

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6091158号  
(P6091158)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int.Cl. F 1  
**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 D

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2012-233891 (P2012-233891)	(73) 特許権者	591125371 デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(22) 出願日	平成24年10月23日(2012.10.23)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(65) 公開番号	特開2014-85208 (P2014-85208A)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(43) 公開日	平成26年5月12日(2014.5.12)	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
審査請求日	平成27年4月17日(2015.4.17)	(72) 発明者	黒澤 寛之 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デ ンカ生研株式会社 鏡田工場内
		(72) 発明者	平山 吉朗 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デ ンカ生研株式会社 鏡田工場内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】尿を変性剤で前処理することによる免疫測定系の感度を上げる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

尿検体中の尿中濃度が低いタンパク質であるメガリンを測定する免疫測定方法であって、システイン若しくはペニシラミンと尿素若しくはn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)を尿検体に混合することにより尿検体を前処理して免疫測定を行い、前記タンパク質の測定感度を向上させる、免疫測定方法。

【請求項2】

0.0625~16mMの濃度のシステイン若しくは0.0625~64mMの濃度のペニシラミンと5~320mMの濃度の尿素若しくは1.43~5.74mMの濃度のn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)を尿検体に混合することにより尿検体を前処理して免疫測定を行う、請求項1記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、尿を前処理することにより免疫測定系の感度を上げる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

尿中にあるタンパク質の測定はさまざまな疾患及び病状の診断に有用である。しかし、これらのタンパク質を測定する時には緩衝液で高度に希釈して測定に用いていた。ところが最近注目を集めているタンパク質のなかには、尿中濃度が低いために従来のように高度

に希釈したのでは検出が困難なものがある。

【 0 0 0 3 】

腎疾患に関連している物質として尿中のメガリンがあり、尿中メガリンを測定することによる、簡便な腎障害の検査手段が開示されている（特許文献 1 及び 2）。

【 0 0 0 4 】

Glycoprotein330(gp330)あるいはLow Density Lipoprotein(LDL)-receptor relate protein 2(LRP2)としても知られるメガリン(Megalin)は、腎臓の近位尿細管上皮細胞に発現する分子量が約600kDaの糖タンパク質である（非特許文献 1 及び 2）。

【 0 0 0 5 】

メガリンは腎臓の近位尿細管上皮細胞を用いた細胞培養実験において、膜結合型の完全長メガリンと、細胞内領域を欠いたSoluble-Form（細胞外領域含有フラグメント）の二種類が存在していることが知られており（非特許文献 3）、尿中の完全長ヒトメガリン、細胞外領域、細胞内領域を測定する方法も報告されている（特許文献 3）。

10

【 0 0 0 6 】

尿中メガリン濃度は低濃度であるため高度に希釈すると測定が難しくなるので、高度に希釈せずに測定するか感度を上げて測定する必要がある。高度に希釈せずに測定する方法は既に公知であるが（特許文献 4）、感度を上げる方法は存在しない。感度を上げる方法が開発されれば特許文献 4 の方法と組み合わせることで、より低濃度の尿中タンパク質を検出することが可能となり、病気の早期発見につながり医療経済上有益である。

【 先行技術文献 】

20

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 国際公開 WO 2 0 0 2 / 0 3 7 0 9 9 号

【 特許文献 2 】 国際公開 WO 2 0 1 0 / 1 2 6 0 5 5 号

【 特許文献 3 】 国際公開 WO 2 0 1 0 / 1 2 6 0 4 3 号

【 特許文献 4 】 国際公開 WO 2 0 0 9 / 0 4 1 5 7 7 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Christensen E.L. , Willnow T.E. (1999) J. Am. Soc. Nephrol. 10 , 2224-2236

30

【 非特許文献 2 】 Zheng G , McCluskey R.T. et al. (1994) J. Histochem. Cytochem. 42 , 531-542

【 非特許文献 3 】 Flavia F.J. , Julie R.I. et al. (1998) Kidney. International. 53 , 358-366

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は免疫測定系の感度を上げる方法を提供することを課題とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

40

本発明者らは上記課題を解決するために、尿に還元剤、カオトロピック試薬及び界面活性剤からなる化合物の 1 種又は 2 種を添加し、尿をこれらの化合物を用いて前処理することで免疫測定系の感度、すなわち測定対象物である尿中のタンパク質の測定感度が上がることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[ 1 ] 尿検体中のタンパク質を測定する免疫測定方法であって、変性剤を尿検体に混合することにより尿検体を前処理して免疫測定を行い、前記タンパク質の測定感度を向上させる、免疫測定方法。

[ 2 ] タンパク質が尿中濃度が低いタンパク質である、[ 1 ] の免疫測定方法。

50

- [ 3 ] 変性剤が還元剤である、[ 1 ]又は[ 2 ]の免疫測定方法。
- [ 4 ] 尿検体中に還元剤を0.0127 ~ 64mMの濃度で添加して尿検体の前処理を行う、[ 3 ]の免疫測定方法。
- [ 5 ] 還元剤がグルタチオンである、[ 3 ]又は[ 4 ]の免疫測定方法。
- [ 6 ] 尿検体中にグルタチオンを0.0127 ~ 13mMの濃度で添加して尿検体の前処理を行う、[ 5 ]の免疫測定方法。
- [ 7 ] 還元剤がシステインである、[ 3 ]又は[ 4 ]の免疫測定方法。
- [ 8 ] 尿検体中にシステインを0.0625 ~ 16mMの濃度で添加して尿検体の前処理を行う、[ 7 ]の免疫測定方法。
- [ 9 ] 還元剤がペニシラミンである、[ 3 ]又は[ 4 ]の免疫測定方法。 10
- [ 1 0 ] 尿検体中にペニシラミンを0.0625 ~ 64mMの濃度で添加して尿検体の前処理を行う、[ 9 ]の免疫測定方法。
- [ 1 1 ] 2種類の変性剤を組み合わせて前処理を行なう、[ 1 ]又は[ 2 ]の免疫測定方法。
- [ 1 2 ] 変性剤の組合せが還元剤とカオトロピック試薬である、[ 1 1 ]の免疫測定方法。
- [ 1 3 ] 還元剤がグルタチオンであり、カオトロピック試薬が尿素である、[ 1 2 ]の免疫測定方法。
- [ 1 4 ] 還元剤がシステインであり、カオトロピック試薬が尿素である、[ 1 2 ]の免疫測定方法。
- [ 1 5 ] 還元剤がペニシラミンであり、カオトロピック試薬が尿素である、[ 1 2 ]の免疫測定方法。 20
- [ 1 6 ] 変性剤の組合せが還元剤と界面活性剤である、[ 1 1 ]の免疫測定方法。
- [ 1 7 ] 還元剤がグルタチオンであり、界面活性剤がn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDBS) である、[ 1 6 ]の免疫測定方法。
- [ 1 8 ] 還元剤がシステインであり、界面活性剤がn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDBS) である、[ 1 6 ]の免疫測定方法。
- [ 1 9 ] 還元剤がペニシラミンであり、界面活性剤がn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDBS) である、[ 1 6 ]の免疫測定方法。
- [ 2 0 ] 尿検体中に尿素を5 ~ 320mMの濃度で添加して尿検体の前処理を行う、[ 1 3 ] ~ [ 1 5 ]のいずれかの免疫測定方法。
- [ 2 1 ] 尿検体中にn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDBS) を1.43 ~ 5.74mMの濃度で添加して尿検体の前処理を行う、[ 1 7 ] ~ [ 1 9 ]のいずれかの免疫測定方法。 30
- 【発明の効果】**
- 【 0 0 1 2 】**
- 本発明により、従来の尿検体を用いた免疫測定方法で測定が困難であった低濃度の尿中タンパク質でも測定することが可能となる。
- 【図面の簡単な説明】**
- 【 0 0 1 3 】**
- 【図 1】**還元剤の有無による尿中メガリンの測定値比較の結果を示す図である。
- 【発明を実施するための形態】**
- 【 0 0 1 4 】** 40
- 以下、本発明を詳細に説明する。
- 【 0 0 1 5 】**
- 本発明は尿を前処理することにより、検体として尿を用いて尿中のタンパク質を測定する免疫測定系の測定感度を上げる方法である。
- 【 0 0 1 6 】**
- 検体である尿は、いかなる被験者から得られたものであってもよい。すなわち、健常人から採取した尿も、特定の疾患に罹患している被験者あるいは特定の健康状態にある被験者から採取した尿も対象となり得る。尿の採取方法は問わないが、早朝尿又は随時尿を用いることが好ましい。また、本発明の方法に必要な尿量は10 ~ 200  $\mu$  L程度である。
- 【 0 0 1 7 】** 50

測定する尿中タンパク質として、例えば、メガリン、ポドカリキシン、2-ミクログロブリン、1-ミクログロブリン、N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ、Neutrophil gelatinase-associated lipocalin、Kidney Injury Molecule-1、ミッドカイン、L型脂肪酸結合蛋白、インターロイキン18、IV型コラーゲンなどが挙げられるが、これらに限定するものではなく、今後、発見されるタンパク質であってもよい。

【0018】

これらのタンパク質は、被験者が特定の疾患に罹患しているとき、あるいは被験者が特定の健康状態にあるときに尿中の濃度が上昇するか、又は減少する、特定の疾患や特定の健康状態に関連したタンパク質である。

【0019】

例えば、メガリン、ポドカリキシン、2-ミクログロブリン、1-ミクログロブリン、N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ、Neutrophil gelatinase-associated lipocalin、Kidney Injury Molecule-1、ミッドカイン、L型脂肪酸結合蛋白、インターロイキン18、IV型コラーゲンは腎機能疾患に関連したタンパク質であるため、高感度な測定が可能になれば腎障害を早期に発見することが可能となり患者にとりとても有益である。

【0020】

これらのタンパク質のあるものは、尿中の濃度が低く、通常の免疫測定法では測定感度が低く、測定することが困難である。本発明の方法によれば、尿検体を用いてこれらの尿中で低濃度のタンパク質を免疫測定系により測定する際の測定感度を上げることができ、尿中濃度が低いタンパク質でも正確に定量することができる。

【0021】

本発明の方法で測定感度を上げることができる測定系は、測定対象であるタンパク質に対する抗体を用いた抗原抗体反応を利用した測定系である。

【0022】

尿の前処理は、採取された尿に所望の処理を行うことができる処理液を添加して混合することにより行うことができる。本発明においては、尿検体に処理液を添加して混合し、尿検体あるいは尿検体中の測定対象であるタンパク質を処理液により一定の処理を行うことを尿検体の前処理という。

【0023】

処理としては、尿のpH調整、尿沈渣のマスキング、並びに尿中タンパク質を可溶化又は変性させることが上げられ、処理液としては、尿のpH調整、尿沈渣のマスキング、並びに尿中タンパク質を可溶化又は変性させることが可能な処理液が挙げられる。好ましくは、尿中タンパク質を可溶化又は変性させることが可能な処理液を用いる。

【0024】

このような処理液として、緩衝液に、変性剤を添加した溶液が例示される。緩衝液は、通常免疫測定に用いられる緩衝液を用いることができ、pH6~9程度のリン酸緩衝液、トリス緩衝液等を用いればよい。

【0025】

本発明において、変性剤は、タンパク質を変性させ、あるいはタンパク質を可溶化する化合物であり、界面活性剤、カオトロピック試薬及び還元剤を含む。

【0026】

界面活性剤としては、陰イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤が挙げられるが、陰イオン系界面活性剤を用いることが好ましい。具体的には、例えば、カルボン酸型、スルホン酸型、硫酸エステル型、リン酸エステル型が挙げられる。さらに具体的にはn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、オクタタン酸ナトリウム、デカン酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、ミリスチン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ペルフルオロノナン酸、N-ラウロイルサルコシナトリウム、アルファスルホ脂肪酸メチルエステル塩、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、1-オクタンスルホン酸ナトリウム、1-デカンスルホン酸ナトリウム、1-ドデカンスルホン酸ナトリウム、ペルフルオロブタ

10

20

30

40

50

ンスルホン酸、トルエンスルホン酸ナトリウム、クメンズルホン酸ナトリウム、オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ナフタレンズルホン酸ナトリウム、ナフタレンジスルホン酸二ナトリウム、ナフタレントリスルホン酸三ナトリウム、ブチルナフタレンズルホン酸ナトリウム、ミリスチル硫酸ナトリウム、ラウレス硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルフェノールズルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸アンモニウム、ラウリルリン酸、ラウリルリン酸ナトリウム、ラウリルリン酸カリウム等が挙げられる。

【0027】

カオトロピック試薬とは、疎水性分子の水溶性を増加させ、疎水性相互作用を低下させる物質をいう。カオトロピック試薬としては、チオシアン酸グアニジン、過塩素酸ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム、グアニジン塩酸塩、尿素、ヨウ化物イオンなどが挙げられるが公知のものであればいかなるものでもよい。

10

【0028】

還元剤としては、グルタチオン、システイン、ペニシラミン、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、アミノエタンチオール、メルカプトプロパンスルホン酸、メルカプトコハク酸、チオ乳酸、メルカプトピリミジン、メルカプトエタノール、ジチオトレイトールなど挙げられるが公知のものであればいかなるものでもよい。

【0029】

また、上記の変性剤は1種類で使用しても、2種類以上を組み合わせで使用してもよい。例えば、少なくとも1種類の還元剤と少なくとも1種類のカオトロピック試薬の組合せ、少なくとも1種類の還元剤と少なくとも1種類の界面活性剤の組合せ、少なくとも1種類のカオトロピック試薬と少なくとも1種類の界面活性剤の組合せが挙げられる。また、2種類以上の還元剤のみ、2種類以上のカオトロピック試薬のみ、2種類以上の界面活性剤のみを用いてもよい。

20

【0030】

界面活性剤、カオトロピック試薬及び還元剤の尿検体に処理液として添加したときの尿検体中の最終濃度は適宜決定することができるが、例えば、0.01~500mMの範囲で決定すればよい。変性剤が還元剤の場合、例えば、0.0127~64mMの濃度で添加すればよい。

【0031】

また、界面活性剤、カオトロピック試薬及び還元剤として用いる具体的な物質についての濃度、具体的な組合せと濃度は以下のとおりである。変性剤として、還元剤であるグルタチオンを用いた場合は、尿中の濃度が0.01~20mM、好ましくは0.01~15mM、さらに好ましくは0.01~13mM、特に好ましくは0.0127~13mMである。変性剤として、還元剤であるシステインを用いた場合は、尿中の濃度が0.05~25mM、好ましくは0.05~20mM、さらに好ましくは0.01~16mM、特に好ましくは0.0625~16mMである。変性剤として、還元剤であるペニシラミンを用いた場合は、尿中の濃度が0.05~100mM、好ましくは0.05~75mM、さらに好ましくは0.05~64mM、特に好ましくは0.0625~64mMである。

30

【0032】

また、上記の還元剤とカオトロピック試薬である尿素又は界面活性剤であるn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)を組合せて用いる場合、上記の濃度範囲の還元剤に、例えば、1~1000mM、好ましくは5~500mM、さらに好ましくは5~320mMの尿素を組合せて用いることができ、あるいは上記の濃度範囲の還元剤に、0.5~20mM、好ましくは1~10mM、さらに好ましくは1.43~5.74mMのSDBSを組合せて用いることができる。

40

【0033】

具体的な処理液としては、例えば400mM Tris-HCl (pH8.0)に、40mM EDTA、2% (Vol./Vol.) TritonX-100、1.625mM グルタチオンを含む溶液が例示される。このような処理液を、等量の尿検体に添加して混合することにより、尿試料溶液を得ることが可能である。例えば、処理液50 $\mu$ Lを、尿検体50 $\mu$ Lに添加して混合して用いればよい。

【0034】

尿検体を上記の変性剤で処理することにより、測定しようとする尿中の抗原タンパク質の物理化学的特性が変化し、該タンパク質に対する抗体との接触頻度が上がり、抗原抗体

50

反応が促進される。また、上記の変性剤で処理することにより、非特異的な結合を低下させることもできる。この結果、尿中のタンパク質の測定感度を上げることができる。ここで、尿中のタンパク質の測定感度を上げるとは、免疫測定系における該タンパク質の存在に基づいて発せられるシグナルの強度を上げることという。また、同時にバックグラウンドのシグナルを低下させ、結果的に前記タンパク質の存在に基づいて発せられるシグナルの強度を上げることを含む。免疫測定系では、標識物質で標識した抗体を測定対象である抗原タンパク質と結合させ、標識物質から発せられるシグナルを測定して、抗体と結合したタンパク質を検出することにより、試料中に存在する抗原タンパク質を測定する。シグナルとは、このような標識物質から発せられるシグナルをいう。標識物質としては、蛍光物質、酵素、重金属、放射性同位元素等が挙げられる。

10

**【0035】**

本発明は、尿検体中のタンパク質を測定する免疫測定方法であり、変性剤を尿検体に混合することにより尿検体を前処理して免疫測定を行い、前記タンパク質の測定感度を向上させる、免疫測定方法であり、また、尿検体中のタンパク質を測定する免疫測定方法において、変性剤を尿検体に混合することにより尿検体を前処理して免疫測定を行うことにより、免疫測定系の感度、すなわち、タンパク質の測定感度を上げる方法でもある。

**【0036】**

以下、測定するタンパク質がメガリンである場合の測定方法について詳述する。他のいかなるタンパク質もメガリン測定法に基づいて、測定することができる。

**【0037】**

尿試料溶液からメガリンを検出する方法は様々な方法が考えられる。メガリンの検出方法の一例として、免疫学的手法が挙げられる。免疫学的手法は、例えば、免疫染色法（蛍光抗体法、酵素抗体法、重金属標識抗体法、放射性同位元素標識抗体法を含む）、電気泳動法による分離と蛍光、酵素、放射性同位元素などによる検出方法とを組み合わせた方法（ウエスタンブロット法、蛍光二次元電気泳動法を含む）、酵素免疫測定吸着法（ELISA）、ドット・プロット法、ラテックス凝集法（LA：Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay）、イムノクロマト法などにより行うことができるが、ELISA法またはLA法を用いることが好ましい。定量性の観点からELISA法のうちサンドイッチ法を用いることが好ましい。サンドイッチ法では、抗メガリン抗体を固相化したマイクロタイタープレートに尿試料溶液を添加し、抗原・抗体反応をさせ、さらに酵素標識した抗メガリン抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して尿中のメガリンを検出すると共に、その測定値から尿中メガリン濃度を算出することができる。また、蛍光標識した抗メガリン抗体を用いて、抗原・抗体反応をさせた後に蛍光を測定してもよい。

20

30

**【0038】**

免疫学的手法において用いられる抗メガリン抗体は、ヒトメガリンを検出し得る抗体であればよい。本発明において用いられる抗メガリン抗体は、公知のものであってもよく、また今後開発される抗体であってもよい。特に限定されないが、抗メガリン抗体として、例えばモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でもよく、キメラ抗体やヒト化抗体、あるいはこれらの結合活性断片などが挙げられる。これらの抗体は酵素や蛍光色素で標識化されていてもよい。また、2種類以上の抗メガリン抗体を用いてもよい。2種類以上の抗メガリン抗体は、上記のサンドイッチ法に用いられ、互いに異なるエピトープを認識する抗体であることが好ましい。

40

**【実施例】****【0039】**

以下に本発明の実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

**【0040】**

（実施例1）還元剤の有無による尿中メガリン測定感度の比較

50

## (1) 非還元処理尿を用いた尿中メガリンの測定法

ヒトメガリン細胞外領域に対するモノクローナル抗体(抗細胞外領域メガリンモノクローナル抗体)を用いてヒトメガリン細胞外領域を含有するフラグメント(細胞外領域メガリン)を測定した。抗細胞外領域メガリンモノクローナル抗体とは、配列番号2に示すアミノ酸配列の配列番号26番目のアミノ酸から314番目のアミノ酸の間の領域(LBD1)に存在するエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体である。LBD1中の異なる二つのエピトープを認識する抗ヒトメガリンLBD1モノクローナル抗体Aと抗ヒトメガリンLBD1モノクローナル抗体Bを用いて測定評価した。抗ヒトメガリンLBD1モノクローナル抗体A固相化マイクロタイタープレートと、ALP標識化抗ヒトメガリンLBD1モノクローナル抗体Bを用いて、尿中のヒトメガリン細胞外領域含有フラグメントを測定した。先ず、尿50 $\mu$ Lと

10 処理液A(400mM Tris-HCl, 40mM Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid(以下、Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acidをEDTAと略す), 2%(vol./vol.) Polyethylene Glycol Mono-p-isooctylphenyl Ether(以下、Polyethylene Glycol Mono-p-isooctylphenyl EtherをTriton X-100と称する)、pH8.0溶液)50 $\mu$ Lを混合し、該混合液100 $\mu$ Lを抗ヒトメガリンLBD1モノクローナル抗体A固相化マイクロタイタープレート(FluoroNunc(商標) Module F16 Black-Maxisorp(商標) Surface plate, Nalge Nunc International社製)のウェルへ加えた。37 $^{\circ}$ Cで1時間放置し、その後、ウェルに加えておいた尿サンプル溶液をデカンテーションにより除去し、そのマイクロタイタープレートのウェルへ、TBS-Tを200 $\mu$ L/ウェルで添加し、デカンテーションによるTBS-Tの除去を行い、洗浄を行った。この洗浄工程を計3回行った。その後、ALP標識化抗ヒトメガリンLBD1モノクロー

20 ナル抗体B(0.5ng/mL)溶液を100 $\mu$ L/ウェルで加えた。ALP標識化抗ヒトメガリンLBD1モノクローナル抗体Bは標識抗体希釈液にて調製した。37 $^{\circ}$ Cで1時間放置し、その後、ウェルに加えておいたALP標識化抗体溶液をデカンテーションにより除去し、そのマイクロタイタープレートのウェルへ、TBS-Tを200 $\mu$ L/ウェルで添加し、デカンテーションによるTBS-Tの除去を行い、洗浄を行った。この洗浄工程を計4回行った。その後、そのマイクロタイタープレートのウェルへ、Assay Bufferを200 $\mu$ L/ウェルで添加し、デカンテーションによるAssay Bufferの除去を行い、洗浄を行った。この洗浄工程を計2回行った。次に、ウェルへCDP-Star(登録商標) Chemiluminescent Substrate for Alkaline Phosphatase Ready-to-Use(0.4mM) with Emerald-II(商標) Enhancer(ELISA-Light(商標) System: Applied Biosystems社製)をALP酵素反応基質溶液として、100 $\mu$ L/ウェルで加え、37 $^{\circ}$ C、30分

30 遮光放置した。その後直ちに、本ウェルの1秒間の積算発光強度を測定し、測定値を尿中メガリンの測定評価の指標とした。化学発光強度の測定には、Microplate Luminometer Centro LB960とMicroWin2000 software(Berthold社製)を用いた。

【0041】

## (2) 還元剤を含む処理液で処理した尿を用いた尿中メガリンの測定法

上記の処理液Aに1.625mMグルタチオンを含む処理液を処理液B、上記の処理液Aに2mMシステインを含む処理液を処理液C、上記の処理液Aに2mMペニシラミンを含む処理液を処理液Dとした。処理液B、C又はD 50 $\mu$ Lと尿検体50 $\mu$ Lを混合した混合液を尿試料溶液として尿中メガリンを測定した。測定方法は実施例1に従って行った。

【0042】

## (3) 還元剤の有無による尿中メガリンの測定感度の比較

尿検体として、健常人2例由来の尿検体を用いて上記(1)及び(2)の方法で尿中メガリンを測定し、還元剤の有無での尿中メガリン測定値の比較を行った。その結果を図1に示す。図1中、縦軸はRLU(Relative Light Unit)を示す。図1より還元剤を使用することで尿中メガリンの測定感度が上がることが分かった。つまり、還元剤を使用することで測定感度を上げることが可能となり、低濃度の尿中メガリンの測定が可能となる。

【0043】

## (実施例2) 還元剤の有効濃度の検討

健常人2例(検体A及び検体B)を用いて実施例1で使用した還元剤の有効濃度を検討した。還元剤はグルタチオン:0~13mM、システイン:0~16mM、ペニシラミン:0~64mMの

10

20

30

40

50

範囲で検討した。グルタチオン、システイン及びペニシラミンについての結果を、それぞれ表1、2及び3に示す。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

表 1 グルタチオンの有効濃度検討

尿中の終濃度 (mM)	検体 A	検体 B
	RLU	
0.0000	4662	1569
0.0127	5037	1689
0.0325	6435	2027
0.0507	9200	3974
0.0650	12410	3391
0.0975	19913	5113
0.1300	28973	7799
0.1625	33784	9113
0.1950	39771	10327
0.2031	70692	17162
0.8125	68211	15401
3.2500	35390	14563
13.0000	6329	6138

10

20

【 0 0 4 5 】

【表 2】

表 2 システインの有効濃度検討

尿中の終濃度 (mM)	検体 A	検体 B
	RLU	
0	4662	1569
0.0625	7219	2590
0.0750	7533	2434
0.1000	11372	4121
0.1250	14220	6171
0.1500	19778	8339
0.1750	29880	10088
0.2000	33934	9851
0.2250	42210	11102
0.2500	85447	20045
1.0000	66844	16103
4.0000	40183	12023
16.0000	10117	7002

30

40

【 0 0 4 6 】

50

【表3】

表3 ペニシラミンの有効濃度検討

尿中の終濃度 (mM)	検体 A	検体 B
	RLU	
0	4662	1569
0.0625	6710	2026
0.0750	7069	2442
0.1000	9667	3599
0.1250	13138	4094
0.1500	16949	5029
0.1750	22244	6902
0.2000	25704	7819
0.2250	32720	8321
0.2500	58711	16323
1.0000	56122	16901
4.0000	46086	15100
16.0000	25281	10903
64.0000	11352	5596

10

20

## 【0047】

表1よりグルタチオン濃度が0.0127～13mM、表2よりシステイン濃度が0.0625～16mM、表3よりペニシラミン濃度が0.0625～64mMの範囲で、還元処理した尿を用いた尿中メガリン測定において、非還元処理尿における尿中メガリン測定より感度が上がることが分かった。

## 【0048】

(実施例3) 還元剤とカオトロピック試薬を組み合わせた処理液の測定感度に対する効果

30

(1) 還元剤と尿素を組み合わせた処理液で処理した尿を用いた尿中メガリン測定

実施例1(2)の還元剤として1.625mMグルタチオンを含む処理液Bに、さらに640mM尿素を含む処理液を処理液E、実施例1(2)の還元剤として2mMシステインを含む処理液Cに、さらに640mM尿素を含む処理液を処理液F、実施例1(2)の還元剤として2mMペニシラミンを含む処理液Dに、さらに640mM尿素を含む処理液を処理液Gとした。処理液E、F又はG 50 $\mu$ Lと尿50 $\mu$ Lを混合した混合液を尿試料溶液として尿中メガリンを測定した。測定方法は実施例1に従って行った。

## 【0049】

(2) 還元剤と界面活性剤であるn-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)を組み合わせた処理液で処理した尿を用いた尿中メガリン測定

40

実施例1(2)の還元剤として1.625mMグルタチオンを含む処理液Bに、さらに2.87mM SDBSを含む処理液を処理液H、実施例1(2)の還元剤として2mMシステインを含む処理液Cに、さらに2.87mM SDBSを含む処理液を処理液I、実施例1(2)の還元剤として2mMペニシラミンを含む処理液D、さらに2.87mM SDBSを含む処理液を処理液Jとした。処理液H、I又はJ 50 $\mu$ Lと尿50 $\mu$ Lを混合した混合液を尿試料溶液として尿中メガリンを測定した。測定方法は実施例1に従って行った。

## 【0050】

(3) カオトロピック試薬又は界面活性剤を含む処理液で処理した尿を用いた尿中メガリン測定

50

実施例1(1)の処理液Aにカオトロピック試薬である640mM尿素を含む処理液を処理液K、実施例1(1)の処理液Aに界面活性剤である2.87mM SDBSを含む処理液を処理液Lとした。処理液K又はL 50  $\mu$ Lと尿検体50  $\mu$ Lを混合した混合液を尿試料溶液として尿中メガリンを測定した。測定方法は実施例1に従って行った。

【0051】

(4) 還元剤とカオトロピック試薬又は界面活性剤を組み合わせた処理液の効果

尿検体として、健常人1例由来の尿検体を用いて実施例1(1)及び実施例3(1)~(3)の方法で尿中メガリンを測定し、還元剤とカオトロピック試薬である尿素又は界面活性剤であるSDBSを組み合わせた処理液の効果を検討した。表4、5、6、7、8及び9に、それぞれ、グルタチオンと尿素を組み合わせた処理液を用いた場合、システインと尿素を組み合わせた処理液を用いた場合、ペニシラミンと尿素を組み合わせた処理液を用いた場合、グルタチオンとSDBSを組み合わせた処理液を用いた場合、システインとSDBSを組み合わせた処理液を用いた場合、及びペニシラミンとSDBSを組み合わせた処理液を用いた場合の効果を示す。表4~9より、還元剤、カオトロピック試薬又は界面活性剤のいずれか1種類を含む処理液よりも、還元剤とカオトロピック試薬又は界面活性剤の両方を含む処理液を用いる事により測定感度が上がるのが分かった。つまり、還元剤とカオトロピック試薬又は界面活性剤の両方を含む処理液を使用することで測定感度を上げることが可能となり、低濃度の尿中メガリンの測定が可能となる。

【0052】

【表4】

表4 グルタチオンと尿素を組み合わせた処理液の効果検討

	RLU
還元剤、尿素未添加	6354
尿素	6480
グルタチオン	35594
グルタチオン+尿素	40737

【0053】

【表5】

表5 システインと尿素を組み合わせた処理液の効果検討

	RLU
還元剤、尿素未添加	6354
尿素	6480
システイン	35161
システイン+尿素	45544

【0054】

## 【表 6】

表 6 ペニシラミンと尿素を組み合わせた処理液の効果検討

	RLU
還元剤、尿素未添加	6354
尿素	6480
ペニシラミン	35996
ペニシラミン+尿素	52485

10

## 【 0 0 5 5 】

## 【表 7】

表 7 グルタチオンと SDBS を組み合わせた処理液の効果検討

	RLU
還元剤と SDBS 未添加	6354
SDBS	7751
グルタチオン	35594
グルタチオン+SDBS	42353

20

## 【 0 0 5 6 】

## 【表 8】

表 8 システインと SDBS を組み合わせた処理液の効果検討

	RLU
還元剤、SDBS 未添加	6354
SDBS	7751
システイン	35161
システイン+SDBS	46735

30

## 【 0 0 5 7 】

## 【表 9】

表 9 ペニシラミンと SDBS を組み合わせた処理液の効果検討

	RLU
還元剤、SDBS 未添加	6354
SDBS	7751
ペニシラミン	35996
ペニシラミン+SDBS	50733

40

## 【 0 0 5 8 】

(実施例 4) 還元剤とカオトロピック試薬又は界面活性剤を組み合わせたときのカオトロピック試薬又は界面活性剤の有効濃度検討

尿検体として、健常人1例由来の尿検体を用いて実施例 3 (1)、(2)で使用したカオトロピック試薬又は界面活性剤の有効濃度の検討を行った。尿検体中の還元剤濃度は、グルタチオンが0.8125mM、システインが1mM、ペニシラミンが1mMであった。尿検体中のカオトロピック試薬である尿素又は界面活性剤であるSDBS濃度は尿素：0～320mM、SDBS：0～5.74m

50

Mの範囲で検討した。その結果を表10及び11に示す。表10より還元剤存在下で、尿素濃度が5～320mM、表11よりSDBS濃度が1.43～5.74mMの範囲で、還元剤とカオトロピック試薬又は界面活性剤を組合せて尿を処理して、尿中メガリンを測定することにより、還元剤のみで尿を処理して尿中メガリン測定を行うよりも測定感度が上がることが分かった。

【 0 0 5 9 】

【表 1 0】

表 10 尿素と還元剤を組み合わせたときの尿素の有効濃度検討

尿素(mM)	尿素+還元剤		
	グルタチオン	システイン	ペニシラミン
	RLU		
0	35594	35161	35996
5	36887	38541	49170
20	38649	41687	47767
80	38598	41936	42532
160	39081	40313	41831
320	40737	45544	52485

10

20

【 0 0 6 0 】

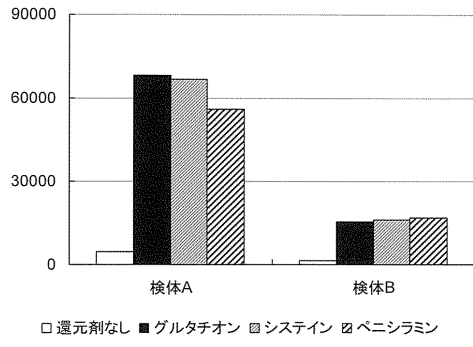
【表 1 1】

表 11 SDBS と還元剤を組み合わせたときの SDBS の有効濃度検討

SDBS(mM)	SDBS+還元剤		
	グルタチオン	システイン	ペニシラミン
	RLU		
0	35594	35161	35996
1.43	42353	46735	50733
5.74	40512	42916	48650

30

【図1】



【配列表】

000609115800001.app

---

フロントページの続き

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開平07 - 027764 (JP, A)  
特開2001 - 289850 (JP, A)  
特開2001 - 124779 (JP, A)  
特開2004 - 239885 (JP, A)  
国際公開第02 / 037099 (WO, A1)  
国際公開第2009 / 041577 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33 / 48 - 33 / 98  
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	一种通过用变性剂预处理尿液来增加免疫测定系统灵敏度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6091158B2</a>	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	JP2012233891	申请日	2012-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
[标]发明人	黒澤寛之 平山吉朗		
发明人	黒澤 寛之 平山 吉朗		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N2333/705 G01N33/6893		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.D		
其他公开文献	JP2014085208A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：提供一种提高尿样中蛋白质免疫分析灵敏度的方法。溶液：将一种或两种由还原剂，离液剂和表面活性剂制成的化合物作为变性剂添加到尿液样本中。通过使用这些化合物预处理尿液样本，免疫测定系统的灵敏度，即作为测量对象的尿液中蛋白质的测量灵敏度得到改善。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6091158号 (P6091158)
(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)		(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)
(51) Int. Cl. G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)	F I G O 1 N 33/531 B G O 1 N 33/53 D	
請求項の数 2 (全 14 頁)		
(21) 出願番号 特願2012-233891 (P2012-233891)	(73) 特許権者 591125371 デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号	
(22) 出願日 平成24年10月23日(2012.10.23)	(74) 代理人 100091086 弁理士 平木 祐輔	
(65) 公開番号 特開2014-85208 (P2014-85208A)	(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 郎	
(43) 公開日 平成26年5月12日(2014.5.12)	(74) 代理人 100111741 弁理士 田中 夏夫	
審査請求日 平成27年4月17日(2015.4.17)	(72) 発明者 黒澤 寛之 新潟県五泉市木越字糠田1359-1 デンカ生研株式会社 糠田工場内	
	(72) 発明者 平山 吉朗 新潟県五泉市木越字糠田1359-1 デンカ生研株式会社 糠田工場内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 尿を変性剤で前処理することによる免疫測定系の感度を上げる方法		