

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6716108号
(P6716108)

(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(24) 登録日 令和2年6月12日(2020.6.12)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28	Z N A
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	E
G O 1 N 33/536 (2006.01)	G O 1 N 33/536	D
G O 1 N 33/72 (2006.01)	G O 1 N 33/72	B

請求項の数 21 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願2017-510081 (P2017-510081)	(73) 特許権者	504150450 国立大学法人神戸大学 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1
(86) (22) 出願日	平成28年3月30日(2016.3.30)	(73) 特許権者	503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/060327	(74) 代理人	100124431 弁理士 田中 順也
(87) 国際公開番号	W02016/159050	(74) 代理人	100174160 弁理士 水谷 馨也
(87) 国際公開日	平成28年10月6日(2016.10.6)	(74) 代理人	100175651 弁理士 迫田 恭子
審査請求日	平成30年11月21日(2018.11.21)	(72) 発明者	岩谷 壮太 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大 学法人神戸大学内
(31) 優先権主張番号	特願2015-68471 (P2015-68471)		
(32) 優先日	平成27年3月30日(2015.3.30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液試料中のアンバウンドビリルビンの測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

非抱合型ビリルビンおよび抱合型ビリルビンを含む血液試料を、前記非抱合型ビリルビンのうちのアンバウンドビリルビン、および前記抱合型ビリルビンの酸化分解反応に供する分解工程(i)と、

前記酸化分解反応を停止して試料分解物を得る分解停止工程(ii)と、

前記試料分解物と、前記血液試料が前記酸化分解反応に供されなかった未反応試料とを、それぞれ別個に、非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドに接触させる接触工程(iii)と、

前記試料分解物と前記未反応試料とのそれぞれについて、前記ポリペプチドに起因する蛍光を検出し、前記蛍光の差から前記アンバウンドビリルビンの量を導出する検出工程(iv)と、を含み、

前記非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドが、前記抱合型ビリルビンおよびその分解物と、前記アンバウンドビリルビンの分解物とに対する結合性は有さず；前記非抱合型ビリルビンと特異的結合した場合に励起光の照射を受けて所定波長の蛍光を発する一方、前記非抱合型ビリルビンが存在しない場合には前記励起光の照射を受けても蛍光を発さず；且つ、アルブミン結合性ビリルビンと接触した場合、アルブミンと前記非抱合型ビリルビンとの結合を切断して前記非抱合型ビリルビンと結合するものであり、以下の(A)から(D)：

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛍光性ポリペプチド；

(B) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 個以上 7 個以下のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛍光性ポリペプチド；

(C) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して 90% 以上の配列同一性を有する蛍光性ポリペプチド；および

(D) 上述の (A) に記載の蛍光性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる蛍光性ポリペプチド

の少なくともいずれかである、血液試料中のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 2】

10

前記血液試料が早産児由来の血液試料である、請求項 1 に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 3】

前記血液試料の血清総ビリルビン濃度が 8 mg / d L 以上である、請求項 1 または 2 に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 4】

前記血液試料の前記抱合型ビリルビン濃度が 1 mg / d L 以上である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 5】

前記酸化分解反応の停止を抗酸化物質の添加によって行う、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

20

【請求項 6】

前記抗酸化物質がアスコルビン酸である、請求項 5 に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 7】

前記酸化分解反応の停止を、分解工程 (i) の反応開始後 10 秒以上 60 秒以下の時点で行う、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 8】

前記抗酸化物質は、前記分解停止工程 (ii) の反応系において 0.1 重量% 以上となるように添加される、請求項 5 から 7 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

30

【請求項 9】

前記抗酸化物質がアスコルビン酸である場合、前記アルコールビン酸は前記分解停止工程 (ii) の反応系において 32 重量% 以下となるように添加される、請求項 8 に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 10】

前記アスコルビン酸は、前記接触工程 (iii) の反応系において 0.8 重量% 以下となるように希釈される、請求項 6 から 9 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 11】

40

前記分解工程 (i) の反応系における前記血液試料の希釈率が、血清換算値で 5 倍以上 120 倍以下である、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 12】

前記分解工程 (i) において、前記酸化分解反応が、グルコースオキシダーゼの存在下でグルコースから生じさせた過酸化水素とペルオキシダーゼとにより進行させるものであり、前記酸化分解反応の反応系において、前記グルコースオキシダーゼおよび前記ペルオキシダーゼ量が、それぞれ、血清 1 μ L に対して 0.0128 U 以上 0.256 U 以下である、請求項 11 に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 13】

50

前記血液試料が全血試料である、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 14】

前記検出工程 (iv) において、ヘマトクリット値による補正を行って前記アンバウンドビリルビンの量を導出する、請求項 13 に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法。

【請求項 15】

反应用容器収容部と対照用容器収容部とを含むインキュベータと、
前記反应用容器収容部内の反应用容器にアンバウンドビリルビン酸化分解試薬液の添加を行う試薬液添加部と、

前記対照用容器収容部内の対照用容器に試薬ブランク液の添加を行う試薬ブランク液添加部と、

前記試薬液添加部および前記試薬ブランク液添加部の動作に基づいて始動するタイマーと、

前記タイマーの計測時間に基づいて制御されかつ前記反应用容器および前記対照用容器それぞれに酸化分解停止剤の添加を行う停止剤添加部と、

前記反应用容器の内容物および前記対照用容器の内容物それぞれを混和する混和部と、
を含む、アンバウンドビリルビン測定用試料調製装置と、

前記酸化分解停止剤が添加された前記反应用容器の内容物および前記対照用容器の内容物それぞれに、非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドが添加された蛍光測定用試料について蛍光測定を行う蛍光測定部と、

少なくとも前記反应用容器の内容物の蛍光値と前記対照用容器の内容物の蛍光値との差分からアンバウンドビリルビン値を導出する演算処理部と、

導出された前記アンバウンドビリルビン値を表示する出力部と、
を含み、

前記非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドが、抱合型ビリルビンおよびその分解物と、アンバウンドビリルビンの分解物とに対する結合性は有さず；前記非抱合型ビリルビンと特異的結合した場合に励起光の照射を受けて所定波長の蛍光を発する一方、前記非抱合型ビリルビンが存在しない場合には前記励起光の照射を受けても蛍光を発さず；且つ、アルブミン結合性ビリルビンと接触した場合、アルブミンと前記非抱合型ビリルビンとの結合を切断して前記非抱合型ビリルビンと結合するものであり、以下の (A) から (D)：

(A) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列 からなる 蛍光性ポリペプチド；

(B) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 個以上 7 個以下のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を有する蛍光性ポリペプチド；

(C) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の配列同一性を有する蛍光性ポリペプチド；および

(D) 上述の (A) に記載の蛍光性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列 からなる 蛍光性ポリペプチド

の少なくともいずれかである、アンバウンドビリルビン測定装置。

【請求項 16】

前記酸化分解停止剤の添加後に前記反应用容器および前記対照用容器それぞれから内容物を測定用容器に分取する分取部と、

前記測定用容器に蛍光特性を示すポリペプチド液を添加する添加部と、
をさらに含む、請求項 15 に記載のアンバウンドビリルビン測定装置。

【請求項 17】

請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法を示すプロトコルに関する情報と、

アンバウンドビリルビンを酸化分解するための酸化還元酵素と、

10

20

30

40

50

前記酸化分解を停止するための酸化分解停止剤と、
非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドと、
を少なくとも含み、

前記非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドが、抱合型ビリルビンおよびその分解物と、アンバウンドビリルビンの分解物とに対する結合性は有さず；前記非抱合型ビリルビンと特異的結合した場合に励起光の照射を受けて所定波長の蛍光を発する一方、前記非抱合型ビリルビンが存在しない場合には前記励起光の照射を受けても蛍光を発さず；且つ、アルブミン結合性ビリルビンと接触した場合、アルブミンと前記非抱合型ビリルビンとの結合を切断して前記非抱合型ビリルビンと結合するものであり、以下の(A)から(D)：

10

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛍光性ポリペプチド；

(B) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1個以上7個以下のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛍光性ポリペプチド；

(C) 配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有する蛍光性ポリペプチド；および

(D) 上述の(A)に記載の蛍光性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる蛍光性ポリペプチド

の少なくともいずれかである、アンバウンドビリルビン測定キット。

20

【請求項18】

グルコースおよびグルコースオキシダーゼをさらに含む、請求項17に記載のアンバウンドビリルビン測定キット。

【請求項19】

前記酸化還元酵素がペルオキシダーゼである、請求項17または18に記載のアンバウンドビリルビン測定キット。

【請求項20】

前記酸化分解停止剤が抗酸化物質である、請求項17から19のいずれか1項に記載のアンバウンドビリルビン測定キット。

【請求項21】

前記抗酸化物質がアスコルビン酸である、請求項20に記載のアンバウンドビリルビン測定キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液試料中のアンバウンドビリルビンの測定方法に関する。特に本発明は、新生児の黄疸管理を適切に行うため、新生児由来血液試料中のアンバウンドビリルビンを正確に測定する方法に関する。中でも本発明は、早産児の核黄疸を確実に予見するため、早産児由来血液試料中のアンバウンドビリルビンを正確に測定する方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

従来、核黄疸は新生児脳障害の原因の1つであったが、周産期医療の進歩によって早期発見早期治療がなされ、正期産児（成熟児）ではほぼ予防可能となった。しかし、近年、超早産児の生存例の増加等に伴って早産児に核黄疸症例が発生している現状が明らかになり、小児新生児医療領域において、緊急に解決すべき大きな課題となっている。

【0003】

核黄疸の原因が、新生児期の黄疸、すなわち血清ビリルビンにあることは良く知られている。血清ビリルビン、いわゆる総ビリルビン（TB）は、それ自体が黄色色素であり、非抱合型ビリルビン（間接ビリルビン；iDB）および抱合型ビリルビン（直接ビリルビン；DB）を含む。神経毒性を有する成分は非抱合型ビリルビンであるが、その中でも、アルブ

50

ミン非結合型のアンバウンドビリルビン（UB）は、低分子量であることから容易に血液脳関門を通過し脳に沈着するため、神経毒性を発揮する重大要因となる。

【0004】

アンバウンドビリルビンの測定技術の開発は1960年代から試みられてきた中で、本発明者は、グルコースオキシダーゼ - ペルオキシダーゼ（GOD - POD）法を報告した（非特許文献1：Clin Chim Acta. 1977 Sep 1; 79(2): 411-7参照）。さらに、GOD - POD法を適用した自動測定装置（（株）アローズ製UB-Analyzer）を開発した（非特許文献2：Kobe J Med Sci. 1982 Apr; 28(2): 91-104参照）。この自動測定装置は、アンバウンドビリルビン測定装置として臨床応用されている唯一の装置であり、アメリカ食品医薬品局（FDA）および日本国厚生労働省に認可されている。

10

【0005】

GOD - POD法では、グルコースとグルコースオキシダーゼとにより発生させた過酸化水素にペルオキシダーゼを作用させ、ビリルビン酸化分解を起こさせる。アルブミン非結合型のアンバウンドビリルビンが無色成分へ容易に酸化分解される一方、アルブミン結合型ビリルビンが酸化分解されにくいため、アンバウンドビリルビンの濃度はその酸化分解の初速度から計測される。具体的には、比色法によりビリルビン色素の減少速度をモニタリングすることで計測される。

【0006】

神戸大学医学部小児科から発表された黄疸治療基準では、血清総ビリルビン濃度とアンバウンドビリルビン濃度との両方について、光線療法および交換輸血の適応基準が示されている（非特許文献3：神戸大学医学部小児科，編，未熟児新生児の管理．東京、日本小児医事出版社，1991参照）。この基準の普及により、成熟児の核黄疸は大きく減少した。しかし、この基準を早産児にあてはめることについて過剰治療の指摘もあり、現状として、遵守率は下がっている。

20

【0007】

また、黄疸治療基準の他の例として、血清総ビリルビン濃度のみに基づいて光線療法および交換輸血の適応基準が示されているものもある（非特許文献4：川瀬康浩．新生児高ビリルビン血症．山口徹、北原光夫、福井次矢 総編集、今日の治療指針2006年版、医学書院、東京、2006 pp 941-942）。

【0008】

一方、ニホンウナギの筋肉において緑色蛍光を示すタンパク質をコードする遺伝子が単離された。その遺伝子産物UnaGは非抱合型ビリルビンと特異的に結合することで強い緑色蛍光を発し、結合したビリルビン自体が蛍光性発色団として働くことが発見された（非特許文献5：Cell. 2013 Jun 20; 153(7): 1602-11および特許文献1：国際公開第2014/133158号参照）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2014/133158号

【非特許文献】

40

【0010】

【非特許文献1】Clinica Chimica Acta, 1977 Sep 1; 79(2): 411-7.

【非特許文献2】Kobe Journal of Medical Sciences, 1982 Apr; 28(2): 91-104.

【非特許文献3】神戸大学医学部小児科，編，未熟児新生児の管理．東京、日本小児医事出版社，1991

【非特許文献4】川瀬康浩．新生児高ビリルビン血症．山口徹、北原光夫、福井次矢 総編集、今日の治療指針2006年版、医学書院、東京、2006 pp 941-942

【非特許文献5】Cell. 2013 Jun 20; 153(7): 1602-11.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0011】

本発明者らによって行われた早産児の核黄疸の発生頻度に関する全国調査によると、核黄疸の年間発生数は、在胎30週未満の早産児で8～9人/年と推察されるところ、実際には在胎30週以上37週未満の早産児にも発症しうることを考慮すると、さらに多い可能性が十分ある。

【0012】

また、通常では血中のアンバウンドビリルビン量は総ビリルビン量に相関するが、新生児のうち特に早産児においては、そのような相関を示さない場合がある。本発明者らによる調査では、30週未満の早産児では、総ビリルビンが15未満の低値であるにも関わらずアンバウンドビリルビンが0.8以上の高値を示す例が39%もみられ、低TB核黄疸児8例中7例も占めていたことが判っている。総ビリルビンに比してアンバウンドビリルビンが相対的に高い症例が少なからず存在することを示したこの結果は、黄疸管理を総ビリルビンのみで管理することが、核黄疸発生の危険状態を見逃すことを警告している。

10

【0013】

アンバウンドビリルビンによる黄疸管理の重要性の再認識により、アンバウンドビリルビンの正確な測定系が必要となる。しかしながら、唯一の自動測定装置UB-Analyzerでさえも、検体中の抱合型ビリルビンが高い場合には正確な測定ができない問題がある。GOD-POD法では、抱合型ビリルビンが高い場合に、アンバウンドビリルビンとともに抱合型ビリルビンも酸化分解されることで、アンバウンドビリルビン測定値が真のアンバウンドビリルビン量からかけ離れた、見かけ上パニック値を示すことがある。このような測定値に直面した場合の臨床的判断の困難性は非常に大きい。新生児、特に早産児では、この抱合型ビリルビンが高い症例が多いため問題は大きい。

20

【0014】

国際公開第2014/133158号(特許文献1)に記載されたポリペプチドUnaGが非抱合型ビリルビンに特異的に結合することから、本発明者らは、このポリペプチドをGOD-POD測定系に適用することを着想した。しかしながら、このポリペプチドはアルブミン結合ビリルビンと接触した瞬間にアルブミンの結合を解いてビリルビンに結合するため、アンバウンドビリルビンとアルブミン結合ビリルビンとの区別が無くなる。そのため、アンバウンドビリルビンの酸化分解の初速度からその濃度を導出するGOD-POD測定系へ単純に適用することができない。

30

【0015】

以上に鑑み、本発明の目的は、抱合型ビリルビン量が高い検体が否かにかかわらず、アンバウンドビリルビンを正確に反映することができる測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、GOD-POD測定系において、アンバウンドビリルビンの濃度測定に必須であったアンバウンドビリルビン酸化分解の初速度測定の手法を敢えて捨象し、代わりに当該酸化分解を停止させる手法を採用した。そして、酸化分解反応前後におけるUnaG結合量の差分をアンバウンドビリルビンの量として導出することで、UnaGを、従来のように検出対象成分のみを標識する形態で使用するのではなく、検出対象成分のみを変化させ標識されない形態で使用することで、GOD-POD測定系への適用を可能にした。本発明は、以下の発明を包含する。

40

【0017】

(1)

本発明のアンバウンドビリルビンの測定方法は、分解工程(i)と、分解停止工程(ii)と、接触工程(iii)と、検出工程(iv)とを含む。

分解工程(i)では、非抱合型ビリルビンおよび抱合型ビリルビンを含む血液試料を、非抱合型ビリルビンのうちのアンバウンドビリルビン、および抱合型ビリルビンの酸化分解反応に供する。

分解停止工程(ii)では、酸化分解反応を停止して試料分解物を得る。

50

接触工程 (iii) では、試料分解物を、非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドに接触させる。別途、血液試料が分解工程 (i) に供されなかった未反応試料も、非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドに接触させる。

検出工程 (iv) では、試料分解物と未反応試料とのそれぞれについて、ポリペプチドに起因する蛍光を検出する。さらに、試料分解物における蛍光と未反応試料における蛍光との差から、アンバウンドビリルビンの量を導出する。

【0018】

上記の構成では、血液試料が、分解工程 (i) を経た系統と、分解工程 (i) を経ない系統とに分けられ、前者のみで、アンバウンドビリルビンが、ポリペプチドへの特異的結合能を持たない成分へ分解される。これにより、血液試料中に含まれていた非抱合型ビリルビン (アンバウンドビリルビンおよびアルブミン結合ビリルビン) および抱合型ビリルビンのうち、分解工程 (i) を経た系統ではアルブミン結合ビリルビンのみの特異的結合および蛍光を生じ、分解工程 (i) を経ない系統ではアンバウンドビリルビンおよびアルブミン結合ビリルビンが特異的結合および蛍光を生じるように調製される。

10

【0019】

したがって、非抱合型ビリルビンと抱合型ビリルビンとが区別されるとともに、非抱合型ビリルビンのアンバウンドビリルビンとアルブミン結合ビリルビンとも区別されるため、抱合型ビリルビンが高い検体か否かにかかわらず、アンバウンドビリルビンを正確に測定することが可能になる。これにより、新生児からの採血試料を血液試料として測定すれば、新生児の黄疸管理を的確に行うことができる。

20

【0020】

さらに、蛍光法であることから高い測定感度が達成されるため、微量血液試料での測定が可能になる。したがって、血液試料が、新生児、特に早産児に由来するものである場合に、採血時の負荷を軽減することができる。

【0021】

(2)

上記 (1) のアンバウンドビリルビンの測定方法において、血液試料は、早産児由来の血液試料であってよい。

【0022】

早産児では、総ビリルビンに対しアンバウンドビリルビンが高い症例が多いため、より有効性の高い黄疸管理が可能となる。

30

【0023】

(3)

上記 (1) または (2) のアンバウンドビリルビンの測定方法において、血液試料は、血清総ビリルビン濃度が 8 mg / dL 以上である血液に由来するものであってよい。

【0024】

このように血清総ビリルビン濃度が高い場合、抱合型ビリルビン量が高い症例が多い。本発明では抱合型ビリルビンを検出しないため、このように抱合型ビリルビン量が高い症例が多いために特に有用である。具体的には、新生児黄疸の管理を効果的に行うことができる。

40

【0025】

(4)

上記 (1) から (3) のいずれかのアンバウンドビリルビンの測定方法において、血液試料の抱合型ビリルビン濃度は 1 mg / dL 以上であってよい。

【0026】

本発明では抱合型ビリルビンを検出しないため、このように抱合型ビリルビン濃度が高い試料の場合に特に有用である。

【0027】

(5)

50

上記(1)から(4)のいずれかのアンバウンドビリルビンの測定方法において、酸化分解反応の停止は抗酸化物質によって行ってよい。

【0028】

この場合、酸化分解反応の停止を簡易かつ効果的に行うことができる。

【0029】

(6)

上記(5)のアンバウンドビリルビンの測定方法において、抗酸化物質はアスコルビン酸であってよい。

【0030】

この場合、酸化分解反応の停止をより簡易かつ効果的に行うことができる。

10

【0031】

(7)

上記(1)から(6)のいずれかのアンバウンドビリルビンの測定方法において、酸化分解反応の停止は、分解工程(i)の反応開始後10秒以上60秒以下の時点で行うことができる。

【0032】

この場合、血液試料中のアンバウンドビリルビンを十分に分解することができるとともに、アンバウンドビリルビンの迅速な測定を行うことができる。

【0033】

(8)

20

上記(5)から(7)のいずれかのアンバウンドビリルビンの測定方法において、抗酸化物質は、分解停止工程(ii)の反応系において0.1重量%以上となるように添加されてよい。

【0034】

この場合、酸化分解反応の停止をより確実に行うための抗酸化作用を発揮することができる。

【0035】

(9)

上記(8)のアンバウンドビリルビンの測定方法において、抗酸化物質がアスコルビン酸である場合、アルコールビン酸は、分解停止工程(ii)の反応系において32重量%以下となるように添加されてよい。

30

【0036】

この場合、接触工程(iii)において、ポリペプチドの結合反応が起こりやすいpHへの調整が容易である。

【0037】

(10)

上記(6)から(9)のアンバウンドビリルビンの測定方法において、アスコルビン酸は、接触工程(iii)の反応系において0.8重量%以下となるように希釈されてよい。

【0038】

この場合、接触工程(iii)の反応系を、ポリペプチドの結合反応が起こりやすいpHとすることができる。

40

【0039】

(11)

上記(1)から(10)のいずれかのアンバウンドビリルビンの測定方法において、分解工程(i)の反応系における血液試料の希釈率は、血清換算値で5倍以上120倍以下であってよい。

【0040】

この場合、血液試料が比較的濃い濃度で反応に供されるため、ビリルビンの自然消費(たとえば、光曝露および/または血清中の未知の代謝物質による分解)を好ましく抑制するとともに、アンバウンドビリルビンの分解反応の進行への悪影響も回避しやすい。した

50

がって、より正確にアンバウンドビリルビンを測定することができる。

【0041】

(12)

上記(11)のアンバウンドビリルビンの測定方法において、分解工程(i)の酸化分解反応が、グルコースオキシダーゼの存在下でグルコースから生じさせた過酸化水素とペルオキシダーゼとにより進行させるものであり、酸化分解反応の反応系において、グルコースオキシダーゼおよびペルオキシダーゼそれぞれの量が、血清1 μ L当たりの換算値で0.0128U以上0.256U以下であってよい。

なお、本明細書において、酵素の量を表す単位Uは、国際単位(International Unit)である。

10

【0042】

この場合、血液試料の濃度に対する酵素量が適切であるため、分解工程(i)の反応速度を適切にコントロールすることができる。

【0043】

(13)

上記(1)から(12)のいずれかのアンバウンドビリルビンの測定方法において、血液試料は全血試料であってよい。

【0044】

この場合、さらに、血清の調製を行う必要が無いため測定効率が良好である。したがって、緊急疾患である新生児黄疸の迅速な検査が可能となる。さらに、採血量が少なく済むため、新生児、特に早産児の採血時の負荷を軽減することができる。

20

【0045】

(14)

上記(13)のアンバウンドビリルビンの測定方法において、検出工程(iv)で、ヘマトクリット値による補正を行ってアンバウンドビリルビンの量を導出してよい。

【0046】

通常ビリルビンは血球成分中に存在せず血漿成分中に存在するために、全血でのアンバウンドビリルビン測定値は、血清または血漿で測定した場合に比べて低く検出される。これをヘマトクリット値で補正することで、全血であっても正確な測定が可能となる。

【0047】

(15)

本発明のアンバウンドビリルビン測定用試料調製装置は、インキュベータと、試薬液添加部と、試薬ブランク液添加部と、タイマーと、停止剤添加部と、混和部と、を含む。

インキュベータは、反应用容器収容部と対照用容器収容部とを含む。

試薬液添加部は、反应用容器収容部内の反应用容器にアンバウンドビリルビン酸化分解試薬液を添加する。

試薬ブランク液添加部は、対照用容器収容部内の対照用容器に試薬ブランク液を添加する。

タイマーは、試薬液添加部および試薬ブランク液添加部の動作に基づいて始動する。

停止剤添加部は、タイマーの計測時間に基づいて制御されかつ、反应用容器および対照用容器それぞれに酸化分解停止剤を添加する。

40

混和部は、反应用容器の内容物および対照用容器の内容物それぞれを混和する。

【0048】

この構成によって、(1)から(14)に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法の分解工程(i)および分解停止工程(ii)をルーチン化し、接触工程(iii)に供するためのアンバウンドビリルビン測定用試料を容易にかつ正確に調製することができる。

【0049】

(16)

本発明のアンバウンドビリルビン測定装置は、(15)に記載のアンバウンドビリルビン測定用試料調製装置と、蛍光測定部と、演算処理部と、出力部とを含む。

50

蛍光測定部は、酸化分解停止剤が添加された反応用容器の内容物および対照用容器の内容物それぞれに蛍光特性を示すポリペプチドが添加された蛍光測定用試料について蛍光測定を行う。

演算処理部は、少なくとも反応用容器の内容物の蛍光値と対照用容器の内容物の蛍光値との差分からアンバウンドビリルビン値を導出する。

出力部は、導出された前記アンバウンドビリルビン値を表示する。

【0050】

この構成によって、(1)から(14)に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法を容易にかつ正確に行うことができる。

【0051】

(17)

上記(16)に記載のアンバウンドビリルビン測定装置は、分取部と添加部とをさらに含んでよい。

分取部は、酸化分解停止剤の添加後に反応用容器および対照用容器それぞれから内容物を測定用容器に分取する。

添加部は、測定用容器に蛍光特性を示すポリペプチド液を添加する。

【0052】

この構成によって、蛍光測定用試料の調製もルーチン化されるため、(1)から(14)に記載アンバウンドビリルビンの測定方法をより容易にかつ正確に行うことができる。

【0053】

(18)

本発明のアンバウンドビリルビン測定キットは、アンバウンドビリルビンを酸化分解するための酸化還元酵素と、酸化分解を停止するための酸化分解停止剤と、非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドと、を少なくとも含む。

【0054】

この構成によって、(1)から(14)に記載のアンバウンドビリルビンの測定方法を実施することができる。

【0055】

(19)

上記(18)のアンバウンドビリルビン測定キットは、グルコースおよびグルコースオキシダーゼをさらに含んでよい。

【0056】

これによって、アンバウンドビリルビンの分解開始のタイミングおよび分解速度のコントロールが容易となる。

【0057】

(20)

上記(18)または(19)のアンバウンドビリルビン測定キットにおいて、酸化還元酵素はペルオキシダーゼであってよい。

これによって、アンバウンドビリルビンの酸化分解を効果的に行うことができる。

【0058】

(21)

上記(18)から(20)のいずれかのアンバウンドビリルビン測定キットにおいて、酸化分解停止剤は抗酸化物質であってよい。

これによって、酸化分解反応の停止を簡易かつ効果的に行うことができる。

【0059】

(22)

上記(21)のアンバウンドビリルビン測定キットにおいて、抗酸化物質はアスコルビン酸であってよい。

これによって、酸化分解反応の停止を簡易かつ効果的に行うことができる。

【発明の効果】

10

20

30

40

50

【0060】

本発明によって、抱合型ビリルビンが高い検体が否かにかかわらず、アンバウンドビリルビン量を正確に反映した測定を行うことができる。このため、たとえば新生児の黄疸管理を的確に行うことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】本発明の一実施形態における測定原理を模式的に示す。

【図2】本発明の測定方法のプロトコルの一例を示す。

【図3】本発明のアンバウンドビリルビン測定用試料調製装置および本発明のアンバウンドビリルビン測定装置の一例のブロック図を示す。

10

【図4】参考例1で行ったUnaG法のプロトコルを模式的に示す。

【図5】参考例1で得られた検量線を示す。

【図6】参考例3で得られた、UnaG法(UnaG使用およびUnaG-HisFLAG使用)による非抱合型ビリルビン濃度と、酵素法による非抱合型ビリルビン濃度との相関を示す。

【図7】図6の相関図について、UnaGを使用したUnaG法の場合(72検体、×ドット)とUnaG-HisFLAGを使用したUnaG法の場合(68検体、ドット)とで区別して示す。

【図8】図6の相関図について、光線治療中の新生児の検体(35検体、三角ドット)と、光線治療を行っていない新生児の検体(105検体、丸ドット)とを区別可能にプロットしたものである。

20

【図9】参考例6で得られた、UnaG法による非抱合型ビリルビン濃度が新生児血清中のヘモグロビン濃度に影響されないことを示したグラフである。

【図10】参考例7で得られた、UnaG法による非抱合型ビリルビン濃度が新生児血清中の乳び濃度に影響されないことを示したグラフである。

【図11】参考例8で得られた、UnaG法による非抱合型ビリルビン濃度が新生児血清中のアスコルビン酸濃度に影響されないことを示したグラフである。

【図12】参考例10で得られた、UnaG法による全血中の非抱合型ビリルビン濃度と、酵素法による血清中の非抱合型ビリルビン濃度との相関を示す。

【図13】参考例10で得られた、UnaG法による全血中の非抱合型ビリルビン濃度と、UnaG法による血清中の非抱合型ビリルビン濃度との相関を示す。

30

【図14】参考例11で得られた、UBアナライザによるアンバウンドビリルビン濃度と総ビリルビン濃度との相関を示す。

【図15】従来の測定方法によるUBアナライザのUB値(UB analyzer UB)と、TB値を基にしたUB値(UB analyzer - 0-20s)との相関を示す。

【図16】従来の測定方法によるUBアナライザのUB値(UB analyzer UB)と、アスコルビン酸混和後の換算値を基にしたUB値(UB analyzer - 0-20s)との相関を示す。

【図17】従来の測定方法によるUB値の算出方法(a)と、本発明によるUB値の算出方法(b)とを説明する図である。

【図18】従来の測定方法によるUBアナライザのUB値(UB analyzer UB)と、GOD-POD-UnaG法のiDB値を基にしたUB値(GOD-POD-UnaG-UB)との相関を示す。

40

【図19】実施例3で得られた、DB低値血清検体についての、従来の測定方法によるUBアナライザのUB値(UB analyzer UB)と、GOD-POD-UnaG法によるiDB値を基にしたUB値(GOD-POD-UnaG-UB)との相関を示す。

【図20】実施例4で得られた、DB高値血清検体についての、従来の測定方法によるUBアナライザのUB値(UB analyzer UB)と、GOD-POD-UnaG法によるiDB値を基にしたUB値(GOD-POD-UnaG-UB)との相関を、図19に重ねて示す。

【図21】実施例3での低DB値の検体と実施例4での高DB値の検体とについて、iDB/A1bモル比と従来の測定方法によるUBアナライザのUB値との関係を示す。

50

【図22】実施例3での低DB値の検体と実施例4での高DB値の検体とについて、 $iD-B/A1b$ モル比と本発明のGOD-POD-UnaG法によるUB値との関係を示す。

【発明を実施するための形態】

【0062】

[1.測定原理]

図1に、本発明の実施形態の一例を挙げて測定原理を模式的に示す。

図1において、 $D-Bil$ は抱合型ビリルビンを、 $iD-Bil$ は非抱合型ビリルビンを示す。 $A1b$ はアルブミンを示し、アルブミン $A1b$ から遊離している $iD-Bil$ はアンバウンドビリルビンUBを示す。 $D-BX$ は抱合型ビリルビンの分解物を示し、 $iD-BX$ はアンバウンドビリルビンの分解物を示す。 $UnaG$ は抱合型ビリルビン $iD-Bil$ に特異的に結合する蛍光性ポリペプチドの一例を示す。

10

【0063】

[1-1.測定対象]

図1の(a1)は、血液試料(未反応試料)を示す。血液試料としては、抱合型ビリルビン $D-Bil$ および非抱合型ビリルビン $iD-Bil$ のアンバウンドビリルビンUBが含まれていれば、ヒトまたは非ヒト生物由来の採血試料であってもよいし、抱合型ビリルビン $D-Bil$ および/またはアンバウンドビリルビンUBを既知濃度で調製した人工血液試料であってもよい。

【0064】

血液試料(a1)は、臨床上の意義が大きい点から、ヒト乳児、特に新生児に由来する血液試料であることが好ましい。血液試料(a1)には、総ビリルビン、つまり抱合型ビリルビン $D-Bil$ および非抱合型ビリルビン $iD-Bil$ が含まれる。非抱合型ビリルビン $iD-Bil$ の多くはアルブミン $A1b$ 結合型ビリルビンとして存在する一方、一部はアルブミン $A1b$ から遊離して神経毒のアンバウンドビリルビンUBとして存在する。血液試料(a1)は、具体的には、全血、血漿および血清のいずれであってもよく、当業者によって適宜血液試料が入手および調製される。調製においては、血漿化处理、血清化处理、希釈処理などが行われる。

20

【0065】

新生児は、通常、生日を0日と数えた場合に、生後0日以上28日未満の乳児である。新生児は、総ビリルビンとアンバウンドビリルビンUBとの間に通常みられる相関から乖離してアンバウンドビリルビンUBが相対的に高いことが多く、アンバウンドビリルビンUB測定を正確に行わなければならない要請が高い。したがって、新生児がアンバウンドビリルビンUB濃度を上昇させる要因を持っている場合、たとえば低アルブミン血症、薬剤治療中、感染症罹患などに該当していることが好ましい。中でも、新生児が、当該要因に該当する可能性が極めて高い早産児であることが好ましい。早産児は、在胎37週未満で生まれた新生児をいうが、在胎30週未満の新生児であることがより好ましい。

30

一方、生後28日以上乳児でも当該要因に該当する可能性があるため、本発明は、生後28日以上乳児にも適用され得る。

【0066】

本発明は、血液試料中の抱合型ビリルビン $D-Bil$ の濃度に影響を受けない測定方法である。したがって本発明は、血液試料が、抱合型ビリルビン $D-Bil$ を高濃度で含んでいる可能性がある場合、たとえば総ビリルビンを 5 mg/dL 以上、好ましくは 8 mg/dL 以上、特に 20 mg/dL 以上の濃度で含む場合に一層有用である。本発明で測定可能な場合の総ビリルビン濃度の上限は特に限定されないが、たとえば 40 mg/dL 、好ましくは 30 mg/dL までを測定対象とすることができる。

40

具体的には、本発明は、抱合型ビリルビン $D-Bil$ 濃度が 0.5 mg/mL 以上、好ましくは 1 mg/mL 以上、さらに好ましくは 2.5 mg/mL 以上である場合に一層有用である。あるいは、総ビリルビン濃度に対する抱合型ビリルビン $D-Bil$ 濃度(抱合型ビリルビン/総ビリルビン比)で表した場合、好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上である場合に一層有用である。本発明者らは、従来のGOD-POD法による

50

アンバウンドビリルビンUB測定法において、検体の抱合型ビリルビン/総ビリルビン比が上記の範囲である場合に、アンバウンドビリルビンUBが総ビリルビン値から通常想定される値よりも高値で出やすいことを確認している。

【0067】

また、本発明は、血液試料の由来元となる被験者が光線療法を受けたか否かに影響を受けない測定方法である。従って、本発明では、血液試料中のビリルビンが脂溶性であってもよいし、光線により水溶性の構造異性体(シクロビリルビン)に変化させられていてもよい。

【0068】

[1-2. 分解工程]

図1に示すように、血液試料(a1)は分解工程(i)に供される。分解工程(i)では、血液試料(a1)中の抱合型ビリルビンD-BilとアンバウンドビリルビンUBとが酸化分解される。当該工程で生じる分解反応は、少なくともアンバウンドビリルビンUBが後述工程(iii)で用いられる蛍光性ポリペプチドとの結合特性を有しない物質に変換し、かつ、アルブミンAlb結合型ビリルビンの当該蛍光性ポリペプチドとの結合特性を変化させない限り、特に限定されるものではない。

【0069】

酸化分解は、酸化還元酵素を用いてビリルビンの水素を水素受容体である過酸化物に転移させることにより進行させればよい。好ましくは、図1に示すように酸化還元酵素としてペルオキシダーゼ、過酸化物として過酸化水素を用いる。

【0070】

過酸化水素は、分解工程(i)の反応系中で発生させることができる。より好ましくは、図1に示すように、過酸化水素を、GOD(グルコースオキシダーゼ)の存在下、グルコース(Glucose)、水および酸素からグルコネート(Gluconate)とともに生じさせる。生じさせた過酸化水素にペルオキシダーゼを作用させることで、ビリルビンを酸化分解する。この場合、分解速度がペルオキシダーゼに依存するため、ペルオキシダーゼの添加タイミングおよび濃度によってアンバウンドビリルビンUBの分解開始のタイミングおよび分解速度をコントロールしやすい点で好ましい。なお、本実施形態では過酸化水素を分解工程(i)の反応系中で発生させている例を示しているが、本発明では、グルコースおよびグルコースオキシダーゼを用いることなく、過酸化水素を試薬として系外から添加することも許容する。

【0071】

図1においては、分解工程(i)によって、血液試料(a1)中のアンバウンドビリルビンUBとともに、抱合型ビリルビンD-Bilも酸化分解される。アンバウンドビリルビンUBおよび抱合型ビリルビンD-Bilは、酸化分解によって、それぞれ無色のアンバウンドビリルビン分解物iD-BXおよび無色の抱合型ビリルビン分解物D-BXに変換される。

【0072】

[1-3. 分解停止工程]

血液試料(a1)では、アンバウンドビリルビンUBとアルブミンAlb結合型ビリルビンとが平衡状態の関係にあるため、アンバウンドビリルビンUBが遊離し続けることによるアンバウンドビリルビンUBの分解反応が後述の接触工程(iii)にまで冗長しないよう、分解停止工程(ii)を行う。これによって、試料分解物(b1)を得る。

【0073】

分解停止工程(ii)では、分解工程(i)の反応の停止が可能な方法を特に限定されることなく用いることができる。具体的には、分解工程(i)を構築している反応系に、酸化分解停止剤を添加すればよい。

【0074】

たとえば、分解反応の停止を簡易かつ効果的に行う観点から、酸化分解停止剤として抗酸化物質を用いることができる。抗酸化物質としては、グルタチオン、N-アセチルシス

10

20

30

40

50

テイン、アスコルビン酸（ビタミンC）、 α -トコフェロール（ビタミンE）、ブチルヒドロキシアニソール、カテキン、クエルセチン、尿酸、フラボノイドなどが挙げられる。図1に示すようなアスコルビン酸を用いる場合、コスト性、入手容易性、操作性（高い水溶性）、高い分解停止効果などにより、分解反応の停止をより簡易かつ効果的に行うことができる。

【0075】

上記の他にも、酸化分解停止剤としては、フェロシアン化物イオン；EDTA鉄錯体；フェロシアン化物およびアルブミン；カチオン性界面活性剤および/または両性界面活性剤；両性界面活性剤およびフェロシアン化物；ポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびフェロシアン化イオン；鉄錯体およびステロイド化合物；ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル縮合物などを用いてもよいし、炭素数8以上24以下の飽和又は不飽和脂肪酸（具体的には、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサトリエン酸、アラキドン酸、イコサン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサン酸、ドコサヘキサエン酸、テトラドコサン酸、およびテトラコサペンタエン酸）を用いてもよい。

10

【0076】

なお、血液試料の由来元となる被験者が点滴などによるビタミンC処置を受けている場合は、上記の分解工程(i)に先立って、血液試料をアスコルビン酸オキシダーゼ処理することで、もともと含まれていたアスコルビン酸の分解工程への悪影響を排除し、正確な測定が可能となる。この場合、アスコルビン酸以外の酸化分解停止剤を用いることによ

20

【0077】

[1-4. 接触工程]

接触工程(iii)では、分解工程(i)を経ていない未反応試料(a1)、および分解工程(i)を経た試料分解物(b1)それぞれに対し、非抱合型ビリルビンiD-Bilに特異的に結合することで蛍光特性を示すポリペプチド（蛍光性ポリペプチド）を接触させる。図1においては、蛍光性ポリペプチドUnaGを用いている。これによって、未反応試料(a1)からは蛍光化未反応試料(a2)が、試料分解物(b1)からは蛍光化試料分解物(b2)が得られる。

30

【0078】

接触工程(iii)で用いる蛍光性ポリペプチドは、少なくとも以下の2つの特性を示す。1つめの特性として、非抱合型ビリルビンiD-Bilに対する特異的結合性を有し、抱合型ビリルビンD-Bilおよびその分解物D-BXと、アンバウンドビリルビンUBの分解物iD-BXとに対する結合性は有しない。2つめの特性として、ホロ体つまり非抱合型ビリルビンiD-Bilと特異的結合した場合に励起光の照射を受けて所定波長の蛍光を発する一方、アポ体つまり非抱合型ビリルビンiD-Bilが存在しない場合には同じ励起光の照射を受けても蛍光を発しない。当該蛍光の強度は、非抱合型ビリルビンiD-Bil濃度に依存する。

【0079】

さらに、蛍光性ポリペプチドの3つめの特性として、アルブミンAlb結合型ビリルビンと接触した場合、アルブミンAlbと非抱合型ビリルビンiD-Bilとの結合を切断して非抱合型ビリルビンiD-Bilと結合してよい。

40

【0080】

図1に示す実施形態で例示されている蛍光性ポリペプチドUnaGは、上記の3つの特性を全て有する。したがって、蛍光化未反応試料(a2)中では、アルブミンAlbに結合しているか否かを問わず、非抱合型ビリルビンiD-Bilに結合する。つまり、アンバウンドビリルビンUBとアルブミンAlb結合型ビリルビンとに結合し、結合量相当の蛍光を発する。一方、蛍光化試料分解物(b2)中では、アルブミンAlb結合型ビリルビンのみに結合する。

【0081】

50

接触工程 (iii) で用いられる蛍光性ポリペプチドは、上記の3つの特性を満たす限り特に限定されない。蛍光性ポリペプチドの具体例は、UnaGを基本構造とするポリペプチドであってよく、たとえば、以下の(A)から(D)に挙げられる。

【0082】

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛍光性ポリペプチド(UnaG)。
 (B) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1個以上7個以下のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を有する蛍光性ポリペプチド。なお、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸の個数は、上記の特性を好ましく満たす点で、1個以上5個以下または1個以上6個以下であることが特に好ましい。
 (C) 配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有する蛍光性ポリペプチド。なお、配列同一性は、上記の特性を好ましく満たす点で、95%以上であることがより好ましく、96%以上、97%以上、98%以上、或いは99%以上であることが特に好ましい。
 (D) 上述の(A)に記載の蛍光性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有する蛍光性ポリペプチド。

10

【0083】

上記蛍光ポリペプチドは、ペプチド結合されたアミノ酸残基で構成されるポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含むものであってもよい。ポリペプチド以外の構造としては、糖鎖、イソプレノイド基などが挙げられるが、特に限定されるものではない。上記の特性を満たすことが前提であるため、非抱合型ビリルビン i D - B i l との結合部位となる構造を有していることは言うまでもない。

20

【0084】

蛍光性ポリペプチドは、天然供給源より単離してもよいし、人為的に得てもよい。より具体的には、当該蛍光性ポリペプチドには、天然の精製産物、化学合成手順の産物、および原核生物宿主または真核生物宿主(例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む)から組換え技術によって産生された翻訳産物が含まれる。人為的に得られる蛍光性ポリペプチドには、たとえば上記の(A)から(D)に挙げられるタンパク質構造に、その精製などの目的でアフィニティタグが付加された態様のものが含まれてよい。蛍光性ポリペプチドの一例として、ウナギ由来のものが挙げられ、より具体的にはニホンウナギ由来のものが挙げられる。

30

【0085】

蛍光性ポリペプチドの蛍光特性は、最大励起波長が480nm以上520nm以下、または490nm以上510nm以下、または494nm以上504nm以下であってよく、最大蛍光波長が緑色光の507nm以上547nm以下、または517nm以上537nm以下、または522nm以上532nm以下であってよい。特にUnaGの主な蛍光特性は、最大励起波長が498nm以上499nm以下、最大蛍光波長が525nm以上530nm以下、モル吸光係数が50,000 M⁻¹ cm⁻¹以上78,000 M⁻¹ cm⁻¹以下、量子収率が50%以上54%以下、蛍光寿命が2.2ナノ秒である。

40

【0086】

上述に具体的に挙げた蛍光性ポリペプチド、特にUnaGは、非抱合型ビリルビン i D - B i l と接触すると即座に結合するとともに、少量の非抱合型ビリルビン i D - B i l であっても強い蛍光活性を確保することができるため、蛍光化未反応試料(a2)および蛍光化試料分解物(b2)の量が微量であっても高感度且つ正確な測定が可能となる。すなわち、最初に用意する血液試料(a1)の量が微量であっても支障なく、また、1回の測定で蛍光化未反応試料(a2)と蛍光化試料分解物(b2)との二系統を並列して調製する必要性に対しても支障がない。このような利点は、新生児黄疸のルーチン検査としての有用性に大きく寄与する。

50

【 0 0 8 7 】

[1 - 5 . 検出工程]

検出工程 (iv) においては、蛍光化未反応試料 (a 2) および蛍光化試料分解物 (b 2) それぞれに対して励起光を照射し、発せられた所定波長の蛍光を検出する。蛍光化未反応試料 (a 2) 中ではアンバウンドビリルビン UB と蛍光性ポリペプチド (Un a G) との結合による蛍光が発せられ、蛍光化試料分解物 (b 2) 中ではアンバウンドビリルビン分解物 i D - B X が蛍光性ポリペプチド (Un a G) に結合していないためそこからは蛍光が発せられない。

【 0 0 8 8 】

当該蛍光性ポリペプチドのホロ体から発せられる蛍光強度は、蛍光性ポリペプチドの結合量に相関する。したがって、蛍光化未反応試料 (a 2) および蛍光化試料分解物 (b 2) から発せられる蛍光強度を計測し、その差を算出することによってアンバウンドビリルビン UB の量が導出される。

10

【 0 0 8 9 】

[1 - 6 . 診断]

測定されたアンバウンドビリルビン UB の測定値に基づいて、血液試料の由来元 (被験者) の黄疸管理を行うことができる。この場合、たとえば、核黄疸発症の予知を行い、光線療法、交換輸血、血漿交換、 γ -グロブリン点滴療法などの治療法の適応を決定することができる。さらに、治療後のフォローアップ時に、治療効果を確認することもできる。診断の基準となるカットオフ値は、症例の蓄積に基づいて決定することができる。この場合、カットオフ値としては、在胎週数 30 週未満と 30 週以上との間、出生体重 1500 g 未満と 1500 g 以上との間で異なる値を設定することができる。

20

【 0 0 9 0 】

本発明は上記の測定原理でアンバウンドビリルビン量を測定するものであるが、適宜、総ビリルビン量の測定法、抱合型ビリルビンの測定法、および他のアンバウンドビリルビンの測定法 (G O D - P O D 法、つまりアンバウンドビリルビン分解による総ビリルビン量の減少速度からアンバウンドビリルビン量を求める方法) の少なくともいずれかによる測定結果と組み合わせてもよい。

【 0 0 9 1 】

[2 . プロトコルおよび諸条件]

図 2 に、本発明の測定方法のプロトコルの一例を示す。以下において、このプロトコルに準じ、それぞれの工程における諸条件等についてさらに詳細に説明する。

30

【 0 0 9 2 】

図 2 の例では、血清 (Serum) を血液試料 (a 1) として用意する。最初に用意する血液試料量は、図 2 の例のような血清の場合で (血液試料が全血など血清でない場合は血清換算値で) たとえば $0.5 \mu\text{l}$ 以上 $25 \mu\text{l}$ 以下であってよい。本発明の方法は、接触工程 (iii) での希釈率が高くても測定可能であるため、血液試料の微量測定が可能である。したがって、血液試料量 (血清換算値) は、たとえば $1 \mu\text{m}$ 未満の微量であってよい。一方、各工程での希釈操作性を考慮すると、必要な血液試料量 (血清換算値) は、たとえば $0.8 \mu\text{l}$ 以上 $2 \mu\text{l}$ 以下、特に $1 \mu\text{l}$ を確保することが好ましい。

40

【 0 0 9 3 】

[2 - 1 . 分解工程 (i) 諸条件]

血液試料 (a 1) は、まず、緩衝液 (Buffer) と混和されることで最初の希釈を受ける。本実施形態では、反応系中で過酸化水素を発生させるため、この緩衝液 (Buffer) の中にグルコース (Glucose) を含ませる。緩衝液としては、P B S 緩衝液 (リン酸緩衝食塩水)、酢酸緩衝液、トリス緩衝液などを使用することができる。

【 0 0 9 4 】

緩衝液による希釈により、血液試料 (a 1) は血清換算値 (血液試料中の血清量を基準とした希釈率) でたとえば 1.5 倍以上、または 1.8 倍以上 (体積基準) に希釈される。希釈率が上記下限値以上であることは、調製容易性の点で好ましい。希釈率の範囲内の

50

上限値は特に限定されないが、希釈倍率の上昇に伴うビリルビンとアルブミンとの平衡関係の変化を考慮する観点、ならびに、光曝露および/または血清中の未知の代謝物質による分解によるビリルビンの自然消費を回避する観点から、血液試料(a1)は薄め過ぎないことが好ましい。この観点から、血液試料(a1)の希釈率は、血清換算値でたとえば55倍以下であってもよいし、2.5倍以下または2.2倍以下(いずれも体積基準)であってもよい。

【0095】

当該緩衝液(Buffer)中のグルコースの濃度は、上述の希釈率と、分解工程(i)の反応系におけるグルコースオキシダーゼ(GOD)基質としての適切量と、を勘案して適宜決定される。たとえば、分解工程(i)の反応系を構築した場合にグルコースオキシダーゼ1Uあたりの量が0.3mg以上1mg以下、好ましくは0.3mg以上0.5mg以下、一例として0.312mgとなるように勘案して決定することができる。したがって、緩衝液中のグルコースの濃度は1mg/mL以上100mg/mL以下、好ましくは1mg/mL以上10mg/mL以下、一例として1mg/mLであってよい。

10

【0096】

希釈された血液試料(血液試料希釈物)の一部はA系統用に使用され、別の一部はB系統用に使用される。

【0097】

本実施形態のB系統の血液試料希釈物には、グルコースオキシダーゼ(GOD)およびペルオキシダーゼ(POD)を含む緩衝液(GOD/POD緩衝液)が加えられ、適切な温度条件を満たすことで、分解工程(i)の反応系が構築される。GOD/POD緩衝液に用いられる緩衝液は、最初の希釈時で使用可能として挙げた緩衝液の中から適宜選択されてよい。

20

【0098】

分解工程(i)の反応系では、GOD/POD緩衝液により血液試料(a1)はさらなる希釈を受ける。分解工程(i)の反応系中における血液試料(a1)の希釈率は、血清換算値でたとえば120倍以下、好ましくは70倍以下、一例として52.5倍であってよい。希釈率が上記上限値以下であることは、ビリルビンの自然消費回避の点で好ましい。当該希釈率の範囲内の下限は特に限定されないが、希釈操作性などを考慮すると、たとえば5倍であってよい。

30

【0099】

GOD/POD緩衝液中のGODおよびPODの量は、上述の希釈率と、分解工程(i)の反応系における酵素としての適切量と、を勘案して適宜決定される。GODの量は、血液試料(a1)1 μ l(血清換算値)に対してたとえば0.0128U以上0.256U以下、好ましくは0.05U以上0.2U以下、一例として0.16Uとなるように調製される。PODの量も、血液試料(a1)1 μ l(血清換算値)に対してたとえば0.0128U以上0.256U以下、好ましくは0.05U以上0.2U以下、一例として0.16Uとなるように調製される。GODおよびPODの量を上記範囲内で設定することにより、適切な速度、つまり遅すぎず早すぎない速度でアンバウンドビリルビンを分解させることができる。GODの量とPODの量とは、同量であってよい。

40

【0100】

分解工程(i)における反応温度は、例えば28℃以上38℃以下、一例として37℃である。分解工程(i)の反応は速やかに終了させられるため、当該反応系を構築する直前の段階で、血液試料希釈物とGOD/POD緩衝液との両方が加温等により上記の温度に調整されていることが好ましい。

【0101】

なお、A系統の血液試料希釈物には、GODおよびPODを加えないことを除いて同じ操作を行う。すなわち、GODおよびPODのいずれも含まない緩衝液が加えられ、かつ、同じ温度条件下に置かれる。

【0102】

50

[2 - 2 . 分解停止工程 (ii) 諸条件]

分解工程 (i) の反応は、アスコルビン酸を含む緩衝液の添加により停止される。アスコルビン酸を含ませる緩衝液は、最初の希釈時で使用可能として挙げた緩衝液の中から適宜選択されてよい。A系統とB系統とでは、分解反応 (i) を経たか否かという点を除いて互いに同じ条件とするため、アスコルビン酸を含む緩衝液は、A系統およびB系統の両方に同様に添加される。A系統では上記の分解反応 (i) を受けていないため、試料中のビリルビンの構成としては当初の血液試料 (a 1) と変わらない (図 1 参照) 。すなわちこの試料は未反応のままであるので、未反応試料 (a 1) と記載する。一方、B系統では上記の分解反応 (i) を受けたため、試料中のビリルビンの構成が変化しており試料分解物 (b 1) となっている (図 1 参照) 。

10

【 0 1 0 3 】

分解停止工程 (ii) を行うタイミングは、分解工程 (i) の反応開始前から既に血液試料 (a 1) 中で遊離していた分のアンバウンドビリルビン U B の分解が完了したタイミングであることが望ましい。分解工程 (i) の反応開始後から分解停止工程 (ii) までに確保する時間は、分解工程 (i) の反応系における血液試料の希釈率などを考慮して選択してよい。

【 0 1 0 4 】

たとえば、当該時間は、抱合型ビリルビン D - B i l が通常量であることで総ビリルビン量の減少度合いと非抱合型ビリルビン量の減少度合いとが同視可能な系を想定した場合に、当該系において、総ビリルビン量とその初期濃度から約 2 0 % 減少 (具体的には 1 8 % 以上 2 5 % 以下減少) するのにかかる時間相当であってよい。完全混和により分解工程 (i) の反応系が均一となるまでに総ビリルビン濃度が 5 % 程度減少することを考慮すると、具体的には、総ビリルビンの初期濃度を 1 0 0 % とした場合に、9 5 % から 7 6 % まで低下するのにかかる時間相当であってよい。さらに具体的には、たとえば分解工程 (i) の反応開始後 1 0 秒以上 6 0 秒以下、好ましくは 1 5 秒以上 3 5 秒以下、より好ましくは 1 5 秒以上 2 5 秒以下、一例として 2 0 秒であってよい。分解停止を行うタイミングの範囲が上記下限値以上であることは、分解すべきアンバウンドビリルビンを確実に分解する点で好ましく、上記上限値以下であることは、測定値の再現性が良好である点で好ましい。

20

【 0 1 0 5 】

分解停止工程 (ii) における反応温度は、たとえば 2 0 以上 3 8 以下、一例として 3 7 であってよい。アスコルビン酸は、分解工程 (i) で使用した P O D 1 U あたり 0 . 0 0 1 5 m g 以上となる量であれば分解停止可能である。分解停止を迅速かつ確実に行うことを目的としてより多量に用いてもよく、たとえば P O D 1 U あたり 0 . 0 1 5 m g 以上 1 2 0 m g 以下、好ましくは 1 . 5 m g 以上 5 0 m g 以下、一例として 1 . 7 3 m g となる量で用いてもよい。より具体的には、アスコルビン酸を含む緩衝液のアスコルビン酸濃度および添加量は、分解工程 (i) の反応液中に添加された後のアスコルビン酸の終濃度がたとえば 0 . 1 重量 % 以上 3 2 重量 % 以下、好ましくは 0 . 2 重量 % 以上 1 0 重量 % 以下、一例として 0 . 3 5 重量 % となるように決定することができる。さらに、アスコルビン酸を含む緩衝液添加後は、血液試料の希釈率は血清換算値で 5 倍以上 1 2 0 倍以下、好ましくは 1 0 倍以上 1 0 0 倍以下、一例として 8 0 倍であってよい。

30

40

【 0 1 0 6 】

アスコルビン酸の終濃度が上記下限値以上であることは、アンバウンドビリルビン U B の分解を確実に停止する点で好ましく、アスコルビン酸濃度が上記上限値以下であることは、p H が酸性に傾き過ぎることを防止することで、引き続き接触工程 (iii) において蛍光性ポリペプチドとの結合特性に悪影響を与えない中性に回復させることが容易となる点で好ましい。また、血液試料の希釈率が上記上限値以下であることは、ビリルビンの自然消費回避の点で好ましい。

【 0 1 0 7 】

[2 - 3 . 接触工程 (iii) 諸条件]

50

接触工程 (iii) では、A 系統の未反応試料 (a 1) および B 系統の試料分解物 (b 1) 両方に、蛍光性ポリペプチド U n a G を含む緩衝液を添加する。蛍光性ポリペプチド U n a G を含ませる緩衝液は、最初の希釈時で使用可能として挙げた緩衝液の中から適宜選択されてよい。蛍光性ポリペプチド U n a G と非抱合型ビリルビン i D - B i l とが特異的に結合した複合体を形成することにより、それぞれ、A 系統では蛍光化未反応試料 (a 2) へ、B 系統では蛍光化試料分解物 (b 2) へ変換される。

【 0 1 0 8 】

接触工程 (iii) は、蛍光性ポリペプチド U n a G の特異的結合性に実質的な悪影響が生じない条件下で行われる。このような条件としては、たとえば温度条件が 4 以上 6 5 以下、好ましくは 2 0 以上 3 7 以下であってよく、p H がおおよそ中性、たとえば 6 . 5 以上 8 . 0 以下、好ましくは 7 . 0 以上 7 . 5 以下、特に 7 . 4 であってよい。図示したようにアスコルビン酸を使用する場合は、p H は低めとなる傾向がある。接触工程 (iii) におけるアスコルビン酸の終濃度は、たとえば 0 . 0 1 重量% 以上 0 . 8 重量% 以下であってよい。好ましくは、アスコルビン酸の終濃度は 0 . 5 重量% 以下、さらに好ましくは 0 . 2 5 重量% 以下、一層好ましくは 0 . 2 重量% 以下、より一層好ましくは 0 . 0 5 重量% 以下であってよい。アスコルビン酸の終濃度が上記上限値以下であることは、蛍光性ポリペプチド U n a G の特異的結合性に実質的な悪影響が生じない点で好ましい。また、反応時間は 2 0 秒以上 3 5 秒以下、好ましくは 2 5 以上 3 0 秒以下であってよい。

【 0 1 0 9 】

接触工程 (iii) における蛍光性ポリペプチド U n a G 添加後の反応液において、血液試料は、蛍光検出工程 (iv) における内部遮断効果が無視できる程度まで希釈されることが極めて好ましい。たとえば、血液試料の希釈率は、血清換算値で 2 0 0 倍以上 3 2 0 0 倍以下、好ましくは 4 0 0 倍以上 1 6 0 0 倍以下、一例として 8 0 0 倍であってよい。

【 0 1 1 0 】

蛍光性ポリペプチド U n a G を含む緩衝液の濃度および添加量は、上記の血液試料の希釈率および上記の p H を考慮して決定することができる。たとえば、蛍光性ポリペプチド U n a G を含む緩衝液の濃度は、測定の正確性の点などから、添加後の U n a G の終濃度が 0 . 5 μ M 以上 4 μ M 以下、好ましくは 1 . 0 μ M 以上 3 μ M 以下、一例として 2 μ M となるように調製することができる。

【 0 1 1 1 】

[2 - 4 . 検出工程 (iv) 諸条件]

検出工程 (iv) では、A 系統の蛍光化未反応試料 (a 2) および B 系統の蛍光化試料分解物 (b 2) それぞれに対して、蛍光性ポリペプチドの蛍光特性に応じた励起光を照射し、所定の波長の蛍光強度を測定する。励起波長は、4 8 0 n m 以上 5 2 0 n m 以下、または 4 9 0 n m 以上 5 1 0 n m 以下、または 4 9 4 n m 以上 5 0 4 n m 以下であってよい。検出波長は、緑色光の 5 0 7 n m 以上 5 4 7 n m 以下、または 5 1 7 n m 以上 5 3 7 n m 以下、または 5 2 2 n m 以上 5 3 2 n m 以下であってよい。特に蛍光性ポリペプチド U n a G を用いる場合は、励起波長が 4 9 8 n m 以上 4 9 9 n m 以下、検出波長が 5 2 5 n m 以上 5 3 0 n m 以下であってよい。

【 0 1 1 2 】

蛍光の検出手段は特に限定されないが、たとえば、U V トランスイルミネータ、L E D トランスイルミネータ、蛍光顕微鏡、蛍光検出器、およびフローサイトメトリなどを用いることができる。

【 0 1 1 3 】

検出工程 (iv) では、A 系統の蛍光化未反応試料 (a 2) および B 系統の蛍光化試料分解物 (b 2) それぞれから検出された蛍光強度の差を計算し、アンバウンドビリルビン U B の濃度として算出する。この場合、蛍光強度の差分は、たとえば既知濃度試料に基づいて予め作成された検量線と照合されることで、アンバウンドビリルビン U B の絶対量として導出することができる。

【 0 1 1 4 】

さらに、蛍光強度の差分は、適宜較正が行われてよい。たとえば本発明では全血を血清化処理することなく血液試料 (a 1) として測定に供することができるため、この場合、本工程でヘマクリット値を考慮することで蛍光強度の差分を較正し、正しいアンバウンドビリルビン U B を導出することができる。

【 0 1 1 5 】

[5 . アンバウンドビリルビン測定装置]

図 3 に、本発明のアンバウンドビリルビン測定用試料調製装置および本発明のアンバウンドビリルビン測定装置の一例のブロック図を示す。

図 3 に示すように、アンバウンドビリルビン測定用試料調製装置は、インキュベータと、試薬液添加部と、試薬ブランク液添加部と、タイマーと、停止剤添加部と、混和部と、を含む。これにより、上記のアンバウンドビリルビンの測定方法の分解工程 (i) および分解停止工程 (ii) を自動化することができる。

【 0 1 1 6 】

インキュベータは、反应用容器収容部と対照用容器収容部とを含む。反应用容器収容部には反应用容器が収容され、対照用容器収容部には対照用容器が収容され、インキュベータにより、それらの内容物が所定の温度に維持される。

【 0 1 1 7 】

反应用容器および対照用容器に最初に添加される内容物は、血液試料の希釈物であって組成が同じものである。反应用容器に添加された血液試料希釈物は図 2 に示すうちの A 系統であり、対照用容器に添加された血液試料希釈物は図 2 に示すうちの B 系統である。

【 0 1 1 8 】

反应用容器および対照用容器に添加される血液試料の希釈物は、たとえば、グルコース含有緩衝液と混和された血液試料であってよい。具体的には、血液試料とグルコース含有緩衝液とを混和した後、得られた混和物の一部を反应用容器に、他の一部を対照用容器に、分割添加することができる。この混和および分割添加の工程は、手動で行うことができる。しかしながら、本発明のアンバウンドビリルビン測定用試料調製装置は、この混和および分割添加の工程を自動化するように構成されることを除外するものではない。

【 0 1 1 9 】

インキュベータにおいては、反应用容器および対照用容器中のビリルビン自然消費を回避する観点から、反应用容器収容部と対照用容器収容部が遮光されるように構成されることが好ましい。

【 0 1 2 0 】

試薬液添加部は、反应用容器収容部内の反应用容器にアンバウンドビリルビン酸化分解試薬液を所定量添加する。これによって、反应用容器中のアンバウンドビリルビンの分解工程 (i) が行われる。そして、混和部によって、反应用容器の内容物が混和される。なお、アンバウンドビリルビン酸化分解試薬液は、たとえば G O D および P O D を含む緩衝液である。アンバウンドビリルビン酸化分解試薬液は、インキュベータ内で、所定の温度に維持された状態で用意されていてよい。

【 0 1 2 1 】

試薬ブランク液添加部は、対照用容器収容部内の対照用容器に試薬ブランク液を所定量添加する。したがって、対照用容器内では、アンバウンドビリルビンの分解工程 (i) は行われぬ。そして、混和部によって、対照用容器の内容物が混和される。なお、試薬ブランク液は、たとえば、上記の G O D および P O D を含む緩衝液から G O D および P O D が除外された組成の緩衝液である。試薬ブランク液は、インキュベータ内で、所定の温度に維持された状態で用意されていてよい。

【 0 1 2 2 】

タイマーは、試薬液添加部および試薬ブランク液添加部の動作に基づいて始動するように制御される。これにより、分解工程 (i) の時間を正確に測定することができる。

【 0 1 2 3 】

停止剤添加部は、タイマーの計測時間に基づいて制御される。具体的には、タイマーが、分解工程(i)の反応開始前から既に血液試料中で遊離していた分のアンバウンドビリルビンの分解が完了するまでにかかる所要の時間(好ましくは30秒)をカウントした時に、反応用容器および対照用容器それぞれに酸化分解停止剤を所定量添加する動作を行うように制御される。酸化分解停止剤を添加した後も、反応用容器および対照用容器それぞれの内容物は混和部によって混和される。これによって、アンバウンドビリルビンの酸化分解反応の停止が正確なタイミングで行われる。なお、酸化分解停止剤は、緩衝液中で溶解された状態で使用されてよく、インキュベータ内で、所定の温度に維持された状態で用意されていてよい。

【0124】

10

図3に示すように、本発明のアンバウンドビリルビン測定装置は、上記のアンバウンドビリルビン測定用試料調製装置を含んで構成され、さらに、蛍光測定部と、演算処理部と、出力部とを含む。本実施形態の場合は、分取部と添加部も含む。

【0125】

蛍光測定部には、測定用容器収容部が含まれ、公知の分光光学系で構成されている。測定用容器収容部に収容される測定用容器は、多穴ウェルのように複数の試料について効率的に蛍光観察できるものであることが好ましい。本実施形態では、測定用容器として多穴ウェルを挙げて説明する。

【0126】

酸化分解停止剤の添加後、反応用容器の内容物(試料分解物(b1)、図1および図2参照)および対照用容器の内容物(未反応試料(a1)、図1および図2参照)はそれぞれ一部がそれぞれのウェルに添加される。この操作は手動で行ってもよいが、本実施形態のように、分取部によって自動に行われてもよい。また、この分取部は、停止剤添加部の動作またはタイマーの計測時間に基づいて、その稼働が自動制御されていてよいし、手動命令(たとえば手動スイッチ)により稼働させてもよい。

20

【0127】

また、蛍光測定部は、反応用容器および対照用容器の内容物のそれぞれ一部がそれぞれのウェルに添加された時点(かつ、後述の蛍光特性を示すポリペプチドの添加前)で、ブランク測定を行ってよい。ブランク測定は、手動命令によって行われてもよいし、分取部を含む本実施形態では、分取部の稼働終了に基づいた蛍光測定部の自動制御により自動的に行われてもよい。

30

【0128】

それぞれのウェルの内容物に対しては、蛍光特性を示すポリペプチドが添加される。これによって、接触工程(iii)が行われ、未反応試料(a1)が入ったウェルからは蛍光化未反応試料(a2)が、試料分解物(b1)が入ったウェルからは蛍光化試料分解物(b2)が、それぞれ蛍光用測定試料として得られる(図1、図2参照)。

【0129】

蛍光特性を示すポリペプチドを添加する操作は手動で行ってもよいが、本実施形態のように、添加部によって行われてもよい。また、この添加部は、たとえば上述のブランク測定の終了に基づいて、その稼働が自動制御されていてよいし、手動命令により稼働させてもよい。なお、蛍光特性を示すポリペプチドは、たとえばUnaGを基本構造とするポリペプチドを含む緩衝液の態様で使用される。このポリペプチドを含む緩衝液は、インキュベータ内で、所定の温度に維持された状態で用意されていてよい。

40

【0130】

蛍光測定部は、蛍光用測定試料、つまり、蛍光化未反応試料(a2)および蛍光化試料分解物(b2)それぞれに対し、蛍光検出を行う。これによって、検出工程(iv)が行われる。この操作は、手動命令によって行われてもよいし、添加部を含む本実施形態では、添加部の稼働に基づいた蛍光測定部の自動制御により行われてもよい。

【0131】

蛍光測定部による検出工程(iv)が自動制御により行われる場合、添加部によって蛍光

50

特性を示すポリペプチドが添加された時点からタイマーが始動するようにタイマーが制御され、当該タイマーの計測時間に基づいて蛍光測定部が稼動するように制御されてよい。たとえば、タイマーが、蛍光特性を示すポリペプチドが最大蛍光強度を示すとされる所定の時間（好ましくは10分以上15分以下）をカウントした時に、蛍光測定部が稼動し蛍光測定するように制御されてよい。あるいは、タイマーが、蛍光特性を示すポリペプチドが最大蛍光強度を示すとされる所定の時間（好ましくは10分以上15分以下）をカウントする間、蛍光測定部を稼動し続けることで蛍光測定し続けてもよい。

【0132】

演算処理部は、少なくとも反応用容器の内容物の蛍光値と対照用容器の内容物の蛍光値との差分からアンバウンドビリルビン値を導出する。上記のように、蛍光測定部が、蛍光特性を示すポリペプチドが最大蛍光強度を示すとされる所定の時間（好ましくは10分以上15分以下）をカウントする間蛍光測定し続ける場合は、演算処理部は、取得したそれぞれの蛍光強度から最大蛍光強度を割り出す処理を行った後に、アンバウンドビリルビン値を導出することができる。また、蛍光化未反応試料（a2）および蛍光化試料分解物（b2）それぞれについて、同じ条件の試料を複数作成することで複数の蛍光強度を取得した場合は、演算処理部は、取得したそれぞれの蛍光強度から代表値（たとえば平均値、中央値など）を割り出す処理を行った後に、アンバウンドビリルビン値を導出することができる。さらに、血液試料が血清でなく全血である場合には、演算処理部は、ヘマクリット値による補正を行ってもよい。

10

出力部は、導出されたアンバウンドビリルビン値を表示する。

20

【0133】

[6. アンバウンドビリルビン測定キット]

本発明のアンバウンドビリルビン測定キットは、上記のアンバウンドビリルビンの測定方法を実施するためのキットである。本発明のアンバウンドビリルビン測定キットは、アイテムとして、アンバウンドビリルビンを酸化分解するための酸化還元酵素と、酸化分解を停止するための酸化分解停止剤と、非抱合型ビリルビンに対する特異的結合により蛍光特性を示すポリペプチドと、を少なくとも含む。

【0134】

酸化還元酵素としてはペルオキシダーゼであることが好ましい。酸化還元酵素の態様は、保存安定性などの観点から凍結乾燥品であることが好ましいが、後述の緩衝液を溶媒として溶解させた液剤の態様であってもよい。

30

【0135】

酸化分解停止剤は、上述のアンバウンドビリルビン測定において例示した物質から適宜選択して含ませることができる。酸化分解停止剤は、粉末剤の態様であってもよいし、前述の緩衝液を溶媒として溶解させた液剤の態様であってもよい。酸化分解停止剤としては抗酸化剤であることが好ましく、アスコルビン酸であることがさらに好ましいが、特にアスコルビン酸である場合は、保存安定性などの観点から粉末剤の態様であることが好ましい。

【0136】

蛍光特性を示すポリペプチドは、上述のアンバウンドビリルビン測定において例示した物質から適宜選択して含ませることができる。蛍光特性を示すポリペプチドは、保存安定性などの観点から凍結乾燥品であることが好ましい。

40

【0137】

アンバウンドビリルビン測定キットには、グルコースおよびグルコースオキシダーゼをさらに含むことができる。グルコースは、粉末剤の態様であってもよいし、測定時の簡便性および/または正確性などの観点から、前述の緩衝液中に溶解された液剤の態様であってもよい。グルコースオキシダーゼは、保存安定性などの観点から凍結乾燥品であることが好ましいが、前述の緩衝液を溶媒として溶解させた液剤の態様であってもよい。

【0138】

アンバウンドビリルビン測定キットには、標準物質としてのアンバウンドビリルビンを

50

さらなるアイテムとして含むことができる。標準物質は、粉末剤の態様であってもよいし、前述の緩衝液中に溶解された液剤の態様であってもよい。

【0139】

それぞれのアイテムは、適宜遮光包装されてよく、1回分の使用に適した量が分包され、複数回分のアイテムセットが含まれてもよい。

【0140】

また、アンバウンドビリルビン測定キットには、酸化還元酵素、酸化分解停止剤、蛍光特性を示すポリペプチド、グルコース、グルコースオキシダーゼおよび標準物質の少なくともいずれかのための溶媒または希釈剤としての緩衝液（PBS緩衝液（リン酸緩衝食塩水）、酢酸緩衝液、トリス緩衝液など）をさらなるアイテムとして含んでもよい。

10

【0141】

アンバウンドビリルビン測定キットには、上記のアンバウンドビリルビン測定方法を示すプロトコルに関する情報をさらに含んでよい。当該情報は、プロトコルを掲載した印刷物であってもよいし、プロトコルがインターネット等で閲覧または取得可能となるように、ウェブ上の閲覧または取得場所についての情報を掲載した印刷物であってもよい。

【0142】

さらに、アンバウンドビリルビン測定キットが、上述のアンバウンドビリルビン測定装置の専用キットである場合などは、専用の測定用容器（たとえば多穴ウェル）がアイテムとして含んでいてもよい。

【実施例】

20

【0143】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

【0144】

以下の参考例および実施例において、人工ビリルビン標準液（単にビリルビン標準液と記載する場合もある）には、株式会社アローズ製のビリルビン標準液を用いた。新生児血清には、神戸大学病院の新生児特定集中治療室に入院した新生児において、黄疸評価目的に行った血液検査の中で発生した余剰検体であり、神戸大学病院の倫理委員会の承認を受け、かつ、余剰検体の基礎研究への使用について患児の代諾者の了承を得たものを用いた。

30

【0145】

UnaGおよびUnaG-HisFLAGには、独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センターより提供された、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛍光性ポリペプチドを用いた。

【0146】

GOD-POD酵素液には、乾燥凍結品のグルコースオキシダーゼ3.2単位と凍結乾燥品のペルオキシダーゼ3.2単位とを、リン酸二水素カリウム0.0068mgとリン酸水素二ナトリウム12水和物0.720mgと精製水に溶解させて25μLとした液剤中に溶解させたものを用いた。溶媒、希釈液、および酵素希釈液に用いたBufferとしては、リン酸緩衝液（pH7.4）を用いた。

40

【0147】

マイクロプレートリーダーには、コロナ電気株式会社製SH-9000を用いた。総ビリルビンTBおよびアンバウンドビリルビンUBは、UBアナライザ（株式会社アローズ製の専用測定器ユービーアナライザ）を用いた。総ビリルビンT-bilおよび抱合型ビリルビンD-bilは、それぞれ、酵素法を用いたイアトロQ T-BILIIおよびイアトロQ D-BBIL(A)（いずれも株式会社LSIメディエンス製）によって測定し、非抱合型ビリルビンiD-bilはそれらの差分を求めることにより導出した。

【0148】

[参考例1：UnaGを用いたUnaG法と酵素法とによる新生児血清中の非抱合型ビリルビン濃度の比較(1)]

50

図4に、本参考例1で行ったUnaG法のプロトコルを模式的に示す。

(検量線の作成)

まず、人工ビリルビン標準液を段階希釈し、コントロールとともに、ビリルビン濃度が0.0mg/dLから33.6mg/dLまでの段階希釈系列を調製した。

人工ビリルビン標準液の段階希釈系列それぞれ50μLと、UnaG溶液150μLとを混和し、総量200μLの混合溶液を作成した。混合溶液中のUnaGの最終濃度は2μMであった。

【0149】

混合溶液の蛍光強度は、混和後10分経過時に最大となった。したがって、混和後10分経過時に、マイクロプレートリーダーを用い、励起波長498nmに対する蛍光波長527nmの蛍光強度を測定した。非抱合型ビリルビン(iD-Bil)濃度に対する蛍光強度をプロットし、検量線を作成した。得られた検量線を図5に示す。

10

【0150】

(検体)

新生児28例より採取した48検体を入手した。28例の症例背景を表1に、48検体の血清採取日齢および酵素法に基づく非抱合型ビリルビンの値を表2に示す。

【0151】

【表1】

n=28	
在胎週数 (weeks)	37.5 (30.4-41.6)
出生体重 (g)	2637 (1394-3838)
median (range)	

20

【0152】

【表2】

n=48	
血清採取日齢	5 (1-35)
iDB (mg/dL)	11.8 (1.2-16.7)
median (range)	

30

【0153】

(非抱合型ビリルビン濃度の測定)

図4に示すように、上述の新生児血清をそれぞれPBSで200倍希釈した。希釈した各新生児血清50μLとUnaG溶液150μL(400mol)とを混和し、10反応分後、同様に蛍光強度を測定した。上記の検量線に基づいて、測定値から非抱合型ビリルビン濃度(UnaG法による非抱合型ビリルビン濃度)を求めた。

【0154】

48検体について、UnaG法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度と、酵素法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度(総ビリルビン測定値と抱合型ビリルビン値との差分として導出)との相関を調べた。その結果、両方法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた($y = 1.04x + 0.18$ 、 $R = 0.954$ 、 $P < 0.001$)。

40

【0155】

(光線療法の影響の検証)

さらに、上述の相関について、光線治療中の新生児の検体(11検体)と、光線治療を行っていない新生児の検体(37検体)との間で相違はなかった。したがって、光線療法の測定系への悪影響は確認されなかった。

【0156】

50

なお、さらに症例数および検体数を増やした例を後述の参考例 3 に示す。

【 0 1 5 7 】

[参考例 2 : U n a G - H i s F L A G を用いた U n a G 法と酵素法とによる新生児血清中の非抱合型ビリルビン濃度の比較 (1)]

(検体)

新生児 2 9 例より採取した 5 3 検体入手した。2 9 例の症例背景を表 3 に、5 3 検体の血清採取日齢および酵素法に基づく非抱合型ビリルビンの値を表 4 に示す。

【 0 1 5 8 】

【表 3】

n=29	
在胎週数 (weeks)	37.0 (27.7-40.0)
出生体重 (g)	2508 (1014-3730)

median (range)

10

【 0 1 5 9 】

【表 4】

n=53	
血清採取日齢	5 (2-27)
iDB (mg/dL)	12.1 (1.3-20.2)

median (range)

20

【 0 1 6 0 】

(非抱合型ビリルビンの測定)

上記の検体を用い、U n a G 法に用いる蛍光性タンパク質として U n a G - H i s F L A G を用いたことを除いて、参考例 1 と同じように、検量線を作成し、U n a G 法と酵素法とで測定された非抱合型ビリルビン測定値の相関を調べた。その結果、両方法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた ($y = 1.02x - 0.08$ 、 $R = 0.954$ 、 $P < 0.001$)。

30

なお、U n a G - H i s F L A G は、参考例 1 で用いた U n a G にヒスチジンタグを介して F L A G タグが付された、U n a G の変形例である。

【 0 1 6 1 】

(光線療法の影響の検証)

さらに、上述の相関について、光線治療中の新生児の検体 (1 9 検体) と、光線治療を行っていない新生児の検体 (3 4 検体) との間で相違はなかった。したがって、光線療法の測定系への悪影響は確認されなかった。

【 0 1 6 2 】

なお、さらに症例数および検体数を増やした例を後述の参考例 3 に示す。

【 0 1 6 3 】

[参考例 3 : U n a G を用いた U n a G 法と酵素法とによる新生児血清中の非抱合型ビリルビン濃度の比較 (2) 、および U n a G - H i s F L A G を用いた U n a G 法と酵素法とによる新生児血清中の非抱合型ビリルビン濃度の比較 (2)]

40

(検体)

上述の参考例 1 および参考例 2 に、新生児の症例および血清検体をさらに増やし、参考例 1 および参考例 2 における症例および血清検体数を含めた合計 9 3 例より採取した血清 1 4 0 検体 (抱合型ビリルビン $< 1.0 \text{ mg/dL}$) について、症例背景をまとめて表 5 に、1 4 0 検体の血清採取日齢および酵素法に基づく抱合型ビリルビンの値をまとめて表 6 に示す。

【 0 1 6 4 】

50

【表5】

n=93	
在胎週数 (weeks)	37 (27-41)
出生体重 (g)	2760 (1014-3898)
median (range)	

【0165】

【表6】

n=140	
血清採取日齢	5 (1-35)
DB (mg/dL)	0.2 (0.1-0.7)
median (range)	

10

【0166】

(非抱合型ビリルビンの測定)

上記の140検体を用い、72検体についてはUnaGを使用して参考例1と同様の操作を行い、68検体についてはUnaG-HisFLAGを使用して参考例2と同様の操作を行うことで検量線を作成し、UnaG法(UnaG method)と酵素法(BOD method)とで測定された非抱合型ビリルビン測定値の相関を調べた。140検体の結果をまとめて図6に示す。図6に示すように両方法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた($y = 1.01x + 0.17$ 、 $r = 0.943$ 、 $P < 0.001$)。

20

【0167】

(非抱合型ビリルビンの測定 - UnaG使用とUnaG-HisFLAG使用との比較)

図6に示された140検体のうち、UnaGを使用した72検体と、UnaG-HisFLAGを用いた68検体とを区別して図7に示す。

【0168】

図7では、UnaGを用いた検体(72検体)をxドットで、UnaG-HisFLAGを用いた検体(68検体)をドットで、区別可能にプロットしている。図7に示すように、UnaGを用いた検体群(72検体、xドット)では、両方法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた($y = 1.03x + 0.18$ 、 $r = 0.956$ 、 $p < 0.001$)。同様に、UnaG-HisFLAGを用いた検体群(68検体、ドット)でも、両方法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた($y = 0.996x + 0.11$ 、 $r = 0.935$ 、 $p < 0.001$)。さらに、両検体群で相関の相違はみられなかった。

30

【0169】

さらに、同日同時間に採取した別の5種類の血清検体について、UnaGまたはUnaG-HisFLAGを用いたUnaG法の検証を行った。その結果を以下の表7に示す。表7に示すように、UnaGおよびUnaG-HisFLAGのいずれを用いた場合も、ほぼ同じ非抱合型ビリルビン濃度が導出されることを確認した。

40

【0170】

【表7】

Sample	#I	#II	#III	#IV	#V
UnaG	3.4	6.6	8.5	12.2	13.8
UnaG-His-FLAG	3.3	6.4	8.5	12.3	13.7

【0171】

50

(光線療法の影響の検証)

上述の140検体について、光線療法を受けていない時間帯に採取した検体群(105検体、丸ドット)と、光線療法を受けている時間帯に採取した検体群(35検体、三角ドット)とを区別可能にプロットした。その結果を図8に示す。図8に示すように、両検体群で有意な差は見られなかった。したがって、光線療法の測定系への悪影響は確認されなかった。

【0172】

[参考例4：高濃度抱合型ビリルビン血清を用いた場合のUnaG法と酵素法とによる非抱合型ビリルビン濃度の比較]

抱合型ビリルビン濃度が高い14検体(抱合型ビリルビン 1.0 mg/dL)について、UnaG法(UnaG method)によって得られた非抱合型ビリルビン濃度と、酵素法(BOD method)によって得られた総ビリルビン(Total bilirubin)濃度、抱合型ビリルビン(Conjugated bilirubin)濃度、それらから導出された非抱合型ビリルビン(Unconjugated bilirubin)濃度と、の比較、ならびに、UnaG法(UnaG-HisFLAG使用)および酵素法によって得られたそれぞれの非抱合型ビリルビン濃度の差(Difference)を表8に示す。表8では、酵素法(BOD(bilirubin oxidase) method)によって得られた総ビリルビン(Total bilirubin)濃度、抱合型ビリルビン(Conjugated bilirubin)濃度、およびその差(Difference)について、平均値(Mean)および標準偏差(SD)も併せて示す。なお、酵素法による非抱合型ビリルビンの導出方法は、以下の式に従った。

$$[\text{非抱合型ビリルビン}] = [\text{総ビリルビン}] - [\text{抱合型ビリルビン}]$$

$$1 \text{ mg/dL} = 17.1 \mu\text{M}$$

【0173】

表8より、酵素法とUnaG法による抱合型ビリルビン濃度は同等であり有意差はなかった(p=0.31)。したがって、UnaG法は、抱合型ビリルビン濃度の高低に関わらず非抱合型ビリルビンを直接的に測定することができることが示された。

【0174】

10

20

【表 8】

Sample	BOD method (mg/dl)			UnaG method (mg/dl)	Difference (mg/dl)	
	Total bilirubin	Conjugated bilirubin	Unconjugated bilirubin			
# 1	9.1	1.0	8.1	9.0	-0.9	
# 2	14.7	1.2	13.5	15.0	-1.5	
# 3	9.6	1.5	8.1	8.7	-0.6	10
# 4	9.1	2.1	7.0	7.1	-0.1	
# 5	3.9	2.4	1.5	0.6	0.9	
# 6	5.5	3.5	2.0	0.8	1.2	
# 7	5.9	4.6	1.3	1.3	0.0	
# 8	6.0	4.7	1.3	1.2	0.1	
# 9	7.9	5.5	2.4	1.7	0.7	
# 10	8.0	6.0	2.0	1.7	0.3	20
# 11	12.0	9.6	2.4	1.5	0.9	
# 12	19.7	16.4	3.3	2.0	1.3	
# 13	21.0	17.7	3.3	2.1	1.2	
# 14	25.0	22.0	3.0	2.0	1.0	
		Mean	4.2	3.9	0.3	
		SD	3.6	4.3	0.9	

【 0 1 7 5 】

30

[参考例 5 : ビリルビン測定値の安定性評価]

新生児血清 5 検体を用い、UnaG 法による非抱合型ビリルビン測定値について、日中変動および日間変動を検証した。その結果を表 9 に示す。表 9 では、日中変動についての検証 (A. Intra-day assay) と日間変動についての検証 (B. Inter-day assay) を表し、それぞれ、UnaG 法による非抱合型ビリルビン測定値 (A: 時刻を変えて測定、B: 日を変えて測定)、その中央値 (Median)、平均値 (Mean)、標準偏差 (SD) および変動係数 (CV) を、酵素法 (BOD method) による非抱合型ビリルビン測定値とともに示す。

なお、日中変動の検証では、調製された同一の血清から時間を異にして測定用試料を調製して得られる iDB の測定値が変化するかどうかを検証した。具体的には、血清を調製後、約 20 分毎に毎回測定用試料を調製し、合計 6 回測定した。

40

また、日間変動の検証では、調製された同一の血清から日を異にして測定用試料を調製して得られる iDB の測定値が変化するかどうかを検証した。具体的には、血清を調製後、毎日測定用試料を調製し、合計 6 日間に亘って測定を行った。

表 9 に示すように、日中および日間のいずれにおいても、UnaG 法による非抱合型ビリルビン測定値が安定的に得られることが示された。

【 0 1 7 6 】

【表 9】

A. Intra-day assay

Sample	BOD method (mg/dl)	UnaG method (mg/dl)						Median	Mean	SD	CV
		1	2	3	4	5	6				
#A	4.0	3.7	3.6	3.3	3.7	3.6	3.2	3.6	3.5	0.2	5.8
#B	11.5	11.1	10.7	10.7	10.6	10.7	10.7	10.7	10.7	0.2	1.5
#C	12.7	12.1	12.2	12.7	12.5	12.3	12.3	12.3	12.4	0.2	1.7
#D	15.0	15.2	14.8	15.1	14.8	14.3	14.1	14.8	14.7	0.4	3.0
#E	16.7	15.0	16.4	14.9	16.1	17.0	16.0	16.0	15.9	0.8	5.2

10

B. Inter-day assay

Sample	BOD method (mg/dl)	UnaG method (mg/dl)						Median	Mean	SD	CV
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6				
#A	4.0	3.9	3.8	4.1	3.7	3.6	4.4	3.9	3.9	0.3	8.1
#B	11.5	13.5	10.8	12.4	11.1	11.7	11.8	11.7	11.9	1.0	8.3
#C	12.7	13.6	12.9	13.6	12.1	14.3	13.3	13.4	13.3	0.7	5.6
#D	15.0	14.7	15.2	14.1	15.3	15.1	14.5	14.9	14.8	0.5	3.2
#E	16.7	17.2	15.7	17.0	15.0	16.2	16.0	16.1	16.2	0.8	5.2

20

【0177】

[参考例 1 - 参考例 5 まとめ]

以上の参考例 1 から参考例 3 より、新生児合計 93 例からの血清合計 140 検体について、酵素法による非抱合型ビリルビン測定値と UnaG 法による非抱合型ビリルビン測定値とはきわめて良好な相関関係を示した。

【0178】

参考例 1 から参考例 3 より、蛍光タンパク質のバリエーションに関し、蛍光タンパク質 UnaG を用いた UnaG 法および蛍光タンパク質 UnaG - His FLAG を用いた UnaG 法いずれにおいても、ほぼ同等の非抱合型ビリルビン測定値を示した。

【0179】

参考例 1 から参考例 3 より、光線療法の影響に関し、蛍光タンパク質 UnaG を用いた UnaG 法および蛍光タンパク質 UnaG - His FLAG を用いた UnaG 法いずれにおいても、光線療法の有無による明らかな影響は確認できなかった。

30

【0180】

参考例 4 より、抱合ビリルビン濃度の影響に関し、抱合ビリルビン濃度が高い 14 検体においても酵素法による非抱合型ビリルビン測定値と UnaG 法による非抱合型ビリルビン測定値とはほぼ同値であった。

【0181】

さらに、参考例 5 より、血清調製後の 24 時間未満のいずれの時点であっても、かつ、1 日以上 (1 日以上 6 日以下) 経過後のいずれの時点であっても、安定した非抱合型ビリルビン測定値が得られた。

40

【0182】

したがって、検体は、抱合ビリルビンの高低、蛍光タンパク質のバリエーション、被験者の光線療法歴の有無、血清調製後の経過時間にかかわらず本発明へ適用可能であることが容易に推認される。

【0183】

[参考例 6 : UnaG 法による溶血検体の非抱合型ビリルビン濃度測定]

本参考例では、UnaG 法による非抱合型ビリルビン (iDB) 測定における、検体中のヘモグロビン (溶血) の影響を検証した。

【0184】

50

(ヘモグロビン含有溶液の作成)

1. 健常成人から全血 5 mL を採取した (血液ガス測定: Hb 16 g / dL)
2. 遠心して上清成分を吸引破棄し、赤血球成分のみを残した。
3. 血球成分 2 mL と dH₂O 3 mL とを加えて溶血させ、全量 5 mL とした。
4. 十分混和したうえで、遠心して上清み液のみを新しいチューブに移した。

これにより、赤血球膜成分を除いた。結果、全量は約 4 mL 程度となった。

5. SLS - ヘモグロビン法による XN - series 9000 (シスメックス株式会社製) を用いて Hb 濃度を測定した (Hb 13.4)。
6. Buffer を用いて、Hb 5 g / dL、Hb 2.5 g / dL、Hb 1 g / dL、Hb 0.5 g / dL の希釈系列を作成した。

10

【0185】

(検量線の作成)

1. ビリルビン標準液 (アンバウンドビリルビン標準物質, アローズ社) を用意した。このビリルビン標準液の UB アナライザでの測定値は TB 17.1 mg / dL であった。
2. ビリルビン標準液を Buffer を用いて段階希釈し、ビリルビン濃度が 1.71 ng / μL、0.855 ng / μL、0.4275 ng / μL の希釈系列を作成した。また、コントロールとして、当該 Buffer のみを用意した。
3. Buffer を用いて Unag - His FLAG の 400 pmol / 150 μL 溶液を作成した。
4. Unag - His FLAG 溶液 150 μL と、ビリルビン標準液の希釈系列 50 μL とを混合し、マイクロプレートリーダーで測定した。この場合、測定感度は ×1 とし、各希釈系列につき 3 回ずつ、注入開始後 10 分経過時の蛍光強度 (最大蛍光強度) を測定した。測定値は、中央値を採用した。
5. ビリルビン濃度と最大蛍光強度とから検量線を作成した。

20

【0186】

(標準液および新生児検体を用いた検証)

1. 2 種類の新生児血清 (血清 225、血清 227) をそれぞれ用意した。それぞれの検体について、酵素法で測定された総ビリルビン値 (T - bil)、抱合型ビリルビン (D - bil)、およびそれらから導出された非抱合型ビリルビン (iD - bil) と、UB アナライザで測定された総ビリルビン値 (TB)、アンバウンドビリルビン (UB) と、アルブミン値 (Alb) とを、ビリルビン標準液の TB および UB と共に下記表 10 に示す。

30

【0187】

【表 10】

	T-bil mg/dL	D-bil mg/dL	iD-bil mg/dL	TB mg/dL	UB μg/dL	Alb g/dL
標準液				17.1	0.66	
血清 225	13.4	0.3	13.1	12.6	0.57	3.7
血清 227	7.7	0.2	7.5	8.0	0.23	3.4

40

【0188】

2. 新生児血清 10 μl と、上記で段階希釈により調製した各ヘモグロビン含有溶液 10 μl と、Buffer 1980 μl とを混和し、新生児血清の 200 倍希釈液 (ヘモグロビン含有) を作成した。それぞれの 200 倍希釈液 (ヘモグロビン含有) におけるヘモグロビンの最終濃度は、25 mg / dl、12.5 mg / dl、5 mg / dl および 2.5 mg / dl であった。

また、新生児血清 10 μl と、Buffer 1990 μl とを混和し、新生児血清の 200 倍希釈液 (ヘモグロビン不含) も作成した。

50

3. 同様に、ビリルビン標準液についても、200倍希釈液（ヘモグロビン含有）4種および200倍希釈液（ヘモグロビン不含）を作成した。

【0189】

4. 検量線作成で用いたUnaG-His FLAG溶液150 μ Lと、新生児血清またはビリルビン標準液の200倍希釈液50 μ Lとを混和し、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。この場合、測定感度は $\times 1$ とし、各希釈系列につき3回ずつ、注入開始後10分経過時の蛍光強度（最大蛍光強度）を測定した。測定値は、中央値を採用した。

5. 上述の検量線を用いて、UnaG法でのiD-bil値を算出した。

【0190】

（結果）

ビリルビン標準液では、いずれのヘモグロビン濃度であってもUnaG法によるiDB値はほとんど変化しなかった。

新生児血清でも、いずれのヘモグロビン濃度であってもUnaG法によるiDB値はほとんど変化しなかった。この結果を下記表11および図9（四角ドット：血清225、丸ドット：血清227）に示す。

【0191】

【表11】

	原試料 Hb濃度(g/dL)	UnaG-iD-bil (mg/dL)	酵素法-iD-bil (mg/dL)
血清 227	5	7.5	7.5
	2.5	7.7	7.5
	1	7.9	7.5
	0.5	7.8	7.5
	0	8.1	7.5
血清 225	5	13.8	13.1
	2.5	13.5	13.1
	1	13.8	13.1
	0.5	13.5	13.1
	0	13.5	13.1

【0192】

〔参考例7：UnaG法による乳び含有検体の非抱合型ビリルビン濃度測定〕

本参考例では、UnaG法による非抱合型ビリルビン（iDB）測定における、乳びの影響を検証した。

【0193】

（乳び溶液の作成）

1. 20%（20g / 100mLつまり200mg / mL）イントラリポス輸液を用意した。

2. Bufferを用いて、20mg / mL、2mg / mLおよび0.2mg / mLのイントラリポス溶液を作成した。これによって、200mg / mL（20%）、20mg / mL（2%）、2mg / mL（0.2%）および0.2mg / mL（0.02%）のイントラリポス希釈系列を作成した。

【0194】

（検量線の作成）

1. ビリルビン標準液（アンバウンドビリルビン標準物質，アローズ社）を用意した。このビリルビン標準液のUBアナライザでの測定値はTB17.1mg / dLであった。

10

20

30

40

50

2. ビリルビン標準液を Buffer を用いて段階希釈し、ビリルビン濃度が 1.71 ng/μL、0.855 ng/μL、0.4275 ng/μL の希釈系列を作成した。また、コントロールとして、当該 Buffer のみを用意した。3. Buffer を用いて Un a G の 400 pmol / 150 μL 溶液を作成した。

4. Un a G 150 μL と、ビリルビン標準液の希釈系列 50 μL とを混合し、マイクロプレートリーダ測定した。この場合、測定感度は × 1 とし、各希釈系列につき 3 回ずつ、注入開始後 10 分経過時の蛍光強度（最大蛍光強度）を測定した。測定値は、中央値を採用した。

5. ビリルビン濃度と最大蛍光強度とから検量線を作成した。

【0195】

（標準液および新生児検体を用いた検証）

1. 2 種類の新生児血清（血清 173、血清 200）をそれぞれ用意した。それぞれの検体について、酵素法で測定された総ビリルビン値（T-bil）、抱合型ビリルビン（D-bil）、およびそれらから導出された非抱合型ビリルビン（iD-bil）と、UB アナライザで測定された総ビリルビン値（TB）、アンバウンドビリルビン（UB）と、アルブミン値（Alb）とを、ビリルビン標準液の TB および UB と共に下記表 12 に示す。

【0196】

【表 12】

	T-bil mg/dL	D-bil mg/dL	iD-bil mg/dL	TB mg/dL	UB μg/dL	Alb g/dL
標準液				17.1	0.66	
血清 173	17	0.1	16.9	15.5	0.54	3.1
血清 200	8	0.2	7.8	8.1	0.33	3.6

【0197】

2. 新生児血清 10 μl と、上記で調製した各乳び溶液 10 μl と、Buffer 1980 μl とを混和し、新生児血清の 200 倍希釈液（乳び含有）を作成した。それぞれの 200 倍希釈液（乳び含有）におけるイントラリポス最終濃度は、0.1%、0.01%、0.001% および 0.0001% であった。

また、新生児血清 10 μl と、Buffer 1990 μl とを混和し、新生児血清の 200 倍希釈液（乳び不含）も作成した。

3. 同様に、ビリルビン標準液についても、200 倍希釈液（乳び含有）4 種および 200 倍希釈液（乳び不含）を作成した。

【0198】

4. 検量線作成で用いた Un a G 溶液 150 μL と、新生児血清またはビリルビン標準液の 200 倍希釈液 50 μL とを混和し、マイクロプレートリーダで蛍光強度を測定した。この場合、測定感度は × 1 とし、各希釈系列につき 3 回ずつ、注入開始後 10 分経過時の蛍光強度（最大蛍光強度）を測定した。測定値は、中央値を採用した。

5. 上述の検量線を用いて、Un a G 法での iD-bil 値を算出した。

【0199】

（結果）

ビリルビン標準液では、いずれのイントラリポス濃度であっても Un a G 法による iD B 値はほとんど変化しなかった。

新生児血清でも、いずれのイントラリポス濃度であっても Un a G 法による iD B 値はほとんど変化しなかった。この結果を下記表 13 および図 10（四角ドット：血清 173、丸ドット：血清 200）に示す。

【0200】

【表 1 3】

	原試料 イントラリポス濃度(%)	UnaG-iD-bil (mg/dL)	酵素法-iD-bil (mg/dL)
血清 173	20	15.5	16.9
	2	17.0	16.9
	0.2	16.3	16.9
	0.02	15.8	16.9
	0	16.5	16.9
血清 200	20	8.9	7.8
	2	8.9	7.8
	0.2	8.7	7.8
	0.02	9.6	7.8
	0	8.8	7.8

10

【0201】

[参考例8: UnaG法によるアスコルビン酸含有検体の非抱合型ビリルビン濃度測定]

本参考例では、UnaG法による非抱合型ビリルビン(iDB)測定における、アルコールの影響を検証した。

20

【0202】

(アスコルビン酸溶液の作成)

1. アスコルビン酸 1000mgをBuffer 10mLに溶解し、100mg/mLのアスコルビン酸溶液を調製した。

2. Bufferを用いて、10mg/mL、1mg/mL、0.1mg/mLのアスコルビン酸溶液も調製した。これによって、100mg/mL(10%)、10mg/mL(1%)、1mg/mL(0.1%)および0.1mg/mL(0.01%)のアスコルビン酸希釈系列を作成した。

【0203】

(標準液および新生児検体を用いた検証)

30

1. 参考例7と同じ新生児血清(血清173、血清200)を用意した。

2. 新生児血清10μlと、上記で調製した各アスコルビン酸溶液200μlと、Buffer 1790μlとを混和し、新生児血清の200倍希釈液(アスコルビン酸含有)を作成した。それぞれの200倍希釈液(アスコルビン酸含有)におけるアスコルビン酸最終濃度は、10mg/mL、1mg/mL、0.1mg/mLおよび0.01mg/mLであった。

また、新生児血清10μlと、Buffer 1990μlとを混和し、新生児血清の200倍希釈液(アスコルビン酸不含)も作成した。

3. 同様に、ビリルビン標準液についても、200倍希釈液(アスコルビン酸含有)4種および200倍希釈液(アスコルビン酸不含)を作成した。

40

【0204】

4. 参考例7の検量線作成で用いたUnaG溶液150μLと、新生児血清またはビリルビン標準液の200倍希釈液50μLとを混和し、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。この場合、測定感度は×1とし、各希釈系列につき3回ずつ、注入開始後10分経過時の蛍光強度(最大蛍光強度)を測定した。測定値は、中央値を採用した。

5. 参考例7の検量線を用いて、UnaG法でのiD-bil値を算出した。

【0205】

(結果)

ビリルビン標準液では、いずれのアスコルビン酸濃度であってもUnaG法によるiDB値はほとんど変化しなかった。

50

新生児血清でも、いずれのアスコルビン酸濃度であってもUnaG法によるiDB値はほとんど変化しなかった。この結果を下記表14および図11（四角ドット：血清173、丸ドット：血清200）に示す。

【表14】

	原試料 アスコルビン酸濃度 (mg/mL)	UnaG-iD-bil (mg/dL)	酵素法-iD-bil (mg/dL)
血清 173	100	15.7	16.9
	10	15.6	16.9
	1	15.3	16.9
	0.1	15.3	16.9
	0	15.4	16.9
血清 200	100	8.2	7.8
	10	8.1	7.8
	1	8.3	7.8
	0.1	8.0	7.8
	0	8.2	7.8

10

20

【0206】

[参考例6 - 参考例8まとめ]

以上より、検体中にヘモグロビン、乳び、およびアルコルビン酸のいずれが含まれていても、UnaG法による非抱合型ビリルビン測定に悪影響がないことを確認した。したがって、検体中にヘモグロビン、乳び、およびアルコルビン酸のいずれが含まれていても、本発明へ適用可能であることが容易に推認される。

【0207】

[参考例9：全血を用いたUnaG法(1)]

本参考例から、新生児血液の一部から調製した血清試料と、他の一部である全血試料とを用いて、血球成分の影響を調べた。

血清試料と全血試料とのそれぞれについて、参考例1と同様にしてマイクロプレートリーダーでUnaGの蛍光を検出し、非抱合ビリルビン値を3回測定した。下記表15に示すように、ヘマトクリット値Htで補正することによって、全血でも非抱合ビリルビン値を測定することができた。

【0208】

【表15】

	蛍光強度		iD-bil濃度 (mg/dL)		
	血清	全血	血清	全血	Ht補正後*
1回目	5759	3042	10.8	5.7	10.0
2回目	6170	3098	11.6	5.8	10.2
3回目	6270	2959	11.8	5.6	9.7

40

$$*Ht補正後値 = (\text{全血濃度}) / (1-Ht), Ht=0.43$$

【0209】

したがって、検体が全血であっても本発明へ適用可能であることが推認される。

【0210】

50

【参考例10：全血を用いたUnaG法(2)】

新生児18例から採取した全血26検体について、参考例1と同様に検量線を作成し、UnaG法によって非抱合型ビリルビン濃度を得た。また、当該全血26検体それぞれから血清検体を調製し、血清検体について、参考例1と同様にUnaG法および酵素法によって非抱合型ビリルビン濃度を得た。

【0211】

得られた非抱合型ビリルビン濃度について、UnaG法による全血中の濃度(Concentration in whole blood by the UnaG method)の、酵素法による血清中の濃度(Concentration in serum by BOD method)との相関を調べた。その結果を図12に示す。図12に示すように、両検体/両方法によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた($y = 0.76x + 0.30$, $r = 0.962$, $p < 0.001$)。

10

また、得られた非抱合型ビリルビン濃度について、UnaG法による全血中の濃度(Concentration in whole blood by the UnaG method)の、UnaG法による血清中の濃度(Concentration in serum by UnaG method)との相関を調べた。その結果を図13に示す。図13に示すように、両検体によって得られた非抱合型ビリルビン濃度には良好な相関が認められた($y = 0.73x + 0.77$, $r = 0.962$, $p < 0.001$)。

【0212】

【参考例11：UBアナライザで測定した新生児血清のUB/TB比の統計】

抱合型ビリルビン濃度が高い65検体(高DB)の新生児血清と、通常の抱合型ビリルビン濃度である245検体(通常DB)の新生児血清とを入手した。それぞれの検体を酵素法によって総ビリルビン濃度および抱合型ビリルビン濃度を測定した。それらの比(抱合型ビリルビン濃度/総ビリルビン濃度)の分布を以下の表16に示す。

20

【0213】

【表16】

DB/TB	5%未満	5%以上 10%未満	10%以上 20%未満	20%以上	合計
通常DB	245	0	0	0	245
高DB	16	34	8	7	65

30

【0214】

それぞれの検体について、UBアナライザを用いてアンバウンドビリルビン濃度を測定し、総ビリルビン濃度との相関を調べた。その結果を図14に示す。図14に示すように、抱合型ビリルビン濃度/総ビリルビン濃度比が5%未満および5%以上10%未満であればおおそTBとUBとの関係は相関が取れている。しかしながら、当該比が10%以上20%未満となると相関は大きく崩れ、当該比が20%以上となると相関の崩れはさらに顕著になる。

【0215】

【実施例1：GOD-POD-UnaG法によるアンバウンドビリルビンの測定】

本実施例では、新生児血清を用いて、本発明の方法によってアンバウンドビリルビンの測定を行った。

40

【0216】

(UnaG法の検量線の作成)

1. ビリルビン標準液(アンバウンドビリルビン標準物質, アローズ社)を用意した。このビリルビン標準液のUBアナライザでの測定値はTB 17.8 mg/dLであった。
2. ビリルビン標準液をBufferで段階希釈し、ビリルビン濃度が17.8 ng/μL、8.9 ng/μLおよび4.45 ng/μLの希釈系列を作成した。また、コントロールとしてBufferのみを用意した。
3. Bufferを用いてUnaG-His FLAGの400 pmol/195 μL溶液を作成した。(His FLAGは、量産用に付されたアフィニティ精製タグ)

50

4. UnaG-HisFLAG溶液195 μ Lと、ビリルビン標準液の希釈系列5 μ Lとを混和し、マイクロプレートリーダーで測定した。この場合、測定感度は $\times 1$ とし、各希釈系列につき3回ずつ、注入開始後15分までの蛍光強度を測定した。測定値(最大蛍光強度)は、中央値を採用した。

5. ビリルビン濃度と最大蛍光強度とから検量線を作成した。

【0217】

(標準液および新生児検体)

1. ビリルビン標準液および3種類の新生児血清(血清172、血清211、血清215)をそれぞれ用意した。それぞれの検体について、酵素法で測定された総ビリルビン値(T-bil)、抱合型ビリルビン(D-bil)、およびそれらから導出された非抱合型ビリルビン(iD-bil)と、UBアナライザで測定された総ビリルビン値(TB)、アンバウンドビリルビン(UB)と、アルブミン値(Alb)とを、ビリルビン標準液のTBおよびUBと共に下記表17に示す。

【0218】

【表17】

	T-bil mg/dL	D-bil mg/dL	iD-bil mg/dL	TB mg/dL	UB μ g/dL	Alb g/dL
標準液				17.8	0.77	
血清172	14.7	0.1	14.8	13.7	0.51	3.5
血清211	15.9	0.1	15.8	15.3	0.75	3.6
血清215	12.9	0.2	12.7	11.9	0.32	3.8

【0219】

(各試薬の作成)

1. アスコルビン酸1600mgをBuffer10mLに溶解し、16%(160mg/mL)アスコルビン酸含有Bufferを作成した。

2. GOD-POD酵素液50 μ Lを酵素液希釈液950 μ Lに溶解し、20倍希釈GOD-POD溶液を作成した。

3. Buffer10mLにGlucose500mgを加え、50mg/mLGlucose含有Bufferを作成した。

4. 上述のUnaG法の検量線の作成に用いたUnaG-HisFLAGの400pmol/195 μ L溶液(UnaG-HisFLAG溶液)を用意した。

【0220】

(GOD-POD-UnaG法の検量線の作成)

1. 50mg/mLGlucose含有Buffer25 μ Lにビリルビン標準液25 μ L(TB17.8mg/dL)を加え、標準液-Glucose混合溶液を作成した。

2. 標準液-Glucose混合溶液のうち20 μ Lを別のチューブに移し、Buffer80 μ Lを加え、さらに16%アスコルビン酸含有Buffer100 μ Lを加えた。これによって、合計200 μ Lの20倍希釈0秒時点サンプルが得られた。

3. 標準液-Glucose混合溶液のうち別の20 μ Lに20倍希釈GOD-POD溶液80 μ Lを加え、30秒後に16%アスコルビン酸含有Buffer100 μ Lを加えた。これによって、合計200 μ Lの20倍希釈30秒時点サンプルが得られた。

4. 0秒時点サンプルと30秒時点サンプルとから5 μ Lずつ採取し、UnaG-HisFLAG溶液195 μ Lを入れたウェル内に注入し、蛍光強度を測定した。この場合、各サンプルにつき3回ずつ、注入開始後15分までの蛍光強度を測定し、最大蛍光強度の中央値を採用した(表18参照)。

5. 0秒時点サンプルの最大蛍光強度から検量線を作成した。

6. 検量線を用いて、0秒時点サンプルおよび30秒時点サンプルの $iD-bil$ を算出した(表18参照)。

【0221】

【表18】

標準液 TB 17.8 UB 0.77		蛍光強度 (中央値)	iD-bil (mg/dL)	$\Delta iD-bil$	$\Delta\%$
	0秒	5185	17.7995194	3.669756	20.61716
30秒	4116	14.12976313			

10

【0222】

上記の情報を下記式(I)にあてはめることによりK値を求めた。

$$iD-bil / Time = K \times [POD] \times [U-bil] \quad (I)$$

その結果、K値は4.77と算出された。

【0223】

(GOD-POD-UnaG法による血清のアンバウンドビリルビンの測定)

1. 50mg/mL Glucose含有Buffer 25 μ Lに血清25 μ Lを加え、血清-Glucose混合溶液を作成した。このとき、血清は2倍希釈相当であった。

2. 血清-Glucose混合溶液のうち20 μ Lに、Buffer 80 μ Lを加え(この時点で、血清は10倍希釈相当)、さらに16%アスコルビン酸含有Buffer 100 μ Lを加えた(この時点で、血清は20倍希釈相当、アスコルビン酸は8%)。これによって、合計200 μ Lの0秒時点サンプルが得られた。

20

【0224】

3. 血清-Glucose混合溶液のうち他の20 μ Lに20倍希釈GOD-POD溶液80 μ Lを加え(この時点で、血清は10倍希釈相当)、30秒後に16%アスコルビン酸含有Buffer 100 μ Lを加えた(この時点で、血清は20倍希釈相当、アスコルビン酸は8%)。これによって、合計200 μ Lの30秒時点サンプルが得られた。

なお、分解反応時(つまりGOD-POD溶液80 μ Lを加えた時)において、血清10 μ Lに対し原液(GOD-POD酵素液)GOD-POD4 μ Lの量関係となった。また、分解反応液200 μ LあたりのGOD-PODの量は0.52Uとなった。

30

【0225】

4. 上記項目2および項目3で作成された0秒時点サンプルおよび30秒時点サンプル200 μ Lのうち5 μ Lずつ採取し、UnaG溶液195 μ Lを入れたウェルに注入し(この時点で、血清は800倍相当、アスコルビン酸は0.2%、pHは7.1から7.2)、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。

【0226】

5. 各検体につき3回ずつ、注入開始後15分までの蛍光強度を測定し、最大蛍光強度の中央値を採用した(表19参照)。

6. 検量線を用いて、最大蛍光強度から、0秒時点サンプルおよび30秒時点サンプルの $iD-bil$ を算出した(表19参照)。

40

【0227】

【表 19】

		蛍光強度 (中央値)	iD-bil (mg/dL)	Δ iD-bil	Δ %
血清 172 TB 13.7 UB 0.51	0 秒	3954	13.57363543	1.434947	10.57157
	30 秒	3536	12.13868864		
血清 211 TB 15.3 UB 0.75	0 秒	5023	17.24339169	2.087195	12.10432
	30 秒	4415	15.15619636		
血清 215 TB 11.9 UB 0.32	0 秒	3977	13.65259183	1.019567	7.467941
	30 秒	3680	12.63302437		

10

【0228】

ビリルビン標準液を用いて算出されたK値(4.77)を用い、上記式(I)から、GOD-POD-UnaG法によるアンバウンドビリルビン値([U-bil])を求めた。その結果、それぞれの血清のアンバウンドビリルビン値は、血清172の場合で0.51、血清211の場合で0.75、血清215の場合で0.32であった。

20

【0229】

[実施例2: GOD-POD-UnaG法によるアンバウンドビリルビンの測定]

本実施例では、新生児血清を用いて、本発明の方法によってアンバウンドビリルビンの測定を行った。

【0230】

(UnaG法の検量線の作成)

1. ビリルビン標準液(アンバウンドビリルビン標準物質, アローズ社)を用意した。このビリルビン標準液のUBアナライザでの測定値はTB17.7mg/dLであった。
2. ビリルビン標準液をBufferで段階希釈し、ビリルビン濃度が4.435ng/ μ L、2.2175ng/ μ Lおよび1.10875ng/ μ Lの希釈系列を作成した。
3. Bufferを用いてUnaG-HisFLAGの132.4pmol/ μ L溶液を作成した。
4. UnaG-HisFLAG溶液180 μ Lと、ビリルビン標準液の希釈系列20 μ Lとを混和し、マイクロプレートリーダーで測定した。この場合、測定感度は $\times 1$ とし、各希釈系列につき3回ずつ、注入開始後15分までの蛍光強度を測定した。測定値(最大蛍光強度)は、中央値を採用した。
5. ビリルビン濃度と最大蛍光強度とから検量線を作成した。

30

【0231】

(標準液および新生児検体)

1. ビリルビン標準液および4種類の新生児血清(血清179、血清180、血清181、血清185)をそれぞれ用意した。それぞれの検体について、酵素法で測定された総ビリルビン値(T-bil)、抱合型ビリルビン(D-bil)、およびそれらから導出された非抱合型ビリルビン(iD-bil)と、UBアナライザで測定された総ビリルビン値(TB)およびアンバウンドビリルビン(UB)と、アルブミン値(Alb)とを、ビリルビン標準液のTBおよびUBと共に下記表20に示す。

40

【0232】

【表 2 0】

	T-bil mg/dL	D-bil mg/dL	iD-bil mg/dL	TB mg/dL	UB μg/dL	Alb g/dL
標準液				17.7	0.77	
血清 179	16.3	0.2	16.1	14.9	0.74	3.5
血清 180	12.7	0.2	12.5	12.6	0.21	3.7
血清 181	12.3	0.1	12.2	12	0.33	3.4
血清 185	13.5	0.1	13.4	12.5	0.51	3.4

10

【 0 2 3 3】

(各試薬の用意)

1. アスコルビン酸 400mg を Buffer 40mL に溶解し、1% (10mg/mL) アスコルビン酸含有 Buffer を作成した。

2. アローズ社 UB アナライザ用試薬である GOD - POD 溶液を用意した (下記表 2 1 参照)。

3. アローズ社 UB アナライザ用試薬である 1mg/mL Glucose 含有 Buffer (下記表 2 1 参照) を用意した。

20

4. 上述の UnaG 法の検量線の作成に用いた UnaG - HisFLAG の 132.4 pmol/μL 溶液 (UnaG - HisFLAG 溶液) を用意した。

【 0 2 3 4】

【表 2 1】

構成試薬	剤型	成分	1 回測定分中
緩衝液	液剤	リン酸二水素カリウム リン酸水素二ナトリウム・12水和物 グルコース 精製水	2.72mg 28.65mg 1 mg 1ml 中適量
酵素剤	凍結乾燥品	グルコースオキシダーゼ ペルオキシダーゼ	3.2 国際単位 3.2 国際単位
酵素剤 溶解液	液剤	リン酸二水素カリウム リン酸水素二ナトリウム・12水和物 精製水	0.068mg 0.720mg 25μl 中適量

30

【 0 2 3 5】

(GOD - POD - UnaG 法の検量線の作成)

1. 1mg/mL Glucose 含有 Buffer 1000μL にビリルビン標準液 20μL (iD-bil 17.7mg/dL) を加え、標準液 - Glucose 混合溶液を作成した。

2. 標準液 - Glucose 混合溶液に、Buffer 25μL を加え、さらに 1% アスコルビン酸含有 Buffer 555μL を加えた。これによって、合計 1600μL の 80 倍希釈サンプルが得られた。

40

3. 80 倍希釈サンプルを 20μL 採取し、UnaG 溶液 180μL をセットした UB アナライザ内のウェルに加え、蛍光強度を測定した。

4. 上記項目 3 の操作を 3 回行い、UnaG 溶液注入開始後 10 分までの蛍光強度を測定した。

5. 最大蛍光強度と iD-bil 濃度とから検量線を作成した。この場合、最大蛍光強度としては注入開始後 10 分までの蛍光強度のうちの最大値であって、かつ中央値を採用した。

【 0 2 3 6】

50

結果、非抱合型ビリルビン濃度 $iD - bil = \text{最大蛍光強度} / 255.9$ という関係が導出された。つまり、図5の検量線と同等であることを確認した。

【0237】

(0秒時点の $iD - bil$ 測定)

1. 1 mg/mL Glucose 含有 $Buffer 1000 \mu L$ にビリルビン標準液または血清 $20 \mu L$ ($iD - bil 17.7 \text{ mg/dL}$) を加え、標準液 - $Glucose$ 混合溶液を作成した。

2. 標準液 - $Glucose$ 混合溶液に、 $Buffer 25 \mu L$ と1%アスコルビン酸含有 $Buffer 555 \mu L$ とを同時に加えた。これによって、合計 $1600 \mu L$ の80倍希釈0秒時点サンプルが得られた。

3. 血清、 $Buffer$ 、アスコルビン酸混和前のサンプルおよびアスコルビン酸混和後のサンプルのTB値をUBアナライザで測定し記録した。

【0238】

(20秒時点の $iD - bil$ 測定)

1. 1 mg/mL Glucose 含有 $Buffer 1000 \mu L$ にビリルビン標準液または血清 $20 \mu L$ ($iD - bil 17.7 \text{ mg/dL}$) を加え、標準液 - $Glucose$ 混合溶液を作成した。

2. 標準液 - $Glucose$ 混合溶液に $GOD - POD$ 溶液 $25 \mu L$ を加え、20秒後に1%アスコルビン酸含有 $Buffer 555 \mu L$ を加えた。これによって、合計 $1600 \mu L$ の80倍希釈20秒時点サンプルが得られた。

3. 血清、 $Buffer$ 、アスコルビン酸混和前のサンプルおよびアスコルビン酸混和後のサンプルのTB値をUBアナライザで測定し記録した。

なお、血清 $10 \mu l$ あたり原液 $GOD - POD 12.5 \mu l$ となり、 $1600 \mu L$ の20秒時点サンプルあたり $GOD - POD 3.2 U$ となり、アスコルビン酸含有 $Buffer$ を加えた後のアスコルビン酸の終濃度は0.35%となった。

【0239】

(検討方法)

1. 上記の0秒時点サンプル(以下、単に0秒サンプルと記載)および20秒時点サンプル(以下、単に20秒サンプルと記載)それぞれ $1600 \mu l$ のうち $20 \mu l$ ずつを採取し、 $UnaG$ 溶液 $180 \mu l$ を入れたウェルに注入し、蛍光強度を測定した。この場合、80倍希釈血清 $20 \mu l$ を採取したこととなり、アスコルビン酸の終濃度は0.035重量%となり、pHは7.30以上7.35以下の範囲となった。

【0240】

2. 各サンプルについて3回ずつ、注入開始後10分までの蛍光強度を測定した。

3. 最大蛍光強度から、0秒時点の $iD - bil$ (0秒値) および20秒時点の $iD - bil$ (20秒値) を算出した。

4. 標準液の0秒値および20秒値と、下記式(I)とから、K値を求めた。

$$iD - bil / \text{Time} = K \times [POD] \times [U - bil] \quad (I)$$

5. 新生児血清の0秒値および20秒値と、上記項目4で得られたK値と、上記式(I)とを用いて、U-bil値を求めた。

6. 上記項目5で得られたU-bil値と、UBアナライザで測定したU-bil値の相関関係を調べた。

【0241】

(参考)

まず、上記と同様に30秒時点サンプル(つまり20秒後に1%アスコルビン酸含有 $Buffer$ を加えた場合のサンプル)を作成し、分解反応時間が20秒(表22参照)である場合と30秒(表23参照)である場合とでどちらがよりTB%が安定するか検討した。

【0242】

10

20

30

40

【表 2 2】

	グルコース Buffer	GOD-POD	TB-0 秒	TB-20 秒	Δ TB	Δ TB%
原液 25 μ L	995 μ L	25 μ L	22.5	18.2	4.3	19.1%
原液 20 μ L	1000 μ L	25 μ L	16.8	12.8	4.0	23.8%
原液 15 μ L	1005 μ L	25 μ L	13.0	9.8	3.2	24.6%

【表 2 3】

	グルコース Buffer	GOD-POD	TB-0 秒	TB-30 秒	Δ TB	Δ TB%
原液 25 μ L	995 μ L	25 μ L	21.7	15.7	6.0	27.6%
原液 20 μ L	1000 μ L	25 μ L	16.6	11.3	5.3	32.0%
原液 15 μ L	1005 μ L	25 μ L	13.2	8.6	4.6	35.0%

10

【0 2 4 3】

上記表 2 2 および表 2 3 より、分解反応時間が 2 0 秒である 2 0 秒サンプルを採用した。

【0 2 4 4】

(結果)

1. 標準液

標準液の T B 値と U B 値とを下記表 2 4 に示す。

20

【0 2 4 5】

【表 2 4】

標準液	TB	UB
1 回目	17.0	0.74
2 回目	16.5	0.71
3 回目	16.1	0.69
Median	16.5	0.71

30

【0 2 4 6】

記録した測定値を下記表 2 5 に示す。なお、表 2 5 において換算値とは、容量変化をもとに 1600/1045 を乗じて算出した値である (以下の表において同様)。

【0 2 4 7】

【表 2 5】

1 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
	血清 20 μ L 混和時点	16.8	16.6		
	20 秒時点	16.8	12.9	3.3	19.6
	アスコルビン酸混和後	10.6	8.5	2.1	19.8
	換算値	16.2	13.0	3.2	19.8
2 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
	血清 20 μ L 混和時点	16.7	16.7		
	20 秒時点	16.3	13.0	3.3	19.8
	アスコルビン酸混和後	10.6	8.5	2.1	19.7
	換算値	16.2	13.0	3.2	22.4
3 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
	血清 20 μ L 混和時点	17.1	16.8		
	20 秒時点	16.7	13.2	3.5	21.0
	アスコルビン酸混和後	10.8	8.8	2.0	18.5
	換算値	16.5	13.5	3.0	18.4

10

20

【 0 2 4 8】

UnaG 溶液添加後の各測定値を下記表 2 6 に示す。表 2 6 が示すように、UB アナライザによる TB 値および UnaG による iDB 値について、いずれも % が 20 % 前後で安定していることを確認した。

【 0 2 4 9】

【表 2 6】

UnaG-1 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	4628	18.1	3584	14.0		
#2	4551	17.8	3526	13.8		
#3	4475	17.5	3527	13.8		
Median	4551	17.8	3527	13.8	4.0	22.5
UnaG-2 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	4749	18.6	3487	13.6		
#2	4494	17.6	3504	13.7		
#3	4483	17.5	3471	13.6		
Median	4494	17.6	3487	13.6	3.9	22.4
UnaG-3 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	4462	17.4	3511	13.7		
#2	4530	17.7	3549	13.9		
#3	4671	18.3	3576	14.0		
Median	4530	17.7	3549	13.9	3.8	21.7

30

40

50

【 0 2 5 0 】

以下のように K 値を算出した。

$$TB / t = Kx[POD]x[UB]$$

$$K = TB / t / [POD] / [UB]$$

t および [POD] はこの実験系では一定であることから 1 とすると

$$K = TB / 0.71 \text{ と算出された。}$$

なお、G O D - P O D - U n a G 法では、i D B 値と T B 値として使用した。

【 0 2 5 1 】

【表 2 7】

元にした Δ TB	K
20 秒時点 TB 値	4.65
アスコルビン酸混和後の換算値	4.51
UnaG 法-iDB 値	5.49

10

【 0 2 5 2 】

2 . 血清 1 7 9

血清 1 7 9 の T B 値と U B 値とを下記表 2 8 に示す。

【 0 2 5 3 】

【表 2 8】

血清 179	TB	UB
1 回目	16.8	0.93
2 回目	15.5	0.89
3 回目	15.9	0.84
Median	15.9	0.89

20

【 0 2 5 4 】

記録した測定値を下記表 2 9 に示す。

【 0 2 5 5 】

【表 2 9】

1 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%	
	血清 20 μ L 混和時点		15.8	15.8		
20 秒時点		15.2	11.4	3.8	25.0	
アスコルビン酸混和後		9.8	7.7	2.1	21.4	
換算値		15.0	11.8	3.2	21.3	
2 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%	
	血清 20 μ L 混和時点		16.1	15.9		
	20 秒時点		15.4	11.2	4.2	19.8
	アスコルビン酸混和後		9.9	7.4	2.5	25.3
	換算値		15.2	11.3	3.9	25.7

40

【 0 2 5 6 】

U n a G 溶液添加後の各測定値を下記表 3 0 に示す。

【 0 2 5 7 】

【表 3 0】

UnaG-1 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	3808	14.9	2486	9.7		
#2	3383	13.2	2290	8.9		
#3	3766	14.7	2509	9.8		
Median	3766	14.7	2486	9.7	5.0	34.0
UnaG-2 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	4058	15.9	2507	9.8		
#2	3897	15.2	2450	9.6		
#3	3816	14.9	2449	9.6		
Median	3897	15.2	2450	9.6	5.7	37.1

10

【 0 2 5 8 】

3 . 血清 1 8 1

血清 1 8 1 の T B 値と U B 値とを下記表 3 1 に示す。

【 0 2 5 9 】

20

【表 3 1】

血清 181	TB	UB
1 回目	12.9	0.52
2 回目	13.0	0.53
3 回目	-	-
Median	13.0	0.53

【 0 2 6 0 】

30

記録した測定値を下記表 3 2 に示す。

【 0 2 6 1 】

【表 3 2】

	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
1 回目	血清 20 μ L 混和時点	13.0	13.2		
	20 秒時点	12.6	10.3	2.3	18.2
	アスコルビン酸混和後	8.2	6.7	1.5	18.3
	換算値	12.6	10.3	2.3	18.3
	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
2 回目	血清 20 μ L 混和時点	13.1	13.0		
	20 秒時点	12.7	10.2	2.5	19.7
	アスコルビン酸混和後	8.1	6.6	1.5	18.5
	換算値	12.4	10.1	2.3	18.5

40

【 0 2 6 2 】

UnaG 溶液添加後の各測定値を下記表 3 3 に示す。

【 0 2 6 3 】

50

【表 3 3】

UnaG-1 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ iDB	Δ iDB%
#1	2916	11.4	2233	8.7		
#2	2909	11.4	1764	6.9		
#3	2947	11.5	2271	8.9		
Median	2916	11.4	2233	8.7	2.7	23.4
UnaG-2 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ iDB	Δ iDB%
#1	3039	11.9	2074	8.1		
#2	3012	11.8	1656	6.5		
#3	2994	11.7	2022	7.9		
Median	3012	11.8	2022	7.9	3.9	32.9

10

【 0 2 6 4 】

4 . 血清 1 8 5

血清 1 8 5 の T B 値と U B 値とを下記表 3 4 に示す。

【 0 2 6 5 】

【表 3 4】

20

血清 185	TB	UB
1 回目	14.2	0.6
2 回目	-	-
3 回目	-	-
Median	14.2	0.60

【 0 2 6 6 】

記録した測定値を下記表 3 5 に示す。

【 0 2 6 7 】

【表 3 5】

30

	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
1 回目	血清 20 μ L 混和時点	14.8	14.2		
	20 秒時点	14.3	10.9	3.4	23.8
	アスコルビン酸混和後	9.3	7.0	2.3	24.7
	換算値	14.2	10.7	3.5	24.6
	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
2 回目	血清 20 μ L 混和時点	14.2	14.0		
	20 秒時点	13.8	10.7	2.5	22.5
	アスコルビン酸混和後	9.0	7.1	1.9	21.1
	換算値	13.8	10.9	2.9	21.0

40

【 0 2 6 8 】

UnaG 溶液添加後の各測定値を下記表 3 6 に示す。

【 0 2 6 9 】

50

【表 3 6】

UnaG-1 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	3455	13.5	2384	9.3		
#2	3238	12.7	2285	8.9		
#3	3167	12.4	2313	9.0		
Median	3238	12.7	2313	9.0	3.6	28.6
UnaG-2 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	Δ DB	Δ DB%
#1	3175	12.4	2235	8.7		
#2	2705	10.6	2393	9.4		
#3	3128	12.2	2185	8.5		
Median	3128	12.2	2235	8.7	3.5	28.5

10

【 0 2 7 0 】

5 . 血清 1 8 0

血清 1 8 0 の T B 値と U B 値とを下記表 3 7 に示す。

【 0 2 7 1 】

20

【表 3 7】

血清 180	TB	UB
1 回目	14.2	0.33
2 回目	14.2	0.33
3 回目	-	-
Median	14.2	0.33

【 0 2 7 2 】

記録した測定値を下記表 3 8 に示す。

30

【 0 2 7 3 】

【表 3 8】

1 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
	血清 20 μ L 混和時点	14.5	14.2		
20 秒時点	14.0	12.0	2.0	14.3	
アスコルビン酸混和後	9.1	7.9	1.2	13.2	
換算値	13.9	12.1	1.8	12.9	
2 回目	TB 表示値	0 秒サンプル	20 秒サンプル	Δ TB	Δ TB%
	血清 20 μ L 混和時点	14.7	14.7		
20 秒時点	14.3	12.8	1.5	10.5	
アスコルビン酸混和後	9.1	8.3	0.8	9.6	
換算値	13.9	12.7	1.2	8.6	

40

【 0 2 7 4 】

UnaG 溶液添加後の各測定値を下記表 3 9 に示す。

【 0 2 7 5 】

50

【表 3 9】

UnaG-1 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	△DB	△DB%
#1	3018	11.8	2587	10.1		
#2	2980	11.6	2469	9.6		
#3	3001	11.7	2121	8.3		
Median	3001	11.7	2469	9.6	2.1	17.7
UnaG-2 回目	0 秒サンプル	iDB-0 秒	20 秒サンプル	iDB-20 秒	△DB	△DB%
#1	3126	12.2	2589	10.1		
#2	3160	12.3	2560	10.0		
#3	3107	12.1	2536	9.9		
Median	3126	12.2	2560	10.0	2.2	18.1

10

【 0 2 7 6 】

(UB 値の導出)

1 . 下記表 4 0 に、従来の測定方法 (GOD - POD 法) による UB アナライザの UB 値と、20 秒時点の TB 値を基にした UB 値 ($TB / 4.65$) とを示す。

20

【 0 2 7 7 】

【表 4 0】

血清	UB 値	△TB	△TB%	UB=△TB/4.65
179-1 回目	0.89	3.8	25.0	0.82
179-2 回目	0.89	4.2	19.8	0.90
181-1 回目	0.53	2.3	18.2	0.49
181-2 回目	0.53	2.5	19.7	0.54
185-1 回目	0.60	3.4	23.8	0.73
185-2 回目	0.60	2.5	22.5	0.54
180-1 回目	0.33	2.0	14.3	0.43
180-2 回目	0.33	1.5	10.5	0.32

30

【 0 2 7 8 】

さらに、図 1 5 に、従来の測定方法による UB アナライザの UB 値 (UB analyzer UB) と、TB 値を基にした UB 値 (UB analyzer - 0-20s) との相関を示す。図 1 5 に示すように、両者は良好な相関を示した。したがって、GOD - POD 液を混和した後の、UB アナライザを用いて測定された TB 値の推移 (0 秒値と 20 秒値との TB) に基づいて UB 値を算出できることが示された。

40

【 0 2 7 9 】

2 . 下記表 4 1 に、従来の測定方法 (GOD - POD 法) による UB アナライザの UB 値と、アスコルビン酸混和後の換算値を基にした UB 値 ($TB / 4.51$) とを示す。

【 0 2 8 0 】

【表 4 1】

血清	UB 値	Δ TB	Δ TB%	UB= Δ TB/4.51
179-1 回目	0.89	3.2	21.3	0.71
179-2 回目	0.89	3.9	25.7	0.86
181-1 回目	0.53	2.3	18.3	0.51
181-2 回目	0.53	2.3	18.5	0.51
185-1 回目	0.60	3.5	24.6	0.78
185-2 回目	0.60	2.9	21.0	0.64
180-1 回目	0.33	1.8	12.9	0.40
180-2 回目	0.33	1.2	8.6	0.27

10

【 0 2 8 1 】

さらに、図 1 6 に、従来の測定方法による UB アナライザの UB 値 (UB analyzer UB) と、アスコルビン酸混和後の換算値を基にした UB 値 (UB analyzer - 0-20s) との相関を示す。図 1 6 に示すように、両者は良好な相関を示した。したがって、アスコルビン酸で反応停止後、UB アナライザを用いて 0 秒値と 20 秒値との TB から UB 値を算出できることが示された。

20

【 0 2 8 2 】

上記項目 1 および項目 2 より、UB アナライザを用いた従来の測定方法 (GOD - POD 法) では、GOD - POD 液を混和した後において TB 値が 95 % から 76 % まで低下するまでにかかる時間から UB 値を算出していた (図 1 7 (a) 参照) が、本発明では、GOD - POD 液の混和時点から 20 秒時点の TB (比色法で測定) からでも、GOD - POD 液の混和時点から 20 秒時点の iDB (UnaG 法で測定) からでも、UB 値を算出できる (図 1 7 (b) 参照) ことが示された。

【 0 2 8 3 】

3. 下記表 4 2 に、従来の測定方法 (GOD - POD 法) による UB アナライザの UB 値と、GOD - POD - UnaG 法の iDB 値を基にした UB 値 (TB / 5.49) とを示す。

30

【 0 2 8 4 】

【表 4 2】

血清	UB 値	Δ TB	Δ TB%	UB= Δ TB/5.49
179-1 回目	0.89	5.0	34.0	0.91
179-2 回目	0.89	5.7	37.1	1.04
181-1 回目	0.53	2.7	23.4	0.49
181-2 回目	0.53	3.9	32.9	0.71
185-1 回目	0.60	3.6	28.6	0.66
185-2 回目	0.60	3.5	28.5	0.64
180-1 回目	0.33	2.1	17.7	0.38
180-2 回目	0.33	2.2	18.1	0.40

40

【 0 2 8 5 】

さらに、図 1 8 に、従来の測定方法による UB アナライザの UB 値 (UB analyzer UB) と、GOD - POD - UnaG 法の iDB 値を基にした UB 値 (GOD-POD-UnaG-UB) との

50

相関を示す。図18に示すように、両者は良好な相関を示した。したがって、アスコルビン酸で反応停止させた後、UBアナライザを用いてUnaG法でのiDB値に基づいてUB値を算出できることが示された。

【0286】

[実施例3：GOD-POD-UnaG法によるアンバウンドビリルビンの測定（DB低値例）]

（検体）

新生児33例より採取した、DB低値（ $DB < 1.0 \text{ mg/dL}$ ）の血清45検体を検証した。33例の症例背景を表43に、45検体の血清採取日齢および酵素法に基づく非抱合型ビリルビンの値を表44に示す。

【0287】

【表43】

n=33	
在胎週数 (weeks)	38 (35-41)
出生体重 (g)	2844 (2054-3474)
median (range)	

【0288】

【表44】

n=45	
血清採取日齢	5 (1-19)
iDB (mg/dL)	13.5 (3.1-23.1)
DB (mg/dL)	0.2 (0.1-0.4)
median (range)	

【0289】

（非抱合型ビリルビンの測定 - GOD-POD法との比較）

上記の45検体を用い、実施例2と同様に、本発明のGOD-POD-UnaG法によりアンバウンドビリルビン（UB）の測定を行った。参考用に、上記の45検体を用い、UBアナライザ（GOD-POD法）によりUBの測定を行った。GOD-POD-UnaG法とGOD-POD法とで測定されたUB測定値の相関を調べた。その結果を図19に示す。図19に示すように両方法によって得られたUB濃度には良好な相関が認められた（ $y = 0.876x + 0.07$ 、 $r = 0.947$ 、 $P < 0.001$ ）。

【0290】

[実施例4：GOD-POD-UnaG法によるアンバウンドビリルビンの測定（DB高値例）]

（検体）

新生児4例より採取した、DB高値（ $DB \geq 1.0 \text{ mg/dL}$ ）の血清11検体を検証した。11検体の検体番号；症例番号（症例番号1はトリソミー18、症例番号2および3は先天性サイトメガロウイルス感染症、症例番号3はメチルマロン酸血症）；在胎週数；出生体重（BW）；血清採取日齢；酵素法で測定された総ビリルビン値（T-bil(mg/dL)）、抱合型ビリルビン値（D-bil(mg/dL)）、およびそれらから導出された非抱合型ビリルビン値（iD-bil(mg/dL)）と総ビリルビンに対する抱合型ビリルビンの比率（DB/TB(%)）；UBアナライザで測定された総ビリルビン値（TB(mg/dL)）およびアンバウンドビリルビン（非抱合型ビリルビン）値（UB($\mu\text{g/dL}$))；ならびにアルブミン値（Alb(g/dL)）を、表45に示す。

【0291】

【表 4 5】

検体No.	症例No.	週数	BW	日齢	T-bil	D-bil	iD-bil	DB/TB	TB	UB	Alb
308	1	30w5d	744	3	9.1	1	8.1	11.0	9.6	0.7	2.6
309	2	39w2d	2054	4	7.9	5.5	2.4	69.6	9.1	0.73	3.1
310	1	30w5d	744	4	14.7	1.2	13.5	8.2	15.1	1.9	4.1
314	1	30w5d	744	5	9.1	2.1	7	23.1	10.4	0.99	2.7
315	1	30w5d	744	6	9.6	1.5	8.1	15.6	11.1	0.64	3.1
302	2	39w2d	2054	2	8.6	6	2.6	69.8	9.9	0.94	3.3
306	2	39w2d	2054	3	8.7	6.1	2.6	70.1	9.7	0.98	3.4
312	2	39w2d	2054	5	7.2	5	2.2	69.4	8.1	0.68	3.1
359	3	38w4d	2362	4	8.0	6.0	2.0	75.0	9.0	1.21	3.2
397	4	39w0d	2526	16	5	1.3	3.7	26.0	5.7	0.29	1.9
413	4	39w0d	2526	52	4.9	3.5	1.4	71.4	5.9	0.68	2.8

10

【 0 2 9 2 】

(非抱合型ビリルビンの測定 - GOD - POD法との比較)

上記の11検体を用い、実施例2と同様に、本発明のGOD - POD - UnaG法によりアンバウンドビリルビン(UB)の測定を行った。従来の測定方法(GOD - POD法)によるUBアナライザのUB値(UB analyzer UB)と、本発明のGOD - POD - UnaG法によるiDB値を基にしたUB値(GOD-POD-UnaG-UB)との相関を調べた。その結果を図20に示す。図20においては、11検体の結果(Xドットでプロット)を実施例3の図19に重ねて示している。

20

図20に示すように、DB高値例の本実施例では、DB低値例の実施例3とはプロットの分布が異なり、従来のGOD - POD法では比較的高値を示す傾向が明らかとなった。

【 0 2 9 3 】

[iDB / Alb比とUBとの関係]

実施例3での低DB値(DB < 1.0 mg / dL)の検体と、実施例4での高DB値(DB > 1.0 mg / dL)の検体とについて、iDB / Albモル比とUB値との関係を調べた。その結果を図21および図22に示す。図21は、iDB / Albモル比と、従来の測定方法によるUBアナライザのUB値との関係を示し、図22は、iDB / Albモル比と、本発明のGOD - POD - UnaG法によるUB値との関係を示す。なお、図21および図22では、iDB / Albモル比が0.6以下である検体、具体的には低DB値の40検体(ドットでプロット)および高DB値の11検体(xドットでプロット)について示している。

30

【 0 2 9 4 】

図21に示すように、従来のGOD - POD法によると、低DB値の40検体では良好な相関関係($r = 0.849$ 、 $P < 0.001$)が認められたが、高DB値の11検体では相関関係は不良($r = 0.375$ 、 $p = 0.255$)であった。

40

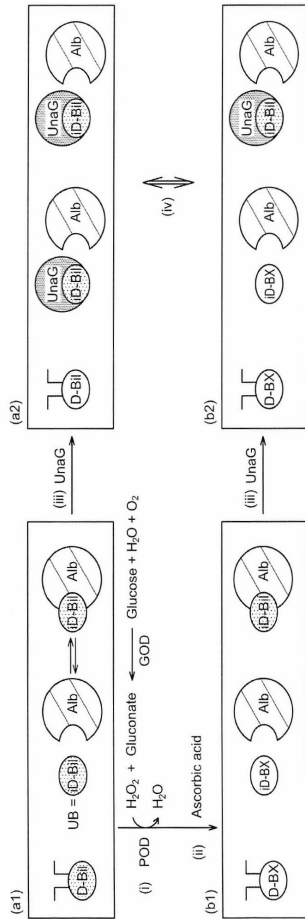
一方、図22に示すように、本発明のGOD - POD - UnaG法によると、低DB値の40検体で良好な相関関係($r = 0.874$ 、 $P < 0.001$)が認められた上に、高DB値の11検体でも良好な相関関係($r = 0.895$ 、 $p < 0.001$)が認められた。

【 0 2 9 5 】

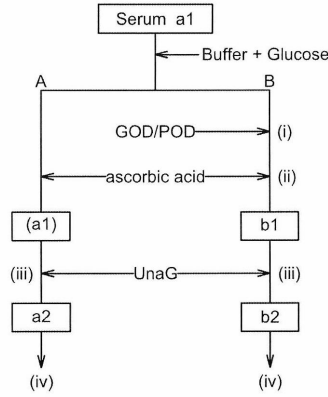
本発明の好ましい実施形態は上記の通りであるが、本発明は、上述の実施形態に限定されるものではなく、本発明の趣旨から逸脱することのない様々な変形がなされる。

50

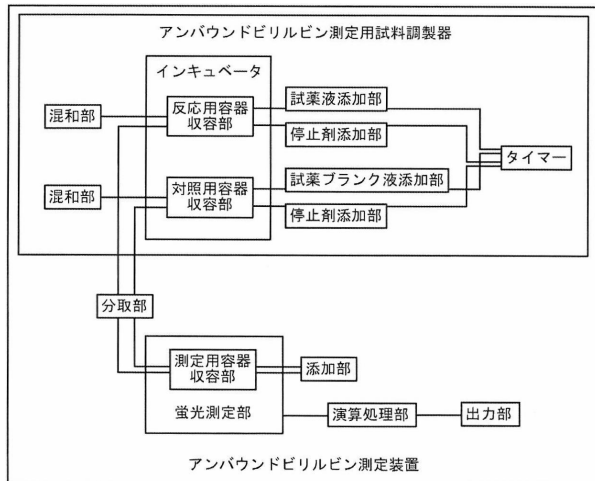
【 図 1 】



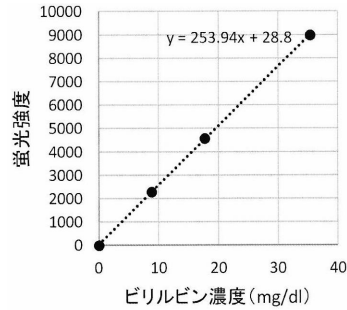
【 図 2 】



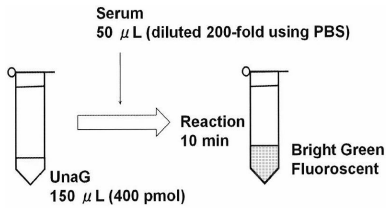
【 図 3 】



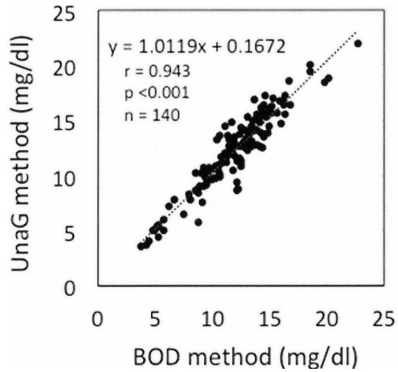
【 図 5 】



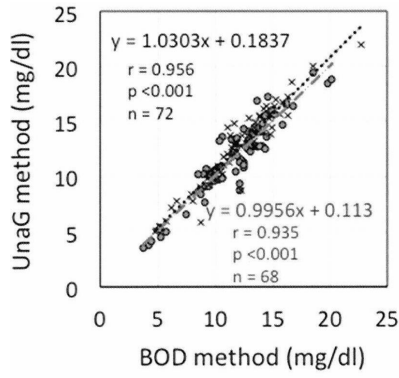
【 図 4 】



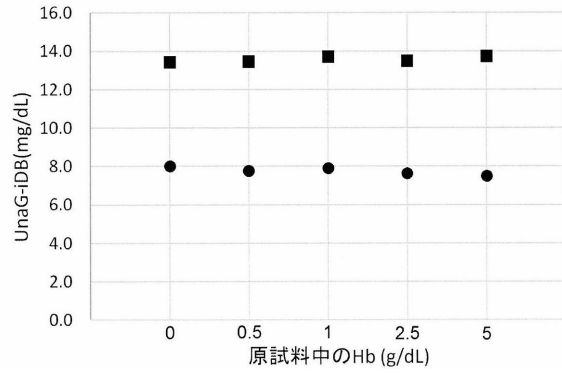
【 図 6 】



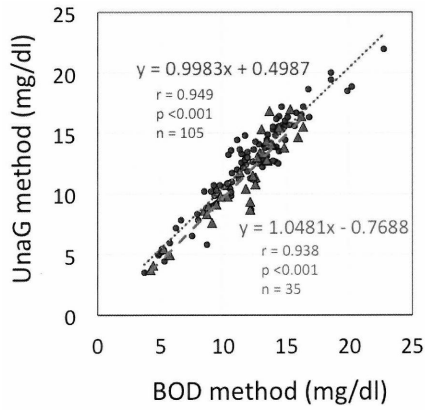
【 図 7 】



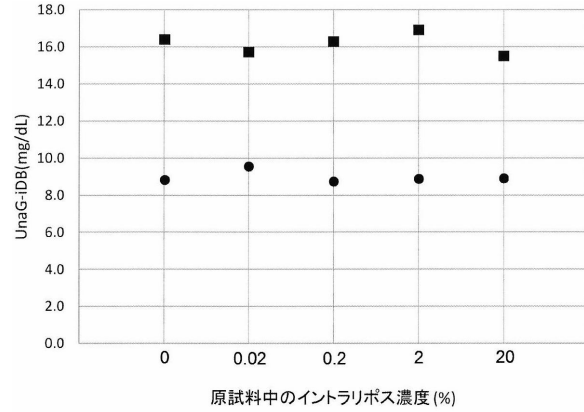
【 図 9 】



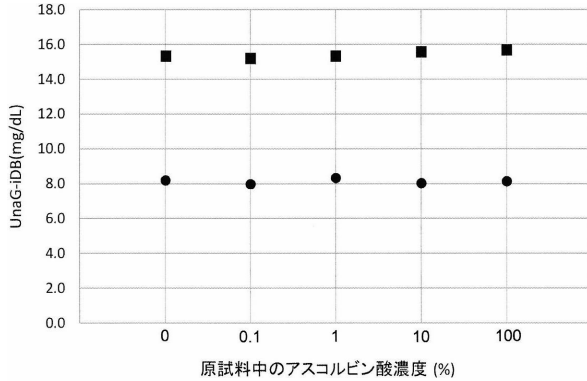
【 図 8 】



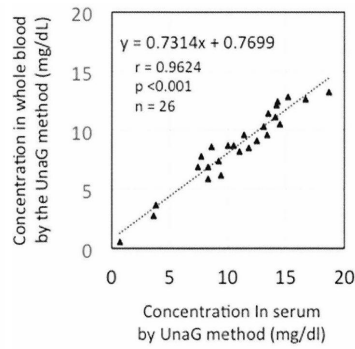
【 図 10 】



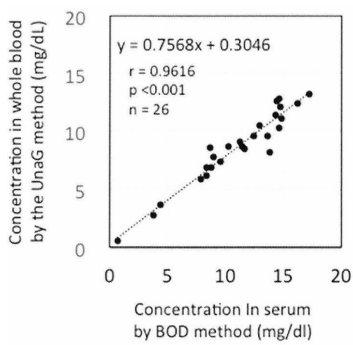
【 図 11 】



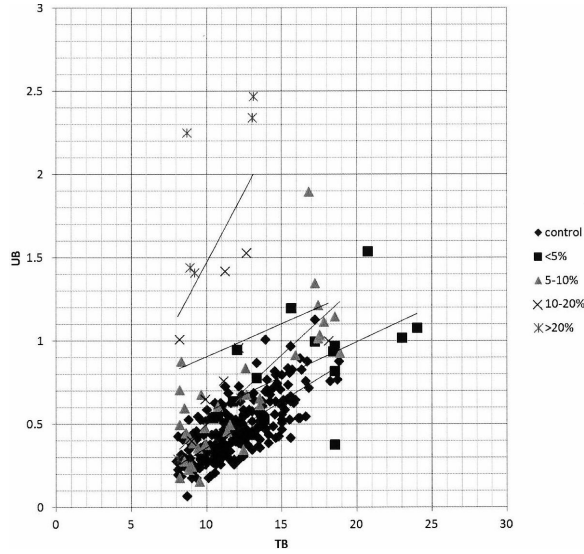
【 図 13 】



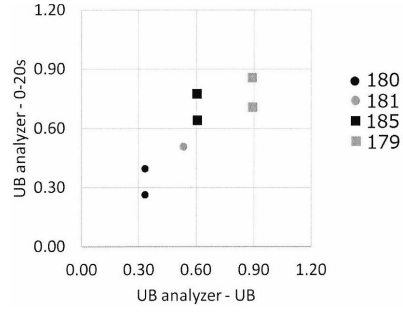
【 図 12 】



【 図 1 4 】

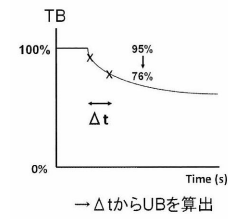


【 図 1 6 】

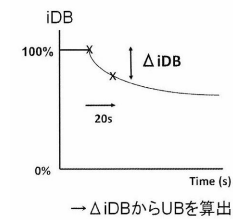


【 図 1 7 】

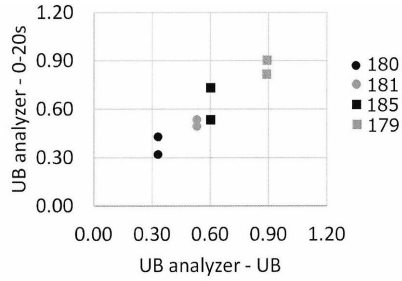
(a) GOD-POD method



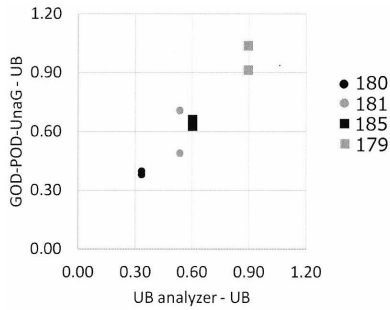
(b) GOD-POD-UnaG method



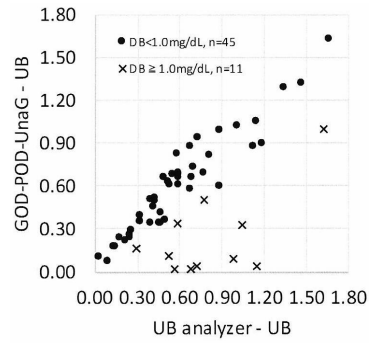
【 図 1 5 】



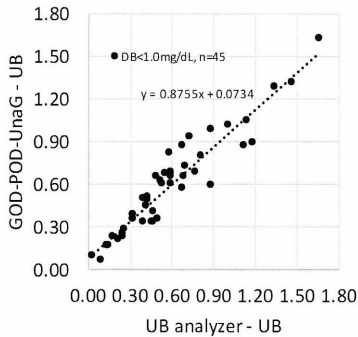
【 図 1 8 】



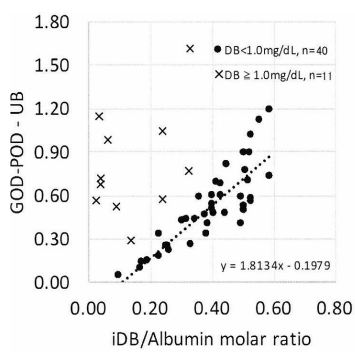
【 図 2 0 】



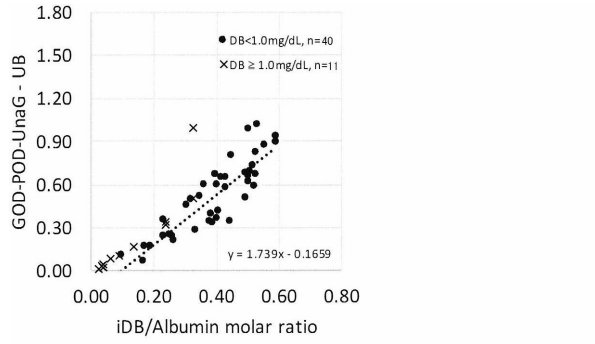
【 図 1 9 】



【 図 2 1 】



【 2 2 】



【 配列表 】

0006716108000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 森岡 一朗
兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内
- (72)発明者 中村 肇
兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内
- (72)発明者 宮脇 敦史
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 熊谷 安希子
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

審査官 西 賢二

- (56)参考文献 特表2001-507790(JP,A)
特開平11-072497(JP,A)
特開2009-139315(JP,A)
特開平02-036200(JP,A)
米国特許第07070999(US,B1)
Database: GenBank, [online], Definition: Anguilla japonica UnaG mRNA for bilirubin binding protein, complete cds, Accession: AB763906, 24-JUL-2013 uploaded, [retrieved on 2019-11-28], Internet, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB763906>
KUMAGAI, Akiko et al., A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle, Cell, 2013年, Vol. 153, pp. 1602-1611
NAKAMURA, Hajime et al., Microdetermination of unbound bilirubin in icteric newborn sera: an enzymatic method employing peroxidase and glucose oxidase, Clin. Chim. Acta., 1977年, Vol. 79, pp. 411-417

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
C12M 1/00-3/10
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	血样中未结合胆红素的测定方法		
公开(公告)号	JP6716108B2	公开(公告)日	2020-07-01
申请号	JP2017510081	申请日	2016-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 国立研究開発法人理化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 国立研究開発法人理化学研究所		
[标]发明人	岩谷壮太 森岡一朗 中村肇 宮脇敦史 熊谷安希子		
发明人	岩谷 壮太 森岡 一朗 中村 肇 宮脇 敦史 熊谷 安希子		
IPC分类号	C12Q1/28 C12Q1/26 C12M1/34 G01N33/536 G01N33/72		
CPC分类号	C12M1/34 C12Q1/26 C12Q1/28 G01N33/72 C12M1/3476 C12Q1/005		
FI分类号	C12Q1/28.ZNA C12Q1/26 C12M1/34.E G01N33/536.D G01N33/72.B		
代理人(译)	田中纯弥		
优先权	2015068471 2015-03-30 JP		
其他公开文献	JPWO2016159050A1 JPWO2016159050A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6716108号 (P6716108)																								
	(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)	(24) 登録日 令和2年6月12日(2020.6.12)																									
提供一种测量方法,通过该方法可以准确反映未结合的胆红素(UB)的量,无论样品中是否含有大量的结合胆红素。根据本发明的UB的测量方法包括分解步骤(i),分解停止步骤(ii),接触步骤(iii)和检测步骤(iv)。在分解步骤(i)中,对包含未结合的胆红素(iD-Bil)和结合的胆红素(D-Bil)的血液样品进行UB在iD-Bil和D-Bil中的氧化分解反应。在分解停止步骤(ii)中,停止氧化分解反应,得到样品的分解产物。在接触步骤(iii)中,使样品的分解产物与能够特异性结合iD-Bil的UnaG接触。单独地,未反应的样品,即未经历分解步骤(i)的血液样品,也与UnaG接触。在检测步骤(iv)中,从样品的分解产物和未反应的样品中检测出UnaG的荧光。然后,从检测值之间的差导出UB量。	<table border="1"> <tr> <td>(51) Int. Cl.</td> <td colspan="3">F 1</td> </tr> <tr> <td>C 1 2 Q 1 / 2 8</td> <td>(2006. 01)</td> <td>C 1 2 Q 1 / 2 8</td> <td>Z N A</td> </tr> <tr> <td>C 1 2 Q 1 / 2 6</td> <td>(2006. 01)</td> <td>C 1 2 Q 1 / 3 4</td> <td>E</td> </tr> <tr> <td>C 1 2 M 1 / 3 4</td> <td>(2006. 01)</td> <td>G O 1 N 3 3 / 5 3 6</td> <td>D</td> </tr> <tr> <td>G O 1 N 3 3 / 5 3 6</td> <td>(2006. 01)</td> <td>G O 1 N 3 3 / 7 2</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>G O 1 N 3 3 / 7 2</td> <td>(2006. 01)</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			(51) Int. Cl.	F 1			C 1 2 Q 1 / 2 8	(2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 2 8	Z N A	C 1 2 Q 1 / 2 6	(2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 3 4	E	C 1 2 M 1 / 3 4	(2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 3 6	D	G O 1 N 3 3 / 5 3 6	(2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 7 2	B	G O 1 N 3 3 / 7 2	(2006. 01)		
	(51) Int. Cl.	F 1																									
C 1 2 Q 1 / 2 8	(2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 2 8	Z N A																								
C 1 2 Q 1 / 2 6	(2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 3 4	E																								
C 1 2 M 1 / 3 4	(2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 3 6	D																								
G O 1 N 3 3 / 5 3 6	(2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 7 2	B																								
G O 1 N 3 3 / 7 2	(2006. 01)																										
	請求項の数 21 (全 55 頁)																										
	(21) 出願番号 特願2017-510081 (P2017-510081) (86) (22) 出願日 平成28年3月30日(2016.3.30) (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/060327 (87) 国際公開番号 W02016/159050 (87) 国際公開日 平成28年10月6日(2016.10.6) 審査請求日 平成30年11月21日(2018.11.21) (31) 優先権主張番号 特願2015-68471 (P2015-68471) (32) 優先日 平成27年3月30日(2015.3.30) (33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(73) 特許権者 504150450 国立大学法人神戸大学 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 (73) 特許権者 503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 (74) 代理人 100124431 弁理士 田中 順也 (74) 代理人 100174160 弁理士 水谷 賢也 (74) 代理人 100175651 弁理士 追田 恭子 (72) 発明者 岩谷 壮太 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 国立大 学法人神戸大学内																									