

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-205408

(P2013-205408A)

(43) 公開日 平成25年10月7日(2013.10.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 B
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545	B

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2012-78449 (P2012-78449)  
 (22) 出願日 平成24年3月30日 (2012. 3. 30)

(71) 出願人 591125371  
 デンカ生研株式会社  
 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号  
 (74) 代理人 100088546  
 弁理士 谷川 英次郎  
 (72) 発明者 加納 まゆみ  
 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  
 (72) 発明者 橋 律子  
 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  
 (72) 発明者 飯塚 雅行  
 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

(54) 【発明の名称】 免疫分析方法及び試薬

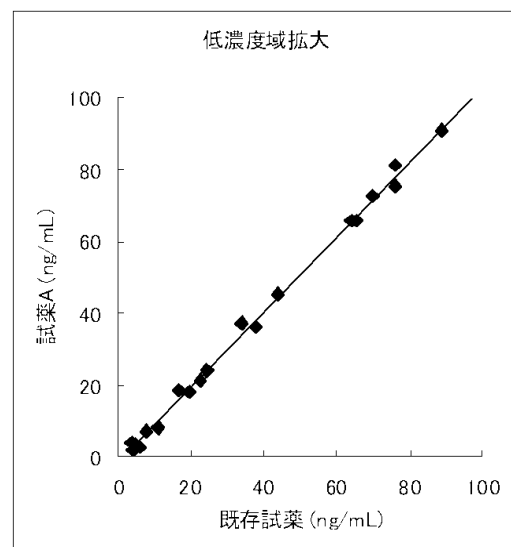
(57) 【要約】

【課題】 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。

【解決手段】 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。

【効果】 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。

【選択図】 図3



## 【特許請求の範囲】

## 【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。

10

## 【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。

20

## 【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。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【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。

40

## 【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

50

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

10

20

30

40

50

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。

10

【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 14 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 16 の低濃度域を拡大して示す。

20

【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 18 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 20 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 22 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。

30

【図 25】図 24 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。

40

【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 (TIA法、ラテックス凝集法)、比色法、RPLA法、CL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】

50

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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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)。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

50

## 【 0 0 2 7 】

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。

## 【 0 0 2 8 】

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。

## 【 0 0 2 9 】

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。

## 【 0 0 3 0 】

## 【 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 OM」 ( 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 )

## 【 0 0 3 1 】

## ( 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  $\mu$ L 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 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 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。

## 【 0 0 3 2 】

## ( 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る既存の市販ラテックス試薬である FER - ラテックス X 2 「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。

## 【 0 0 3 3 】

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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 3 4 】

( 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。

【 0 0 3 5 】

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。

10

【 0 0 3 6 】

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 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、「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。

20

【 0 0 3 7 】

【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

30

【 0 0 3 8 】

( 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 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 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。

40

【 0 0 3 9 】

( 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。

【 0 0 4 0 】

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

50

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、pH8.0)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、pH8.5)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OM」(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10.0μLに試薬J~Lの上記で調製した緩衝液100μLを添加し、この混合液を37で攪拌混合した。5分間放置後、ラテックス浮遊液100μLを添加し、更に37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】

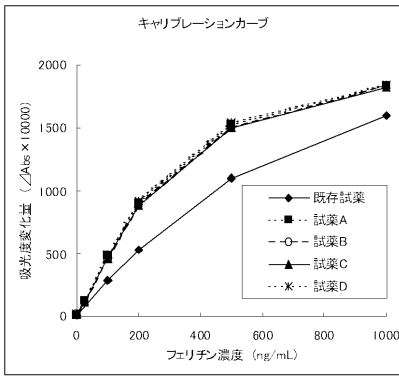
(3) 既存試薬との比較

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。

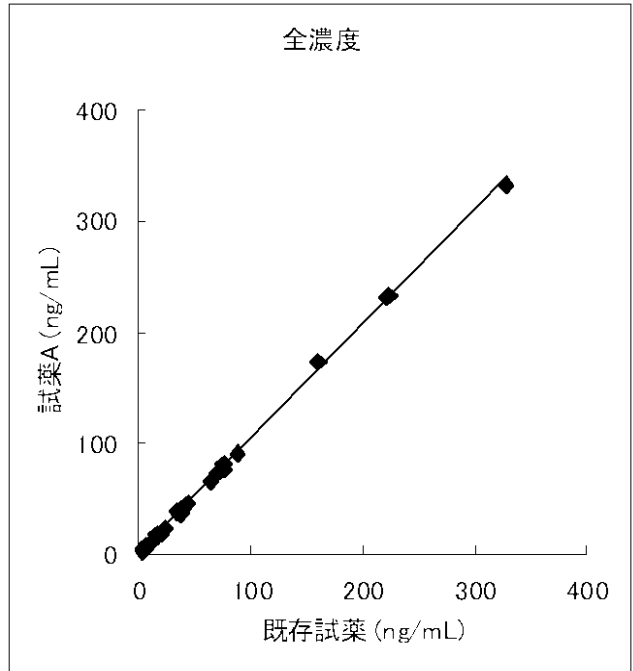
【0045】

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。

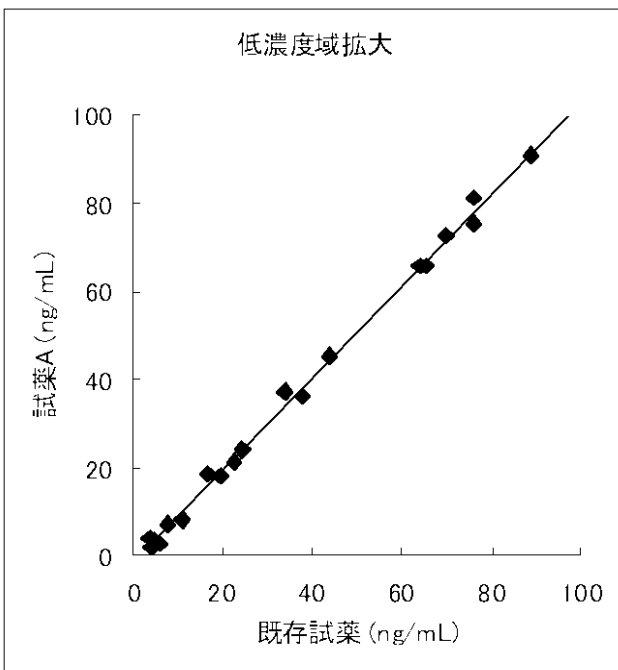
【 図 1 】



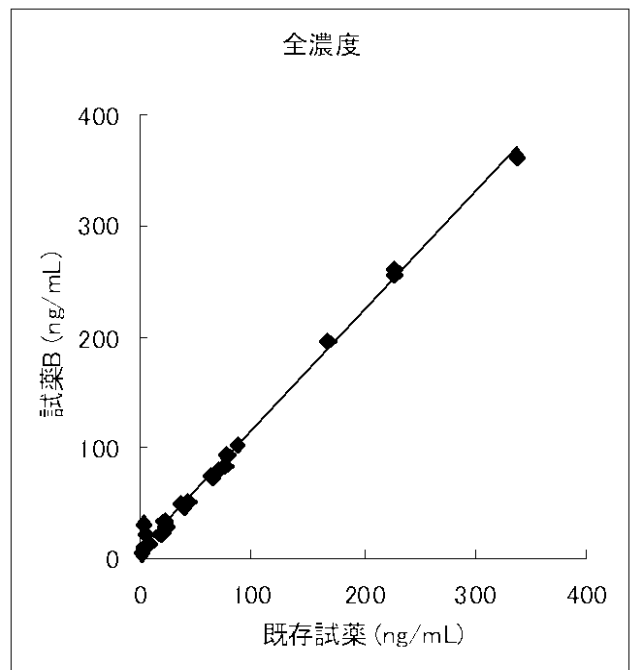
【 図 2 】



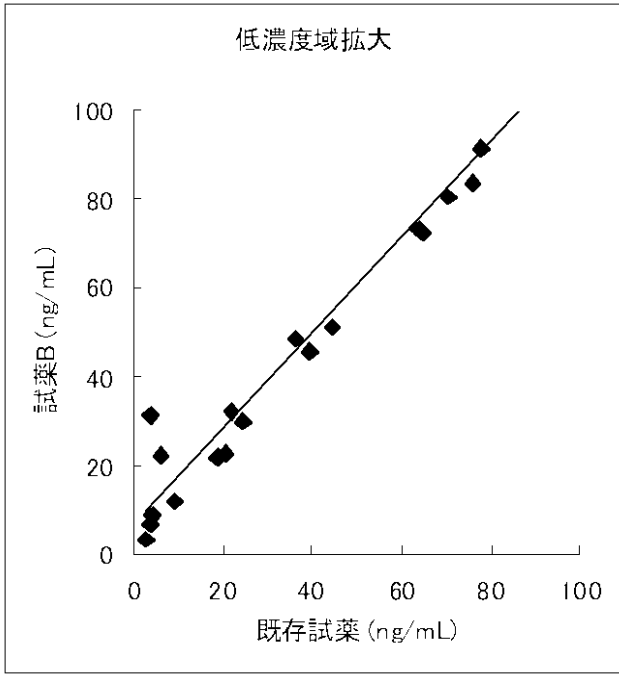
【 図 3 】



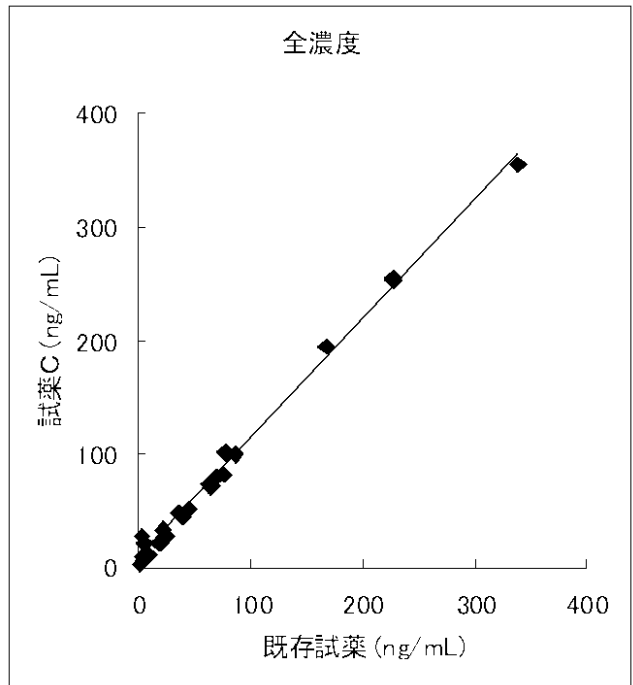
【 図 4 】



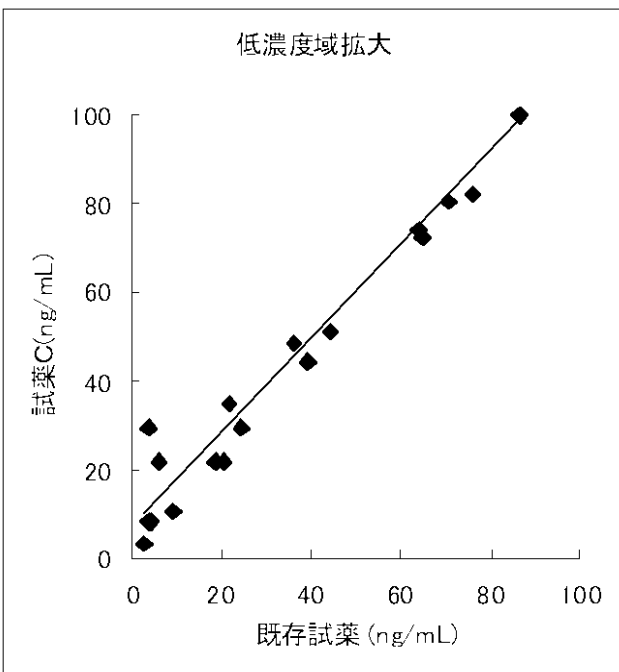
【 図 5 】



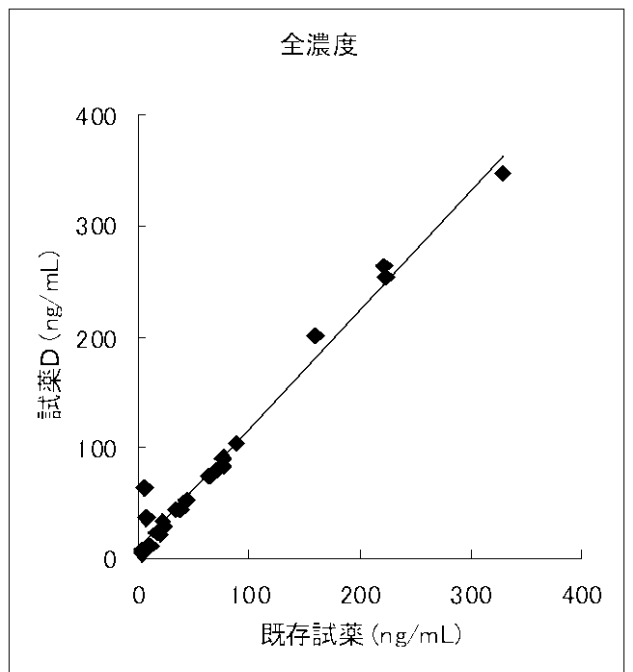
【 図 6 】



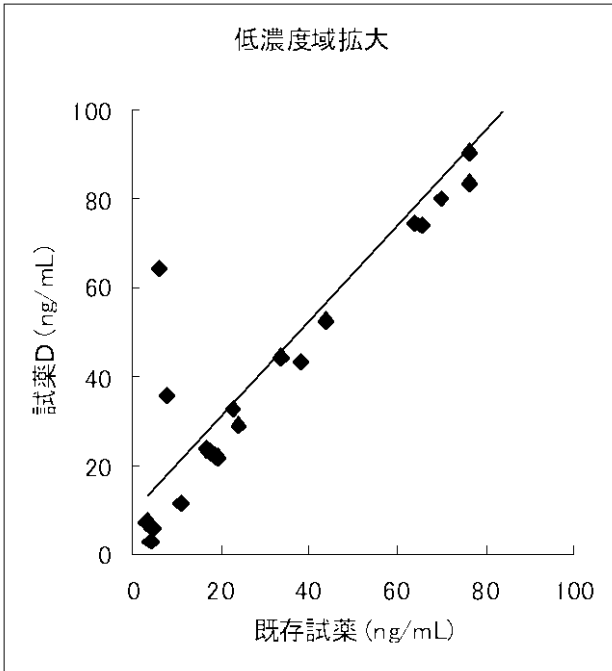
【 図 7 】



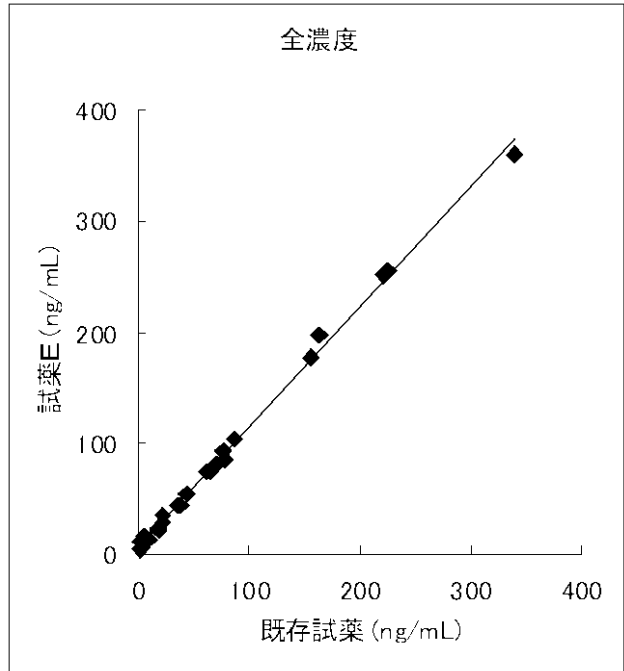
【 図 8 】



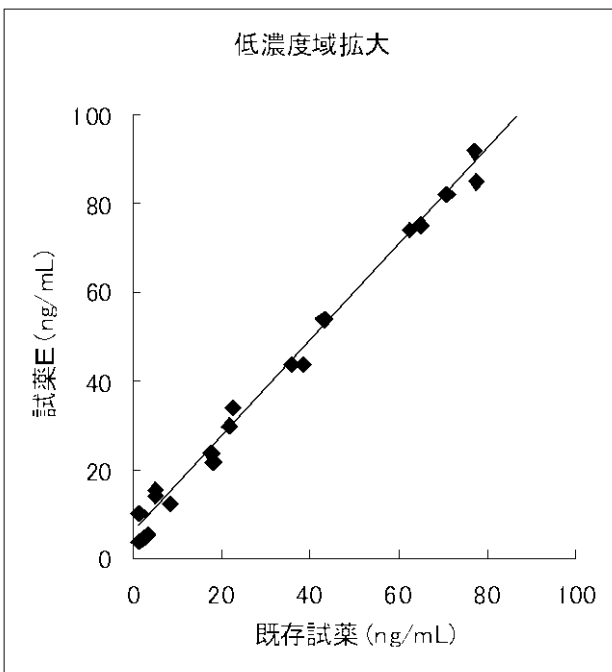
【 図 9 】



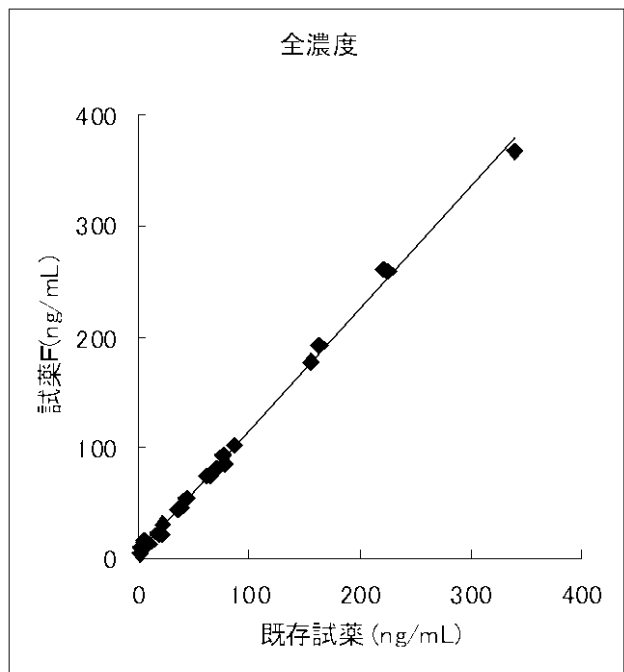
【 図 1 0 】



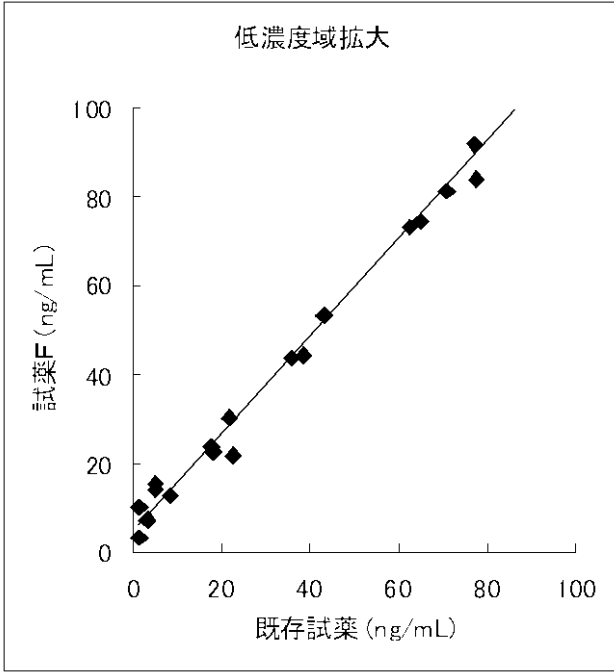
【 図 1 1 】



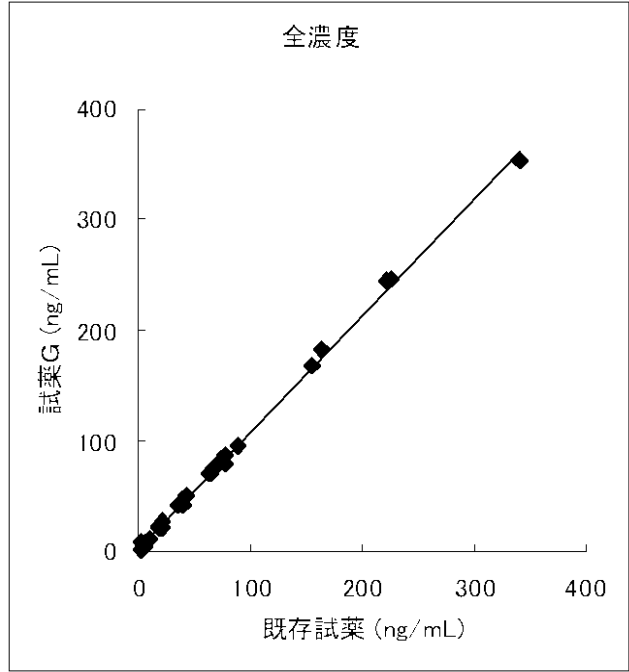
【 図 1 2 】



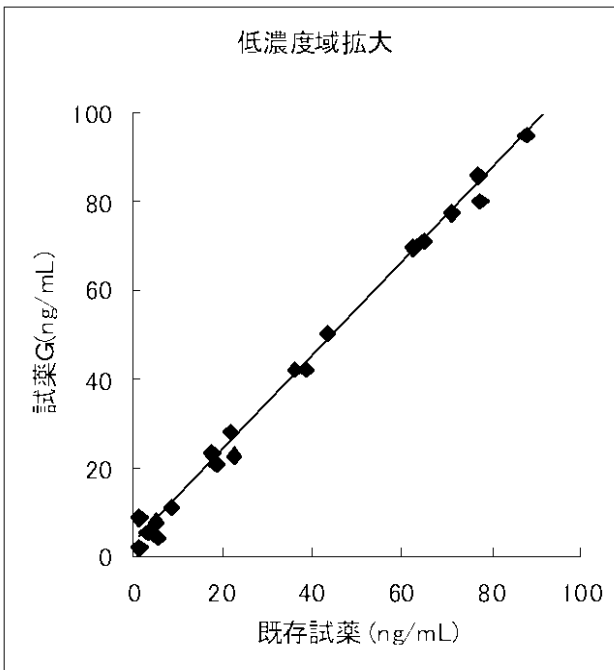
【 図 1 3 】



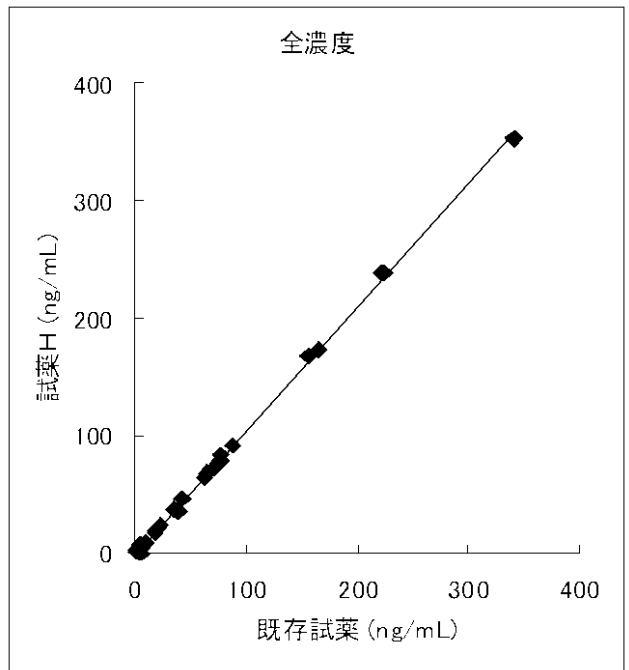
【 図 1 4 】



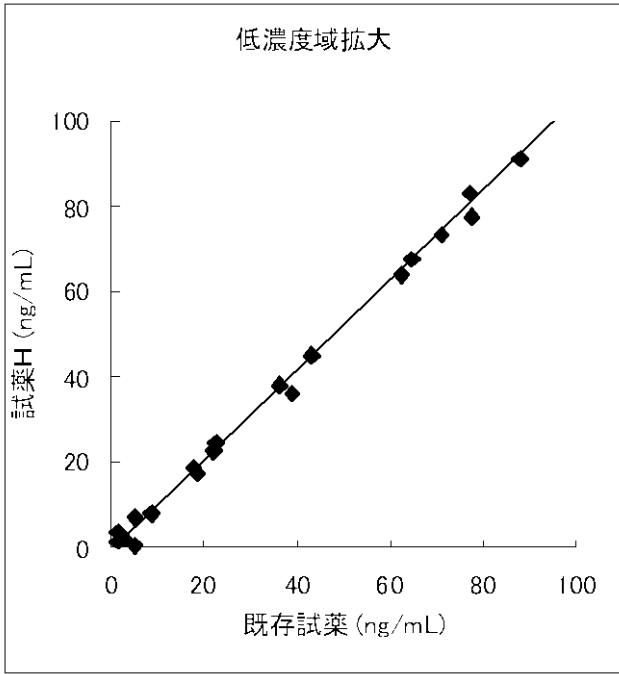
【 図 1 5 】



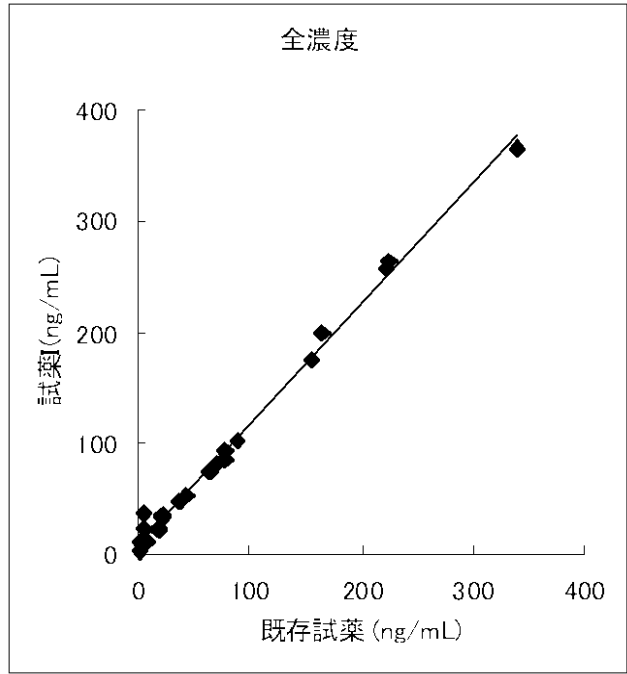
【 図 1 6 】



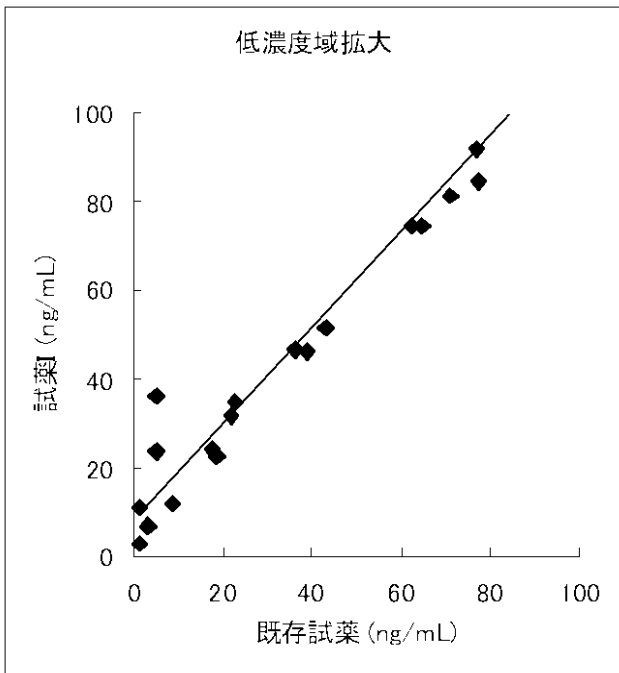
【 図 1 7 】



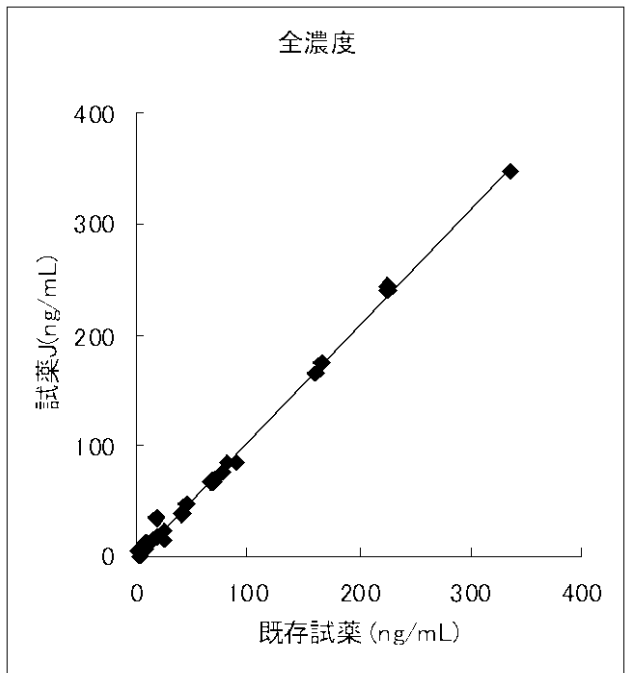
【 図 1 8 】



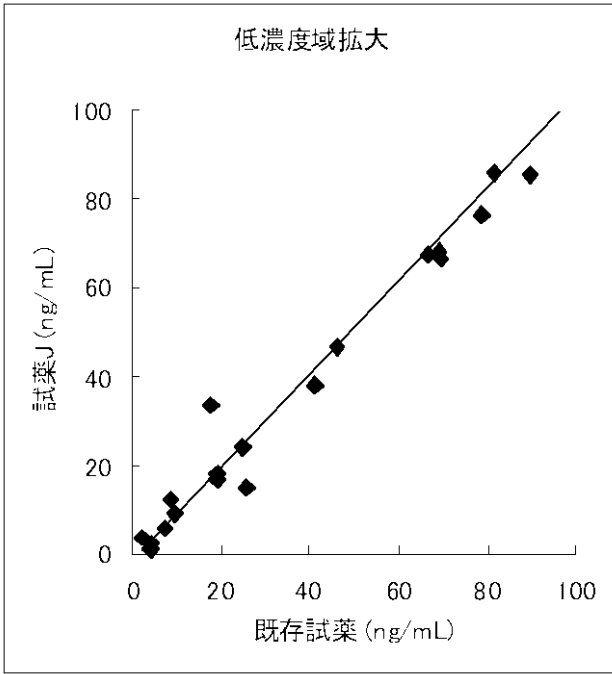
【 図 1 9 】



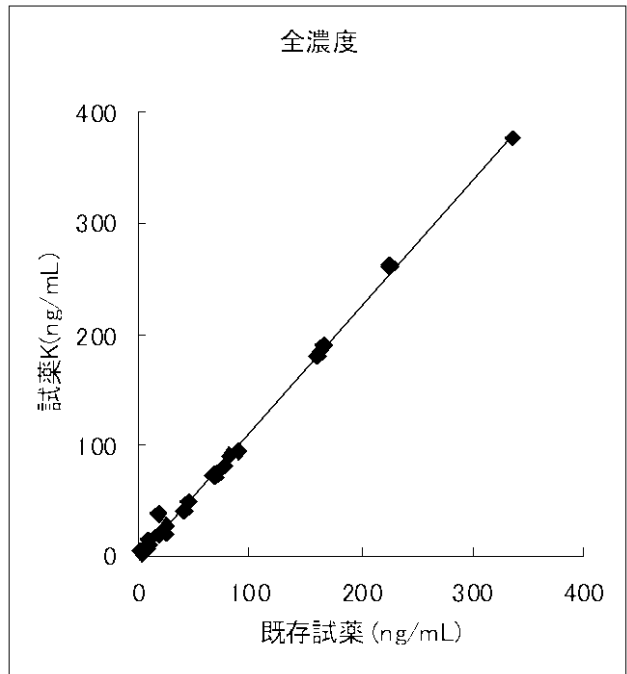
【 図 2 0 】



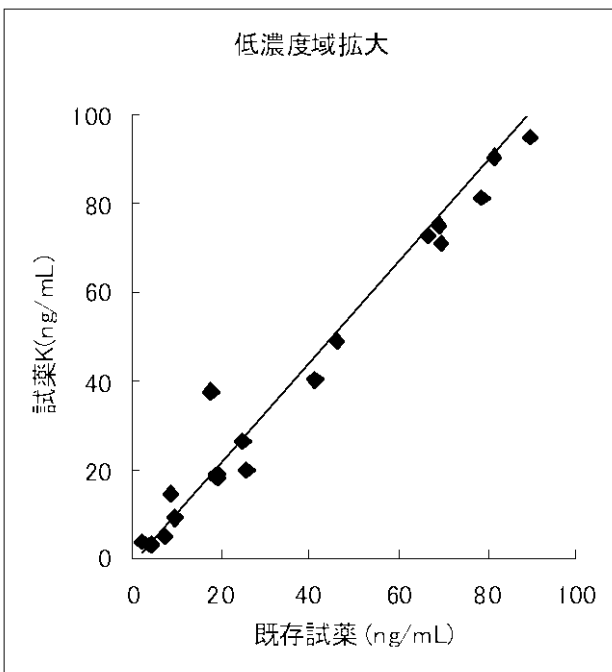
【 図 2 1 】



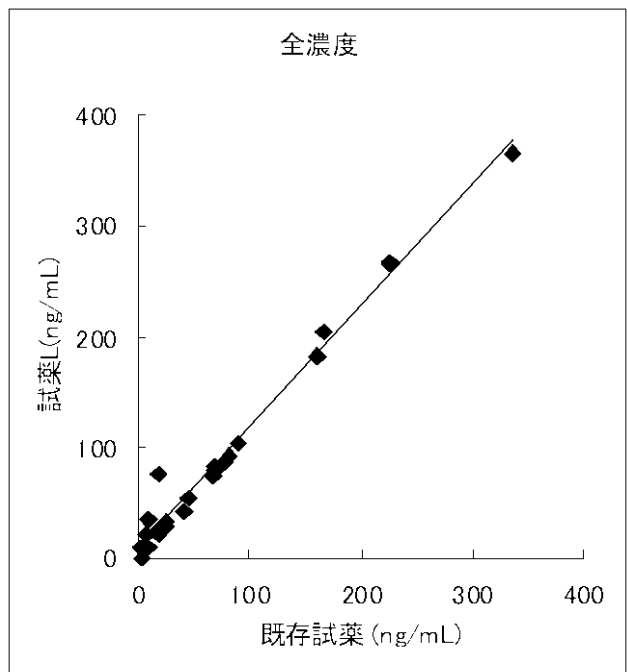
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

