

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4241301号  
(P4241301)

(45) 発行日 平成21年3月18日(2009.3.18)

(24) 登録日 平成21年1月9日(2009.1.9)

(51) Int.Cl.

F 1

G O 1 N 33/543 (2006.01)

G O 1 N 33/543 5 8 1 D

請求項の数 12 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2003-340028 (P2003-340028)	(73) 特許権者	000252300
(22) 出願日	平成15年9月30日 (2003.9.30)		和光純薬工業株式会社
(65) 公開番号	特開2005-106609 (P2005-106609A)		大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(43) 公開日	平成17年4月21日 (2005.4.21)	(72) 発明者	角田 恭一
審査請求日	平成18年5月17日 (2006.5.17)		兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純
			薬工業株式会社臨薬研究所内
		(72) 発明者	藤田 稔
			兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純
			薬工業株式会社臨薬研究所内
		(72) 発明者	足立 広道
			兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純
			薬工業株式会社臨薬研究所内
		審査官	海野 佳子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

前立腺特異抗原の遊離体と結合体の両者と反応性を有するモノクローナル抗体1が固定化されたラテックス1と、抗体1とは前立腺特異抗原に対する認識部位が異なる、前立腺特異抗原の遊離体と結合体の両者と反応性を有するモノクローナル抗体2が固定化された、ラテックス1とは平均粒径の異なるラテックス2とを含む、前立腺特異抗原測定用の免疫学的測定用試薬。

【請求項2】

ラテックス1の平均粒径が0.05～0.3μmで、ラテックス2の平均粒径が0.18～0.5μmである、請求項1記載の試薬。

【請求項3】

前立腺特異抗原の遊離体と結合体の両者と反応性を有するモノクローナル抗体1が固定化されたラテックス1、及び抗体1とは前立腺特異抗原に対する認識部位が異なる、前立腺特異抗原の遊離体と結合体の両者と反応性を有するモノクローナル抗体2が固定化された、ラテックス1とは平均粒径の異なるラテックス2と、前立腺特異抗原とを反応させ、生じる凝集反応の結果に基づいて測定物質量を求めることを特徴とする、前立腺特異抗原の測定方法。

【請求項4】

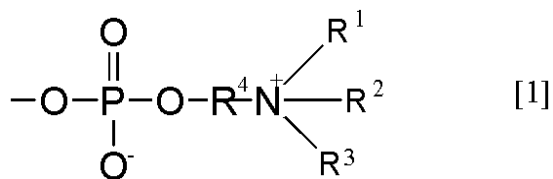
凝集反応の結果が濁度の変化である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

ラテックス 1 の平均粒径が  $0.05 \sim 0.3 \mu\text{m}$  で、ラテックス 2 の平均粒径が  $0.18 \sim 0.5 \mu\text{m}$  である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

凝集反応を、下記一般式 [ 1 ]

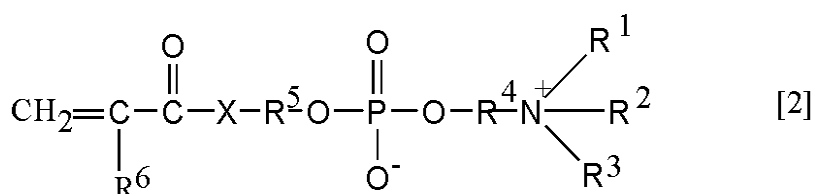


( 式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$  は夫々独立して水素原子又は水酸基を有していてもよいアルキル基を示し、 $\text{R}^4$  はアルキレン基を示す。 ) で表される基を側鎖に有するポリマーの存在下で行わせる、請求項 3 ～ 5 の何れかに記載の方法。

10

【請求項 7】

凝集反応を、下記一般式 [ 2 ]



( 式中、 $\text{R}^5$  は、置換基を有していてもよく且つ鎖中に酸素原子を有していてもよいアルキレン基を示し、 $\text{R}^6$  は水素原子又はメチル基を示し、 $\text{X}$  は酸素原子又は  $-\text{NH}-$  基を示し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$  は前記に同じ。 ) で表されるモノマーに由来するモノマー単位を有するポリマーの存在下で行わせる、請求項 3 ～ 5 の何れかに記載の方法。

20

【請求項 8】

前立腺特異抗原の遊離体と結合体の両者と反応性を有するモノクローナル抗体 1 が固定化されたラテックス 1 と、抗体 1 とは前立腺特異抗原に対する認識部位が異なる、前立腺特異抗原の遊離体と結合体の両者と反応性を有するモノクローナル抗体 2 が固定化された、ラテックス 1 とは平均粒径の異なるラテックス 2 とを含む、免疫学的測定用試薬と、抗原抗体反応の凝集促進剤を含んでなる試薬とからなる、前立腺特異抗原測定用の免疫学的測定法用試薬キット。

30

【請求項 9】

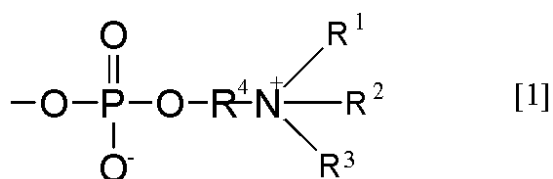
抗原抗体反応の凝集促進剤を含んでなる試薬に更に非特異的反応抑制剤を有する請求項 8 記載のキット。

【請求項 10】

非特異的反応抑制剤が、グアニジン、グアニジン塩またはその誘導体である、請求項 9 記載のキット。

【請求項 11】

凝集促進剤が、下記一般式 [ 1 ]

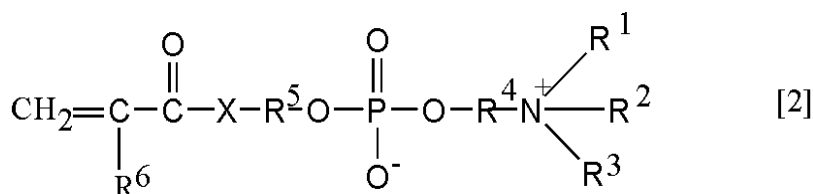


40

( 式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$  は夫々独立して水素原子又は水酸基を有していてもよいアルキル基を示し、 $\text{R}^4$  はアルキレン基を示す。 ) で表される基を側鎖に有するポリマーである、請求項 8 ～ 10 の何れかに記載のキット。

【請求項 12】

凝集促進剤が、下記一般式 [ 2 ]



(式中、 $\text{R}^5$  は、置換基を有していてもよく且つ鎖中に酸素原子を有していてもよいアルキレン基を示し、 $\text{R}^6$  は水素原子又はメチル基を示し、 $\text{X}$  は酸素原子又は  $-\text{NH}-$  基を示し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$  は前記に同じ。) で表されるモノマーに由来するモノマー単位を有するポリマーである、請求項 8 ~ 10 の何れかに記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高感度免疫学的測定用試薬、該試薬を用いた免疫学的測定法並びに該試薬を有する試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

生体中の物質には、遊離体と結合体の両方で存在するものがあることは従来から知られていた。その代表例として前立腺特異抗原 (PSA) があり、PSA は、遊離体である PSA 自体以外に、PSA と 1-アンチキモトリプシン (ACT) 等との結合体で血中に存在することが知られている。このような物質は、遊離体と結合する物質の量や生体内の環境等により遊離体と結合体の比率が変化するため、このような物質の量を測定する際には、両者を測定する必要があった。しかしながら、このような物質を、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定方法で測定すると、抗体の結合率が遊離体と複合体とで異なってしまう、精度よく測定することができないという問題点があった。この問題を解決するために、特開平9-234068号では、ELISAによる、遊離体と結合体両者と等モル反応する測定試薬及びそれを用いた測定方法が提案されている。しかしながら、この方法は、ELISAによる測定方法であるため、特定の装置のみでしか測定することができず、汎用の自動分析装置に用いることができなかった。また、汎用の自動分析装置を利用した高感度な免疫学的測定方法としてはラテックス比濁法が知られているが、該方法では、ELISAで等モル反応を示す抗体を感作させたラテックスを用いても、遊離体と結合体両者を等モルに測定することが難しいという問題があった。そのため、生体中で遊離体と結合体で存在する物質を精度よく測定でき、且つ汎用の自動分析装置に用いることができる方法の開発が望まれていた。

20

30

【0003】

一方、特開平10-123137号には、2種類以上のモノクローナル抗体をラテックス等の不溶性担体に担持させ、且つその不溶性担体が平均粒径の異なるものを用いた免疫分析方法が記載されているが、試料中で遊離体と結合体の両方で存在するものを該測定法により測定することはなされていなかった。

【0004】

【特許文献1】平成9年公開特許公報234068号

40

【特許文献2】平成10年公開特許公報123137号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような現状に鑑み、平均粒径の異なる2種類以上のラテックスに固定化された2種類以上の抗体を用いた、高感度且つ高精度に、生体中で遊離体と結合体の両方が存在する物質を等モルに測定するための免疫学的測定用試薬、該試薬を用いた測定方法、並びに該試薬を有する試薬キットの提供を目的とするものであり、その手段として以下のものを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 0 6 】

即ち、

( 1 ) 測定対象物質が検体中で遊離体と結合体で存在するものであり、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1が固定化されたラテックス 1 と、抗体 1 とは測定対象物質に対する認識部位が異なるモノクローナル抗体 2 が固定化された、ラテックス 1 とは平均粒径の異なるラテックス 2 とを含む、免疫学的測定用試薬、

( 2 ) 測定対象物質が検体中で遊離体と結合体で存在するものであり、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1が固定化されたラテックス 1、及び抗体 1 とは測定対象物質に対する認識部位が異なるモノクローナル抗体 2 が固定化された、ラテックス 1 とは平均粒径の異なるラテックス 2 と、測定対象物質とを反応させ、生じる凝集反応の結果に基づいて測定物質量を求めることを特徴とする、免疫学的測定方法、  
並びに

( 3 ) 測定対象物質が検体中で遊離体と結合体で存在するものであり、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1が固定化されたラテックス 1 と、抗体 1 とは測定対象物質に対する認識部位が異なるモノクローナル抗体 2 が固定化された、ラテックス 1 とは平均粒径の異なるラテックス 2 とを含む、免疫学的測定用試薬と、抗原抗体反応の凝集促進剤を含んでなる試薬とからなる免疫学的測定法用試薬キット、に関する。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、測定対象物質が検体中で遊離体と結合体で存在するものである、高感度且つ高精度な免疫学的測定用試薬、該試薬を用いた測定方法、並びに該試薬を有する試薬キットに関するものであり、本発明の測定方法を用いることにより遊離体及び結合体である測定対象物質両者を等モルに精度よく測定することができる。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 0 8 】

本発明に係る測定対象物質は、遊離体と結合体を有するものであれば特に限定されないが、測定試料中に両者を有するものが好ましい。ここに於いて、遊離体とは、例えば生体試料等の検体中で単独で存在しているものを意味し、結合体とは、上記遊離体と測定対象物質に対して親和性を有する物質（結合物）とが結合しているものを意味する。具体的には、前立腺特異抗原（PSA）、プロテインC、エラスターゼ、カテプシンG、トロンビン、 $C_{11}$ -エステラーゼ、プラスミン、組織型プロスミノゲン・アクチベータ等が挙げられ、中でもPSAが好ましい。尚、結合体に於ける結合物としては、測定対象物質に対して親和性を有し結合し得る物質であれば特に限定はされないが、具体的には、測定対象物質がPSAの場合、 $\gamma_1$ -アンチキモトリプシン又はプロテインCインヒビターが、プロテインCの場合プロテインCインヒビターが、エラスターゼの場合 $\gamma_1$ -プロテアーゼインヒビターが、カテプシンGの場合 $\gamma_1$ -アンチキモトリプシンが、トロンビンの場合抗トロンビンIIIが、 $C_{11}$ -エステラーゼの場合 $C_{11}$ -インヒビターが、プラスミンの場合 $\alpha_2$ -抗プラスミンが、組織型プロスミノゲン・アクチベータの場合プロスミノゲン・アクチベータ・インヒビター1等が夫々挙げられる。

## 【 0 0 0 9 】

本発明に係る測定対象物質に対するモノクローナル抗体としては、測定対象物質との反応性を有するものであれば良く、特に限定されない。その由来も特に限定されず、市販品、或いは細胞融合技術や遺伝子組換え技術等を利用した自体公知の方法〔Eur. J. immunol., 6, 511 (1976)〕等によって産生された、上記した如き性質を有するものは全て使用可能である。

## 【 0 0 1 0 】

また、本発明に係る測定対象物質に対するモノクローナル抗体には、パパイイン等で部分分解して得られるFabフラグメント、ペプシン等で部分分解して得られるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを還元処理して得られるFab'フラグメント等の、所謂抗体フラグメントも全て包含される。尚、このようなフラグメントとして使

10

20

30

40

50

用した方が、目的の測定対象物質測定時に於ける非特異的反応を回避し易くなるのでより望ましい。

【0011】

また、2種類以上の本発明に係る測定対象物質に対するモノクローナル抗体は、測定対象物質の抗原認識部位がお互いに異なるものである。このようなモノクローナル抗体を2種類用いる場合、一方は酸性側の等電点(pI)を有するもの、他方は中性の等電点を有するものを用いるのが好ましく、具体的には、酸性側のpIは、通常3~5、好ましくは4~5であり、中性のpIは通常6~8、好ましくは7~8を用いるのがよい。尚、3種類以上の抗体を用いる場合には上記pIに準じた値の抗体を用いればよい。

【0012】

本発明に係るラテックスとしては、通常この分野で用いられているものであれば特に限定はされないが、例えばポリスチレンラテックス等のスチレン系ラテックス、アクリル酸系ラテックス等が好ましく挙げられる。尚、これらラテックス粒子のうち、乳化剤を用いない乳化重合によって得られるポリスチレンラテックス粒子等は、表面の疎水性が強いため、タンパク質或いはペプチドをスムーズに吸着し、且つ表面の負電荷同士の反発に基づき、乳化剤なしでも溶液中で安定に分散するという性質を有しているので、特に好ましい。尚、種々の変性ラテックス(例えば、上記ポリスチレン中にカルボキシル基を導入したカルボン酸変性ラテックス)、磁性ラテックス(磁性粒子を内包させたラテックス)等も必要に応じて使用できる。

【0013】

また、本発明に係るラテックスとしては、市販のものを使用してもよいが、該ラテックスの粒子の平均粒径が小さいもの、即ち、単位重量あたりの表面積が大きいものが、抗体を効率良く感作させることができるので好ましい。具体的には、通常0.05~2.4 $\mu$ m、好ましくは0.05~1.0 $\mu$ m、更に好ましくは0.05~0.28 $\mu$ mの平均粒径のものの中から選ばれた2種類の、平均粒径が異なるものを組み合わせて用いるとよい。好ましい組み合わせとしては1つが通常0.05~0.3、好ましくは0.05~0.18 $\mu$ mの範囲から選択されるものであり、他の一つが通常0.18~0.5 $\mu$ m、好ましくは0.18~0.28 $\mu$ mの範囲から選択されるもの等が挙げられる。このような平均粒径のものを併せて用いることにより、遊離体及び結合体である測定対象物質両者を等モルに測定することが可能になる。尚、平均粒径の異なる2種類のラテックスの粒径差は少なくとも0.05nm以上の差があることが好ましい。

【0014】

本発明の免疫学的測定用試薬としては、測定対象物質に対するモノクローナル抗体の1つが固定化されたラテックスと、該抗体の一つとは測定対象物質に対する認識部位が異なるモノクローナル抗体が固定化された、前記ラテックスとは平均粒径の異なるラテックスとを含むものであり、具体的には例えば測定対象物質がPSAである場合、PSAモノクローナル抗体が固定化された例えば平均粒径0.05~0.18 $\mu$ mのラテックスと前記PSA抗体とは異なる認識部位を有するPSA抗体を固定化された例えば平均粒径0.18~0.28 $\mu$ mのラテックスとを含むもの等が挙げられる。上記のような粒径のラテックスを用いることで、遊離体と結合体とをほぼ等モルで測定することが可能となる。また、2種類のラテックスを混合する際、その容量の比は、平均粒径の大きいものと小さいものとの比が、1:10~10:1であるのが好ましく、1:10~2:1であるのがより好ましい。尚、3種類以上用いる場合は、その中の2種類が上記比率となるようにし、それ以外はそれに準じた容量とすればよい。

【0015】

尚、該試薬を調製するために用いられる溶媒としては、上記モノクローナル抗体が測定対象物質に結合するのを妨げる性質を有さないものであればよく、例えばpH5.0~10.0、好ましくはpH6.5~8.5の中性付近に緩衝作用を有する、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液等が好ましく挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常10~500mM、好ましくは10~300mMの範囲から適宜選択される。また、この溶液中には、上記モノクローナル抗体が測定対象物質に結合す

10

20

30

40

50

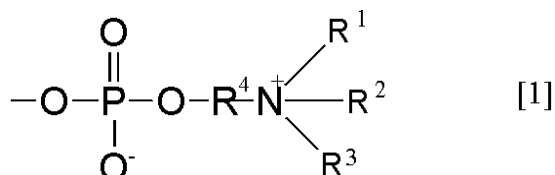
るのを妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤等が含まれていてもよい。

【0016】

ラテックスにモノクローナル抗体を固定化する方法としては、自体公知の方法に準じて行えばよく、例えば、モノクローナル抗体とラテックスとを例えば上記緩衝液中に入れて懸濁させ、20～30 で2～3時間反応させた後、遠心分離、ブロッキング処理等、通常この分野で行われる後処理を行うことにより得ることができる。

【0017】

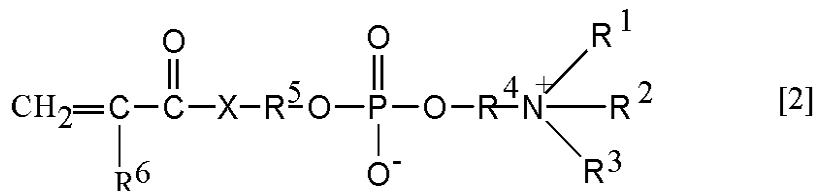
本発明の免疫学的測定法用試薬キットとしては、上述したような本発明の測定用試薬と、抗原抗体反応の凝集促進剤を含んでなる試薬とからなるものであれば特に限定はされない。該抗原抗体反応の凝集促進剤としては、抗原抗体反応の凝集反応を促進する作用を有するものであればよく、具体的には、例えば下記一般式[1]



【0018】

(式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$  は夫々独立して水素原子又は水酸基を有していてもよいアルキル基を示し、 $\text{R}^4$  はアルキレン基を示す。)

で表される基を側鎖に有するポリマー等が挙げられ、より具体的には、下記一般式[2]



【0019】

(式中、 $\text{R}^5$  は、置換基を有していてもよく且つ鎖中に酸素原子を有していてもよいアルキレン基を示し、 $\text{R}^6$  は水素原子又はメチル基を示し、Xは酸素原子又は-NH-基を示し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$  は前記に同じ。)

で表されるモノマーに由来するモノマー単位を有するもの等が挙げられる。

【0020】

上記一般式[1]又は[2]に於いて、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$  で示される水酸基を有していてもよいアルキル基のアルキル基としては、直鎖状、分枝状、環状の何れでもよく、通常炭素数1～6、好ましくは1～4、より好ましくは1～2、更に好ましくは1のものが挙げられ、具体的には、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、sec-ペンチル基、tert-ペンチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基、sec-ヘキシル基、tert-ヘキシル基、シクロプロピル基、シクロヘキシル基、シクロペンチル基等が挙げられ、好ましくはメチル基、エチル基等であり、より好ましくはメチル基等である。

【0021】

また、水酸基を有するアルキル基としては、上記した如きアルキル基の水素原子の1～2個、好ましくは1個が水酸基に置換したものが挙げられ、具体的には、例えばヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシ-n-プロピル基、ヒドロキシイソプロピル基、ヒドロキシ-n-ブチル基、ヒドロキシ-イソブチル基、ヒドロキシ-sec-ブチル基、ヒドロキシ-tert-ブチル基、ヒドロキシ-n-ペンチル基、ヒドロキシ-イソペンチル基、ヒドロキシ-sec-ペンチル基、ヒドロキシ-tert-ペンチル基、ヒドロキシ-n-ヘキシル基、ヒドロキシ-イソヘキシル基、ヒドロキシ-sec-ヘキシル基、ヒドロキシ-tert-ヘキシル基、ヒドロキシ-シクロプロピル基、ヒドロキシ-シクロヘキシル基、ヒドロキシ-シクロペンチ

10

20

30

40

50

ル基等が挙げられ、好ましくはヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基等である。

【 0 0 2 2 】

R<sup>4</sup>で示されるアルキレン基としては、例えば炭素数 1 ~ 6、好ましくは 2 ~ 3 のものが挙げられ、これらは直鎖状、分枝状、環状の何れでもよい。具体的には、例えばメチレン基、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、ブチレン基、1 - エチルエチレン基、2 - メチルトリメチレン基、2 - エチルトリメチレン基、ヘキシレン基、シクロプロピレン基、シクロブチレン基、シクロペンチレン基、シクロヘキシレン基等が挙げられ、好ましくはエチレン基、プロピレン基、トリメチレン基等である。

【 0 0 2 3 】

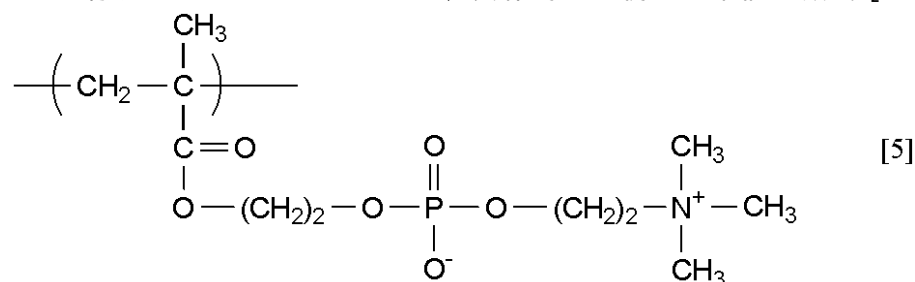
一般式 [ 2 ] に於いて R<sup>5</sup> で表される、置換基を有していてもよく且つ鎖中に酸素原子を有していてもよいアルキレン基において、酸素を有さない場合のアルキレン基としては、例えば炭素数 1 ~ 10、好ましくは 1 ~ 6、より好ましくは 2 ~ 6 のものが挙げられ、これらは直鎖状、分枝状、環状の何れでもよい。具体的には、例えばメチレン基、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、ブチレン基、1 - エチルエチレン基、2 - メチルトリメチレン基、2 - エチルトリメチレン基、ヘキシレン基、シクロプロピレン基、シクロブチレン基、シクロペンチレン基、シクロヘキシレン基等が挙げられる。また、その置換基としては、例えば炭素数 1 ~ 6、好ましくは 1 ~ 3 のアルコキシ基〔直鎖状、分枝状、環状の何れにてもよい。〕、より具体的には例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、イソペンチルオキシ基、sec-ペンチルオキシ基、tert-ペンチルオキシ基、n-ヘキシルオキシ基、イソヘキシルオキシ基、sec-ヘキシルオキシ基、tert-ヘキシルオキシ基、シクロプロポキシ基、シクロヘキシルオキシ基、シクロペンチルオキシ基等、例えばハロゲン原子、より具体的にはフッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられ、好ましくはエチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、ブチレン基等である。また、鎖中に酸素原子を有する場合、酸素原子としては 1 ~ 5 個、好ましくは 1 ~ 3 個であり、より具体的には - ( C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O )<sub>n</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> - ( 式中、n は 1 ~ 5 の整数を表す。 ) 等が挙げられる。上記した R<sup>5</sup> で表される、置換基を有していてもよく且つ鎖中に酸素原子を有していてもよいアルキレン基の中でも、エチレン基、プロピレン基が好ましく、エチレン基がより好ましい。

【 0 0 2 4 】

上記一般式 [ 1 ] で示される基を側鎖に有するモノマーに基づく構成単位を有するポリマーは、市販されているものを用いてもよいし、例えば特開平 10 - 45794 号公報、特開 2000 - 239696 号公報等に記載された方法に準じて合成されたものを用いてもよい。

【 0 0 2 5 】

上記一般式 [ 2 ] で表されるモノマーに基づく構成単位としては、上記した如き R<sup>1</sup> ~ R<sup>6</sup> を有するものであればよいが、具体的には例えば下記一般式 [ 5 ]



【 0 0 2 6 】

で表されるモノマーに基づく構成単位等が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

上記一般式 [ 2 ] で表されるモノマーに基づく構成単位を有するポリマーがコポリマーである場合、上記一般式 [ 2 ] で表されるモノマーに基づく構成単位以外のモノマー単位

としては、アクリル酸又はアクリル酸エステル、メタクリル酸又はメタクリル酸エステル、アクリルアミド又はそのN置換体、メタクリルアミド又はそのN置換体、或いはスチレン又はその誘導体から選ばれるモノマー由来のものが挙げられる。尚、これらモノマー単位は、コポリマー中に2種類以上含まれていてもよい。また、コポリマーにおける、一般式〔2〕で表されるモノマーに基づく構成単位の比率は、通常20%以上100%未満であり、好ましくは30～95%であり、より好ましくは30～90%である。

#### 【0028】

上記一般式〔2〕で表されるモノマーに基づく構成単位以外のモノマー単位としてのアクリル酸エステルとしては、アルキルアクリレート、アラルキルアクリレート等が挙げられ、アクリルアミドのN置換体は、N-アルキルアクリルアミド又はN-アラルキルアクリルアミドであり、メタクリルアミドのN置換体は、N-アルキルメタクリルアミド又はN-アラルキルメタクリルアミドであり、スチレン誘導体としては、 $\alpha$ -メチルスチレン、置換基を有するスチレン又は $\alpha$ -メチルスチレン等が挙げられる。

#### 【0029】

上記のアルキルアクリレート、アルキルメタクリレート、N-アルキルアクリルアミド及びN-アラルキルメタクリルアミドに於けるアルキル基としては、直鎖状、分枝状、環状の何れでもよく、通常炭素数1～6、より好ましくは、1～4のものが挙げられ、具体的には、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、sec-ペンチル基、tert-ペンチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基、sec-ヘキシル基、tert-ヘキシル基、シクロプロピル基、シクロヘキシル基、シクロペンチル基等が挙げられる。このアルキル基は置換基を有していてもよく、その置換基としては、例えばヒドロキシ基、炭素数1～3の低級アルコキシ基、トリアルキルアンモニオ基（アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基等の炭素数1～3のものが挙げられる。尚、置換基としてトリアルキルアンモニオ基を有する場合、本置換基はプラスに荷電しているため、通常カウンターアニオンが結合しているが、このようなカウンターアニオンとしては、フッ素イオン、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン等のハロゲン化物イオン等が挙げられる。）等が挙げられる。また、置換基を有するアルキル基としては、例えば以下のような基



#### 【0030】

（尚、 $\text{R}^7$ は炭素数1～3のアルキル基を表し、mは1～100を表す。）で表されるものも含まれる。

#### 【0031】

また、アラルキルアクリレート、アラルキルメタクリレート、N-アラルキルアクリルアミド及びN-アラルキルメタクリルアミドに於けるアラルキル基としては、炭素数7～10のものが挙げられ、具体的には、例えばベンジル基、フェニルエチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基等が挙げられる。

#### 【0032】

スチレン若しくは $\alpha$ -メチルスチレンが有していてもよい置換基としては、例えば直鎖状、分枝状、環状の、通常炭素数1～6、より好ましくは1～4のアルキル基（具体的には、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、sec-ペンチル基、tert-ペンチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基、sec-ヘキシル基、tert-ヘキシル基、シクロプロピル基、シクロヘキシル基、シクロペンチル基等）、例えば直鎖状、分枝状、環状の、通常炭素数1～6、より好ましくは1～4のアラルキル基（具体的には、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、イソペンチルオキ



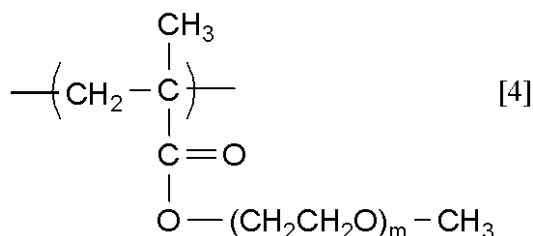
シ基、sec-ペンチルオキシ基、tert-ペンチルオキシ基、n-ヘキシルオキシ基、イソヘキシルオキシ基、sec-ヘキシルオキシ基、tert-ヘキシルオキシ基、シクロプロポキシ基、シクロヘキシルオキシ基、シクロペンチルオキシ基等)、例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、カルボキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基等が挙げられる。

#### 【0033】

上記一般式[2]で表されるモノマーに基づく構成単位以外のモノマー単位的具体例としては、例えばメタクリル酸、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸プロピル、メタクリル酸ブチル、メタクリル酸ドデシル、メタクリル酸オクタデシル、メタクリル酸2-エチルヘキシル、メタクリル酸ラウリル、メタクリル酸ステアリル、メタクリル酸2-トリメチルアンモニオエチル、メタクリル酸ベンジル、メタクリル酸フェニルエチル、アクリル酸、アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ブチル、アクリル酸2-エチルヘキシル、アクリル酸ラウリル、アクリル酸ステアリル、アクリル酸2-トリメチルアンモニオエチル、アクリル酸ベンジル、アクリル酸フェニルエチル、アクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-ブチルアクリルアミド、N-2-エチルヘキシルアクリルアミド、N-ラウリルアクリルアミド、N-ステアリルアクリルアミド、N-2-トリメチルアンモニオエチルアクリルアミド、N-ベンジルアクリルアミド、N-フェニルエチルアクリルアミド、メタクリルアミド、N-メチルメタクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-ブチルメタクリルアミド、N-2-エチルヘキシルメタクリルアミド、N-ラウリルメタクリルアミド、N-ステアリルメタクリルアミド、N-2-トリメチルアンモニオエチルメタクリルアミド、N-ベンジルメタクリルアミド、N-フェニルエチルメタクリルアミド、スチレン、カルボキシスチレン、ヒドロキシスチレン、アミノスチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、メトキシスチレン、エトキシスチレン、クロロスチレン、ブロモスチレン、-メチルスチレン、-メチル-カルボキシスチレン、-メチル-ヒドロキシスチレン、-メチル-アミノスチレン、-メチル-メチルスチレン、-メチル-エチルスチレン、-メチル-メトキシスチレン、-メチル-エトキシスチレン、-メチル-クロロスチレン、-メチル-ブロモスチレン、N,N,N-トリエチルアンモニウムエチルメタクリレートプロミド、N,N,N-トリメチルアンモニウムエチルメタクリレートクロリド、N,N,-ジエチル-N-プロピルアンモニウムエチルメタクリレートプロミド、N,N,N-トリメチルアンモニウム-2-ヒドロキシプロピルメタクリレートクロリド(QM)、N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスチレンプロミド等由来のものが挙げられ、また、下記一般式[4]

#### 【0034】

##### 【化1】



#### 【0035】

(式中、mは1~100を表す。)で表されるもの等も具体例として挙げられる。

#### 【0036】

上記した中でも、メタクリル酸、メタクリル酸ステアリル、メタクリル酸ベンジル、メタクリル酸ブチル、メタクリル酸ドデシル、メタクリル酸オクタデシル、N,N,N-トリメチルアンモニウム-2-ヒドロキシプロピルメタクリレートクロリド(QM)等由来のもの、一般式[4]で表されるもの等が好ましい。

#### 【0037】

上記の如き凝集促進剤の中でも、下記一般式[5]

10

20

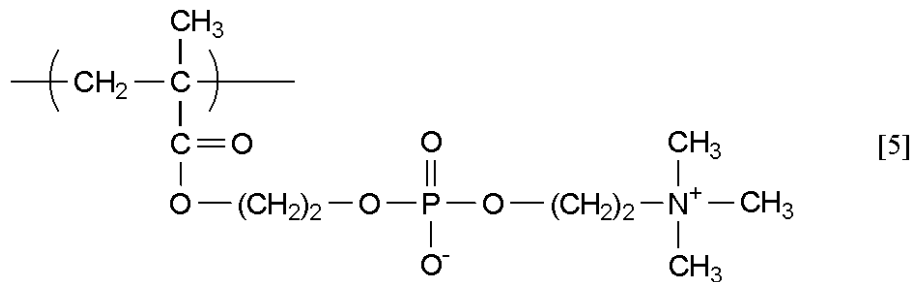
30

40

50

【 0 0 3 8 】

【 化 2 】



10

【 0 0 3 9 】

で示されるモノマー単位からなるポリマー、一般式[5]で示されるモノマー単位とメタクリル酸ブチルとからなるコポリマー、一般式[5]で示されるモノマー単位と上記一般式[4]で示されるモノマー単位とからなるコポリマー、一般式[5]で示されるモノマー単位とメタクリル酸オクタデシルとからなるコポリマー、一般式[5]で示されるモノマー単位とメタクリル酸オクタドデシルとからなるコポリマー、一般式[5]で示されるモノマー単位とメタクリル酸ベンジルとからなるコポリマー等が特に好ましく、中でも一般式[5]で示されるモノマー単位とメタクリル酸ベンジルとからなるコポリマー等がより好ましい。

【 0 0 4 0 】

上記凝集促進剤は、反応時の濃度として、通常0.1～20w/v%、好ましくは0.1～10w/v%、より好ましくは0.1～5w/v%となるように用いられる。また、上記凝集促進剤は2種以上を用いてもよく、その場合も上記濃度範囲となるように用いるのが好ましい。

20

【 0 0 4 1 】

尚、上記凝集促進剤として用いられるモノマー及びポリマーの製造方法は、特許公開公報特開2002-365296等の記載に準じて行えばよい。

【 0 0 4 2 】

また、抗原抗体反応の凝集促進剤を含んでなる試薬には、グアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を非特異的の反応抑制剤として添加してもよく、該グアニジン塩としては、例えばグアニジン塩酸塩、グアニジン炭酸塩、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン硫酸塩、グアニジン硝酸塩、グアニジンリン酸塩等が挙げられ、また、グアニジン誘導体としては、例えばアルギニン、グアニジノ安息香酸、グアニジノグルタル酸、グアニジノコハク酸、グアニジノ酢酸等が挙げられる。尚、該添加物は、2種以上を選択し添加してもよい。また、これら添加物の添加量としては、目的の効果が得られる量であれば特に限定されないが、試薬中の濃度として通常10～700mMとなるように、反応時の濃度として通常7.5～525mMとなるように、添加するのが好ましい。

30

【 0 0 4 3 】

本発明に係る抗原抗体反応の凝集促進剤を含んでなる試薬を調製するために用いられる溶媒としては、上記の本発明の測定用試薬で用いられるものと同じものを用いればよい。

【 0 0 4 4 】

本発明の免疫学的測定方法は、生体中若しくは試料中で遊離体及び結合体で存在する測定対象物質を含む試料と、測定対象物質に対するモノクローナル抗体1が固定化されたラテックス1、及び抗体1とは測定対象物質に対する認識部位が異なるモノクローナル抗体2が固定化された、ラテックス1とは平均粒径の異なるラテックス2からなる試薬とを反応させ、生じる凝集の度合いに基づいて測定物質量を求めるものである。その測定は、具体的には、例えば測定対象物質としてPSAを用いる場合、PSAを含む試料と、PSAモノクローナル抗体に例えば平均粒径150nmのラテックスを担持(感作)させたもの、及び上記モノクローナル抗体とは認識部位の異なるPSAモノクローナル抗体に例えば平均粒径280nmのラテックスを担持(感作)させたものからなる試薬とを反応させ、その結果生じた凝集の度合いを例えば吸光度を用いて測定し、予め求めてあった標準品の検量線からその濃度を求めることによってなされる。尚、吸光度の測定波長は、通常340～1000nm、好まし

40

50

くは500～900nmで測定すればよい。また、凝集の度合いは、吸光度に限定されるものではなく、自体公知の方法であればいずれでもよく、例えばネフェロメトリー、カウンティングイムノアッセイ等の方法により値を測定してもよい。

#### 【0045】

上記のように本発明の免疫学的測定方法によれば、遊離体及び結合体である測定対象物質両者を等モルに精度よく測定することができる。尚、本発明に於ける遊離体及び結合体両者の等モル反応とは、ラテックスに固定化されたモノクローナル抗体が両者にほぼ1：1で結合する反応をいうが、具体的には、例えばPSAでの等モル反応とは以下の様に定義できる。即ち、スタンフォード大学より入手した精製遊離体PSA及びACT-PSA結合体をそれぞれ段階希釈して測定し、X軸に表示値から算出される理論値、Y軸に実際の測定値をプロットしたとき、その希釈直線の傾きを回帰式から求め、両者の傾きの比（遊離体PSAの傾き/ACT-PSA結合体の傾き）を偏り度と表す。その範囲が0.9<1.1のときに等モル反応しているとみなされ、0.8<0.9、1.1<1.2のときにほぼ等モル反応しているとみなされる〔第65回日本泌尿器科学会東部総会シンポジウム〕。

10

#### 【0046】

以下実施例によって本発明を説明するが、本発明はこれによって限定されるものでない。

#### 【実施例1】

#### 【0047】

ラテックス免疫比濁法による前立腺特異抗原（PSA）の測定

20

（1）抗ヒトPSA抗体感作（固定化）ラテックス試液の調製

抗ヒトPSAマウスモノクローナル抗体（クローンNo. PSA10）（和光純薬工業（株）社製）0.3mgを含む50mMホウ酸緩衝液（pH7.1）0.5mlと、ポリスチレンラテックス〔平均粒径0.22μm若しくは0.28μm、積水化学工業（株）社製〕を2%（W/V）となるように懸濁させた50mMホウ酸緩衝液（pH7.1）0.5mlとを混合し、25℃で2時間反応させた。その後、遠心分離により分離したラテックスを50mMホウ酸緩衝液（pH7.1）で洗浄し、該ラテックスを濃度が1%（W/V）となるように、BSAを0.5%（W/V）含有する50mMホウ酸緩衝液（pH7.3）中で懸濁し、得られたものを抗ヒトPSA抗体感作ラテックス試液〔1〕とした。

#### 【0048】

30

また、上記と同様にして抗ヒトPSAマウスモノクローナル抗体（クローンNo. PSA14）（和光純薬工業（株）社製）0.7mgを含む50mMホウ酸緩衝液（pH7.1）0.5mlと、2%（W/V）ポリスチレンラテックス〔平均粒径0.12μm若しくは0.15μm、積水化学工業（株）社製〕0.5mlを混合して調製したものを抗ヒトPSA抗体感作ラテックス〔2〕とした。

#### 【0049】

（2）試料

フリーPSA標準品、コンプレックスPSA標準品（スタンフォード大学製）を1%BSAを含有する10mMリン酸緩衝液（0.85%NaCl含）で希釈し、25ng/mlとした。試薬盲検には上記リン酸緩衝液を使用した。

#### 【0050】

40

（3）試薬

I. 第1試液

0.1%BSA及び1%NaClを含む100mM HEPES-NaOH緩衝液（pH7.0）を第1試液とした。

II. 第2試液

（1）で調製した抗ヒトPSA抗体感作ラテックス試液〔1〕及び〔2〕をそれぞれ0.1%（W/V）ラテックスに調整し、等量混合したものを第2試液とした。

#### 【0051】

（4）測定方法

PSA濃度の測定は自動分析装置（日本電子（株）BM-8形）を用い、以下の測定条

50

件で測定を行った。

試料 : 5  $\mu$  l

第1試液 : 90  $\mu$  l

第2試液 : 30  $\mu$  l

測定方法 : 2 ポイントエンド法 (34 - 65)

主波長 : 571 nm

【0052】

(5) 結果

得られた吸光度 (濁度) を表1に示した。尚、表中の値は、得られた吸光度を10000倍にしたもので、ブランク値を減算した値である。また、偏り度は、フリーPSAの傾き (実測値 / 理論値) をコンプレックスPSAの傾き (実測値 / 理論値) で割った値であり、この値が1.0に近いほど、抗体感作ラテックスがフリー体及びコンプレックス体と等モルで結合していることを表す。

【比較例1】

【0053】

同一平均粒径のラテックスを用いたPSAの測定

2種の抗ヒトPSAマウスモノクローナル抗体 (クローンNo. PSA10及びPSA14) (和光純薬工業 (株) 社製) をそれぞれ0.6mg含む50mMホウ酸緩衝液 (pH7.1) 0.5mlと、ポリスチレンラテックス [平均粒径0.22  $\mu$ m、積水化学工業 (株) 社製] を2% (W/V) となるように懸濁させた50mMホウ酸緩衝液 (pH7.1) 0.5mlとを混合し、25℃で2時間反応させた以外は、実施例1と同様の方法でラテックスを調製し、実施例1と同様の測定を行った。得られた結果及び偏り度を、実施例1と併せて表1に示した。

【0054】

【表1】

	実施例1			比較例1
抗体感作ラテックス[1] 粒径	0.28 $\mu$ m		0.22 $\mu$ m	0.22 $\mu$ m
抗体感作ラテックス[2] 粒径	0.12 $\mu$ m	0.15 $\mu$ m	0.15 $\mu$ m	0.22 $\mu$ m
PSA濃度 (ng/ml)				
試薬盲検	-72	-44	-30	-69
感度 (吸光度 $\times$ 10000)				
フリーPSA 25ng/ml	602	984	484	1136
コンプレックスPSA 25ng/ml	629	898	426	825
偏り度 $\gamma$	0.96	1.10	1.14	1.38

【0055】

表1から明らかなように、異なる平均粒径のラテックスを組み合わせた方法では、偏り度がほぼ1.0を示しており、フリーPSAとコンプレックスPSAを等モル的に反応させることが可能なのに対し、同一平均粒径のラテックスの組み合わせでは、偏り度が1.38でありコンプレックスPSAに比べてフリーPSAが強く反応していることが分かる。

【実施例2】

【0056】

(1) 試料

フリーPSA標準品、コンプレックスPSA標準品 (スタンフォード大学製) を1% BSAを含有する10mM リン酸緩衝液 (0.85% NaCl) で希釈し、0、5、10、25、50ng/mlとした。

【0057】

(2) 試薬

I. 第1試薬

実施例1で調製した第1試薬を用いた。

10

20

30

40

50

## II. 第 2 試薬

実施例 1 で調製した抗体感作ラテックスのうち、抗体感作ラテックス [ 1 ] は平均粒径  $0.28 \mu\text{m}$  ラテックスに感作したものを、抗体感作ラテックス [ 2 ] は平均粒径  $0.15 \mu\text{m}$  ラテックスに感作したものを、実施例 1 と同様にして混合した。

【 0 0 5 8 】

( 3 ) 測定法

P S A 濃度の測定は自動分析装置 ( 東芝 T B A - 1 2 0 F R 形 ) を用い、以下の測定条件で測定を行った。

試 料 :  $12 \mu\text{l}$

第 1 試液 :  $120 \mu\text{l}$

第 2 試液 :  $40 \mu\text{l}$

測定方法 : 2 ポイントエンド法 ( 20 - 33 )

主波長 :  $572 \text{nm}$

【 0 0 5 9 】

( 4 ) 結果

得られた吸光度 ( 濁度 ) 及び偏り度 を表 2 に示した。尚、表中の吸光度値は、得られた吸光度を 10000 倍にしたもので、ブランク値を減算した値である。表中の測定値はフリー PSA 標準品から作製した検量線を用いて算出した値である。また、得られたフリー体の P S A とコンプレックス体の P S A の吸光度と、各濃度との関係 ( グラフ ) を図 1 に示した。

【 比較例 2 】

【 0 0 6 0 】

同一平均粒径のラテックスを用いた P S A の測定

比較例 1 で調製した 2 種の抗体感作ラテックス ( 平均粒径  $0.22 \mu\text{m}$  ) を用いた以外は、実施例 2 と同様の測定を行った。得られた結果及び偏り度 を、実施例 2 と併せて表 2 に示した。

【 0 0 6 1 】

【 表 2 】

	実施例 2		比較例 2	
抗体感作ラテックス[1] 粒径	$0.28 \mu\text{m}$		$0.22 \mu\text{m}$	
抗体感作ラテックス[2] 粒径	$0.15 \mu\text{m}$		$0.22 \mu\text{m}$	
PSA濃度(ng/ml)				
試薬盲検	9		-23	
	吸光度	測定値	吸光度	測定値
フリー-PSA 5	298	5.0	300	5.0
コンプレックスPSA 5	291	4.9	239	4.0
フリー/コンプレックス(%)		102%		125%
フリー-PSA 10	761	10.0	707	10.0
コンプレックスPSA 10	759	10.0	567	8.3
フリー/コンプレックス(%)		100%		120%
フリー-PSA 25	2221	25.0	2293	25.0
コンプレックスPSA 25	2335	27.1	1751	19.9
フリー/コンプレックス(%)		92%		126%
フリー-PSA 50	3580	50.0	4952	50.0
コンプレックスPSA 50	3755	53.2	4013	41.2
フリー/コンプレックス(%)		94%		121%
偏り度 $\gamma$		0.93		1.22

【 0 0 6 2 】

表 2 に於いて、異なる平均粒径のラテックスを組み合わせた方法ではいずれの P S A 濃

度においてもほぼ等モルの反応を示しており、また、偏り度も0.93と1.0に近い値を示していることから、実質的に等モル反応系が実現されていることが分かる。また、同一平均粒径のラテックスを用いた場合にはいずれの濃度においてもコンプレックスP S A に比べてフリーP S A の反応性が高く、また偏り度も1.22であり、等モルで反応していないことが分かる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 3 】

【図 1】実施例 2 において得られたフリーP S A とコンプレックスP S A の吸光度と、各濃度から作成した検量曲線、即ち、両者と抗体感作ラテックスの反応性の比較を表す。

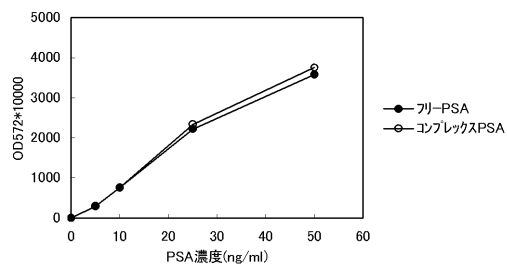
【符号の説明】

10

【 0 0 6 4 】

- - は、フリー体のPSAを用いたときの実施例 2 の測定結果を、- - はコンプレックスのPSAを用いた時の実施例 2 の測定結果を夫々表す。

【図 1】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2001-108681(JP,A)  
国際公開第02/079782(WO,A1)  
特開2002-365296(JP,A)  
特開平11-344493(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/543-556