

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年1 月10 日 (10.01.2002)

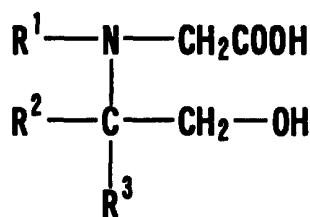
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/03068 A1

- (51) 国際特許分類: **G01N 33/543**, 33/58, 33/53 (74) 代理人: 廣田雅紀(HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05115
- (22) 国際出願日: 2001 年6 月15 日 (15.06.2001) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (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2000-198831 2000 年6 月30 日 (30.06.2000) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和メデックス株式会社 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0042 東京都中央区入船2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 重信香代子 (SHIGENOBU, Kayoko) [JP/JP]. 小栗一人 (OGURI, Kazuhito) [JP/JP]; 〒411-0932 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INSOLUBLE CARRIER PARTICLE NEPHELOMETRIC IMMUNOASSAY REAGENT

(54) 発明の名称: 不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬



(57) Abstract: An insoluble carrier particle nephelometric immunoassay reagent which comprises containing insoluble carrier particles and a buffer comprising a compound having a group represented by the formula below, such as vicine and tricine, or a salt thereof; a kit comprising a suspension containing insoluble carrier particles, such as a latex, and the buffer; an insoluble carrier particle nephelometric immunoassay which comprises allowing insoluble carrier particles to carry an antibody or an antigen in the presence or absence of the above buffer, contacting a specimen in the presence of the above buffer with the resulting insoluble carrier particles having the antibody or the antigen carried thereon to carry out an immune agglutination reaction, and measuring a turbidity caused by the insoluble carrier particle immune agglutination reaction, thereby determining the antibody or the antigen in the specimen. The immunoassay reagent can suppress the action of a blood plasma component which intervenes an agglutination reaction of insoluble carrier particles and affects measured values, to thereby stabilize the agglutination reaction and the absorbance of a reaction mixture, and thus can provide accurate measurement results. [chemical formula] wherein R¹, R² and R³ may be the same or different from one another, and independently represent a hydrogen atom, a hydroxyalkyl group or the like. wherein R¹

[続葉有]

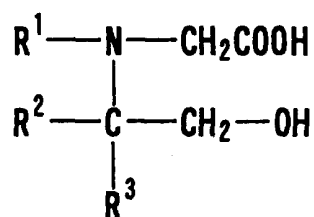
WO 02/03068 A1



(57) 要約:

ラテックス等の不溶性担体粒子凝集反応に関与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化し、反応液の吸光度を安定化し、精確な測定結果を与えることができる不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬や不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット、該試薬やキットを用いる不溶性担体粒子比濁免疫測定法を提供するものである。ピシン、トリシン等の分子内に以下に示される基を有する化合物を含む緩衝液の存在下又は非存在下に、不溶性担体粒子に抗体又は抗原を担持させ、次いで、上記緩衝液の存在下、抗体又は抗原感作不溶性担体粒子懸濁液を検体と接触させ免疫凝集反応を行い、不溶性担体粒子凝集反応によって発生した濁度を測定して、検体中の抗原又は抗体を定量する。

[化学式]



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、ヒドロキシアルキル基等を表す。)

明 細 書

不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬

5 技術分野

本発明は、ラテックス等の不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用試薬、不溶性担体粒子を用いた比濁免疫測定方法及び不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用キットに関し、より詳細には、吸光度を安定化し、かつ反応に關与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制することができ
10 きる不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用試薬、不溶性担体粒子を用いた比濁免疫測定方法及び不溶性担体粒子を含む比濁免疫測定用キットに関する。

背景技術

15 ラテックスは、臨床検査の分野において検体中の抗原又は抗体を測定する免疫測定法に盛んに使用されている。例えば、特開平10-253629号公報には、pH4.2のリン酸クエン酸緩衝液等のpH4.0～6.0の緩衝液中で、抗原又は抗体をポリスチレン系ラテックス粒子に担持させた後、pH8.0のトリス緩衝液等のpH6.5～9.0の
20 緩衝液に置換することからなる、高感度を維持しつつ、プロゾーンの発生を抑制し、バラツキが少なく、安定性に優れた免疫測定試薬の製造方法が記載されている。

また、特開平9-318632号公報には、検体と、抗原又は抗体を担持したラテックス懸濁液とを混合し、この混合液中に二価アルコール
25 を添加し、抗原抗体反応によるラテックス粒子の凝集によって生じる吸光度の変化量を測定することからなる、測定すべき抗原又は抗体が検体

中に高濃度に含まれる場合にあっては、検体を希釈することなく原液のまま測定可能なラテックス比濁免疫測定方法が記載されている。

また、特開平 7-301632 号公報には、表面にカルボキシレート基を有するラテックス粒子と該粒子に共有結合で結合した免疫反応体とを含む担持した微粒子であって、ラテックス粒子が 0.1 ~ 0.6 μm の直径及び 8 ~ 35 平方オングストロームの表面カルボキシレート占有領域を有する、担持した微粒子、及び該微粒子と緩衝液とを含むイムノアッセイ試薬が記載されている。

上記のように、ラテックスはラテックス比濁免疫測定法等免疫凝集反応を利用した測定系によく用いられているが、ラテックス懸濁液は、その中に微量に混入する重金属イオンなどによって反応液中に共存する血漿成分と反応し、抗原又は抗体のラテックス担体に対する吸着性を変化させたり、あるいは抗原又は抗体を結合させたラテックスから抗原又は抗体が解離して遊離の抗原又は抗体が発生し、反応時のラテックス凝集の度合いを変化させたりすることによって、感度が不安定化するという問題があった。また、抗原や抗体を結合させていないラテックスの場合では、表面の電荷を担っているカルボキシル基やスルホン基に重金属イオンが結合することによって表面電荷が変化し、感度が不安定化するという問題があった。

本発明の課題は、ラテックス等の不溶性担体粒子凝集反応に関与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化し、反応液の吸光度が安定化することにより精確な測定結果を与えることができる不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬や不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット、及び該試薬やキットを用いる不溶性担体粒子比濁免疫測定法を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究し、ラテックス凝集

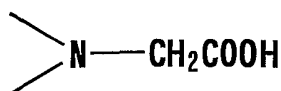
- 反応を不安定化する血漿成分、すなわち血漿中に存在する微量の複数価の金属イオンに対して、分子式中に特定の基を有する化合物を含む緩衝剤を用いると、ラテックス表面の荷電状態を安定化し、ラテックスに結合した抗原又は抗体の遊離を防止し、ラテックス凝集反応を安定化して、
- 5 精確な測定結果を得ることができることを見い出し、本発明を完成するに至った。

発明の開示

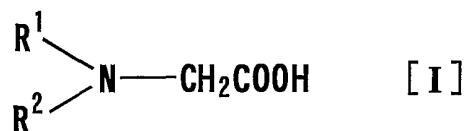
- すなわち本発明は、不溶性担体粒子と、分子内に下記〔化学式 1〕で
- 10 表される基をもつ化合物又はその塩からなる緩衝剤とを含有することを特徴とする不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 1）や、上記化合物が下記〔化学式 2〕に示される一般式〔I〕〔式中、 R^1 、 R^2 は、互いに同一又は異なっているいてもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、あるいは、 R^1 、 R^2 が窒素原子と共に環状構造を形成し、置換もしくは無置換のピペラジニル基、置換もしくは無置換のモルホリノ基、又は置換もしくは無置換のピペリジノ基を形成する基を示す。〕で表される化合物であることを特徴とする請求項 1 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 2）や、上記一般式〔I〕で表される化合物が、
- 15
- 20
- 25

下記〔化学式 3〕に示される一般式〔II〕〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、又はトリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基を示す。〕で表される化合物であることを特徴とする請求項 2 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 3）や、一般式〔II〕で表される化合物が、ビシン又はトリシンであることを特徴とする請求項 3 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 4）や、緩衝剤が、濃度 $5 \sim 200 \text{ mmol/L}$ に調整しうるような形態で含まれていることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 5）や、不溶性担体粒子が、濃度 $0.005 \sim 5$ 重量％に調整しうるような形態で含まれていることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 6）や、不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬（請求項 7）に関する。

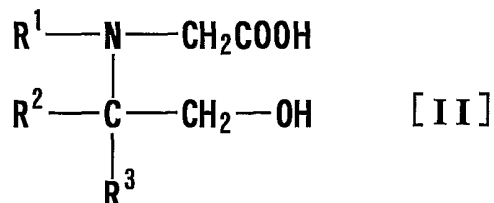
〔化学式 1〕



[化学式 2]



[化学式 3]



- 5 また本発明は、不溶性担体粒子と、分子内に上記 [化学式 1] で表される基を有する化合物又はその塩からなる緩衝剤とを用いることを特徴とする不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項 8）や、上記化合物として、上記 [化学式 2] に示される一般式 [I] [式中、 R^1 , R^2 は前記と同じ。] で表される化合物を用いることを特徴とする請求項 8 記載
- 10 の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項 9）や、一般式 [I] で表される化合物として、上記 [化学式 3] [式中、 R^1 , R^2 , R^3 は前記と同じ。] で表される化合物を用いることを特徴とする請求項 9 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項 10）や、一般式 [II] で表される化合物として、ピシン又はトリシンを用いることを特徴とする請求項 10 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項 11）や、抗原又は抗体を、緩衝剤の存在下に不溶性担体粒子に保持させ、次いで免疫凝集反応を行わせることを特徴とする請求項 8～11 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項 12）や、抗原又は抗体を不溶性担体粒子に保持させた後、緩衝剤の存在下に免疫凝集反応を行わせることを特徴とする請求項 8～12 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項 13）や、緩衝剤を、緩衝剤濃度 5～200
- 15
- 20

mmol/Lの緩衝液として用いることを特徴とする請求項8～13のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項14）や、不溶性担体粒子を、不溶性担体粒子濃度0.005～5重量%の不溶性担体粒子懸濁液として用いることを特徴とする請求項8～14のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項15）や、不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項8～15のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法（請求項16）に関する。

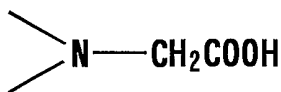
さらに本発明は、不溶性担体粒子を含有する懸濁液と、分子内に上記〔化学式1〕で表される基をもつ化合物又はその塩からなる緩衝剤を含む緩衝液とを含有することを特徴とする不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット（請求項17）や、上記化合物が上記〔化学式2〕に示される一般式〔I〕〔式中、 R^1 , R^2 は前記と同じ。〕で表される化合物であることを特徴とする請求項17記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット（請求項18）や、上記一般式〔I〕で表される化合物が、上記〔化学式3〕に示される一般式〔II〕〔式中、 R^1 , R^2 , R^3 は前記と同じ。〕で表される化合物であることを特徴とする請求項18記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット（請求項19）や、一般式〔II〕で表される化合物が、ピシン又はトリシンであることを特徴とする請求項19記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット（請求項20）や、緩衝剤を含む緩衝液が、緩衝剤の濃度が5～200mmol/Lの緩衝液であることを特徴とする請求項17～20のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット（請求項21）や、不溶性担体粒子を含有する懸濁液が、不溶性担体粒子の濃度が0.005～5重量%の懸濁液であることを特徴とする請求項17～21のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット（請求項22）や、不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項17～22のいずれか記載の不溶性担体粒子比

濁免疫測定用キット（請求項 2 3）に関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬としては、不溶性担体粒子と、分子内に以下の〔化学式 4〕で表される基を有する化合物又はその塩からなる緩衝剤とを含有する不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬であれば特に制限されるものではなく、また本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法としては、不溶性担体粒子と、分子内に以下の〔化学式 4〕で表される基を有する化合物又はその塩からなる緩衝剤とを用いる不溶性担体粒子比濁免疫測定方法であれば特に制限されるものではない。ここで、不溶性担体粒子比濁免疫測定方法とは、不溶性担体粒子を用いる免疫凝集反応によって発生した濁度を測定して、検体中の抗原又は抗体を定量する方法をいう。さらに、本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キットとしては、不溶性担体粒子を含有する懸濁液と、分子内に以下の〔化学式 4〕で表される基をもつ化合物又はその塩からなる緩衝剤を含む緩衝液とを含有する不溶性担体粒子比濁免疫測定用キットであれば特に制限されるものではない。

〔化学式 4〕



上記緩衝剤である化合物としては、下記一般式〔I〕で表される化合物を例示することができ、一般式〔I〕中の R^1 、 R^2 としては、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非

置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシアルキル）アルキル基等を挙げることができる。

上記アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシアルキル）アルキル基、及びトリ（スルホーヒドロキシアルキル）アルキル基におけるアルキル基としては、直鎖又は分枝状の炭素数が1～6のアルキル基を挙げることができ、該直鎖又は分枝状の炭素数が1～6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等を具体的に例示することができる。

上記置換アミノアルキル基及び置換アミノカルボニルアルキル基における置換基としては、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基、スルホアルキル基、スルホーヒドロキシアルキル基、窒素原子を含んで形成される複素環基等を例示することができ、該アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基、スルホアルキル基、スルホーヒドロキシアルキル基におけるアルキル基としては、前

記の直鎖又は分枝状の炭素数が1～6のアルキル基を挙げることができる。上記窒素原子を含んで形成される複素環基としては、ピペラジニル基、モルホリノ基、ピペリジノ基等を挙げることができる。

上記置換アルコキシアルキル基における置換基としては、水酸基、カルボキシル基、スルホン基等を挙げることができる。

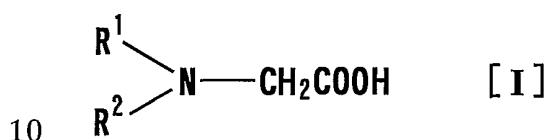
また、一般式 [I] 中の R^1 、 R^2 としては、 R^1 、 R^2 が窒素原子と共に環状構造を形成し、置換もしくは無置換のピペラジニル基、置換もしくは無置換のモルホリノ基、又は置換もしくは無置換のピペリジノ基を形成する基を挙げることができ、該置換ピペラジニル基、置換モルホリノ基、及び置換ピペリジノ基における置換基としては、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基等を挙げることができる。

上記アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、

ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、及びトリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基におけるアルキル基としては、前記の直鎖又は分枝状の炭素数が1～6のアルキル基を挙げることができる。

上記置換アミノアルキル基及び置換アミノカルボニルアルキル基における置換基としては、前記の置換アミノアルキル基及び置換アミノカルボニルアルキル基における置換基が挙げることができる。また、上記置換アルコキシアアルキル基における置換基としては、前記の置換アルコキシアアルキル基における置換基が挙げることができる。

[化学式5]



前記ヒドロキシアアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシブチル基、2-ヒドロキシペンチル基、2-ヒドロキシヘキシル基等を、ジ（ヒドロキシアアルキル）アルキル基としては、ジ（ヒドロキシメチル）メチル基、ジ（2-ヒドロキシエチル）メチル基等を、トリ（ヒドロキシアアルキル）アルキル基としては、トリ（ヒドロキシメチル）メチル基、トリ（2-ヒドロキシエチル）メチル基等を、カルボキシアアルキル基としては、カルボキシメチル基、2-カルボキシエチル基等を、ジ（カルボキシアアルキル）アルキル基としては、ジ（カルボキシメチル）メチル基、ジ（2-カルボキシエチル）メチル基等を、トリ（カルボキシアアルキル）アルキル基としては、トリ（カルボキシメチル）メチル基、トリ（2-カルボキシエチル）メチル基等を、それぞれ具体的に例示することができる。

また、前記置換もしくは無置換のアミノアルキル基としては、アミノ

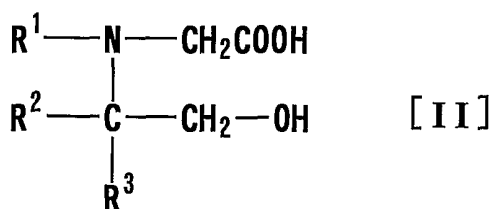
メチル基、2-アミノエチル基、N-メチルアミノメチル基、2-(N-メチルアミノ)エチル基等を、置換もしくは無置換のアミノカルボニルアルキル基としては、アミノカルボニルメチル基、2-アミノカルボニルエチル基、N-メチルアミノカルボニルメチル基、2-(N-メチルアミノカルボニル)エチル基等を、置換もしくは無置換のアルコキシアルキル基としては、メトキシメチル基、エトキシメチル基、2-メトキシエチル基、(カルボキシメチルオキシ)メチル基、(2-ヒドロキシエチルオキシ)メチル基等を、スルホアルキル基としては、スルホメチル基、2-スルホエチル基等を、ジ(スルホアルキル)アルキル基としては、ジ(スルホメチル)メチル基、ジ(2-スルホエチル)メチル基等を、トリ(スルホアルキル)アルキル基としては、トリ(スルホメチル)メチル基、トリ(2-スルホエチル)メチル基等を、スルホ-ヒドロキシアアルキル基としては、2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル基、3-ヒドロキシ-4-スルホプロピル基等を、ジ(スルホ-ヒドロキシアアルキル)アルキル基としては、ジ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)メチル基、ジ(3-ヒドロキシ-4-スルホプロピル)メチル基等を、トリ(スルホ-ヒドロキシアアルキル)アルキル基としては、トリ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)メチル基、トリ(3-ヒドロキシ-4-スルホプロピル)メチル基等を、それぞれ具体的に例示することができる。

また、一般式 [I] で表される化合物の中でも下記一般式 [II] で表される化合物が好ましく、一般式 [II] 中の R^1 , R^2 , R^3 としては、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアアルキル基、ジ(ヒドロキシアアルキル)アルキル基、トリ(ヒドロキシアアルキル)アルキル基、カルボキシアアルキル基、ジ(カルボキシアアルキル)アルキル基、トリ(カルボキシアアルキル)アルキル基、置換もし

くは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基等を挙げることができる。上記アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、及びトリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基としては、それぞれ、前記の各基が挙げることができ、それぞれの具体例も前記の通りである。

上記置換アミノアルキル基、置換アミノカルボニルアルキル基及び置換アルコキシアルキル基における置換基としては、それぞれ、前記の各基が挙げることができ、それぞれの具体例も前記の通りである。

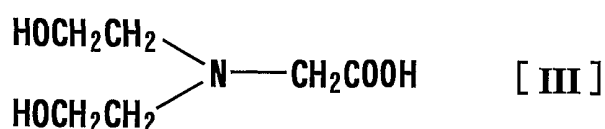
20 [化学式 6]



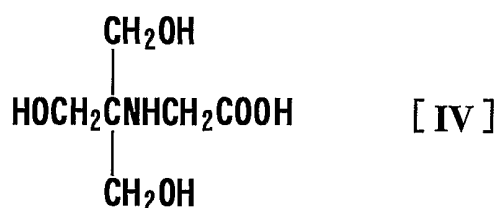
本発明で用いられる緩衝剤として、具体的には、グッド緩衝剤として知られているピシン [N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン]、

トリシン {N- [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] グリシン} の他、
 グリシン、ADA [N- (2-アセトアミド) イミノ二酢酸] 等を挙げ
 ることができ、中でも下記式 [III] で表されるピシンや式 [IV] で表さ
 れるトリシンが、不溶性担体粒子凝集反応をより安定化することができ
 5 るので好ましい。

[化学式 7]



[化学式 8]



上記一般式 [I]、特に一般式 [II] で表される化合物からなる緩衝
 10 剤は、5 ~ 200 mmol/L 濃度で使用することがラテックス等の不
 溶性担体粒子凝集反応をより安定化することができるので好ましい。不
 溶性担体粒子凝集反応における反応時の pH は、反応を安定化する上で
 非常に重要であり、緩衝成分の濃度が 5 mmol/L 以上では、一定の
 pH を維持することが容易となり、他方、200 mmol/L 以下では
 15 不溶性担体粒子同士が抗原抗体反応によらない非特異的な凝集を起
 こすことがない。また、緩衝成分を含有する緩衝液の pH を調節する酸
 類としては通常塩酸や、硫酸、硝酸の他、酢酸等の有機酸等を使用す
 ることができ、アルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、
 水酸化リチウム、水酸化アンモニウムなどを使用することができる。ま

た、本発明における緩衝剤には、上記緩衝成分の他、必要に応じて他の任意成分をも含ませることができる。かかる任意成分としては、検体中の脂質の可溶化に効果のある界面活性剤、特にポリオキシエチレングリコール基を持ったノニオン系界面活性剤やその他カチオン系、アニオン系界面活性剤を例示することができる。

本発明における不溶性担体粒子としては、上記本発明の緩衝剤と併用した場合に、測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化しうるものであればどのようなものでもよく、例えば、特公昭 58-11575号公報等に記載された従来公知の有機高分子物質の微粒子や、無機酸化物の微粒子、あるいは核となるこれらの物質の表面を有機物等で表面処理した微粒子を例示することができ、具体的には、例えば、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、(メタ)アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成樹脂(ラテックス)や、ニトロセルロース、セルロース、メチルセルロース等のセルロース誘導体や、金属、セラミック、ガラス、シリコンラバー等の無機物を挙げる

10 ことができる。これらの中でも、特にポリスチレン系の合成高分子、電荷を与える為に成分としてアクリル酸系のモノマーやスルホン酸をもつモノマーなどを共重合したポリスチレン系の合成高分子が好ましい。

上記のように、本発明においては、上記不溶性担体として、ポリスチレンラテックス等のラテックス粒子が特に好ましく用いられる。ポリスチレンラテックス等の表面の疎水性が強いラテックスを用いると、タンパク質やペプチドの吸着をスムーズにすることができる。また、乳化剤として界面活性剤を用いないソープフリー重合によって得られるポリスチレンラテックス粒子は、表面の負電荷同士の反発に基づき、界面活性

20 剤なしでも安定に存在できるので特に好ましく用いることができる。その他、種々の変性ラテックス(例えば、カルボン酸変性ラテックス)、

25

磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス）等を必要に応じて用いることもできる。

- 定量的にイムノアッセイを行う場合、通常は、不溶性担体粒子の大きさの均一性、表面状態の制御、内部構造の選択などが高度の次元で要求されるが、このような試薬向けの良好なラテックス等の不溶性担体粒子は、市販品の中から選択して用いることが可能である。また、不溶性担体粒子の形状としては、特に制限されるものではないが、例えば、球状等を挙げることができ、球状の場合の粒子径としては、例えば0.03～0.8 μm の平均粒径、特に0.06～0.2 μm の平均粒径が好ましい。そしてまた、本発明における不溶性担体粒子の反応液中の濃度としては、特に制限がないが、例えば、0.001～10重量%、好ましくは0.005～5重量%、より好ましくは0.01～2重量%の濃度で使用することが不溶性担体粒子凝集反応をより安定化することができるので好ましい。
- 15 本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬としては、その使用濃度が5～200 mg / L に調整し得るような形態で含まれているビシン、トリシン等の緩衝剤、その使用濃度が0.005～5重量%に調整し得るような形態で含まれているラテックス等の不溶性担体粒子、不溶性担体粒子担持用抗原又は抗体、及びその他の任意成分を含有する試薬
- 20 を例示することができる。また、かかる試薬において、抗原又は抗体をあらかじめ担持させた不溶性担体粒子を使用することもできる。

- 本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法としては、抗原又は抗体をビシン、トリシン等の緩衝剤の存在下に不溶性担体粒子に、化学結合や物理吸着等により担持させ、次いで免疫凝集反応を行わせる方法や、抗原又は抗体を担持させた不溶性担体粒子に、緩衝剤の存在下に免疫凝集
- 25 反応を行わせる方法を挙げることができ、その場合、緩衝剤は緩衝液と

して、不溶性担体粒子は不溶性担体粒子懸濁液として、使用することができるが、不溶性担体粒子は緩衝液に懸濁させた状態で使用してもよい。また、免疫凝集反応時や、抗原又は抗体の不溶性担体粒子担持時における、緩衝剤濃度を $5 \sim 200 \text{ mmol/L}$ 、不溶性担体粒子を濃度 $0.005 \sim 2$ 重量% とすることが好ましい。

本発明の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キットとしては、ピシン、トリシン等の緩衝剤を $5 \sim 200 \text{ mmol/L}$ の濃度で含有する緩衝液、ラテックス等の不溶性担体粒子を $0.005 \sim 5$ 重量% の濃度で含有する懸濁液、不溶性担体粒子担持用抗原又は抗体、及びその他の任意成分を含有する試薬からなるキットを例示することができる。また、かかる測定用キットにおいて、抗原又は抗体をあらかじめ担持させた不溶性担体粒子を使用することもできる。

以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、実施例中の% 表記は、特に断りがない場合は重量% を示す。

実施例 1

〔試薬 1（緩衝液）の調製〕

緩衝剤としてのピシン（同仁化学社製） 3.26 g を蒸留水に溶解し、 0.1 g のトリトン X-100、 17.5 g の塩化ナトリウム、 0.01 g のアジ化ナトリウムをそれぞれ添加し、 20°C で pH を計測しながら 1 mol/L の塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH 8.0 に調整し、蒸留水で全量を $1,000 \text{ mL}$ とした。また、ピシンの代わりに、緩衝剤としてトリシン（同仁化学社製） 3.58 g 、TAPS O {2-ヒドロキシー-3-[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ]プロパンスルホン酸}（同仁化学社製） 5.18 g 、POPSO

〔ピペラジン－1，4－ビス（2－ヒドロキシー－3－プロパンスルホン酸）・2水和物〕（同仁化学社製）7.97 g、TES {2－〔N－トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕エタンスルホン酸}（同仁化学社製）4.59 gをそれぞれ蒸留水に溶解し、同様にトリトンX－1
5 00、塩化ナトリウム、アジ化ナトリウムを添加し、pH 8.0に調整した後、蒸留水で全量を1,000 mLとした。このようにして、本発明のピシン又はトリシンをそれぞれ20 mmol/L含む緩衝液と、比較例としてTAPSO、POPSPO、TESをそれぞれ20 mmol/L含む緩衝液とからなる5種類の緩衝液を調製した。

10 〔試薬2（抗体担持ラテックス懸濁液）の調製〕

平均粒子径0.31 μ mの10%ポリスチレンラテックス懸濁液（協和メデックス社製）1容に、1/60 mmol/LのPBS溶液（pH 7.4になるように1 mmol/Lの塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液で調製したもの）9容を添加してラテックスを希釈し、1%ラテックス懸濁液
15 とした。また、抗ヒトフェリチン抗体（協和メデックス社製）は、蛋白濃度が50 μ g/mLになるように1/60 mmol/LのPBS溶液で希釈し担持用の抗体液とした。1%ラテックス懸濁液600 μ Lを25℃のインキュベーター中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、これに上記抗体液1200 μ Lを素早く添加し、25℃にて2時間攪拌
20 した。その後、10 mmol/Lのグリシン緩衝液にBSA（和光純薬社製）が0.6%、トリトンX－100（シグマ社製）が0.015%になるように調製したブロッキング液を3 mL添加し、25℃にて続けて2時間攪拌した。その後、4℃、15000 rpmにて1時間遠心分離した。得られた沈殿にブロッキング液を4 mL添加し、同様に遠心分
25 離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング液6 mLを添加し、0.1%の抗体担持ラテックス懸濁

液とした。

[検体の調製]

人血液を採血管（ベノジェクト真空採血管；テルモ社製）で採血後、
2時間放置して得られた上澄み液（血清）を検体1とした。また、人血
5 液をEDTA採血管（ベノジェクト真空採血管；テルモ社製）で採血後、
2時間放置して得られた上澄み液（血清）を検体2とし、人血液を採血
管（ベノジェクト真空採血管；テルモ社製）で採血後、2時間放置して
得られた上澄み液（血清）に、エチレンジアミン四酢酸二カリウム（同
仁化学社製）を1mg/mLになるように添加したものを検体3とした。

10 [試薬1と試薬2を用いた検量線の作成]

フェリチン（スクリプス社製）を生理食塩水に溶解して、10.9、
21.9、43.8、87.5、175ng/mLの各濃度のフェリチ
ン溶液をそれぞれ調製し、これらを10μLずつ140μLの試薬1に
添加し、37℃、6分間反応させた後、150μLの試薬2を添加し、
15 37℃、13分後に、日立自動分析装置7170型を使用して、2ポイ
ントエンド法（測光ポイント21-39）、主波長750nm、副波長
800nmで吸光度変化量を測定することにより検量線を作成した。

[試薬1と試薬2を用いたフェリチン濃度の測定]

上記検量線を作成したと同様に、前記検体1と検体2及び検体3の各
20 10μLを、140μLの試薬1にそれぞれ添加し、37℃、6分間反
応させた後、調製直後の150μLの試薬2を添加し、37℃13分後
に、日立自動分析装置7170型を使用して、2ポイントエンド法（測
光ポイント21-39）、主波長750nm、副波長800nmで吸光
度変化量を測定し、上記検量線を用いて各検体中のフェリチン濃度を測
25 定した。結果を表1に示す。また、調製直後の試薬1に代えて、調製後
1週間が経過した試薬1を用いる他は上記と同様にして測定した結果を

表 2 に示す。表 1 及び表 2 から、緩衝剤としてピシンやトリシンを用いた場合、測定感度が安定することがわかる。

表 1

緩衝液 (調製直後)	フェリチン濃度 (ng/ml)		
	検体 1	検体 2	検体 3
ピシン	40	39	39
トリシン	41	40	41
TAPSO	39	30	38
POPSO	41	23	40
TES	41	31	40

5

表 2

緩衝液 (調製 1 週間後)	フェリチン濃度 (ng/ml)		
	検体 1	検体 2	検体 3
ピシン	40	39	39
トリシン	41	40	41
TAPSO	41	37	41
POPSO	38	33	42
TES	42	38	42

実施例 2

[試薬 3 (ラテックス懸濁液) の調製]

- 10 緩衝剤としてのピシン 3.26 g を蒸留水に溶解させ、10% ラテックス (粒径 0.087 μ m ; 積水化学社製) 3.3 mL、及び 0.1 g のアジ化ナトリウムを添加し、20℃で pH を計測しながら 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液又は塩酸を加え、pH を 7.8 に調整し、
- 15 蒸留水で全量を 1,000 mL とした。また、ピシンの代わりに、緩衝剤としてトリシン 3.58 g、TAPSO 5.18 g、POPSO 7.

97 g、TES 4.59 g をそれぞれ蒸留水に溶解し、同様にラテックス、アジ化ナトリウムを添加し、pH を 7.8 に合わせ、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。このようにして、本発明のピシン又はトリシンをそれぞれ 20 mmol / L 含む緩衝液と、比較例として TAPSO、
5 POPSO、TES をそれぞれ 20 mmol / L 含む緩衝液とからなる 5 種類の緩衝液を調製した。

〔試薬 4（抗体溶液）の調製〕

抗原として変性ヒト HbA1c を用いてマウスを免疫し、常法により得られる抗ヒト HbA1c マウスモノクローナル抗体を抗体溶液の調製
10 に用いた。ピシン緩衝剤 3.26 g を蒸留水に溶解し、塩化ナトリウムを 15 g 添加し、20℃ で pH を計測しながら 1 mol / L の塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH を 7.0 に調整し、Tween 20（和光純薬社製）を 2 g 添加し、アジ化ナトリウムを 0.1 g 添加し、
15 次いで前記抗ヒト変性 HbA1c マウスモノクローナル抗体を 0.025 g（IgG 換算）、抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体（和光純薬社製）を 0.04 g（IgG 換算）添加し、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。また、ピシン緩衝剤の代わりにトリシン緩衝剤 3.58 g、TAPSO 緩衝剤 5.18 g、POPSO 緩衝剤 7.97 g、TES 緩衝剤 4.59 g、をそれぞれ蒸留水に溶解し、同様に塩化ナトリウムを
20 添加し、pH を 7.0 に合わせたものに、ピシンの場合と同様に、Tween 20、アジ化ナトリウムを添加し、次いで抗ヒト HbA1c マウスモノクローナル抗体、抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体を添加し、蒸留水で全量を 1,000 mL とした。

〔検体の調製〕

25 人血液を EDTA 採血管（ベノジェクト真空採血管；テルモ社製）で採血後、2 時間放置して沈殿した血球層 10 μ L をとり、蒸留水 1 mL

で希釈した検体 4 と、この検体 4 に E D T A 採血管の上澄み液である血漿を 10 μ L 添加した血漿混入検体 5 を調製した。

〔試薬 3 と試薬 4 を用いた検量線の作成〕

東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 H L C - 7 2 3 G H b V を用い
5 て測定した H b A 1 c 値が、0.0%、4.2%、7.7%、11.3%、
14.8% であった各検体を用いて、日立自動分析装置 7 1 7 0 型を使用
して吸光度変化量を測定することにより検量線を作成した。上記吸光
度変化量の測定は、240 μ L の試薬 3 に 4 μ L の検体を添加し、37℃
10 で 5 分間反応させた後、80 μ L の試薬 4 を添加し、37℃で 5 分間反
応させた後に主波長 450 nm、副波長 800 nm にて、2 ポイントエ
ンド法（測光ポイント 16 - 34）で吸光度変化量を測定することによ
り行った。

〔試薬 3 と試薬 4 を用いた H b A 1 c 濃度の測定〕

上記検量線を作成したと同様に、前記検体 4 と検体 5 の各 4 μ L を、
15 調製直後の 240 μ L の試薬 3 にそれぞれ添加し、37℃で 5 分間反
応させた後、調製 3 日後の 80 μ L の試薬 4 を添加し、37℃で 5 分間反
応させた後に、日立自動分析装置 7 1 7 0 型を使用して、2 ポイントエ
ンド法（測光ポイント 16 - 34）、主波長 450 nm、副波長 800
nm で吸光度変化量を測定し、上記検量線を用いて各検体中の H b A 1
20 c 濃度を測定した。結果を表 3 に示す。また、調製直後の試薬 3 に代え
て、調製後 1 週間が経過した試薬 3 を用いる他は上記と同様にして測定
した結果を表 4 に示す。表 3 及び表 4 から、緩衝剤としてピシンやトリ
シンを用いた場合、測定感度が安定していることがわかる。

表 3

緩衝液 (調製直後)	H b A 1 c 値 (%)	
	検体 4	検体 5
ピシン	6 . 1	6 . 1
トリシン	6 . 1	6 . 0
T A P S O	6 . 1	5 . 4
P O P S O	6 . 2	3 . 3
T E S	6 . 1	5 . 3

表 4

緩衝液 (調製 1 週間後)	H b A 1 c 値 (%)	
	検体 4	検体 5
ピシン	6 . 1	6 . 1
トリシン	6 . 1	6 . 0
T A P S O	6 . 2	5 . 6
P O P S O	5 . 9	3 . 1
T E S	6 . 3	5 . 6

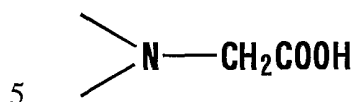
5 産業上の利用可能性

本発明によると、不溶性担体粒子凝集反応に関与して測定値に影響を与える血漿成分の働きを抑制して凝集反応を安定化し、反応液の吸光度を安定化し、精確な測定結果を与えることができる。

請 求 の 範 囲

1. 不溶性担体粒子と、分子内に

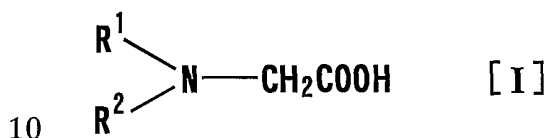
[化学式 1]



で表される基をもつ化合物又はその塩からなる緩衝剤とを含有することを特徴とする不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。

2. 化合物が、一般式 [I]

[化学式 2]



[式中、 R^1 、 R^2 は、互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、あるいは、 R^1 、 R^2 が窒素原子と共に環状構造を形成し、置換もしくは無置換のピペラジニル基、置換もしくは無置換のモルホリノ基、又は置換もしくは無置換のピペリジノ基を形成する基を示す。] で表される化合物であることを特徴とする請求項 1 記載の不

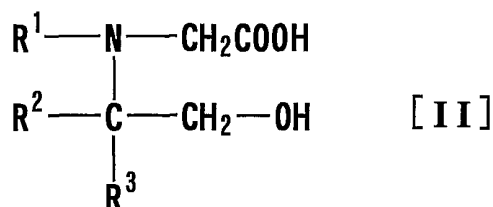
15

20

溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。

3. 一般式 [I] で表される化合物が、一般式 [II]

[化学式 3]



- 5 [式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシアルキル）アルキル基、又はトリ（スルホーヒドロキシアルキル）アルキル基を示す。]
- 10 15 ことを特徴とする請求項 2 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。
4. 一般式 [II] で表される化合物が、ビシン又はトリシンであることを特徴とする請求項 3 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。

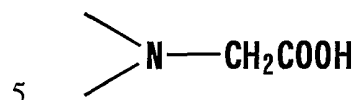
5. 緩衝剤が、濃度 $5 \sim 200 \text{ mmol/L}$ に調整しうるような形態で含まれていることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。
- 20

6. 不溶性担体粒子が、濃度 $0.005 \sim 5$ 重量％に調整しうるような形態で含まれていることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。

7. 不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用試薬。

8. 不溶性担体粒子と、分子内に

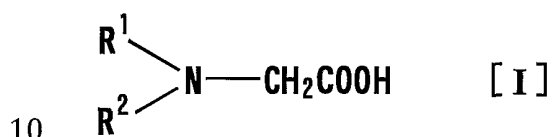
[化学式 4]



で表される基を有する化合物又はその塩からなる緩衝剤とを用いることを特徴とする不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

9. 化合物として、一般式 [I]

[化学式 5]

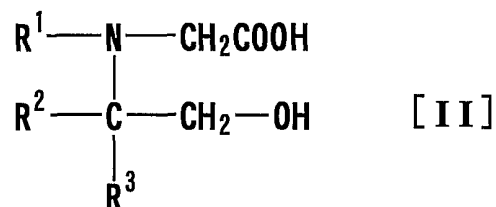


[式中、 R^1 , R^2 は、互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、あるいは、 R^1 , R^2 が窒素原子と共に環状構造を形成し、置換もしくは無置換のピペラジニル基、置換もしくは無置換のモルホリノ基、又は置換もしくは無置換のピペリジノ基を形成する基を示す。] で表される化合物であることを特徴とする請求項 8 記載の不

溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

10. 一般式 [I] で表される化合物として、一般式 [II]

[化学式 6]



- 5 [式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、又はトリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基を示す。]
- 10 で表される化合物であることを特徴とする請求項 9 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

11. 一般式 [II] で表される化合物として、ビスシン又はトリシンを用いることを特徴とする請求項 10 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

12. 抗原又は抗体を、緩衝剤の存在下に不溶性担体粒子に保持させ、
- 20 次の免疫凝集反応を行わせることを特徴とする請求項 8～11 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

13. 抗原又は抗体を不溶性担体粒子に保持させた後、緩衝剤の存在下に免疫凝集反応を行わせることを特徴とする請求項 8～12 のいずれか

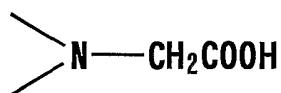
記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

14. 緩衝剤を、緩衝剤濃度 $5 \sim 200 \text{ mmol/L}$ の緩衝液として用いることを特徴とする請求項 8～13 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

5 15. 不溶性担体粒子を、不溶性担体粒子濃度 $0.005 \sim 5$ 重量％の不溶性担体粒子懸濁液として用いることを特徴とする請求項 8～14 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

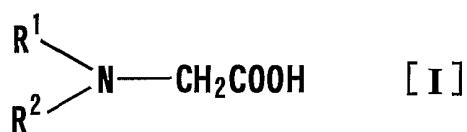
16. 不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項 8～15 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定方法。

10 17. 不溶性担体粒子を含有する懸濁液と、分子内に
[化学式 7]



で表される基をもつ化合物又はその塩からなる緩衝剤を含む緩衝液とを含有することを特徴とする不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

15 18. 化合物が、一般式 [I]
[化学式 8]



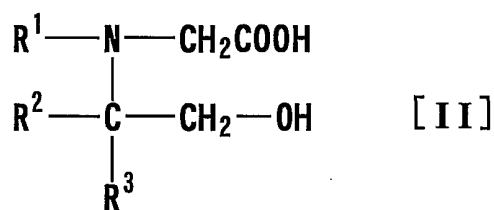
[式中、 R^1 、 R^2 は、互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアルキル

20

基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、トリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、あるいは、 R^1 、 R^2 が窒素原子と共に環状構造を形成し、置換もしくは無置換のピペラジニル基、置換もしくは無置換のモルホリノ基、又は置換もしくは無置換のピペリジノ基を形成する基を示す。］で表される化合物であることを特徴とする請求項 17 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

19. 一般式 [I] で表される化合物が、一般式 [II]

10 [化学式 9]



〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアアルキル基、ジ（ヒドロキシアアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアアルキル）アルキル基、カルボキシアアルキル基、ジ（カルボキシアアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアアルキル）アルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、置換もしくは非置換アルコキシアアルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホーヒドロキシーアルキル基、ジ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基、又はトリ（スルホーヒドロキシーアルキル）アルキル基を示す。］で表される化合物であることを特徴とする請求項 18 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

20. 一般式 [II] で表される化合物が、ヒシン又はトリシンであることを特徴とする請求項 19 記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

21. 緩衝剤を含む緩衝液が、緩衝剤の濃度が $5 \sim 200 \text{ mmol/L}$ の緩衝液であることを特徴とする請求項 17～20 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

22. 不溶性担体粒子を含有する懸濁液が、不溶性担体粒子の濃度が $0.005 \sim 5$ 重量%の懸濁液であることを特徴とする請求項 17～21 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

23. 不溶性担体粒子がラテックスであることを特徴とする請求項 17～22 のいずれか記載の不溶性担体粒子比濁免疫測定用キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/05115

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/543, G01N33/58, G01N33/53		
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) Int.Cl ⁷ G01N33/543, G01N33/58, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, JICST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2-147957 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 06 June, 1990 (06.06.90), (Family: none)	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23
Y		3, 4, 10, 11, 19, 20
X	JP 11-23573 A (Tokuyama Corporation), 29 January, 1999 (29.01.99), (Family: none)	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23
Y		3, 4, 10, 11, 19, 20
X	JP 4-20859 A (Tokuyama Soda Co., Ltd.), 24 January, 1992 (24.01.92), (Family: none)	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23
☐ 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 document 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 11 September, 2001 (11.09.01)		Date of mailing of the international search report 18 September, 2001 (18.09.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, G01N33/58, G01N33/53

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. Cl⁷ G01N33/543, G01N33/58, G01N33/53

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 1971-2001年
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年
 日本国実用新案登録公報 1996-2001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)

BIOSIS, JICST

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 請求の範囲の番号
X	JP 2-147957 A (日立化成工業株式会社) 6. 6月. 1990 (06. 06. 90) ファミリーなし	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 1 5, 16, 17, 18, 2 1, 22, 23
Y		3, 4, 10, 11, 1 9, 20

☒ 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

「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
 「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
 「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)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
 「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
 「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
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 09. 01

国際調査報告の発送日

18.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)

竹中靖典

2J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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 請求の範囲の番号
X	JP 11-23573 A (株式会社トクヤマ) 29. 1月. 1 999 (29. 01, 99) ファミリーなし	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 1 5, 16, 17, 18, 2 1, 22, 23
Y		3, 4, 10, 11, 1 9, 20
X	JP 4-20859 A (徳山曹達株式会社) 24. 1月. 19 92 (24. 01. 92) ファミリーなし	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 1 5, 16, 17, 18, 2 1, 22, 23