

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5541747号
(P5541747)

(45) 発行日 平成26年7月9日(2014.7.9)

(24) 登録日 平成26年5月16日(2014.5.16)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 J
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B
	GO 1 N 33/53 A

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2012-68667 (P2012-68667)	(73) 特許権者	591122956 株式会社 L S I メディエンス 東京都千代田区内神田一丁目 1 3 番 4 号
(22) 出願日	平成24年3月26日 (2012. 3. 26)	(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(65) 公開番号	特開2013-200208 (P2013-200208A)	(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(43) 公開日	平成25年10月3日 (2013. 10. 3)	(72) 発明者	荒井 望 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学 メディエンス株式会社内
審査請求日	平成25年11月7日 (2013. 11. 7)	(72) 発明者	庄司 慶一 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学 メディエンス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低分子の免疫学的測定方法及びキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質を分解することが可能な非特異反応抑制物質を用いることを特徴とする、低分子の免疫学的測定方法。

【請求項 2】

前記低分子がハプテンである、請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】

前記非特異反応抑制物質がリパーゼ類である、請求項 1 又は 2 に記載の測定方法。

【請求項 4】

前記非特異反応抑制物質が、肝臓由来リパーゼ、非肝臓由来リパーゼ、リポプロテインリパーゼ、ホルモン感受性リパーゼ、及びホスホリパーゼからなる群から選んだ少なくとも 1 つのリパーゼである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 5】

脂質を分解することが可能な非特異反応抑制物質を含有する、低分子の免疫学的測定キット。

【請求項 6】

前記低分子がハプテンである、請求項 5 に記載の測定キット。

【請求項 7】

前記非特異反応抑制物質がリパーゼ類である、請求項 5 又は 6 に記載の測定キット。

【請求項 8】

10

20

前記非特異反応抑制物質が、肝臓由来リパーゼ、非肝臓由来リパーゼ、リポプロテインリパーゼ、ホルモン感受性リパーゼ、及びホスホリパーゼからなる群から選んだ少なくとも1つのリパーゼである、請求項5～7のいずれか一項に記載の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低分子の高精度な免疫学的測定法及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

血液中の低分子（例えば、ハプテンなど）はその大部分が特異的、非特異的にタンパク質・脂質などに結合していることが知られている。また、低分子は、容器にも非特異的に結合することが知られているため、低分子の総量を正確に精度良く測定するためには低分子を特異的、非特異的結合から遊離する必要があった（特許文献1）。特に低分子が甲状腺ホルモン、ステロイドホルモンの場合はそれぞれ代表的な結合タンパク質が存在し、甲状腺ホルモンの場合はサイロキシン・バインディンググロブリンに、ステロイドホルモンの場合はアルブミンもしくはセックスホルモン・バインディンググロブリンに結合していることが知られている（非特許文献1）。従来知られている低分子の特異的結合阻害剤は、コルチゾールの免疫測定法におけるグルタミン酸溶液（特許文献2）、8-アニリノ1-ナフタレンスルホン酸（ANS）あるいはその塩（特許文献3）、ステロイドホルモン測定方法における測定外ステロイドの共存（特許文献4）やサリチル酸（特許文献5）などが報告されている。一方、非特異的結合阻害剤として低分子の測定法における疎水性アミノ酸（特許文献6）なども報告されている。

10

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開平7-270412号公報

【特許文献2】特開昭53-101521号公報

【特許文献3】特開昭61-12547号公報

【特許文献4】特開平6-102275号公報

【特許文献5】特開平6-34636号公報

30

【特許文献6】特開平7-270412号公報

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】日本臨床42巻11号（11, 1984）31-36

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者らは、臨床検体の低分子の免疫学的測定法において、低分子に結合する脂質類が測定に負あるいは正の影響を与えてしまい、正確に測定できないことに気がついた。本発明はこの問題に鑑みてなされたものであり、本発明の課題は、特に低分子の脂質に対する非特異反応抑制物質（結合阻害物質）を開発し、低分子の免疫学的測定法において検体中の低分子の濃度を正確に測定する方法及びキットを提供するものである。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記のような課題に鑑みて鋭意検討を重ねた結果、脂質の低分子に対する非特異反応を、脂質を分解することが可能な非特異反応抑制物質（結合阻害物質）によって抑制できることを発見し、低分子の免疫学的測定法において検体中の低分子の濃度を正確に測定する方法及びキットを見出した。

本発明はこの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0007】

50

すなわち、本発明は

〔 1 〕 脂質を分解することが可能な非特異反応抑制物質を用いることを特徴とする、低分子の免疫学的測定方法、

〔 2 〕 前記低分子がハプテンである、〔 1 〕の測定方法、

〔 3 〕 前記非特異反応抑制物質がリパーゼ類である、〔 1 〕又は〔 2 〕の測定方法、

〔 4 〕 前記非特異反応抑制物質が、肝臓由来リパーゼ、非肝臓由来リパーゼ、リポプロテインリパーゼ、ホルモン感受性リパーゼ、及びホスホリパーゼからなる群から選んだ少なくとも1つのリパーゼである、〔 1 〕～〔 3 〕のいずれかの測定方法、

〔 5 〕 脂質を分解することが可能な非特異反応抑制物質を含有する、低分子の免疫学的測定キット、

10

〔 6 〕 前記低分子がハプテンである、〔 5 〕の測定キット、

〔 7 〕 前記非特異反応抑制物質がリパーゼ類である、〔 5 〕又は〔 6 〕の測定キット、

〔 8 〕 前記非特異反応抑制物質が、肝臓由来リパーゼ、非肝臓由来リパーゼ、リポプロテインリパーゼ、ホルモン感受性リパーゼ、及びホスホリパーゼからなる群から選んだ少なくとも1つのリパーゼである、〔 5 〕～〔 7 〕のいずれかの測定キット、

に関する。

【発明の効果】

【 0 0 0 8 〕

本発明の低分子の免疫学的測定方法及びキットによれば、脂質、中でも単純脂質、好ましくは中性脂肪の影響を回避し、安定して正確に検体中の低分子を測定することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 〕

【図 1】臨床検体におけるリパーゼ添加の効果を示すグラフである。横軸はリパーゼを添加有りの場合の検体測定値を、縦軸はリパーゼを添加無の場合の検体測定値を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 〕

以下、本発明を更に詳細に説明するが、以下の説明は、本発明の実施態様の代表例であり、本発明はこれらの内容のみに特定されるものではない。

本明細書における「低分子」とは、ハプテンなど、臨床検体中に混入している分子量 1 万以下、好ましくは 1 0 0 0 以下の物質である。ハプテンなどのように生体由来の成分やその類似物質、医薬品などのように治療のために生体内に取り入れられるような物質も意味する。

30

【 0 0 1 1 〕

例えば、前記「ハプテン」とは、分子量 1 万以下の低分子のうち、単独ではヒトあるいは動物に対し抗体産生を惹起させるのは困難だが、タンパク質等の高分子物質と結合することにより抗体産生を惹起しうる物質を指す。さらに、高分子に結合した状態における構造的に該当する部位を指す場合もある。臨床検査でハプテンとして測定されるものの例を挙げると、甲状腺ホルモン、ステロイド、アドレナリン等の低分子ホルモン、ガストリン、パソプレシン、アンジオテンシン等の小ペプチドホルモン、ビタミン類、各種合成薬剤

40

【 0 0 1 2 〕

上記の「高分子」とは、ハプテンと異なり、単独で抗体産生を惹起できる抗原性を有する分子量 5 0 0 0 以上の物質で、分子内にハプテン分子を含有するか、或いは化学的にハプテン分子を結合しうる官能基を有する必要がある。通常ウシ血清アルブミン、ウマフェリチンのようなタンパク質あるいはポリリジンのような、分子量数万から数十万で水溶性に優れ、官能基に富む物質が用いられる。

【 0 0 1 3 〕

本発明で用いることのできる「ハプテンに対する類似物質（アナログ体）」とは、例えば、ステロイドに対しては、ステロイド骨格を有する該ステロイドの類似物質であればよ

50

く、例えば、エストラジオールに対しては、アルドステロン、アンドロステンジオン、コルチゾール、コルチゾン、DHEA-S、17-エストラジオール、17-エストラジオール-3-グルクロニド-17-硫酸塩、17-エストラジオール-3-D-グルクロニド、17-エストラジオール-17-D-グルクロニド、17-エストラジオール-3-硫酸塩、5-アンドロステン-3, 17-ジオール、17-エストラジオール-17-プロピオン酸塩、17-エストラジオール-3-硫酸-17-グルクロニド、17-エストラジオール-17-吉草酸塩、エストリオール、エストリオール-3-硫酸塩、エストリオール-3-グルクロニド、エチステロン、ノルエチンドロン酢酸塩、17-エチニル-エストラジオール、エストロン、エストロン-D-グルクロニド、エストロン-3-硫酸塩、エストロン-3-グルクロニド、エストロン-3-硫酸塩、プレグネロン、2-メトキシ-エストラジオール、クロミフェン、プレドニゾロン、ダナゾール、メステロロン、d-エキレニン、エキリン、ノルゲストレル、プロゲステロン、塩酸ラロキシフェン、タモキシフェンクエン酸塩、テストステロン、5-ジヒドロテストステロン、5-アンドロステン-3, 17-ジオールなどが挙げられる。上記で挙げた以外でも、当業者であれば該ステロイドの物質を合成したり購入することで入手することができる。

【0014】

本発明において使用される検体としては、例えば全血、血清、血漿等の体液や尿、糞便抽出液等が挙げられる。

【0015】

本発明の測定方法は、脂質を分解することが可能な非特異反応抑制物質を用いること以外は、公知の免疫学的測定法に従って実施することができる。

免疫学的測定法としては、一元放射免疫拡散法、比濁法、比ろう法、凝集法、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法等があるが、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法は測定感度も高く、特に極微量成分の測定に好適である。

放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法はそれぞれ放射性物質、酵素、蛍光物質を、標的物質に特異的に反応する抗体に結合した標識抗体を用いる方法で、一般的には、抗体や抗原を不溶性担体に結合した固相化抗体または固相化抗原と組み合わせた固相法で使用される。固相法には「固相化抗体-抗原-標識抗体」複合物を作らせ測定するサンドイッチ法や、固相化抗原と検体中の遊離抗原が反応系内に添加された一定量の標識抗体に対して競合的に反応することを原理とする競合法がある。

【0016】

本発明の測定原理は上述した免疫学的測定方法を使用することができる。

該免疫学的測定方法に使用可能な抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、抗体を産生する任意の動物種、例えば家兎、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウスまたはラットなど由来の抗体が使用できる。

また、使用可能な抗体としては完全抗体や、それを酵素処理や化学処理により切断した $F(a b')_2$ や $F a b'$ 等のような抗体断片が挙げられる。

【0017】

「固相化抗体-抗原-標識抗体」複合物を作らせ測定するサンドイッチ法の場合、これらの抗体は、固相担体あるいは標識物質に固定化される。固相担体としては、マイクロタイタープレート、試験管、ビーズ、粒子、ナノ粒子、膜などが挙げられる。粒子としては、磁性粒子、ポリスチレンラテックスのような疎水性粒子、粒子表面にアミノ基、カルボキシル基などの親水基を有する共重合ラテックス粒子、赤血球、ゼラチン粒子などが挙げられる。中でも、迅速簡便なB/F分離を実現する観点においては磁性粒子が特に好ましく、具体的には、例えば、四酸化三鉄 (Fe_3O_4)、三酸化二鉄 (Fe_2O_3)、種々のフェライト、鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属、コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金からなる微粒子等の磁性粒子が好ましく用いられる。また、これらの磁性粒子を、ポリスチレン等の高分子のラテックスや、ゼラチン、リポソーム等の内部に含まれる形で調製したり、表面に固定化したりしたものを好ましく用いることがで

10

20

30

40

50

きる。膜としては、ニトロセルロース膜、セルロース濾紙、ナイロン膜などが挙げられ、イムノクロマトグラフィーなどを原理とする簡易測定キットの試験片にも使用することも可能である。

【0018】

該免疫学的測定方法に使用可能な標識物質としては、例えば、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性同位元素、発色物質、不溶性粒状物質、などが挙げられる。該標識用の酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、西洋わさびペルオキシターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。蛍光物質としては、フルオレッセイン誘導体（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC））、ローダミン誘導体、グリーン蛍光タンパク質（GFP）、ルシフェリンなどが挙げられる。化学発光物質としては、アクリジニウムエステルなどが挙げられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、などが挙げられる。発色物質としては、パラニトロアニリン（pNA）などが挙げられる。すなわち、発色、蛍光、時間分解蛍光、化学発光、電気化学発光、放射活性等を測定する方法を用いることができる。

10

【0019】

また、標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質を用いて発光、蛍光又は発色反応を行うことにより、標識物質を測定できる。例えば、酵素がアルカリホスファターゼである場合、基質としては、CDP-star（登録商標）（2-クロロ-5-（4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-（5'-クロロ）-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル）-1-フェニルホスフェート・ニナトリウム）、CSPD（登録商標）（3-（4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-（5'-クロロ）トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル）フェニルリン酸2ナトリウム）、AMPPD（登録商標）（アダマンチルメトキシフェニルホスホリルジオキセタン）、APS-5などの化学発光基質；4-メチルウンベリフェリルフォスフェート（4-methylumbelliferyl phosphate）などの蛍光基質；p-ニトロフェニルホスフェート、BCIP（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸）、NBT（4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリド）、INT（ヨードニトロテトラゾリウム）などの発色基質を用いることができる。

20

【0020】

本発明における非特異反応抑制物質の使用方法としては、標的物質とそれに対する特異的な抗体との特異的な免疫反応工程の前に、予め適当な緩衝液中で非特異反応抑制物質と検体を接触させ、適当な時間（例えば1分～2時間）インキュベートする方法がある。この間に、検体中の非特異反応を起こす物質（非特異反応物質）は非特異反応抑制物質と反応し、特異的な免疫反応工程での標識抗体との非特異反応活性は失われる。

30

非特異反応抑制物質が、特異的な免疫反応工程に影響しない測定法を使用する場合には、インキュベートを完了した検体と非特異反応抑制物質の混合液をそのまま用いればよく、一方、特異的な免疫反応工程に影響する測定法を使用する場合には、特異的な免疫反応工程を行う前に、インキュベートを完了した後の非特異反応抑制物質を除去すれば良い。

特異的な免疫反応工程に影響しない測定法とは、例えば、最も一般的に用いられるサンドイッチ法の場合、特異的な免疫反応で分離される「固相化抗体-非特異反応物質-標識抗体」サンドイッチ複合体に関わらない測定法である。このような場合、具体的には、前記複合体と共に分離されない非特異反応抑制物質（例えば、遊離のタンパク質や分離されない粒子などを含むもの）が使用できる。

40

特異的な免疫反応工程に影響する測定法とは、例えば、最も一般的に用いられるサンドイッチ法の場合、特異的な免疫反応で分離される「固相化抗体-非特異反応物質-標識抗体」サンドイッチ複合体に関わる測定法である。このような場合、具体的には、前記複合体と共に分離される非特異反応抑制物質（例えば、前記複合体が磁性粒子を含み、磁力体で分離される場合、同様な磁性粒子などを含むもの）が使用できる。

【0021】

50

本発明における非特異反応抑制物質の別の使用方法としては、非特異反応抑制物質の共存下に特異的免疫反応工程を行う方法がある。例えば、最も一般的に用いられるサンドイッチ法の場合、固相化抗体と検体中の抗原（標的物質）とを反応させる第一免疫反応工程の緩衝液に非特異反応抑制物質を添加する。非特異反応が検出されるのは、抗体の特異的反応部位を介さずに「固相化抗体 - 非特異反応物質 - 標識抗体」サンドイッチ複合体を形成するためであるが、この場合、第一免疫反応中に非特異反応物質の標識抗体に対する反応活性が非特異反応抑制物質により吸収される。さらに、抗体の特異反応部位を介して固定化された抗原と標識抗体とを反応させる第二免疫反応工程の緩衝液にも添加すれば、第一免疫反応工程で完全に吸収されなかった非特異反応物質も吸収されるため、測定信頼性をより一層高めることができる。

10

上記と同様に、いずれの測定法も使用可能であるが、特異的免疫反応工程で非特異反応抑制物質が使用されるため、前記特異的免疫反応工程に影響しない測定法で行う方が好ましい。

【0022】

また、1段階サンドイッチ法においても免疫反応工程の緩衝液に非特異反応抑制物質を添加して反応させることにより、非特異反応は回避される。

上記と同様に、いずれの測定法も使用可能であるが、特異的免疫反応工程で非特異反応抑制物質が使用されるため、前記特異的免疫反応工程に影響しない測定法で行う方が好ましい。

非特異反応抑制物質の添加時期は、標的物質や測定法に合わせて、好適な方法を適宜選択すれば良い。

20

【0023】

本発明で対象とする非特異反応物質は脂質である。脂質とは、単純脂質、複合脂質、誘導脂質が挙げられるが、中でも単純脂質、好ましくは中性脂肪に効果を有する。中性脂肪とは、脂肪酸のグリセリンエステルであり、脂肪酸グリセリンエステルにはモノグリセリド（モノアシルグリセロール）、ジグリセリド（ジアシルグリセロール）、トリグリセリド（トリアシルグリセロール）が存在するが、血液中に含まれる中性脂肪のほとんどはトリグリセリドである。

よって、公知の脂質を分解することが可能な物質を非特異反応抑制物質として使用することができる。具体的には、リパーゼ類が挙げられる。特に、肝臓由来リパーゼ、非肝臓由来リパーゼ、リポプロテインリパーゼ、ホルモン感受性リパーゼ、ホスホリパーゼ等が挙げられる。生体試料から精製したもので、インビトロで作製したもので使用できる。前記精製あるいは作製は、公知の方法に従って実施することができ、また、簡単に購入することもできる。

30

【0024】

本発明における非特異反応抑制物質は、免疫反応工程の前に予め適当な緩衝液に添加して使用されるか、あるいは免疫反応工程の緩衝液に添加して使用される。非特異反応物質を反応させる工程における非特異反応抑制物質の有効活性濃度は、当業者であれば、それらの種類によって、適宜、好適な濃度に決定することができる。好適な濃度とは、脂質を分解することが可能である濃度であれば良いが、例えば、特開2002-369681号公報にリパーゼ類が0.1~20U/mLで脂質を分解できることが記載されている。更に、後述する実施例に示すように、検体中の低分子の測定において、脂質の影響を抑制することが可能な濃度を検討し、適宜、設定することができる。例えば、本発明は検体と初めに接触する反応場において1.0~500U/mLの濃度において有効であることが確認されている。

40

【0025】

本発明において、リパーゼ類の使用濃度の下限としては、検体と初めに接触する反応場において、例えば、1U/mL以上、好ましくは5U/mL以上、より好ましくは10U/mL以上、更に好ましくは20U/mL以上、特に好ましくは300U/mL以上である。リパーゼ類の使用濃度の上限としては、例えば、1000U/mL以下、好ましくは

50

800 U/mL以下、より好ましくは500 U/mL以下、特に好ましくは400 U/mL以下である。

【0026】

本発明で使用される緩衝液は公知の通常免疫反応に使われる適当な緩衝液であってよい。

また、緩衝液中に通常用いられる添加剤、例えば、反応促進剤、洗浄剤または安定剤と共に使用することができる。さらに別の非特異反応抑制物質と共に用いることもできる。適当な緩衝液として例えば、20～100 mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH6～8)または50 mmol/Lトリス-塩酸/100 mmol/L NaCl(pH7～8)などが使用できる。反応促進剤としては例えばデキストランサルフェートまたはポリエチレングリコールなど、洗浄剤としては例えばTriton X-100、Tween 20などを、また安定化剤としてアルブミン、スキムミルク、ゼラチンなどのタンパク質やアジ化ナトリウム、チメロサル、ケーソンCG、プロクリンなどの防腐剤を挙げることができる。

10

【0027】

本発明の非特異反応抑制物質を含む測定キットとしては、従来の免疫学的測定キットに前記非特異反応抑制物質を更に含ませることができる。一般に、ELISA法による測定キットは標識抗体液、固相化抗体、標準物質などの試薬から構成され、さらに必要に応じて、サンドイッチ法で検体と固相化抗体を反応させるため緩衝液、酵素反応のための発色液と反応停止液、固相を洗浄するための洗浄液、検体の前処理剤などを含んで構成される。

20

【0028】

本発明の非特異反応抑制物質は単独でキットの構成試薬にしてもよいし、他の構成試薬に予め添加してもよい。しかし、測定操作を増やすことなしに非特異反応抑制効果が得られることを考慮すれば、構成試薬の一成分として添加するのが好ましい。例えば、本発明の非特異反応抑制物質は、検体処理液や検体と固相化抗体を反応する緩衝液や標識抗体溶液に添加してキットの構成試薬とすることが挙げられる。これらの構成試薬が凍結乾燥品の場合には復元液に添加することもできる。

【実施例】

【0029】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

30

【0030】

《材料》

以下の実施例で使用した材料を示す。

リパーゼは、旭化成より購入した非肝臓由来リパーゼ：T-63 Lipase (LPBP)を用いた。

脂質は、フレゼニウス カービ ジャパンより購入した20%イントラリピッド輸液を用いた。イントラリピッド輸液は、トリグリセリドを主成分とする大豆油を含む。

【0031】

40

《実施例1：テストステロンの免疫学的測定法へのリパーゼの添加効果の検討》

(1-1) 抗テストステロン抗体結合磁性粒子の作製

抗テストステロン抗体を50 mmol/Lリン酸緩衝液中でBiotin-(AC5) 2 Sulfate-Osu (同仁堂社)と反応させた。反応液中の抗体の濃度は1 mg/mLであり、これに対し、ビオチンを10当量添加し室温で30分間反応させた。未反応のビオチンは脱塩カラム(NAP-10:GEヘルスケアサイエンス社)にて除去した。

ストレプトアビジン結合磁性粒子(Dynal社)がゼラチンを含む緩衝液[0.1 mol/L MES (pH6)、0.6 mol/L NaCl]に0.05%で懸濁された溶液と、上記で調製したビオチン化抗テストステロン抗体を0.02 μg/mLになるように混合し、抗テストステロン抗体結合粒子とした。

50

【0032】

(1-2) 標識テストステロンの作製

標識テストステロンの作製は Testosterone - 3 CMO (SIGMA社) のカルボキシル基を、NHS / EDC 混合液とそれぞれが 35 mmol / L になるように、DMF 中にて活性化させた。一方で 0.1 mol / L リン酸緩衝液中に ALP (アルカリフォスファターゼ) が 2 mg / mL になるように懸濁したものを用意した。上記でカルボキシル基を活性化させた Testosterone - 3 CMO と ALP をさらに終濃度 0.009 mmol / L になるように混合し、ALP 中のアミノ基と結合させるアミンカップリング法を行った。Superose 6 (GEヘルスケアサイエンス社) を使用したゲルろ過クロマトグラフィーにより、未反応物の除去を行い標識テストステロンを作製した。

10

【0033】

(1-3) テストステロンの測定

テストステロンの測定は、小型自動免疫測定装置 (PATHFAST; 三菱化学メディエンス社製) を用いて、以下のような競合反応系で行った。詳細には、健常人由来の血清 25 μ L と、緩衝液 1 [0.1 mol / L HEPES (pH 7.0)、0.05% Tween 20、0.5% BSA (セラケア社)] 25 μ L を 37 °C で 8 分間反応させた (反応 1)。この混合溶液 50 μ L に、更に抗テストステロン抗体結合磁性粒子と、ゼラチンを含む緩衝液 2 [0.1 mol / L MES (pH 6)、0.6 mol / L NaCl] に 0.05% で懸濁された溶液 50 μ L、及び 0.075 mAbs の標識テストステロンを含む緩衝液 3 [0.01 mol / L MES (pH 5.5)、0.3 mol / L NaCl、0.1% BSA (セラケア社)] 50 μ L を加え、37 °C で 5 分間反応させた (反応 2)。0.01 mol / L MOPS (pH 7.5)、1 mol / L NaCl、0.05% アジ化ナトリウム、0.05% Triton X - 100 で上記磁性粒子を洗浄した後、ケミルミネッセンス基質溶液 [2 - クロロ - 5 - (4 - メトキシスピロ {1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ) - トリシクロ [3.3.1.1^{3,7}] デカン} - 4 - イル) - 1 - フェニルホスフェート・二ナトリウム: CDP - Star 溶液] 100 μ L を混合し、37 °C で 1 分間反応させ、発光量をカウントした。

20

【0034】

リパーゼは、緩衝液 3 に 0、100、200、500、1000 U / mL になるように添加した。反応場 (反応 2) でのリパーゼ濃度は 0、33.3、66.7、166.7、333.3 U / mL である。

30

サンプルは、血清に脂質を 500、1000 mg / dL になるように添加し、ブランクに対するテストステロンの回収率 (回収量 / ブランク) を求めた。

【0035】

結果を、表 1 に示す。

ブランクと比較して脂質が存在することによって、約 10% もの正の誤差を生じた。リパーゼを添加することにより、誤差は小さくなった。脂質添加量が 500 mg / dL の場合には、緩衝液 3 へリパーゼを 100 U / mL 以上で添加すると、ブランクに対し + 5% 以内の誤差、脂質添加量が 1000 mg / dL の場合には、緩衝液 3 へリパーゼを 200 U / mL 以上で添加すると、ブランクに対し + 5% 以内の誤差となり、診断薬として正確に測定できると認められる値となった。

40

想定される高脂血症等の患者検体を考慮すると、少なくとも、緩衝液 3 へ添加するリパーゼの有効濃度は 100 U / mL 以上、反応場 (反応 2) では 33.3 U / mL 以上であることがわかった。更に、緩衝液 3 へリパーゼを 1000 U / mL で添加した場合には、ブランクに対し + 2% 以内の誤差となり、非常に高い精度で測定できることがわかった。

【0036】

【表 1】

緩衝液 3 への リパーゼ添加量 (U/mL)	回収率 (回収量/ブランク)		
	脂質添加量 (mg/dL)		
	ブランク	500	1000
0	100%	109%	110%
100	100%	104%	108%
200	100%	104%	104%
500	100%	104%	103%
1000	100%	102%	101%

10

【 0 0 3 7 】

実施例 2 : リパーゼ添加工程の検討

次に、実施例 1 のテストステロン測定において、いずれの工程でもリパーゼの効果が得られるか検討した。具体的には、緩衝液 1、2、3 にリパーゼを 1 0 0 0 U / m L になるように添加した。ただし、反応場におけるリパーゼ濃度は、リパーゼを緩衝液 1 に加えた場合は、反応 1 では 5 0 0 U / m L、反応 2 では 1 6 6 . 7 U / m L、リパーゼを緩衝液 2 あるいは 3 に加えた場合には、反応 2 では 3 3 3 . 3 U / m L である。サンプルとしては、血清に脂質を 0、5 0 0、1 0 0 0 m g / d L になるように添加し、ブランクに対するテストステロンの回収率 (回収量 / ブランク) を求めた。

20

【 0 0 3 8 】

結果を表 2 に示す。

緩衝液 1、2、3 のいずれにリパーゼを添加しても、ブランクに対し + 5 % 以内の誤差となり、いずれの工程に添加してもリパーゼが有効であることが確認できた。

【 0 0 3 9 】

【表 2】

リパーゼ 添加緩衝液	回収率 (回収量/ブランク)		
	脂質添加量 (mg/dL)		
	ブランク	500	1000
緩衝液 1	100%	97%	101%
緩衝液 2	100%	104%	103%
緩衝液 3	100%	101%	101%

30

【 0 0 4 0 】

実施例 3 : 臨床検体へのリパーゼ添加効果の検討

次に臨床検体において、リパーゼの添加効果が認められるか検討した。具体的には、脂質 (中性脂肪) 濃度が 5 0 0 m g / d L 以上の高脂血症群 3 1 名、および健常人群検体 3 8 名の血清を用いて、リパーゼ添加有無の影響を相関解析により検討した。実施例 1 のテストステロン測定において、緩衝液 3 にリパーゼを 0、1 0 0 0 U / m L になるように添加したそれぞれの系において各検体を測定した。反応場 (反応 2) におけるリパーゼ濃度は 0、3 3 3 . 3 U / m L である。

40

【 0 0 4 1 】

結果を図 1 に示す。横軸はリパーゼを添加有りの場合の検体測定値を、縦軸はリパーゼを添加無の場合の検体測定値を示す。高脂血症群ではリパーゼ添加無の測定値が下がることが確認された。

以上より、リパーゼの添加によって高脂血症群の挙動が改善することが判明した。

50

【 0 0 4 2 】

実施例 4 : エストラジオール (E 2) の免疫学的測定法へのリパーゼの添加効果の検討

(4 - 1) 抗 E 2 抗体含有緩衝液 1 の作製

抗 E 2 抗体を 5 0 m m o l / L リン酸緩衝液中でビオチン B i o t i n - (A C 5) 2 S u l f o - O s u (同仁堂社) と反応させた。反応液中の抗体の濃度は 1 m g / m L であり、これに対し、ビオチンを 1 0 当量添加し室温で 3 0 分間反応させた。未反応のビオチンは脱塩カラム (N A P - 1 0 : G E ヘルスケアサイエンス社) にて除去した。

上記で調製した抗 E 2 抗体を 0 . 1 μ g / m L となるよう 0 . 1 m o l / L T r i s - H C l (p H 7 . 0) 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 、 1 % B S A (セラケア社) にて希釈し、抗 E 2 抗体含有緩衝液 1 とした。

10

【 0 0 4 3 】

(4 - 2) 標識エストラジオールの作製

標識エストラジオールの作製は上記 (1 - 2) の標識テストステロンの作製方法と同様の方法で実施した。E 2 - 6 C M O (S I G M A 社) のカルボキシル基を、N H S / E D C 混合液とそれぞれが 3 5 m m o l / L になるように、D M F 中にて活性化させた。一方で 0 . 1 m o l / L リン酸緩衝液中に A L P (アルカリフォスファターゼ) が 2 m g / m L になるように懸濁したものを用意した。上記でカルボキシル基を活性化させた E 2 - 6 C M O と A L P をさらに終濃度 0 . 0 0 9 m m o l / L になるように混合し、A L P 中のアミノ基と結合させるアミンカップリング法を行った。S u p e r o s e 6 (G E ヘルスケアサイエンス社) を使用したゲルろ過クロマトグラフィーにより、未反応物の除去を行い標識エストラジオールを作製した。

20

【 0 0 4 4 】

(4 - 3) エストラジオールの測定

エストラジオールの測定は、小型自動免疫測定装置 (P A T H F A S T ; 三菱化学メディアエンス社製) を用いて、以下のような競合反応系で行った。詳細には、血清に脂質を添加したサンプル 2 5 μ L と、抗 E 2 抗体含有緩衝液 1 [0 . 1 m o l / L T r i s - H C l (p H 7 . 0) 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 、 1 % B S A (セラケア社)] 2 5 μ L を 3 7 ° C で 8 分間反応させた (反応 3) 。この混合溶液 5 0 μ L に、更にストレプトアビジン結合磁性粒子 (D y n a l 社) と、ゼラチンを含む緩衝液 2 [0 . 1 m o l / L M E S (p H 6) 、 0 . 6 m o l / L N a C l] に 0 . 0 5 % で懸濁された溶液 5 0 μ L 、及び 0 . 0 5 m A b s の標識エストラジオールを含む緩衝液 3 [0 . 0 1 m o l / L C H 3 C O O N a (p H 5) 、 0 . 3 m o l / L N a C l 、 0 . 1 % B S A (セラケア社)] 5 0 μ L を加え、3 7 ° C で 5 分間反応させた (反応 4) 。0 . 0 1 m o l / L M O P S (p H 7 . 5) 、 1 m o l / L N a C l 、 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム、0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0 で上記磁性粒子を洗浄した後、ケミルミネッセンス基質溶液 [2 - クロロ - 5 - (4 - メトキシスピロ { 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - (5 ' - クロロ) - トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 ³ . 7] デカン } - 4 - イル) - 1 - フェニルホスフェート・二ナトリウム : C D P - S t a r 溶液] 1 0 0 μ L を混合し、3 7 ° C で 1 分間反応させ、発光量をカウントした。

30

40

【 0 0 4 5 】

リパーゼは、緩衝液 1 に 0 、 1 0 、 5 5 U / m L になるように添加した。ただし、反応場におけるリパーゼ濃度は反応 3 では 0 . 5 . 0 、 2 7 . 5 U / m L 、反応 4 では 1 . 6 7 、 9 . 1 7 U / m L である。

サンプルは、血清に脂質を 0 、 5 0 0 、 1 0 0 0 m g / d L になるように添加し、プランクに対する標識エストラジオールの回収率を求めた。

【 0 0 4 6 】

結果を、表 3 に示す。

リパーゼ添加無し (0) に比較して脂質が存在することによって、約 1 0 % もの正の誤差を生じた。リパーゼを添加することにより、誤差は小さくなり、緩衝液 1 に添加される

50

リパーゼ 10 U / mL では、ブランクに対し $\pm 5\%$ 以内の誤差となり、診断薬として正確に測定できると認められる値となり、リパーゼの有効濃度は 10 U / mL 以上であることがわかった（すなわち、反応場 3 において 5 U / mL 以上、反応場 4 で 1.67 U / mL 以上である）。更に、緩衝液 1 にリパーゼが 55 U / mL で添加されている際には、ブランクに対し $\pm 2\%$ 以内の誤差となり、非常に高い精度で測定できることがわかった。

【0047】

【表 3】

緩衝液 1 中の リパーゼ添加量 (U/mL)	回収率 (回収量 / ブランク)		
	脂質添加量 (mg/dL)		
	ブランク	500	1000
0	100%	106%	108%
10	100%	97%	100%
55	100%	99%	98%

10

【0048】

実施例 5 : リパーゼ添加工程の検討

次に、実施例 4 のエストラジオール測定において、いずれの工程でもリパーゼの効果が得られるか検討した。具体的には、緩衝液 1 あるいは 2 にリパーゼを 55 U / mL になるように添加した。反応場における濃度は、緩衝液 1 に添加した場合には反応 3 では 27.5 U / mL、反応 4 では 9.17 U / mL、緩衝液 2 に添加した場合には 18.3 U / mL である。サンプルとしては、血清に脂質を 0、500、1000 mg / dL になるように添加し、ブランクに対する標識エストラジオールの回収率 (回収量 / ブランク) を求めた。

20

【0049】

結果を表 4 に示す。

緩衝液 1 及び 2 のいずれにリパーゼを添加しても、ブランクに対し $+5\%$ 以内の誤差となり、いずれの工程に添加してもリパーゼが有効であることが確認できた。

【0050】

【表 4】

リパーゼ 添加緩衝液	回収率 (回収量 / ブランク)		
	脂質添加量 (mg/dL)		
	ブランク	500	1000
緩衝液 1	100%	99%	98%
緩衝液 2	100%	99%	96%

30

【0051】

以上のデータより、ステロイドホルモン (テストステロン、E2) はトリグリセリドのような脂質にトラップされやすいが、リパーゼの添加により影響を回避することが可能であることがわかった。

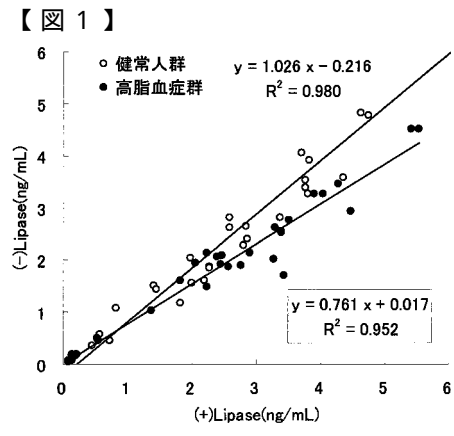
40

【産業上の利用可能性】

【0052】

本発明の低分子の免疫学的測定方法及び測定キットを用いることにより、検体中の非特異反応物質の影響を簡便かつ効果的に抑制し、検体中の微量成分を正確に測定することが可能となる。低分子は、臨床検体中に低濃度で存在することが多く、それが高精度に測定可能となることは、様々な疾患の診断や病態の把握、また、治療薬の薬効評価などに有用である。

50



フロントページの続き

(72)発明者 伊神 恒
東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学メディエンス株式会社内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2008-249603(JP,A)
特開2003-322653(JP,A)
特開平07-270412(JP,A)
特開2013-148496(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53
G01N 33/531

专利名称(译)	免疫分析和小分子试剂盒		
公开(公告)号	JP5541747B2	公开(公告)日	2014-07-09
申请号	JP2012068667	申请日	2012-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学有限公司Medience		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司的LSI Medience		
[标]发明人	荒井望 庄司慶一 伊神恒		
发明人	荒井 望 庄司 慶一 伊神 恒		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/53.J G01N33/531.B G01N33/53.A		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2013200208A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：提供免疫测量方法和测量试剂盒，通过避免脂质，特别是单一脂质，或优选中性脂肪的影响，稳定准确地测量分析物中的低分子。解决方案：免疫学测量方法使用可以分解脂质的非特异性反应抑制剂。测量试剂盒含有一种可以分解脂质的非特异性反应抑制剂。

リパーゼ 添加緩衝液	回収率 (回収量/ブランク)		
	脂質添加量 (mg/dL)		
	ブランク	500	1000
緩衝液 1	100%	97%	101%
緩衝液 2	100%	104%	103%
緩衝液 3	100%	101%	101%

【 0 0 4 0 】