

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4548812号
(P4548812)

(45) 発行日 平成22年9月22日 (2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日 (2010.7.16)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 33/48 A

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 X

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-304703 (P2000-304703)
 (22) 出願日 平成12年10月4日 (2000.10.4)
 (65) 公開番号 特開2001-188065 (P2001-188065A)
 (43) 公開日 平成13年7月10日 (2001.7.10)
 審査請求日 平成19年10月1日 (2007.10.1)
 (31) 優先権主張番号 特願平11-295539
 (32) 優先日 平成11年10月18日 (1999.10.18)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 390014960
 シスメックス株式会社
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
 1号
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (72) 発明者 山下 和昭
 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2
 国際試薬株式会社 研究開発
 センター内
 (72) 発明者 白波瀬 泰史
 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2
 国際試薬株式会社 研究開発
 センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトCRP測定用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテルと、曇点が40以上のポリ
 エチレングリコールモノ-p-フェニルエーテルとを含有するヒトCRP測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、試料の測定方法の改良に関する。より詳しくは本発明は、酵素反応又は免疫反
 応などを適用する試料中成分の測定方法の改良、酵素活性量の測定方法の改良に関するも
 のであり、臨床、薬物化学、生化学及び食品化学の分野に応用可能である。

【0002】

【従来の技術】

生体試料中の特定成分を分析する臨床検査診断分野において、生体試料の濁りにより正確
 な分析ができないことがしばしば起こる。試料中の濁りの主な原因は、リポ蛋白質の一種
 類であるカイロミクロンや超低比重リポ蛋白質であることが多い。これらのリポ蛋白質は
 非極性の脂質である中性脂肪の含有率が高いため、水溶液中で濁りやすいという性質を有
 している。

【0003】

試料の濁りの影響を回避する方法として、種々の界面活性剤により、濁りの原因となっ
 ているリポ蛋白質を可溶化する技術が開示されている（特開昭59-162454号公報、

特公平04-7832号公報)。また、特定の界面活性剤にコラン酸のオキシ誘導体を組合わせることによる生体試料の濁りの除去方法も開示されている(特公平02-24520号公報)。しかしながら、これらの界面活性剤を用いる方法はいずれの場合においても、濁りの除去効果が十分でなかったり、高濃度の界面活性剤を使用するため泡が生じたり、測定に必要な酵素や基質の成分を変性させたり不安定化する等の問題があった。

【0004】

このような問題点を解決するために、特定の界面活性剤と酵素とを組合わせて濁りを除去する方法や、リパーゼを用いた濁り除去方法も開示されている(特公平04-7400号公報、特開平09-288111号公報)。これらの方法はいずれも、測定対象物質が当該酵素によって分解等を受けないことが必要であるため、蛋白質濃度測定などの一部の測定項目に限られていた。例えば、特開平09-288111号公報に開示されているリパーゼを用いる方法は、リパーゼを反応成分に使用する中性脂肪の測定等には適用できなかった。

10

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、試料中の成分の測定において、濁りを防ぐために界面活性剤を添加するに際し、界面活性剤本来の濁りの除去効果を保ちながら、しかも測定対象物質や反応物質に影響を及ぼすことなく温和な条件で測定を達成できるヒトCRP(C反応性蛋白質)測定用試薬を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、高親油性の界面活性剤が有する濁りを減ずる効果と該界面活性剤の曇点との関係に注目して本発明を完成した。曇点とは化合物を試験管中で加熱してゆくときに初めて曇りを生ずる温度をいう。一般に曇点が高い界面活性剤で親油性の高いものは、濁り除去効果は高いが、それ自体の曇点が高いために界面活性剤そのものの濁りが生じるため使用できなかった。

しかしながら本発明者らは、このように曇点が高く通常では用いられない界面活性剤に曇点を上昇させる物質を添加することにより、界面活性剤本来の濁りの除去効果を保ちながら、しかも測定対象物質や反応物質に影響を及ぼすことなく、該界面活性剤を使用できることを見出し、本発明の試料の濁り除去方法及び試料測定用組成物を完成した。

30

【0007】

すなわち、本発明は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテルと、曇点が40以上のポリエチレングリコールモノ-p-フェニルエーテルとを含有するヒトCRP測定用試薬である。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明の試料の濁り除去方法は、親油性の高い界面活性剤の少なくとも1つを用いることにより、試料中の濁りを除去し、さらに、曇点が40以上の物質であって前記界面活性剤の曇点を上昇させうる少なくとも1つの物質を用いることにより、親油性の高い界面活性剤自身の濁りを解消することを特徴とする。

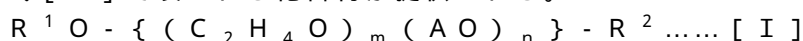
40

【0009】

本発明の試料の濁り除去方法に用いることのできる親油性の高い界面活性剤は、その曇点が40以下であることが好ましい。また、一般に使用されるエチレンオキシド型非イオン性界面活性剤ではなく、オキシエチレン基とオキシアルキレン基の重合体で曇点が40以下のものが、極めて可溶化力が強いことから好適である。

【0010】

特にオキシアルキレン基がオキシプロピレン基のものがより好ましい。具体的には、下記式[I]で表される化合物が提供される。



(式中R¹及びR²は水素原子又はアルキル基、AOはオキシアルキレン基であり、m及

50

び n はそれぞれオキシエチレン基及びオキシアルキレン基の数を示す)

【0011】

上記式 [I] で表される化合物はさらに好ましくは、オキシアルキレン基がオキシプロピレン基であり、 R^1 は水素原子、 R^2 はアルキル基であり、その炭素原子数が 9 ~ 20 個であることを特徴とする化合物である。当該化合物の曇点は、40 以下が好ましい。

【0012】

上記式 [I] で表される化合物は、少なくとも 1 又は 2 以上を試料中に終濃度が 0.01 ~ 10 W/V %、好ましくは 0.1 ~ 5.0 W/V % となるように添加する。

【0013】

本発明の試料の濁り除去方法に用いることのできる曇点を上昇させうる物質とは、上記の親油性の高い界面活性剤、特に曇点 40 以下の化合物を、その添加により最終的に曇点 40 以上に上昇させうる物質をいう。この物質は、少なくとも 40 以上の曇点を有し、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、フェニル基含有化合物及びその塩類、糖、及び配糖体から選択される。より好ましくは、40 以上の曇点を有する非イオン性界面活性剤である。

【0014】

該曇点を上昇させうる物質は具体的には、ポリオキシエチレン二級アルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンデシルテトラデシルエーテル、コール酸、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸、デオキシコール酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、ジメチルラウリルベタイン、アルプチン、フェニルアラニン、トリプトファン、 n -オクチル- β -グルコシド、及びシュークロースモノカプレート等を例示することができる。

【0015】

これらの中から選ばれた一種類又は二種類以上の物質を、試料中に終濃度 0.001 ~ 2 W/V %、好ましくは 0.01 ~ 1.0 W/V % となるように添加する。

【0016】

上記の中から選択された曇点を上昇させうる物質は、例えば生理的食塩水や種々の緩衝液に溶解させて調製した試薬の中に溶解させて使用するのが一般的である。緩衝液としては種々のものを用いることができるが、例えば、ACE、ADA、BES、Bicine、BIS-TRIS、CAPS、CAPSO、CHES、DIPSO、EPPS、HEPES、HEPPSO、MES、MOPS、MOPSO、PIPES、POPSO、TAPS、TAPSO、TES、TricineなどのGood's緩衝液を用いてもよい。

【0017】

本発明の試料測定用組成物は、親油性の高い界面活性剤、好ましくはその曇点が 40 以下である親油性の高い界面活性剤、の少なくとも 1 つと、曇点が 40 以上の物質であって当該界面活性剤の曇点を上昇させうる少なくとも 1 つの物質とを組合せて含有する組成物である。この組成物の構成成分である親油性の高い界面活性剤及び当該界面活性剤の曇点を上昇させうる物質は、上記の界面活性剤及び物質からそれぞれ選択して使用できる。さらに、本発明の試料測定用組成物の曇点は、40 以上であることが好ましい。ここで組成物の曇点とは、組合わせて混合した後の組成物の曇点をいう。本発明の試料測定用組成物は、試料の濁り除去剤として使用される。

【0018】

本発明の試料の濁り除去方法及び試料測定用組成物は、濁りを伴う試料に、又は化合物の添加により濁りが生じると予想される試料に適用される。好適には、リポ蛋白質や脂質による濁りを伴う試料に使用される。さらに好適には、血清や血漿などの血液由来の試料、尿及びその他の体液試料などの生体試料に適用され、臨床検査診断薬の分野で利用される。特に試料の濁りの影響が測定結果に影響を及ぼす短波長の測定による測定項目(例えばAST、ALT、CPK、LDH、コレステロール、トリグリセライド)に好適に用いら

10

20

30

40

50

れる。またさらに、薬物化学、生化学及び食品化学において適用可能である。

【0019】

【実施例】

本発明をより具体的に説明するために、以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕

種々の界面活性剤を終濃度0.2 W/V%に調製し、試料の濁りを除去する効果を調べた。調製した各界面活性剤溶液270 μ Lに市販の静注用脂肪乳剤（商品名：イントラリピッド）の2 W/V%液3 μ Lを添加し、混和直後及び混和後5分後の波長340 nmでの吸光度の変化を調べるにより濁りの除去効果を検討した。吸光度が低い程、試料の濁りが除去されている。その結果、表1に示したように、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテルが良好な濁りの除去効果を示した。

10

【0020】

【表1】

界面活性剤	添加物	混和比	曇点 ℃	吸光度 (A_{340})	
				0%	2%
無添加				0.001	1.004
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	ナシ		90	0.002	0.922
ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	ナシ		60	0.005	0.826
ポリオキシエチレン[9]二級鎖アルキルエーテル 注1)	ナシ		48	0.004	0.401
ポリオキシエチレン[7]二級鎖アルキルエーテル 注1)	ナシ		25	0.295	0.154
ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル	ナシ		34	0.570	0.065
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	2:1	80	0.002	0.931
ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	2:1	60	0.004	0.825
ポリオキシエチレン[9]二級鎖アルキルエーテル 注1)	ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	2:1	52	0.004	0.616
ポリオキシエチレン[7]二級鎖アルキルエーテル 注1)	ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	2:1	35	0.781	0.005
ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル	ポリエチレングリコールモノ- <i>p</i> -フェニルエーテル	2:1	42	0.007	0.004

注1): []内はポリエチレン基のモル数を現す。
アルキル基の炭素原子数は12～14である。

【 0 0 2 1 】

〔実施例2〕 Good's 緩衝液にポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル及びポリエチレングリコールモノ-*p*-フェニルエーテルを混合した界面活性剤（混合割合 2 : 1）を終濃度 0.5 W/V % になるように添加し第一試薬とした。また、試

10

20

30

40

50

料として生理的食塩水及び静注用脂肪乳剤（商品名：イントラリピッド）を生理食塩水で 2 W / V % 、 1 W / V % 、 0 . 5 W / V % に希釈したものを用意した。試料 6 μ L と第一試薬 270 μ L を混合し波長 340 nm での吸光度変化を測定した。その結果を図 1 に示す。脂肪乳剤 2 W / V % を含む試料の強い濁りも約 3 分で除去され、第一試薬が高い濁り除去効果を有することが明らかとなった。

【0022】

〔実施例 3〕ヒト CRP 測定用試薬を次のように調製した。第一試薬として、0 . 15 M の塩化ナトリウム、1 mM の EDTA、0 . 1 W / V % のアジ化ナトリウムを含む 50 mM の HEPES 緩衝液（pH = 7 . 2）に、実施例 2 で調製したポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル及びポリオキシエチレングリコールモノ - p - フェニルエーテルを混合した界面活性剤（混合割合 2 : 1）を第一試薬中の濃度として 2 . 0、2 . 2、2 . 4、2 . 6、2 . 8、3 . 0 W / V % と変化させたものを調製した。第二試薬として、抗ヒト CRP ヤギ抗体を総力価 1 . 5 mg / mL となるように 0 . 15 M の塩化ナトリウム、1 mM の EDTA、0 . 1 W / V % のアジ化ナトリウムを含む 50 mM の HEPES 緩衝液（pH = 7 . 2）に添加したものを調製した。

【0023】

試料は、生理的食塩水で静注用脂肪乳剤（商品名：イントラリピッド）が 2 W / V %、CRP 濃度が 2 . 00 mg / dL になるように生理的食塩水で希釈したものを試料とした。

【0024】

測定は日立 7170 型自動分析装置を用いて行った。具体的には、試料 15 μ L と第一試薬 250 μ L を加え、37 で 5 分間反応後、第二試薬 50 μ L を加えて 37 で 5 分間反応させ、波長 340 nm での吸光度差を測定し、CRP 濃度既知の標準試料を用いて同様の操作により予め作成した検量線から CRP の値に換算した。その結果を図 2 に示す。

【0025】

また、静注用脂肪乳剤（商品名：イントラリピッド）が 2 W / V % になるように生理的食塩水で希釈したものを試料とし、濁り除去効果を、波長 340 nm における吸光度変化を経時的に測定した結果を図 3 に示す。

【0026】

図 2 及び図 3 に示すように、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル及びポリオキシエチレングリコールモノ - p - フェニルエーテルを混合した界面活性剤（混合割合 2 : 1）の添加により試料中の濁りが除去され、試料中の成分の正確な測定が可能となった。すなわち、免疫学的測定においても本発明が有効であることが明らかになった。

【0027】

【発明の効果】

以上説明したように本発明は、試料中の成分の測定において、濁りを防ぐために界面活性剤を添加するに際し、界面活性剤本来の濁りの除去効果を保ちながら、しかも測定対象物質や反応物質に影響を及ぼすことなく温和な条件で測定を達成できるヒト CRP 測定用試薬を提供する。

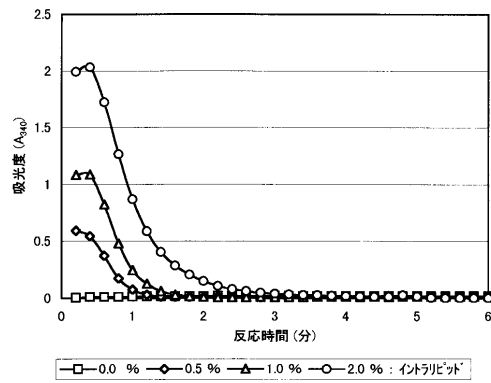
【図面の簡単な説明】

【図 1】ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル及びポリエチレングリコールモノ - p - フェニルエーテルを混合した界面活性剤の、試料中の濁り除去効果を、波長 340 nm での吸光度変化により経時的に説明した図である。

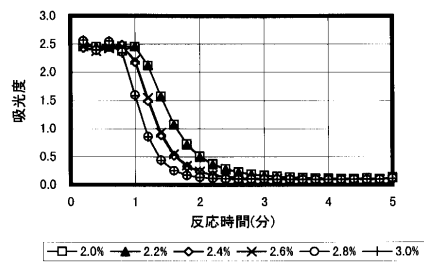
【図 2】ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル及びポリエチレングリコールモノ - p - フェニルエーテルを混合した界面活性剤の添加により、濁りを伴う試料中の CRP が正確に測定できることを示す図である。

【図 3】ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル及びポリエチレングリコールモノ - p - フェニルエーテルを混合した界面活性剤の、試料中の濁り除去効果を、波長 340 nm での吸光度変化により経時的に説明した図である。

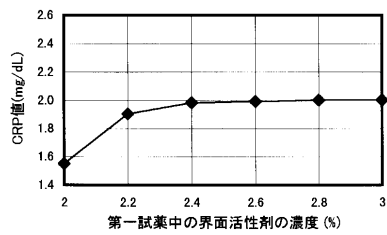
【図 1】



【図 3】



【図 2】



フロントページの続き

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開平 1 0 - 2 1 3 5 8 2 (J P , A)

特開昭 5 5 - 1 5 7 5 1 8 (J P , A)

特開昭 5 6 - 1 6 9 5 8 3 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-98

CAPLUS/MEDLINE(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMII)