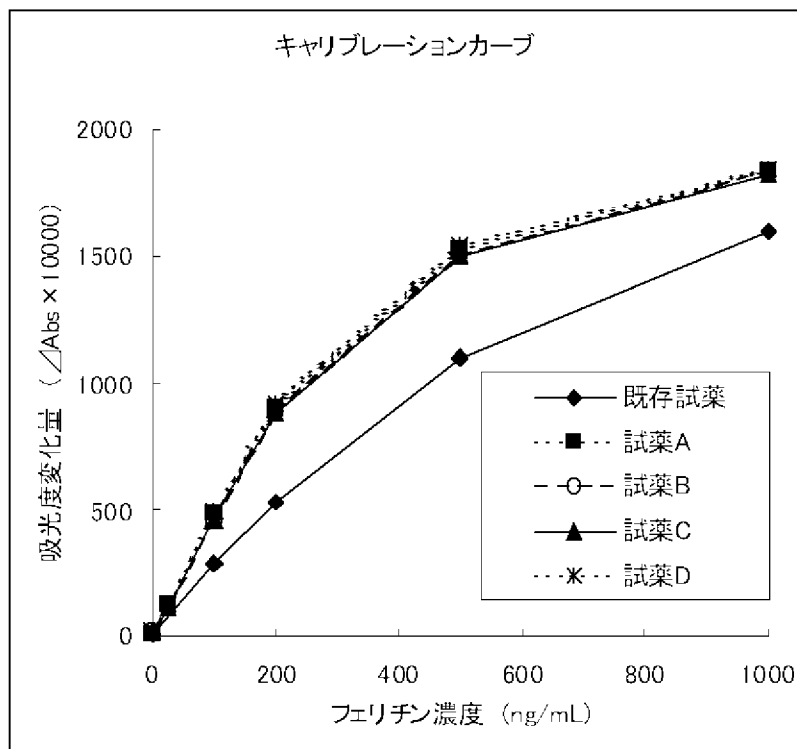
上記実施例 6 及び 7 並びに比較例 5 の測定結果と、上記既存試薬を用いた方法との測定結果を比較した。結果を図 20～25 にそれぞれ示す。

[0045] 既存試薬は非特異反応が抑制されている試薬であることが知られている。実施例 6～7 の結果を示す図 20～図 23 と、比較例 5 の結果を示す図 24～図 25 を比べると、高感度化した免疫分析方法において、ポリカルボン酸型界面活性剤を添加することで、非特異反応が抑制され、既存試薬を用いた場合の測定結果との相関が向上することが示された。特に低濃度領域にて向上することが示された。

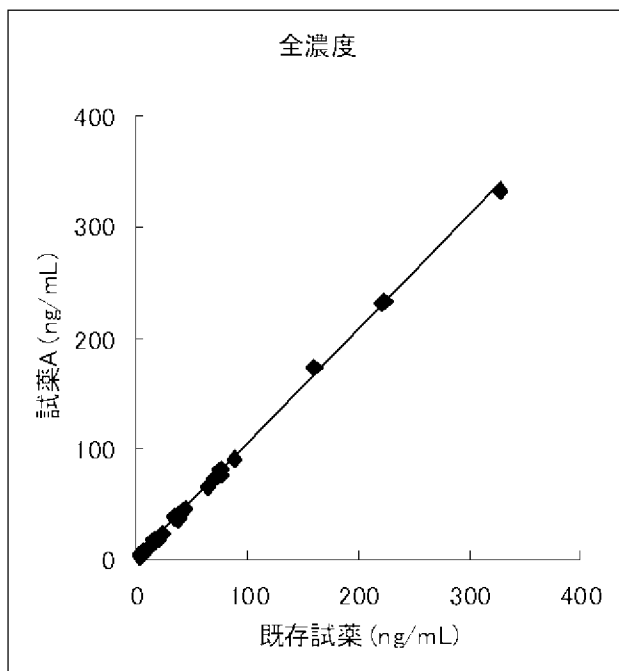
## 請求の範囲

- [請求項1]           ポリカルボン酸型界面活性剤の存在下で抗原抗体反応及び／又は測定を行う免疫分析方法。
- [請求項2]           前記ポリカルボン酸型界面活性剤が、(1)マレイン酸及び／若しくは無水マレイン酸と、(2)ジイソブチレンとの共重合体、並びに／又はその塩である請求項1記載の方法。
- [請求項3]           前記ポリカルボン酸型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カルボン酸型界面活性剤の濃度が0.001%～3%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カルボン酸型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]           免疫分析方法が、免疫凝集法である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6]           免疫凝集法がラテックス凝集法である請求項5記載の方法。
- [請求項7]           請求項1記載の方法に使用される免疫分析試薬であって、ポリカルボン酸型界面活性剤を含むことを特徴とする免疫分析試薬。
- [請求項8]           前記ポリカルボン酸型界面活性剤が、(1)マレイン酸及び／又は無水マレイン酸と、(2)ジイソブチレンとの共重合体である請求項7記載の試薬。
- [請求項9]           免疫凝集法のための試薬をさらに含む、免疫凝集用試薬である請求項7又は8記載の試薬。
- [請求項10]          ラテックス凝集法のための試薬をさらに含む、ラテックス凝集用試薬である請求項9記載の試薬。

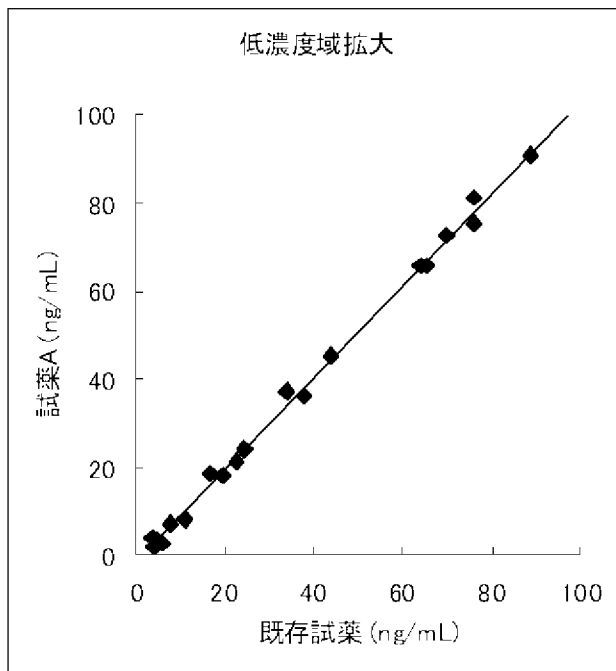
[図1]



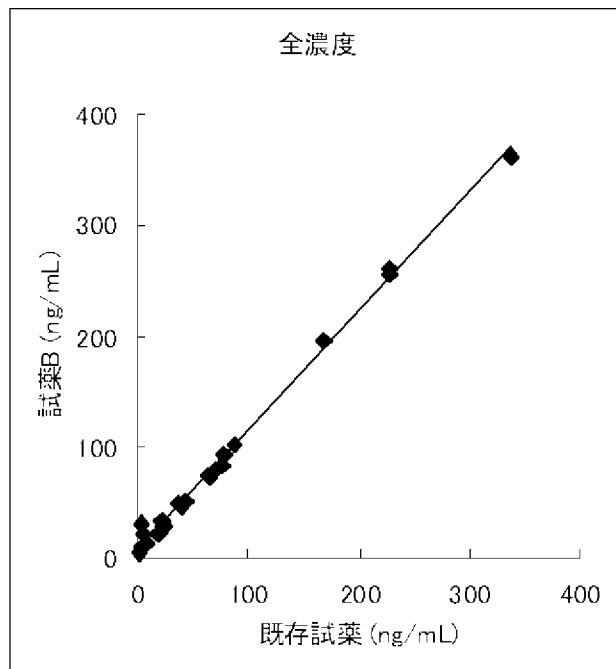
[図2]



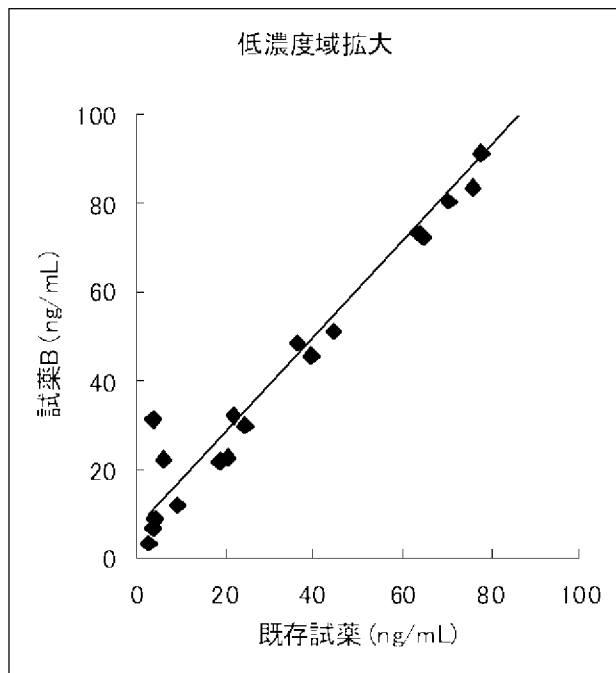
[図3]



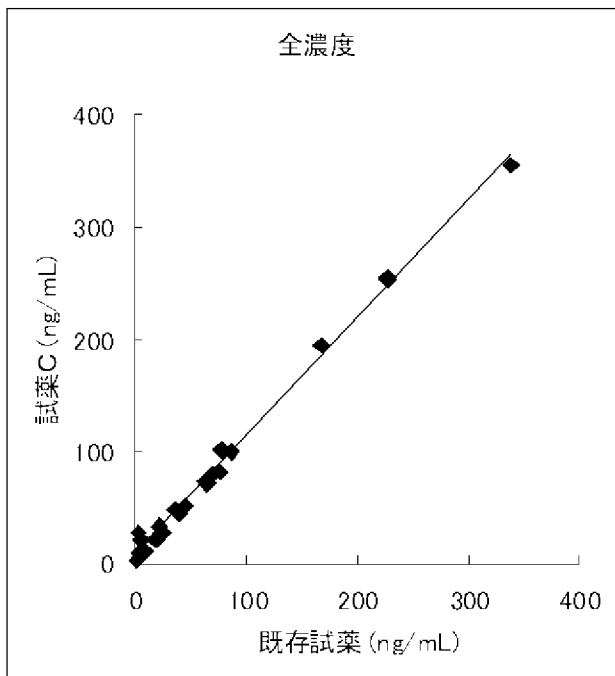
[図4]



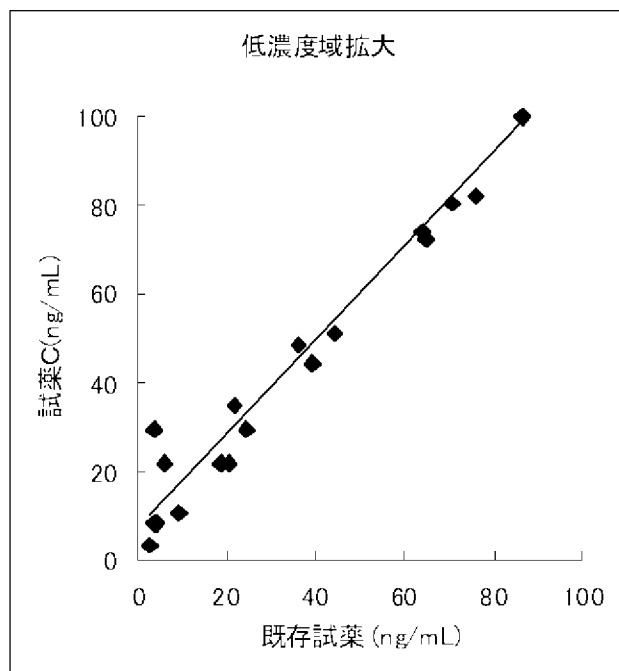
[図5]



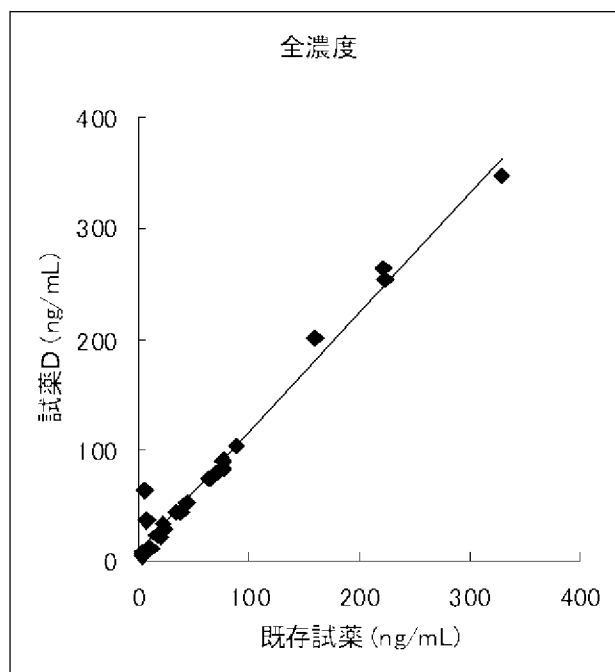
[図6]



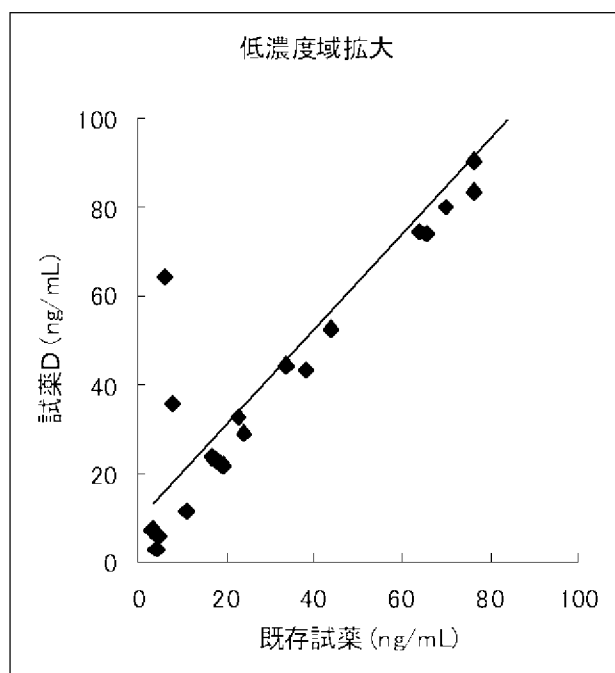
【図7】



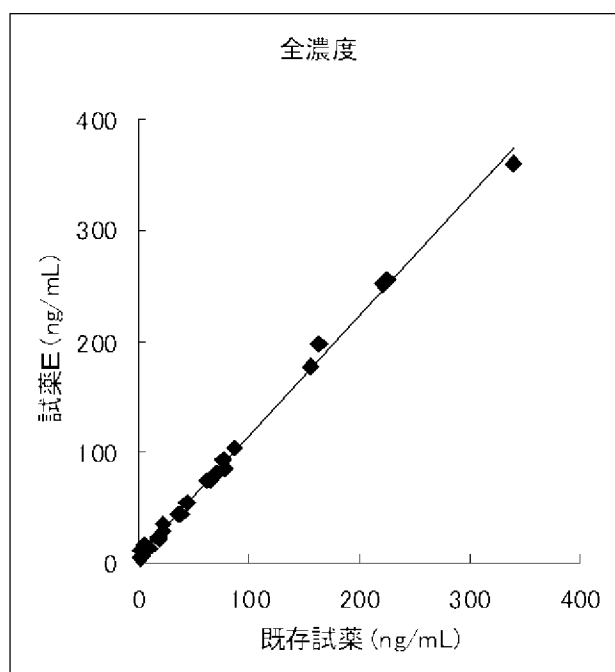
【図8】



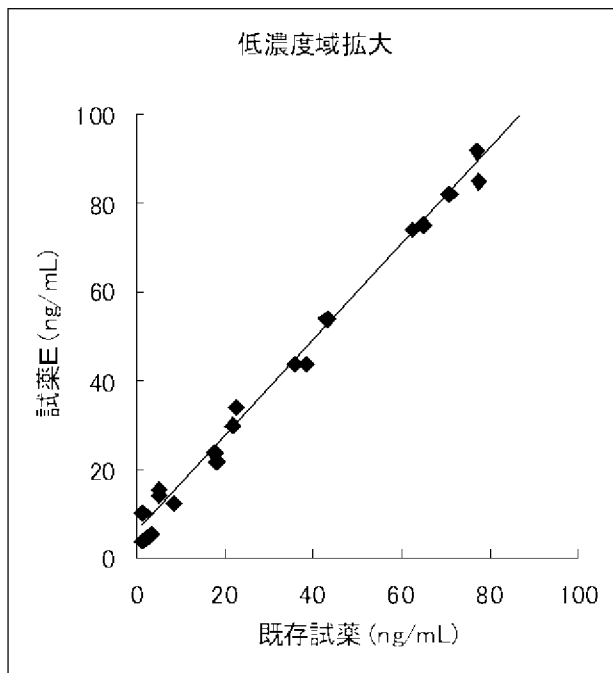
[図9]



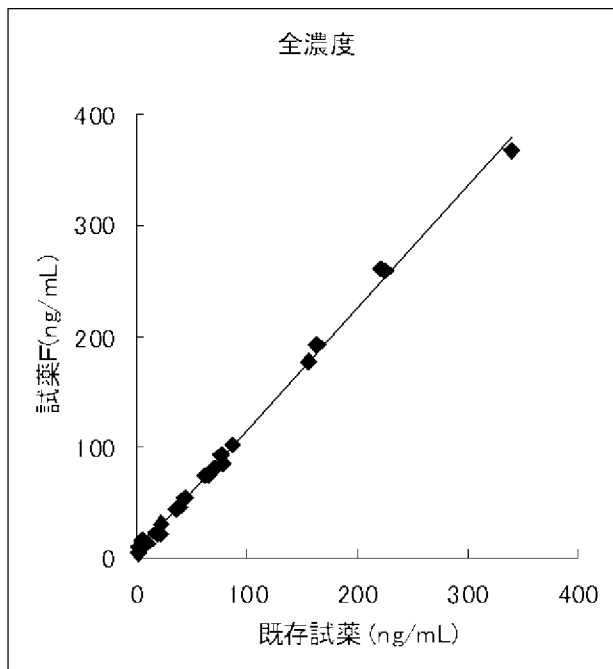
[図10]



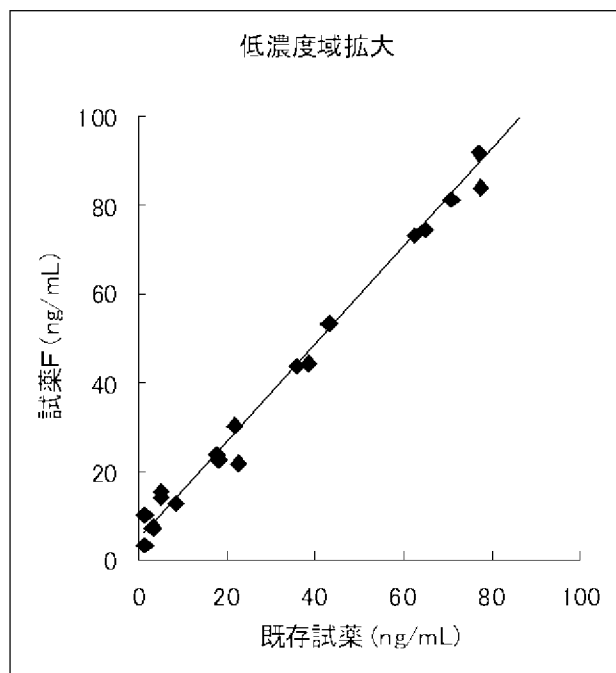
[図11]



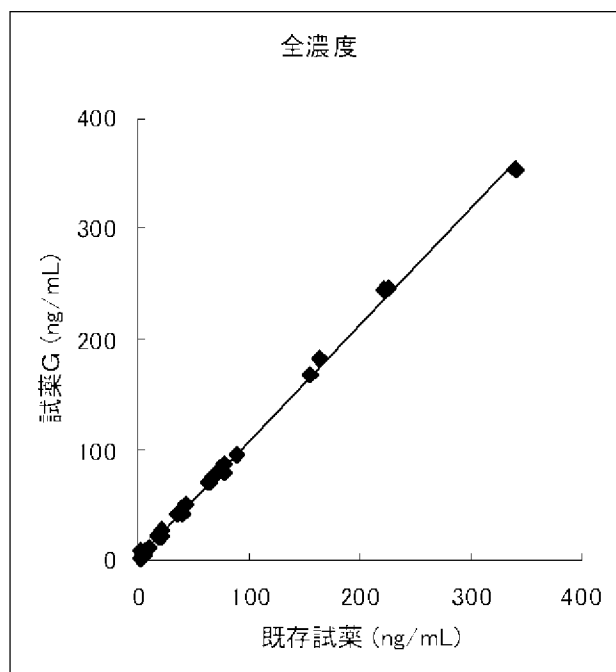
[図12]



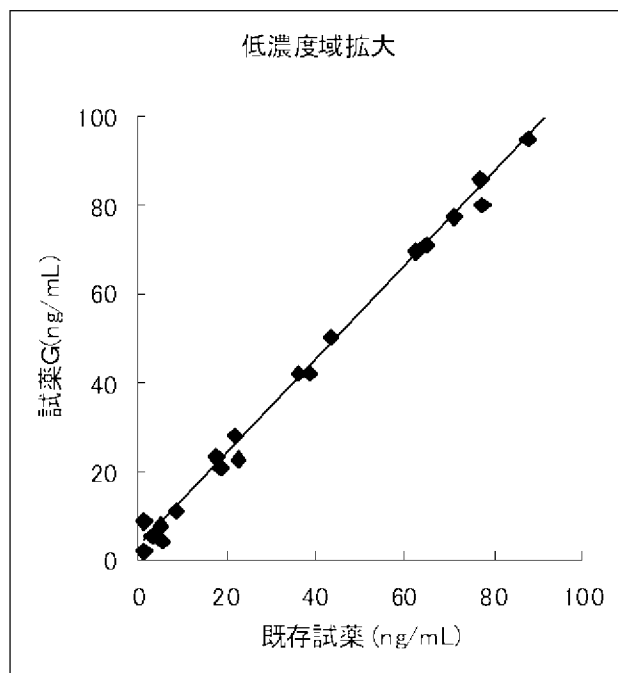
[図13]



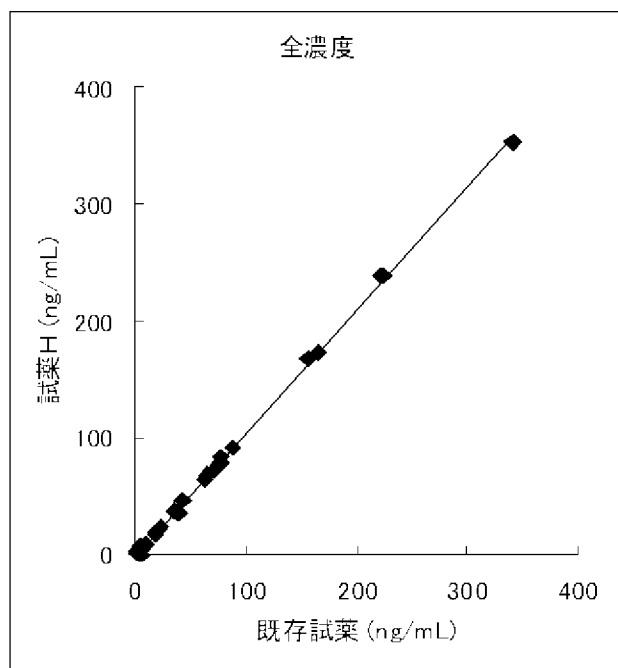
[図14]



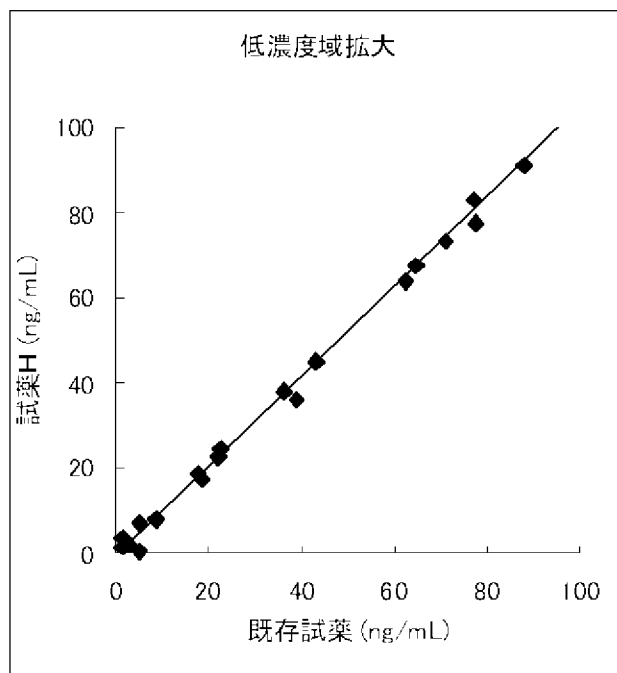
[図15]



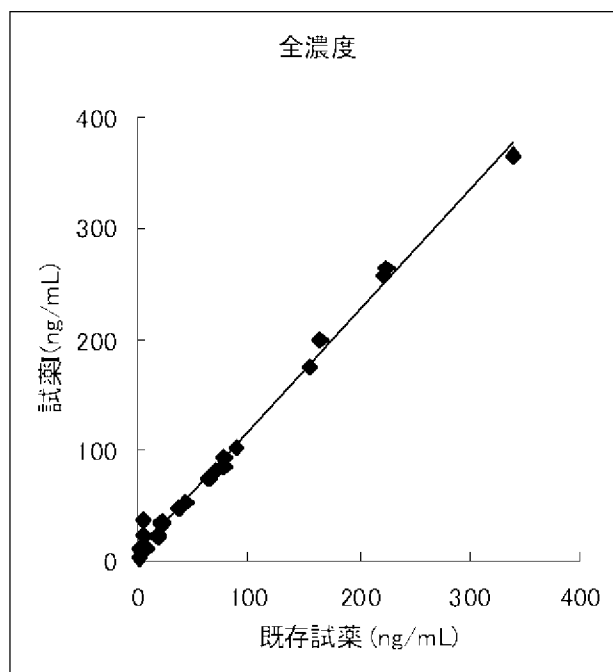
[図16]



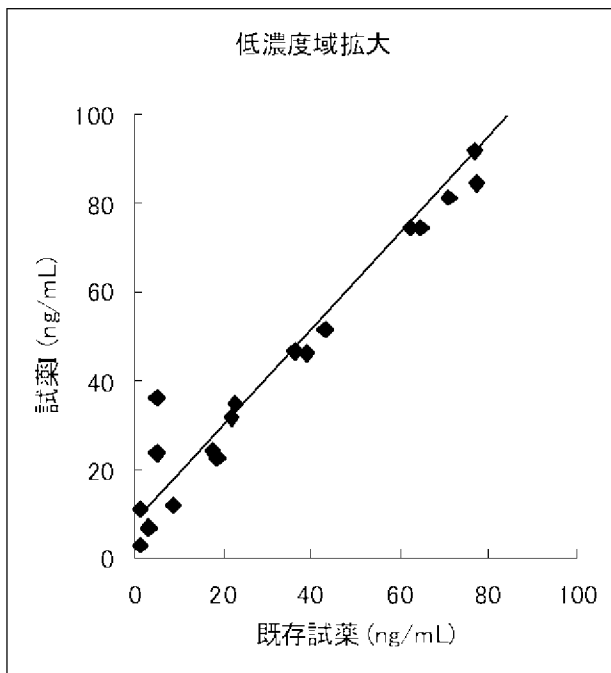
[図17]



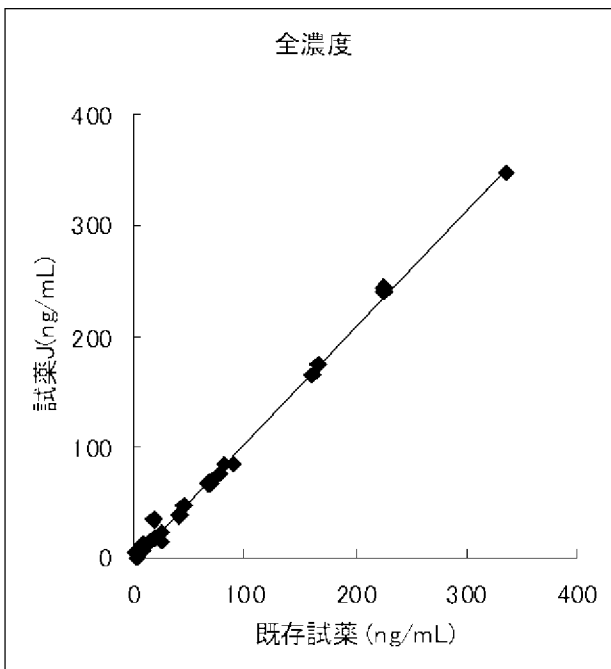
[図18]



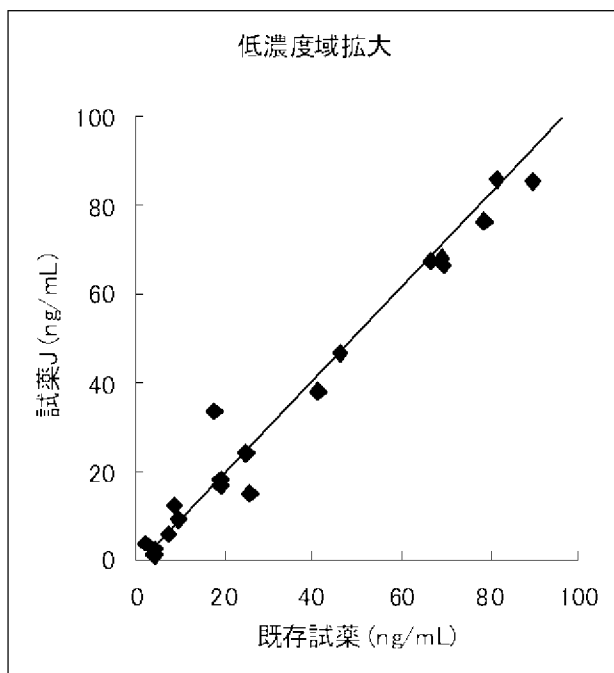
[図19]



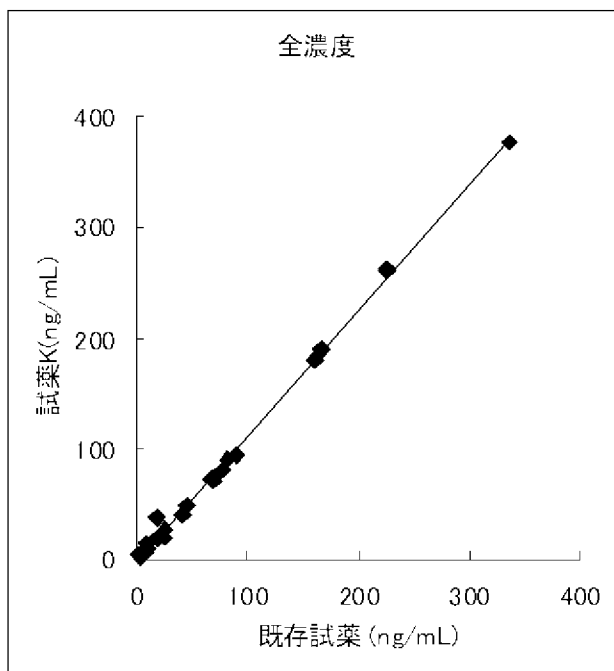
[図20]



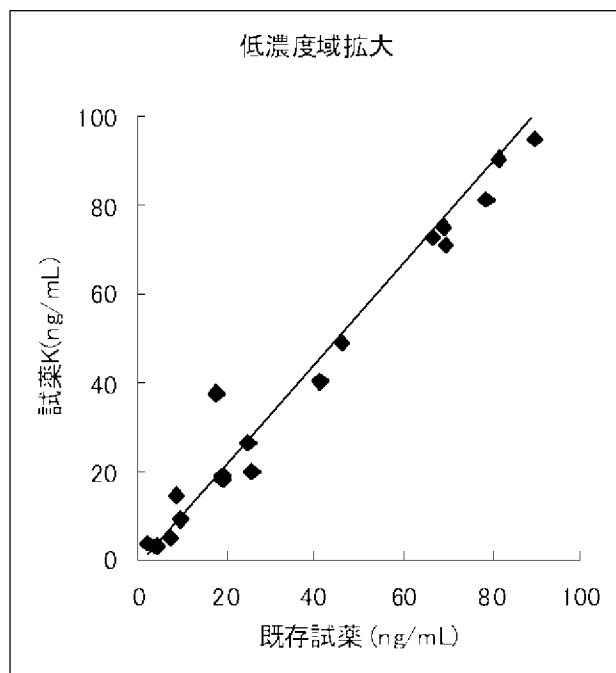
[図21]



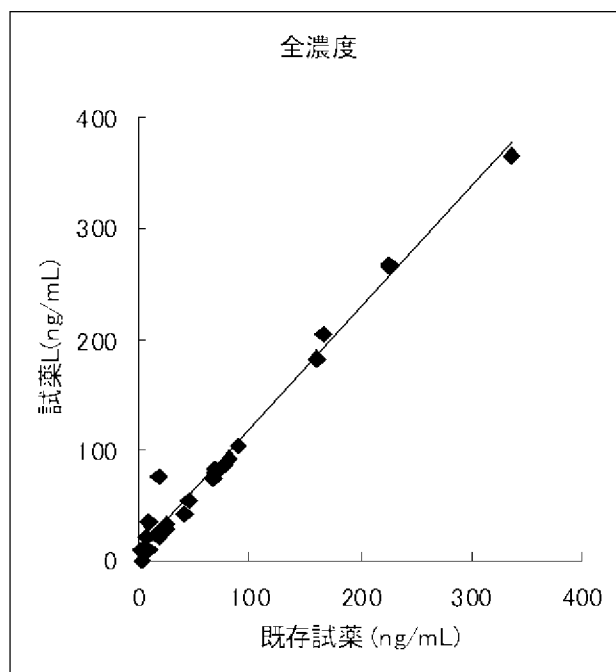
[図22]



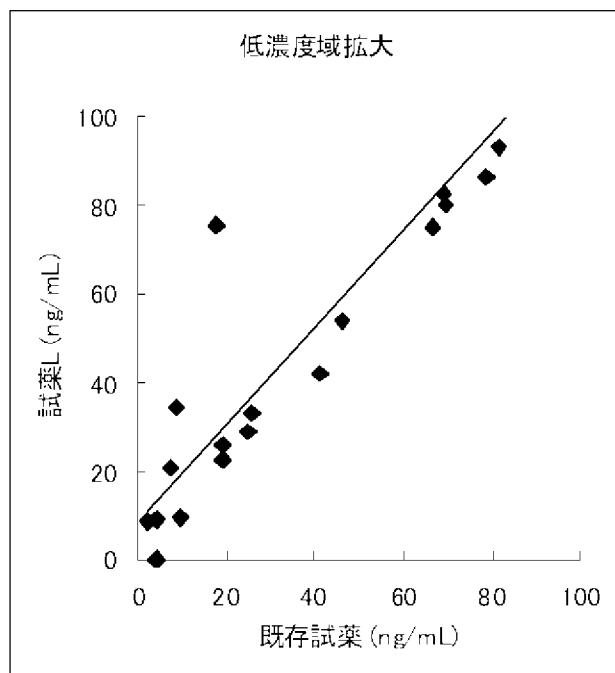
[図23]



[図24]



[図25]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/059180

**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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-235465 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 31 August 2001 (31.08.2001), claims; paragraphs [0026], [0029], [0058] to [0064] (Family: none)	1-10
A	JP 3-76767 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 02 April 1991 (02.04.1991), claims (Family: none)	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“T” 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

“X” 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

“Y” 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  
03 June, 2013 (03.06.13)

Date of mailing of the international search report  
11 June, 2013 (11.06.13)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/059180

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-201503 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 27 July 2001 (27.07.2001), claims; particularly, claims 11, 15; paragraphs [0017], [0021]; examples (Family: none)	1-10

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013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)

CAplus/REGISTRY (STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
X	JP 2001-235465 A (昭和電工株式会社) 2001.08.31, クレーム、【0026】、【0029】、【0058】～【0064】等参照 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 3-76767 A (三菱化成株式会社) 1991.04.02, クレーム等参照 (ファミリーなし)	1-10
X	JP 2001-201503 A (昭和電工株式会社) 2001.07.27, クレーム特にクレーム 1、15、【0017】、【0021】、【実施例】等参照 (ファミリーなし)	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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  
03.06.2013

国際調査報告の発送日  
11.06.2013

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
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)  
加々美 一恵  
2 J | 9408  
電話番号 03-3581-1101 内線 3252