

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-101924

(P2008-101924A)

(43) 公開日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545	B
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 H

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2006-282278 (P2006-282278)	(71) 出願人	591063394 財団法人 東京都医学研究機構 東京都新宿区西新宿二丁目8番1号
(22) 出願日	平成18年10月17日 (2006.10.17)	(71) 出願人	506348455 高橋 慶一 埼玉県さいたま市中央区大戸1-16-3
		(71) 出願人	000231394 アルフレッサファーマ株式会社 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号
		(74) 代理人	100104673 弁理士 南條 博道
		(72) 発明者	川喜田 正夫 東京都新宿区下落合3-11-15
		(72) 発明者	平松 恭子 東京都葛飾区新小岩2-18-6 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 尿中成分の免疫学的測定方法およびそれに用いるための試薬

(57) 【要約】

【課題】尿中成分の免疫学的測定において、尿検体中または尿希釈検体中の被測定物質量を正確に測定するための方法、ならびに該方法で使用できる試薬を提供すること。

【解決手段】本発明の尿中成分の免疫学的測定用試薬（例えば、標準液、希釈液、または反应用試薬）は、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、および尿酸ナトリウムの中から選ばれる少なくとも1種類の物質を含有する。これらの試薬を用いて、尿中成分を免疫学的に測定すると、従来よりも正確に測定できる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

尿中成分の免疫学的測定に用いるための試薬であって、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、および尿酸ナトリウムからなる群より選ばれる物質を少なくとも 1 種類含有する、試薬。

【請求項 2】

前記試薬中の蛋白質の濃度が 0.01 ~ 1 W/V % である、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 3】

前記蛋白質がウシ血清アルブミンである、請求項 2 に記載の試薬。

【請求項 4】

前記試薬中の塩の濃度が 0.01 ~ 10 W/V % である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 5】

前記試薬が、標準液、希釈液、または反应用試薬である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 6】

前記尿がヒトの尿である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 7】

前記尿中成分がジアセチルスベルミンである、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 8】

前記免疫学的測定が凝集法によるものである、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 9】

前記凝集法がラテックス凝集法または金コロイド凝集法である、請求項 8 に記載の試薬。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の試薬を含む、尿中成分測定用試薬キット。

【請求項 11】

尿中成分の量を免疫学的に測定する方法であって、
 (a) 尿検体または尿検体と希釈液との混合液に反应用試薬を添加して反応液を生成し、免疫学的反応による変化または生成物を測定する工程、
 (b) 標準液または標準液と希釈液との混合液に該反应用試薬を添加して反応液を生成し、免疫学的反応による変化または生成物を測定する工程、および
 (c) (a) の測定結果と (b) の測定結果とを比較して、該尿検体中の該尿中成分の量を決定する工程を含み、

ここで該希釈液、該標準液、および該反应用試薬からなる群より選ばれる試薬の少なくとも 1 つが、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸および尿酸ナトリウムからなる群より選ばれる物質の少なくとも 1 種類を含有し、該 (b) で生成した反応液に、該物質が含まれる、方法。

【請求項 12】

前記 (b) で生成した反応液中の蛋白質の濃度が 0.00025 ~ 0.03 W/V % である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記蛋白質がウシ血清アルブミンである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 (b) で生成した反応液中の塩の濃度が 0.00025 ~ 0.3 W/V % である、請求項 11 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記尿がヒトの尿である、請求項 11 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記尿中成分がジアセチルスペルミンである、請求項 11 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記免疫学的測定が凝集法によるものである、請求項 11 から 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記凝集法がラテックス凝集法または金コロイド凝集法である、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、尿中成分の免疫学的測定方法および該測定に用いるための試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床検査などの分野において、物質の測定を行うための方法の一つとして、免疫学的な測定法が利用されている。免疫学的測定法としては、RIA法、EIA法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法などの多くの方法がある。これらの測定法では、生体試料中の被測定物質である抗原（または抗体）とそれに対する抗体（または抗原）との間における抗原抗体反応を利用している。臨床検査の分野の各種検査では、自動化および測定時間の短縮が図られており、この中でもラテックス凝集法および金属コロイド凝集法は、反応液の分離や洗浄を行わないため、自動化に適している。これらの免疫学的測定においては、標準品を測定して得た測定値（例えば、吸光度）と濃度との関係を表す検量線と、検体中の被測定物質の測定値とを比較することによって、被測定物質の濃度を求める。生体試料中の被測定物質を測定した場合に検量線の濃度域を超えるか、または超えると想定される場合には、検量線の濃度範囲となるように、生体試料を希釈液で希釈する必要がある。また、これらの測定においては、測定の正確性を確認するために、あらかじめ用意されたコントロール液を測定する場合もある。このような標準品の溶液、希釈液、およびコントロール液には、一般的に、生理食塩水や緩衝液が使用される。

20

【0003】

30

しかし、生理食塩水や緩衝液は、測定する生体試料とは成分、粘度、比重などの性状が異なるために、生体試料と、標準品、希釈された検体、またはコントロールとでは反応性に差が生じ、正確に測定できず、真の値との乖離が生じるという問題がある。そのため、生体試料と同一の反応性を有する、標準品（溶液）、希釈液、またはコントロールを調製する必要が生じる。

【0004】

生体試料として尿を用いた被測定物質の検出および測定は、尿の採取が容易であるため、注目されている。例えば、尿中に存在するジアセチルスペルミンは、腫瘍マーカーの1つであり、その測定には、免疫学的方法が利用されている（非特許文献1および特許文献1）。ジアセチルスペルミンの測定用試薬の一つとして、「尿中ジアセチルスペルミン測定試薬用ELISAキット」が、株式会社トランスジェニック（販売、フナコシ株式会社）より市販されている。

40

【0005】

生体試料として尿を用いた被測定物質の免疫学的測定においても、標準液、希釈液などに生理食塩水や緩衝液を用いると、免疫反応性に差が生じ、正確に測定できず、真の値との乖離が生じるという問題がある。

【特許文献1】特開2006-38594号公報

【非特許文献1】ヒラマツ（Hiramatsu, K.）ら，ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.），1998年，第124巻，p. 231 - 236

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0006】**

本発明の目的は、尿中成分の免疫学的測定において、尿検体中または尿希釈検体中の被測定物質の量を正確に測定するための方法、ならびに該方法で使用できる試薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本発明は、尿中成分の免疫学的測定に用いるための試薬を提供し、この試薬は、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、および尿酸ナトリウムからなる群より選ばれる物質を少なくとも1種類含有する。

10

【0008】

1つの実施態様では、上記試薬中の蛋白質の濃度が0.01~1W/V%である。さらなる実施態様では、上記蛋白質はウシ血清アルブミンである。

【0009】

1つの実施態様では、上記試薬中の塩の濃度が0.01~10W/V%である。

【0010】

ある実施態様では、上記試薬は、標準液、希釈液、または反应用試薬である。

【0011】

本発明はまた、上記試薬を含む、尿中成分測定用試薬キットを提供する。

【0012】

さらに、本発明は、尿中成分の量を免疫学的に測定する方法を提供し、この方法は、
(a)尿検体または尿検体と希釈液との混合液に反应用試薬を添加して反応液を生成し、免疫学的反応による変化または生成物を測定する工程、

20

(b)標準液または標準液と希釈液との混合液に該反应用試薬を添加して反応液を生成し、免疫学的反応による変化または生成物を測定する工程、および

(c)(a)の測定結果と(b)の測定結果とを比較して、該尿検体中の尿中成分の量を決定する工程を含み、

ここで該希釈液、該標準液、および該反应用試薬からなる群より選ばれる試薬の少なくとも1つが、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸および尿酸ナトリウムからなる群より選ばれる物質の少なくとも1種類を含有し、該(b)で生成した反応液に、該物質が含まれる。

30

【0013】

1つの実施態様では、上記(b)で生成した反応液中の蛋白質の濃度が0.00025~0.03W/V%である。さらなる実施態様では、上記蛋白質はウシ血清アルブミンである。

【0014】

別の実施態様では、上記(b)で生成した反応液中の塩の濃度が0.00025~0.3W/V%である。

【0015】

1つの実施態様では、上記尿はヒトの尿である。

40

【0016】

1つの実施態様では、上記尿中成分は、ジアセチルスペルミンである。

【0017】

1つの実施態様では、上記免疫学的測定は、凝集法によるものである。さらなる実施態様では、上記凝集法は、ラテックス凝集法または金コロイド凝集法である。

【発明の効果】**【0018】**

本発明によれば、尿中成分を免疫学的に測定する際に、該尿中成分の量をより正確に測定できる。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。明細書を通して、溶液中の含有量を示すために記載した%は、特に記載がない限り、W/V%を表す。

【0020】

(尿中成分の免疫学的測定のための試薬)

本発明の試薬として、標準液、希釈液、および反应用試薬が挙げられる。

【0021】

標準液とは、尿中に存在する物質(以下、「尿中成分」ともいう)の免疫学的測定において、被測定物質の検量線(以下、「標準曲線」ともいう)作成のために用いる溶液をいい、所定の濃度の被測定物質を含有する。標準液は、単一の濃度の被測定物質を含有する溶液であっても、複数の濃度の被測定物質を含有する複数の溶液であってもよい。

10

【0022】

希釈液とは、尿検体中の被測定物質の濃度が検量線の濃度域の範囲内となるように、尿検体または標準液を希釈するために用いる溶液をいう。希釈液は、通常、検体を希釈するために使用されるが、溶解して標準液を調製するためあるいは標準液を希釈して種々の濃度の被測定物質を含む溶液を調製するために使用してもよい。

【0023】

反应用試薬は、被測定物質に対応する免疫学的パートナーを含む試薬溶液であり得る。競合法の場合は、被測定物質に対応する免疫学的パートナーを含む試薬溶液および被測定物質と競合する物質を含む試薬溶液であり得る。

20

【0024】

本発明によれば、尿中成分の免疫学的測定のために、特に標準品について、尿中成分の免疫学的反応を生じさせるための反応液中に、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、および尿酸ナトリウムの少なくとも1種類の物質が含有されればよい。したがって、尿中成分の免疫学的測定に用いられる希釈液、標準液、および反应用試薬のうちのいずれかが上記物質を含有していればよい。

【0025】

以下、本発明の試薬を、希釈液、標準液、および反应用試薬について個々に説明するが、これは、尿中成分の免疫学的測定に用いられる希釈液、標準液、および反应用試薬の全てが上記物質を含まなければならないことを意味するわけではない。

30

【0026】

本発明の標準液または希釈液は、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、および尿酸ナトリウム(尿酸ナトリウム塩)の少なくとも1種を含有する。これらの物質は、単独でも、または組み合わせても含有され得る。これらの物質は、標準液または希釈液中での免疫反応の反応性を、尿検体の場合と差がないか、またはほとんど差がないようにできる濃度で含有される。被測定物質の測定値と真の値との乖離率が $\pm 15\%$ 以内となるような濃度が好ましい。より好ましくは、 $\pm 10\%$ 以内であり、さらに好ましくは、 $\pm 8\%$ 以内である濃度である。例えば、上記物質を単独で含有させる場合、尿素は、 $0.2 \sim 1.2\%$ 、更に好ましくは $0.5 \sim 1.0\%$ ；チオシアン化カリウムは、 $0.2 \sim 1.2\%$ 、更に好ましくは $0.5 \sim 1.0\%$ ；グアニジン塩酸塩は、 $0.2 \sim 1.2\%$ 、更に好ましくは $0.5 \sim 1.0\%$ ；イミダゾールは、 $0.2 \sim 1.2\%$ 、更に好ましくは $0.5 \sim 1.0\%$ ；ヒダントインは、 $0.2 \sim 1.2\%$ 、更に好ましくは $0.5 \sim 1.0\%$ ；馬尿酸は、 $0.001 \sim 0.2\%$ 、更に好ましくは $0.005 \sim 0.1\%$ ；そして尿酸ナトリウムは、 $0.001 \sim 0.2\%$ 、更に好ましくは $0.005 \sim 0.1\%$ の濃度で含有され得る。これらの物質を組み合わせる場合は、上記の各濃度の $1/10$ の濃度でも含有され得る。

40

【0027】

これらの溶液は、蛋白質もまた含有し得る。好ましくは、 $0.01 \sim 1\%$ 、更に好ましくは $0.05 \sim 0.5\%$ の濃度である。蛋白質としては、アルブミン、カゼイン、グロブリン、ヘモシアニン、サイログロブリンなどが挙げられる。その中でも、好ましいのはア

50

ルブミンであり、特に好ましいのは牛血清アルブミン (B S A) である。

【 0 0 2 8 】

これらの溶液は、塩もまた含有し得る。好ましくは、0.01 ~ 10%、更に好ましくは0.05 ~ 5%の濃度である。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの無機塩である。

【 0 0 2 9 】

これらの溶液は、pHの維持のために、緩衝剤を含有し得る。緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、コハク酸緩衝液、あるいはグリシルグリシン、MES (2 - (N - モノホリノ) エタンスルホン酸)、HEPES (N - 2 - ヒドロキシエチル - ピペラジン - N ' - エタンスルホン酸)、TES (N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸)、MOPS (3 - (N - モノホリノ) プロパンスルホン酸)、PIPES (ピペラジン - 1 , 4 - ビス (2 - エタンスルホン酸)) などのグッド緩衝液が好適に用いられる。pHは、3.0 ~ 7.0であることが好ましい。緩衝剤の使用濃度は、終濃度として5 ~ 500 mMであることが好ましい。

10

【 0 0 3 0 】

その他の含有成分として、防腐剤としてのアジ化ナトリウム、キレート剤としてのEDTAなどや、有機酸類、糖類、アミノ酸類を含有しても良い。

【 0 0 3 1 】

標準液は、検体の比較のために使用されるため、好ましい濃度の被測定物質を含有し得る。標準液は、希釈液に被測定物質を好ましい濃度となるように添加することによって調製できる。例えば、被測定物質がジアセチルスペルミンである場合には、標準液には、測定に好ましい濃度のジアセチルスペルミンが含有される。好ましい濃度は、0 ~ 1000 nMである。一般に、検量線作成のためには、異なる濃度の被測定物質を含む標準液が必要であり、該濃度の選択は当業者により適宜行われ、標準液は、希釈液で適宜希釈され得る。

20

【 0 0 3 2 】

上記標準液および希釈液は、測定の正確性を確認するためのコントロール液としても使用可能である。

【 0 0 3 3 】

本発明の反应用試薬は、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、および尿酸ナトリウムの少なくとも1種を含有する。これらの物質は、単独でも、または組み合わせても含有され得る。これらの物質は、検体または標準液に希釈液を添加する場合または添加しない場合のいずれにおいても、検体または標準液に反应用試薬を添加して反応させる場合に、検体および標準液のそれぞれにおける免疫反応の反応性に差がないか、またはほとんど差がないようにできる濃度で含有される。被測定物質の測定値と真の値との乖離率が±15%以内となるような濃度が好ましい。より好ましくは、±10%以内であり、さらに好ましくは、±8%以内である濃度である。被測定物質の測定のために2種以上の反应用試薬が必要な場合、反应用試薬のいずれかまたは全部 (すなわち、少なくとも1つの反应用試薬) に上記物質を含有し得る。

30

【 0 0 3 4 】

反应用試薬は、例えば、単独では、尿素は、0.1 ~ 3%、更に好ましくは0.5 ~ 2% ; チオシアン化カリウムは、0.1 ~ 3%、更に好ましくは0.5 ~ 2% ; グアニジン塩酸塩は、0.1 ~ 3%、更に好ましくは0.5 ~ 2% ; イミダゾールは、0.1 ~ 3%、更に好ましくは0.5 ~ 2% ; ヒダントインは、0.1 ~ 3%、更に好ましくは0.5 ~ 2% ; 馬尿酸は、0.0005 ~ 0.2%、更に好ましくは0.0007 ~ 0.1% ; そして尿酸ナトリウムは、0.0005 ~ 0.2%、更に好ましくは0.0007 ~ 0.1%の濃度で含有され得る。これらの物質を組み合わせる場合は、上記の各濃度の1/10の濃度でも含有され得る。

40

【 0 0 3 5 】

上記物質を含むこと以外は、反应用試薬は、必要に応じて、被測定物質の測定について

50

公知の組成を有し得る。例えば、上記標準液または希釈液と同様に、防腐剤、キレート剤、有機酸類、糖類、アミノ酸類などを含有してもよい。

【0036】

(尿中成分測定用キット)

上記で説明した希釈液、標準液および反应用試薬は、尿中成分の免疫学的測定のために、これらの少なくとも1つを含むキットとしてもよい。

【0037】

本発明のキットに含まれる標準液は、好ましい最大濃度の被測定物質を含む1つの溶液であり得る。これを継代希釈して使用し、より低い濃度の標準液を調製してもよい。あるいは、本発明のキットは、検量線作成用に数種の濃度の被測定物質を含む各溶液を標準液として含んでもよい。

10

【0038】

本発明のキットは、上記物質を含む標準液の代わりに、標準液を調製するための被測定物質の標品と上記物質を含む希釈液とをともに含んでもよい。もちろん、上記物質を含む希釈液は、所定の濃度の被測定物質を含む標準液とともに含んで、標準液および検体の希釈のために使用してもよい。

【0039】

本発明のキットは、上記物質を含む反应用試薬を単独で含み、通常の標準液および/または希釈液を用いても、あるいは上記物質を含む標準液および/または上記物質を含む希釈液と合わせて含んでもよい。

20

【0040】

本発明のキットは、上記物質を含む希釈液、標準液または反应用試薬のような試薬に加えて、被測定物質の免疫学的測定に必要な他の成分(試薬または器具)をさらに含み得る。測定の手順を示す指示書もまた、含まれ得る。

【0041】

(尿中成分の免疫学的測定方法)

尿中成分の免疫学的測定は、被測定物質(例えば、抗原または抗体)とそれに対応する免疫学的パートナー(例えば、上記抗原に対する抗体または上記抗体に対する抗原)との間の免疫反応を利用する。免疫学的測定には、被測定物質とこれに対応する免疫学的パートナーとの免疫反応を検出することにより、直接的に被測定物質を検出する方法、および被測定物質とその競合物質を共存させて競合免疫反応を検出することにより、間接的に被測定物質を検出する方法がある。尿検体を、被測定物質に対応する免疫学的パートナーを含む反应用試薬と合わせて(競合法の場合は、さらに被測定物質と競合する物質を含む反应用試薬と合わせて)、反応液を生成し、反応液中での免疫学的反応による変化または生成物の量を測定し、該尿検体中に含まれる被測定物質の量を測定する。測定手段としては、光学的手段が好適に用いられ得る。

30

【0042】

被測定物質の量(通常、濃度)は、標準品(通常、溶液の形態である)を尿検体の代わりに用いて反応液を生成し、反応液中での免疫学的反応による変化または生成物の量を測定し、この測定結果と尿検体での測定結果とを比較することにより決定され得る。例えば、少なくとも2濃度の標準品を尿検体の代わりに用いて、免疫学的反応による変化または生成物の量を測定し、これらの測定値(例えば、吸光度)と被測定物質の量との関係を示す検量線を作成し、尿検体中の被測定物質の測定値を検量線と比較することによって、尿検体中の被測定物質の量を決定し得る。尿検体中の被測定物質を測定した場合に検量線の濃度域を超えるか、または超えると想定される場合には、検量線の濃度範囲となるように、希釈液で尿検体を希釈し得る。

40

【0043】

本発明の方法では、測定値と真の値との乖離が生じないようにするために、特に標準品について、尿中成分の免疫学的反応を生じさせるための反応液中に、尿素、チオシアン化カリウム、グアニジン塩酸塩、イミダゾール、ヒダントイン、馬尿酸、尿酸ナトリウムの

50

中から選ばれる少なくとも1種類の物質が含有されればよい。このため、希釈液、標準液、および反应用試薬の少なくとも1つが、上記物質を含有する。最終的に、上記反応液中に、例えば、単独では、尿素は、0.0056~0.34%、更に好ましくは0.014~0.28%；チオシアン化カリウムは、0.0056~0.34%、更に好ましくは0.014~0.28%；グアニジン塩酸塩は、0.0056~0.34%、更に好ましくは0.014~0.28%；イミダゾールは、0.0056~0.34%、更に好ましくは0.014~0.28%；ヒダントインは、0.0056~0.34%、更に好ましくは0.014~0.28%；馬尿酸は、0.000028~0.0056%、更に好ましくは0.00014~0.0028%；尿酸ナトリウムは、0.000028~0.0056%、更に好ましくは0.00014~0.0028%含まれ得る。これらの物質が組み合わせて使用される場合は、上記の各濃度の1/10の濃度でも含有され得る。

10

【0044】

上記反応液中には、蛋白質もまた含有され得る。好ましくは、0.00025~0.03%、更に好ましくは0.001~0.01%の濃度である。蛋白質としては、アルブミン、カゼイン、グロブリン、ヘモシアニン、サイログロブリンなどが挙げられる。その中でも、好ましいのはアルブミンであり、特に好ましいのは牛血清アルブミン(BSA)である。

【0045】

上記反応液中には、塩もまた含有され得る。好ましくは、0.00025~0.3%、更に好ましくは0.001~0.1%の濃度である。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの無機塩である。

20

【0046】

尿中成分の測定試薬として上記物質を含有する反应用試薬を用いる場合、尿検体の希釈には精製水や生理食塩水や緩衝液を用いてもよい。

【0047】

本発明の方法において、測定のための尿としては各種動物の尿が対象になるが、好ましくはヒトの尿である。

【0048】

本発明において免疫学的に測定される尿中成分は、尿中に存在し得る、免疫学的に測定可能な物質であれば特に限定されない。タンパク質、脂質、多糖類などの高分子であっても測定対象となり得る。免疫学的に測定可能な物質としては、例えば、各種抗原、抗体、レセプター、酵素なども含まれる。例えば、ジアセチルスペルミンが挙げられる。

30

【0049】

本発明に適用される免疫学的測定法としては、RIA法、EIA法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法などが挙げられる。金属コロイド凝集法で用いられる金属コロイドとしては、金、銀、セレンなどのコロイドがありいずれでもよく、利用しやすい点からは、金コロイドが好ましい。反応液の分離や洗浄操作を行わない検査の自動化が容易な免疫凝集法が好ましく、特にラテックス凝集法や金コロイド凝集法が好ましい。反応液の分離や洗浄操作を行わない免疫凝集法では、検体や標準液などの溶液成分が測定の最後まで反応液中に保持されるので、本発明の試薬の使用はより好適である。

40

【0050】

例えば、抗原(または抗体)である被測定物質を測定する場合、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法では、被測定物質である抗原(または抗体)に対する抗体(または抗原)を、担体のラテックスや金属コロイドに予め結合させておく。例えば、金コロイド凝集法の場合、あらかじめ金コロイドと結合させた標識抗体(または標識抗原)が、被測定物質である抗原(または抗体)を介して凝集する。その際に生じる色差(色調変化)を光学的に測定し、抗原量または抗体量を測定する。

【0051】

ジアセチルスペルミンが免疫学的に測定される場合、好ましくは、特許文献1に記載の方法が用いられる。

50

【実施例】

【0052】

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0053】

本実施例で使用した免疫学的測定を以下に説明する。

【0054】

(参考例1. アセチルスペルミン結合BSAの調製)

アセチルスペルミン結合BSAを、非特許文献1に記載の方法に準じて調製した。まず、担体蛋白質であるBSA 200mgとS-アセチルメルカプト無水コハク酸15mgとを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で混合し、室温で30分間攪拌して、S-アセチルメルカプトコハク酸(AMS)-BSA複合体を作製した。これとは別に、二価性架橋試薬であるGMB 45mgとN-アセチルスペルミン・3塩酸塩147mgとをテトラヒドロフラン/50mMリン酸緩衝液(pH7.0)(1:1(v/v))中で室温にて30分間混合して、アセチルスペルミン-GMB結合物を作製した。次いで、AMS-BSA 200mgにヒドロキシルアミン塩酸塩4.2mgを加え、メルカプトスクシニル-BSA(MS-BSA)とした。次いで、アセチルスペルミン-GMB結合物とMS-BSAとを混合して、N-アセチルスペルミンがアシルアミド結合した免疫抗原アセチルスペルミン-GMB-BSAを作製した。このようにしてアセチルスペルミンを担体にアシルアミド結合させることにより、ジアセチルスペルミン類似化合物を側鎖として多数有する免疫抗原を作製した。

10

20

【0055】

アセチルスペルミン結合BSAの濃度は、1mg/mLのBSA溶液の280nmにおける吸光度(光路長1cm)である A_{280} を0.66として、 A_{280} 値に基づいて算出した。

【0056】

(参考例2. 抗ジアセチルスペルミンモノクローナル抗体の調製)

上記参考例1で得たアセチルスペルミン結合BSAとアジュバントとの混和物をマウスに投与した。投与は、2週間間隔で4回免疫を行った。免疫する最終日の4日後に抗体産生細胞を採取した。

30

【0057】

次に、採取した抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行い、ハイブリドーマを得た。細胞融合は、血清を含まない動物細胞培養用培地(RPMI-1640培地)で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mLの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mLのミエローマ細胞とを混合し、細胞融合促進剤(1000~6000Daのポリエチレングリコール)を添加した状態で融合させた。細胞融合後、細胞から目的とするハイブリドーマを選択した。このために、細胞懸濁液をウシ胎児血清含有RPMI-1640培地で希釈し、マイクロタイタープレートにまいた。各ウェルにHAT選択培地を加え培養し、2週間程度で生育した細胞をハイブリドーマとして得た。増殖してきたハイブリドーマの培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法によって、ジアセチルスペルミンに反応する抗体をスクリーニングした。融合細胞は、限界希釈法によりクローニングを行った。ジアセチルスペルミンに強い反応性を示し、かつ(1)N¹-アセチルスペルミンとの交差反応が0.1%以下、および/または(2)尿中のジアセチルスペルミン類似物質との交差反応による測定結果への干渉の総和が5%以下である抗体を産生するハイブリドーマを選択し、樹立した。樹立したハイブリドーマから、37℃にて、5%CO₂濃度で7~14日の培養によってモノクローナル抗体を採取した。採取した抗体を、硫酸塩析法により精製した。

40

【0058】

(参考例3. 金コロイド液の調製)

95%の蒸留水1Lに10%塩化金酸溶液2mLを攪拌しながら加え、1分後に2%ク

50

エン酸ナトリウム溶液 10 mL を加え、さらに 20 分間攪拌した後 30 に冷却した。冷却後、0.1 M 炭酸カリウム溶液で pH 7.1 に調節した。

【0059】

(参考例 4 . 第 1 試薬の調製)

上記参考例 1 で調製したアセチルスペルミン結合 BSA 66.0 ng/mL、2.0% 塩化ナトリウム、および 1.85% ポリエチレングリコール 20000 (PEG) (PEG 濃度は、測定感度を出すため、ロットにより若干異なった) を含む、0.2% EDTA、0.2% TWEEN 80、0.001% DTT、0.025% 1-チオグリセロールおよび 0.01% アジ化ナトリウムを含む 250 mM MES (pH 6.2) を調製し、第 1 試薬とした。

10

【0060】

(参考例 5 . 第 2 試薬の調製)

上記参考例 2 で調製した抗ジアセチルスペルミン抗体を、0.05% アジ化ナトリウムを含む 10 mM HEPES (pH 7.1) で希釈し、40 μg/mL の濃度にした。この液 100 mL を上記参考例 3 で調製した金コロイド液 1 L に加え、冷蔵下で 2 時間攪拌した。この混合物に、5.46% マンニトール、0.5% BSA、および 0.05% アジ化ナトリウムを含む 10 mM HEPES (pH 7.1) を 110 mL 添加し、37 で 90 分間攪拌し、8,000 回転で 40 分間遠心分離し、上清を除去した。得られた残渣に、3% マンニトール、0.1% BSA、および 0.05% アジ化ナトリウムを含む 5 mM HEPES (pH 7.5) (A 溶液) を約 1 L 加え、抗体結合金コロイドを分散させた後、8,000 回転で 40 分間遠心分離し、上清を除去した。残渣を A 溶液に分散させ、この抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイドの分散液を精製水で 30 倍希釈したときに 540 nm での吸光度が 1.0 となるように A 溶液を添加し、抗体結合金コロイド原液とした。

20

【0061】

さらに、抗体結合金コロイド原液を A 溶液で 3 倍希釈して、抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイド試薬を調製し、第 2 試薬とした。

【0062】

(参考例 6 . 尿中ジアセチルスペルミンの測定)

ジアセチルスペルミン含有尿検体 7 μL および上記参考例 4 で調製した第 1 試薬 180 μL を混合・攪拌し、37 で約 5 分加温した。次いで、上記参考例 5 で調製した第 2 試薬 60 μL を添加・攪拌した後、日立 7070 形自動分析装置により主波長 546 nm および副波長 660 nm で測光ポイント 18 から 31 の二ポイント測定を行って、二ポイント間の吸光度差を求めた。測定時間は約 10 分間であった。

30

【0063】

標準曲線を作成するために、希釈液を用いて標準液を調製した。必要に応じて、ジアセチルスペルミン含有尿検体の調製のために希釈液を用いた。

【0064】

(実施例 1 : 尿検体中のジアセチルスペルミンの測定に対する標準液および希釈液の尿素濃度の影響)

40

本実施例においては、尿検体中のジアセチルスペルミンの測定に対する標準液および希釈液の尿素濃度の影響を調べた。

【0065】

(1-1. 尿素を含む標準液および希釈液に関する検討)

0.3% BSA、0.9% 塩化ナトリウム、および 0.2 M MES (pH 6.2) を含む溶液に、尿素を 0%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、および 30% になるようにそれぞれ添加した。得られたそれぞれの尿素溶液を希釈液とした。種々の尿素濃度の希釈液を用いて、ジアセチルスペルミンを、0 nM、10 nM、50 nM、200 nM、400 nM、および 1000 nM 含む標準液を調製した。一方、尿検体として、ジアセチルスペルミンを 154 nM 含有

50

することを、上記第1試薬（参考例4）および第2試薬（参考例5）により測定し、質量分析法にて定量された標準品を用いて作成した標準曲線により値付けして確認した、健常人プール尿を用いた。上記各尿素濃度につき6点の標準液および尿検体について、日立7070形自動分析装置にて、第1試薬および第2試薬を添加して吸光度差を測定し、各尿素濃度における標準曲線から、尿検体中のジアセチルスベルミン濃度をそれぞれ求めた。この測定値と真の値との乖離率から尿素の最適な添加濃度を決定した。この結果を表1および図1に示す。

【0066】

【表1】

尿素 %	測定値 nM	乖離 %
0	171.3	+11.3
0.01	172.7	+12.2
0.05	174.7	+13.4
0.1	182.1	+18.3
0.5	165.5	+7.4
1	165.4	+7.4
5	152.4	-1.0
10	140.9	-8.5
15	130.8	-15.1
20	109.8	-28.7
25	109.8	-28.7
30	92.5	-39.9
基準値	154	

10

20

30

40

50

【0067】

表1より、尿素濃度が0%の場合、ジアセチルスベルミン154 nM尿検体は、171.3 nMと測定され、真の値との乖離率が+11.3%であった。0.01%では+12.2%、0.05%では+13.4%、0.1%では+18.3%であり、真の値との乖離率が高い値を示した。0.5%では+7.4%、1%は+7.4%、5%は-1.0%、10%は-8.5%となり、真の値との乖離率は±10%以内に収束していた。また、15%以上になると、15%以上の減少が見られた。このことから尿素を適量加えることにより、測定値が真の値に近づくことがわかった。

【0068】

図1は、横軸に希釈液中の尿素添加濃度（%）を示し、縦軸にジアセチルスベルミン濃度の測定値（nM）を示す。尿検体中のジアセチルスベルミン濃度の真の値である154 nMのバーもまた示した。図1から、約0.5%～約10%の尿素添加が有効であると考えられる。

【0069】

尿素有効濃度幅をさらに細かく検討した。0.3% BSA、0.9% 塩化ナトリウム、および0.2 M MES (pH 6.2) を含む溶液に、尿素を0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、および1.5%になるようにそれぞれ添加した。得られたそれぞれの尿素溶液を希釈液とした。種々の尿素濃度の希釈液を用いて、ジアセチルスベルミンを、0 nM、10 nM、50 nM、200 nM、400 nM、および1000 nM含む標準液を調製した。一方、尿検体として、ジアセチルスベルミンを120 nM、および238 nM含有することを、上記第1試薬（参考例4）および第2

試薬（参考例 5）により測定し、質量分析法にて定量された標準品を用いて作成した標準曲線により値付けして確認した、2種の健常人プール尿を用いた。上記各尿素濃度につき6点の標準液および尿検体について、日立7070形自動分析装置にて、第1試薬および第2試薬を添加して吸光度差を測定し、各尿素濃度における標準曲線から、尿検体中のジアセチルスベルミン濃度をそれぞれ求めた。この測定値と真の値との乖離率から尿素の最も適した添加濃度を決定した。この結果を表2に示す。

【0070】

【表2】

尿素 %	測定値 nM	乖離 %
0.1	138.2	+15.1
0.2	135.5	+12.9
0.3	133.4	+11.2
0.4	130.9	+9.1
基準値	120	
11	214.8	-9.8
12	206.5	-13.8
13	194.3	-18.4
14	192.0	-19.3
15	187.9	-21.1
基準値	238	

10

20

【0071】

表2より、尿素濃度が0.1%の場合、ジアセチルスベルミン120 nM尿検体は、138.2 nMと測定され、真の値との乖離率が+15.1%であった。一方、0.2%では+12.9%、0.3%では+11.2%、0.4%では+9.1%であり、真の値との乖離率が±15%未満であり、尿素添加有効範囲内であった。さらに、15%では238 nM尿検体は187.9 nMと測定され、真の値との乖離率が-21.1%、また、14%では-19.3%、13%では-18.4%であった。一方、12%は206.5 nMと測定され、真の値との乖離率は-13.8%であり、乖離率±15%以内に収束していた。

30

【0072】

以上の結果をまとめると、乖離率±15%内に収まる尿素の有効範囲は0.2~12%であると考えられる。

【0073】

（1-2. BSAを含む標準液および希釈液に関する検討）

40

上記1-1の結果を受けて、尿素の含有量を5%とした。したがって、5%尿素、0.9%塩化ナトリウム、0.2 M MES (pH 6.2)を含む溶液に、BSAを0%、0.01%、0.1%、0.3%、1%、および3%になるようにそれぞれ添加した。得られたそれぞれのBSA溶液を希釈液とした。種々のBSA濃度の希釈液を用いて、ジアセチルスベルミンを、0 nM、10 nM、50 nM、200 nM、400 nM、および1000 nM含む標準液を調製した。一方、尿検体として、ジアセチルスベルミンを154 nM含有することを、上記第1試薬（参考例4）および第2試薬（参考例5）により測定し、質量分析法にて定量された標準品を用いて作成した標準曲線により値付けして確認した、健常人プール尿を用いた。上記各BSA濃度につき6点の標準液および尿検体について、日立7070形自動分析装置にて、第1試薬および第2試薬を添加して吸光度差を測定

50

し、各 B S A 濃度における標準曲線から、尿検体中のジアセチルスペルミン濃度をそれぞれ求めた。真の値に対する測定値の割合（一致率）から B S A の添加濃度について検討した。この結果を表 3 に示す。

【 0 0 7 4 】

【表 3】

BSA	測定値 nM	一致率 %
0%	142.2	99.2
0.01%	139.5	97.3
0.1%	142.3	99.3
0.3%	143.3	100.0
1%	137.5	96.0
3%	126.8	88.5
基準値	154	

10

【 0 0 7 5 】

上記表 3 からわかるように、B S A 濃度が 3 % の場合に若干測定値の低下が見られた以外は、ほぼ 1 0 0 % の値を示した。

20

【 0 0 7 6 】

（実施例 2：尿中ジアセチルスペルミンの測定）

本実施例では、5 % 尿素、0 . 3 % B S A、および 0 . 9 % 塩化ナトリウムを含む 0 . 2 M M E S (p H 6 . 2) を希釈液として使用した。この希釈液を用いて、ジアセチルスペルミンを、0 n M、1 0 n M、5 0 n M、2 0 0 n M、4 0 0 n M、および 1 0 0 0 n M 含む標準液を調製した。これらの 6 点の標準液から標準曲線を作成した。結果を図 2 に示す。図 2 の横軸は、ジアセチルスペルミンの濃度 (n M) を示し、そして縦軸は、吸光度 (O D × 1 0 0 0 0) を示す。図 2 から明らかなように、尿中ジアセチルスペルミン濃度に応じ吸光度の低下が見られた。

30

【 0 0 7 7 】

一方、尿検体として、ジアセチルスペルミンを 1 5 4 n M および 2 4 0 n M 含有することを、上記第 1 試薬（参考例 4）および第 2 試薬（参考例 5）により測定し、質量分析法にて定量された標準品を用いて作成した標準曲線により値付けして確認した、2 種の健常人プール尿を用いた。尿検体 A (1 5 4 n M) および B (2 4 0 n M) 中のジアセチルスペルミン濃度を測定した (n = 4)。結果を表 4 に示す。

【 0 0 7 8 】

【表 4】

N=4	検体A (154nM)	検体B (240nM)
1	154.1	259.2
2	152.8	245.9
3	154.9	256.0
4	148.7	255.4
平均	152.6	254.1

40

【 0 0 7 9 】

上記表 4 から明らかなように、5 % 尿素、0 . 3 % B S A、0 . 9 % 塩化ナトリウムを

50

含む 0.2 M MES (pH 6.2) を標準液および希釈液として使用した場合には、得られた測定値は、真のジアセチルスベルミン濃度との誤差があまりなかった。このように、上記溶液を標準液および希釈液として使用することにより、尿検体のマトリックスの影響を無視でき、生理食塩水を使用する場合に生じるような測定乖離が回避され得る。

【0080】

(実施例3：標準液を調製するための液中成分の検討)

本実施例では、ジアセチルスベルミン測定において検体に正確な測定値を与えるのに有効である可能性がある物質を用いて標準液を調製し、これを用いて尿検体中のジアセチルスベルミン濃度を測定した。

【0081】

まず、0.3% BSA、0.9% 塩化ナトリウム、0.2 M MES (pH 6.2) を含む溶液に、以下の濃度となるように各試験物質をそれぞれ添加し、希釈液を得た：1% チオシアン化カリウム (KSCN)、1% グアニジン塩酸塩 (GdnHCl)、1% イミダゾール、1% ヒダントイン、0.05% 馬尿酸または0.05% 尿酸ナトリウム (尿酸-Na)。ポジティブコントロールとして、1% 尿素を添加した溶液、ネガティブコントロールとして、BSA、塩化ナトリウム、MES 以外の物質を含まない溶液 (ベース)、また、生理食塩水 (0.9% NaCl) を用いた。これらの希釈液を用いて、ジアセチルスベルミンを、0 nM、10 nM、50 nM、200 nM、400 nM、および 1000 nM 含む標準液を調製した。一方、尿検体として、ジアセチルスベルミンを 154 nM 含有することを、上記第1試薬 (参考例4) および第2試薬 (参考例5) により測定し、質量分析法にて定量された標準品を用いて作成した標準曲線により値付けして確認した、健康人プール尿を用いた。上記各物質につき6点の標準液および尿検体について、日立7070形自動分析装置にて、第1試薬および第2試薬を添加して吸光度差を測定し、各物質における標準曲線から、尿検体中のジアセチルスベルミン濃度をそれぞれ求めた。結果を表5および図3に示す (図3は、表5の結果をグラフ化したものであり、横軸は添加物質を示し、縦軸はジアセチルスベルミン濃度の測定値 (nM) を示す)。

【0082】

【表5】

		測定値 nM	乖離 %
1%	KSCN	147.7	-4.1
1%	GdnHCl	159.4	+3.5
0.05%	馬尿酸	163.4	+6.1
0.05%	尿酸-Na	163.8	+6.3
1%	尿素	165.4	+7.4
1%	ヒダントイン	166.0	+7.8
1%	イミダゾール	168.1	+9.1
0.9%	NaCl	170.9	+11.0
	ベース	171.3	+11.3
基準値		154	

【0083】

表5および図3に示すように、ネガティブコントロールであるベースを用いた場合、154 nM 尿検体は 171.3 nM と測定され、真の値との乖離率は +11.3% となり、10% を超えるものであった。また、生理食塩水 (0.9% NaCl) においても 170.9 nM と高値を示し、10% を超える乖離が見られた。これに対し、1% イミダゾール

ル、1%ヒダントイン、0.05%尿酸ナトリウム、0.05%馬尿酸、1%グアニジン塩酸塩、または1%チオシアン化カリウム添加による測定値は、それぞれ168.1 nM、166.0 nM、163.8 nM、163.4 nM、159.4 nM、および147.7 nMとなり、1%尿素添加時の測定値165.4 nMに近い結果が得られ、真の値との乖離率は±10%以内であった。

【0084】

(実施例4：第1試薬への尿素の添加)

尿素を第1試薬に添加した場合の効果について検討した。

【0085】

詳しくは、まず、第1試薬(参考例4)に尿素を0.2%または1%となるように添加した。尿検体として、ジアセチルスペルミンをそれぞれ475.3 nM(検体A)、477.1 nM(検体B)、612.2 nM(検体C)および577.5 nM(検体D)含有することを、上記第1試薬(参考例4)および第2試薬(参考例5)により測定し、質量分析法にて定量された標準品を用いて作成した標準曲線により値付けして確認した尿検体を用い、それぞれ精製水で5倍希釈した。

10

【0086】

5%尿素、0.3%BSA、および0.9%塩化ナトリウムを含む0.2M MES(pH6.2)を希釈液として用いて、ジアセチルスペルミンを、0 nM、10 nM、50 nM、200 nM、400 nM、および1000 nM含む標準液を調製した。これらの6点の標準液から標準曲線を作成した。

20

【0087】

尿素添加した第1試薬を用いて、希釈した尿検体中のジアセチルスペルミン濃度を測定した。結果を表6に示す。

【0088】

【表6】

検体No.	尿素 0.2%			尿素 1.0%		
	表示値 nM	精製水 ×5希釈 nM	一致率 %	表示値 nM	精製水 ×5希釈 nM	一致率 %
A	475.3	428.3	90.1	475.3	462.2	97.2
B	477.1	431.5	90.5	477.1	454.6	95.3
C	612.2	565.0	92.3	612.2	581.1	94.9
D	577.5	547.7	94.8	577.5	551.6	95.5

30

【0089】

表6から、0.2%尿素添加または1%尿素添加の第1試薬を用いて、精製水で5倍希釈した尿検体を測定した結果、両者とも表示値に対して90%以上の一致がみられた。このことより、試薬自体に尿素を添加しても、検体に真の測定値を与えることが可能であることが示される。

40

【産業上の利用可能性】

【0090】

本発明によれば、尿中成分を免疫学的に測定する際に、被測定物質の量をより正確に測定できる。診断指標または早期診断マーカーとして用いられ得る物質において、その物質の量で陽性が否かが決定される場合、より正確な診断が可能となる。例えば、ジアセチルスペルミンは、簡便かつ安価に使用可能な金コロイド法を用いて好適に測定され得るが、この方法においてもさらに精度が上昇し、より利用しやすいものとなる。

【図面の簡単な説明】

50

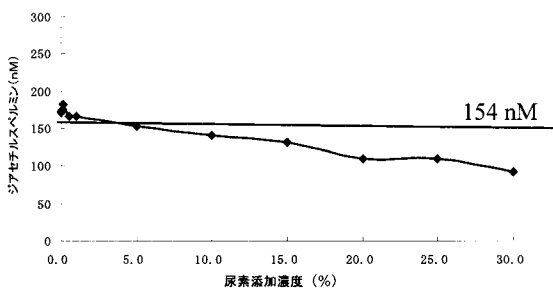
【 0 0 9 1 】

【 図 1 】 種々の濃度の添加尿素を含む希釈液および標準液を使用した場合の尿中ジアセチルスベルミン濃度の測定値を示すグラフである。

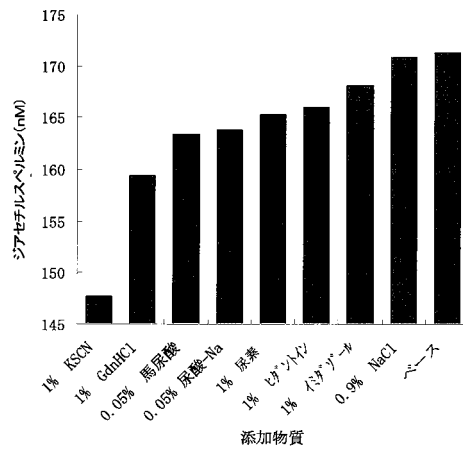
【 図 2 】 尿中ジアセチルスベルミン濃度と尿素含有希釈液および標準液を使用して測定した吸光度との関係を示すグラフである。

【 図 3 】 種々の物質を添加した希釈液および標準液を使用した場合の尿中ジアセチルスベルミン濃度の測定値を示すグラフである。

【 図 1 】

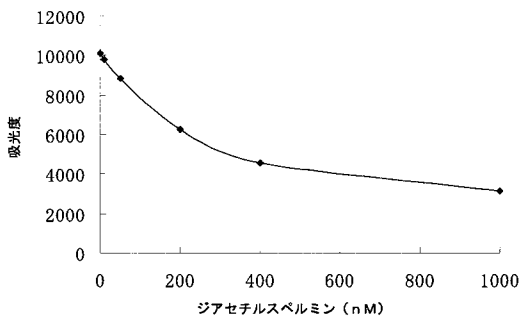


【 図 3 】



【 図 2 】

標準曲線



フロントページの続き

(72)発明者 高橋 慶一

埼玉県さいたま市中央区大戸 1 - 1 6 - 3

(72)発明者 柳谷 真理

大阪府茨木市庄二丁目 2 4 番 3 号アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内

(72)発明者 小坂 美恵子

大阪府茨木市庄二丁目 2 4 番 3 号アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内

专利名称(译)	尿液成分的免疫学测量方法和其中使用的试剂		
公开(公告)号	JP2008101924A	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2006282278	申请日	2006-10-17
申请(专利权)人(译)	财团法人 东京都医学研究机构 高桥圭一 Alfresa制药社		
[标]发明人	川喜田正夫 平松恭子 高桥慶一 柳谷真理 小坂美惠子		
发明人	川喜田 正夫 平松 恭子 高桥 慶一 柳谷 真理 小坂 美惠子		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/62 C07D401/04 G01N33/54313 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.S G01N33/545.B G01N33/553 G01N33/543.581.H		
其他公开文献	JP5317040B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种准确测量尿液样本或稀释尿液样本中测量物质的量的方法，以及该方法中使用的试剂，用于尿液成分的免疫学测量。

解决方案：本发明的尿液成分的免疫学测定试剂（例如标准溶液，稀释液或反应试剂）含有选自尿素，硫氰酸钾，盐酸胍等中的至少一种物质，咪唑，乙内酰胺，马尿酸和尿酸钠。当使用至少一种试剂进行免疫学测量时，尿液中的组分比常规技术中更准确地测量。之

尿素 %	測定値 nM	乖離 %
0	171.3	+11.3
0.01	172.7	+12.2
0.05	174.7	+13.4
0.1	182.1	+18.3
0.5	165.5	+7.4
1	165.4	+7.4
5	152.4	-1.0
10	140.9	-8.5
15	130.8	-15.1
20	109.8	-28.7
25	109.8	-28.7
30	92.5	-39.9
基準値	154	