

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6331413号
(P6331413)

(45) 発行日 平成30年5月30日(2018.5.30)

(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)

(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 H

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2014-8763 (P2014-8763)
 (22) 出願日 平成26年1月21日(2014.1.21)
 (65) 公開番号 特開2015-137891 (P2015-137891A)
 (43) 公開日 平成27年7月30日(2015.7.30)
 審査請求日 平成28年12月21日(2016.12.21)

(73) 特許権者 000003300
 東ソー株式会社
 山口県周南市開成町4560番地
 (72) 発明者 堀田 秀樹
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ
 ー株式会社 東京研究センター内
 審査官 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料の調製方法及びビタミン類の免疫測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルカリ処理された血液試料に20～40 かつ1～30秒間の処理で界面活性剤を混合することを特徴とする、ビタミン類測定用血液試料混合物の調製方法。

【請求項2】

界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項1に記載の調製方法。

【請求項3】

ビタミン類がビタミンD代謝産物、ビタミンB12又は葉酸である、請求項1又は2に記載の調製方法。

【請求項4】

請求項1～3いずれかに記載の方法で得られた血液試料混合物中のビタミン類を、免疫学的方法によって測定することを特徴とする、ビタミン類の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液中のビタミン類を免疫学的に測定する方法において、アルカリ処理された血液試料中に界面活性剤を混合することによって血液中のビタミン類の濃度を精度よく測定する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

免疫測定法によって測定されるビタミン類にはビタミンD代謝産物、ビタミンB₁₂及び葉酸などの小分子がある。血液中のそれらの小分子は、その大部分が特異的又は非特異的に蛋白質、脂質などと結合している。そのためそれらの小分子を測定するためには、小分子を前記蛋白質等から遊離する必要がある(以下、前処理と記載することがある)。なお、ビタミン類にはそれぞれ特異的な結合蛋白質が存在し、血液中での安定性に貢献している。例えばビタミンDバインディングプロテイン(DBP)、ハプトコリンや内因子などが良く知られている。

【0003】

従来知られているビタミン類の結合蛋白質の遊離方法として、アルカリ処理が報告されており、特にアルカリ剤として水酸化ナトリウム水溶液を用いる場合が多い。特許文献1では -ランダムメチル化シクロデキストリン、サリチル酸ナトリウムを含む水酸化ナトリウム水溶液、特許文献2ではEDTA、DTT、炭酸エチレンを含む水酸化ナトリウム水溶液が報告されている。

10

【0004】

しかしながらアルカリ処理は血液中の蛋白質を変性させ、不溶物を発生させる。そのため中和後、免疫反応にその処理した試料を用いる場合、測定精度が悪化するといった問題を有している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第4130958号公報

【特許文献2】国際公開第2011/144661号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

臨床検査の分野において血液中のビタミン類の測定は、アルカリ処理、免疫反応の順に実施されることが多く、アルカリ処理を含め、迅速かつ全自動とすることが求められている。アルカリ処理は血液中の蛋白質を変性させ、不溶物を発生させる。そのため中和後、免疫反応にその処理した試料を用いる場合、測定精度が悪化するといった問題を有している。変性した蛋白質を除去するために一般的な方法として分離や抽出が用いられるが、迅速な測定を実現しつつ、それらを自動化することは困難である。

30

【0007】

そこで本発明の目的は、アルカリ処理された血液試料中に界面活性剤を混合することによって測定用試料を調製し、血液中のビタミン類の濃度を精度よく測定する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を行なった結果、ビタミン類を免疫学的に測定する方法において、アルカリ処理された血液試料中に界面活性剤を混合することによって測定用試料を調製することにより、血液中のビタミン類の濃度を精度よく測定できることを見出し、本発明を完成するに至った。

40

【0009】

即ち本発明は以下のとおりである。

(1) アルカリ処理された血液試料に界面活性剤を混合することを特徴とする、ビタミン類測定用血液試料混合物の調製方法。

(2) 界面活性剤が非イオン性界面活性剤である(1)に記載の調製方法。

(3) ビタミン類がビタミンD代謝産物、ビタミンB₁₂又は葉酸である、(1)又は(2)に記載の調製方法。

(4) (1)~(3)いずれかに記載の方法で得られた血液試料混合物中のビタミン類を、免疫学的方法によって測定することを特徴とする、ビタミン類の免疫測定方法。

50

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本発明において、ビタミン類とはビタミンD代謝産物、ビタミンB₁₂又は葉酸のことをいう。ビタミンD代謝産物としてはビタミンD₃(コレカルシフェロール)、ビタミンD₂(エルゴカルシフェロール)、25-ヒドロキシビタミンD₃、25-ヒドロキシビタミンD₂、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃、1,25-ジヒドロキシビタミンD₂、24,25-ジヒドロキシビタミンD₃、24,25-ジヒドロキシビタミンD₂を例示することができる。中でも、臨床検査の測定項目として注目されている、25-ヒドロキシビタミンD₃、25-ヒドロキシビタミンD₂、ビタミンB₁₂及び葉酸に対して、本発明を適用すると好ましい。

10

【0012】

血液試料のアルカリ処理に用いられるアルカリ剤としては特に限定されるものではないが、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム、アンモニア等を使用することができ、中でも、水酸化ナトリウムが好ましい。アルカリ処理中のアルカリ剤の濃度は、0.01~10Mが好ましい。その時の温度、時間には特に限定はないが、34~40で、5~15分間処理することが好ましい。

【0013】

また、アルカリ剤と混合して使用する前処理剤として、他の種々の薬剤(水溶性溶媒、還元剤、乖離剤等)を用いても差し支えない。

20

【0014】

界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤が用いられる。好ましくは非イオン性界面活性剤が用いられる。非イオン性界面活性剤としては、例えば、ノニデッドP-40、TWEEN20、TWEEN80、TritonX-100等、アニオン性界面活性剤としては、アルキルベンゼンスルホン酸塩、SDS等、カチオン性界面活性剤としては、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、ジドデシルジメチルアンモニウムクロリド等、両性界面活性剤としては、CHAPS、CHAPSO等が用いられる。

【0015】

本発明においては、非イオン性界面活性剤が好ましく用いられ、特に好ましくはノニデッドP-40が用いられる。

30

【0016】

アルカリ処理された血液試料に混合する界面活性剤の濃度としては、0.001~1%重量%が好ましく、さらに好ましくは0.001~0.1%重量%であり、とりわけ0.001~0.05%重量%が好ましいが、測定対象物や使用する界面活性剤によって至適濃度を決定するのが好ましい。このときの温度、時間には特に限定はないが、20~40で、1~30秒間処理することが好ましい。

【0017】

このようにして調製された血液試料混合物は、分離や抽出を行わなくてもそのまま免疫学的測定法によってビタミン類を測定することができる。

40

【0018】

ビタミン類の測定に適用される免疫測定方法は、その原理や検出のためのラベルの種類を問わないものである。即ち、原理としてはサンドイッチ法、競合法、凝集法等を使用することができ、ラベルとしては放射性同位元素、酵素、化学発光、又は生物化学発光等を使用することができる。中でも、酵素、蛍光物質又は化学発光基質をラベルとして用いた、競合法が好ましい。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、アルカリ処理された血液試料に界面活性剤を混合させるという簡便な操作で、ビタミン類測定用の試料混合物を調製することができ、その測定用試料混合物は

50

、分離や抽出を行わなくてもそのまま免疫学的測定法によってビタミン類の濃度を精度良く測定することが可能となる。例えば、臨床検査において有効な手段であるEIA、RIAで測定されているビタミン類は、その大部分が特異的、非特異的に蛋白質や脂質などと結合しているため、アルカリ処理をする例が多数を占める。その場合、精度良くビタミン類の濃度を測定することは容易ではないため、本発明によって高精度な測定、自動化への発展に対する多くの要望を簡便に解決するものであり、その応用範囲は広い。

【実施例】

【0020】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は本実施例により限定されるものではない。

【0021】

実施例1

免疫測定装置として全自動エンザイムイムノアッセイ装置(AIA-2000、東ソー社製)と免疫測定用試薬として当該装置用25-ヒドロキシビタミンD免疫反応試薬を用い、自動前処理1ステップ競合法により25-ヒドロキシビタミンDの測定を行った。なお、その他の測定に必要な試薬は後述したようにして調製した。

【0022】

血液試料のアルカリ処理に用いるアルカリ剤は0.3M水酸化ナトリウム水溶液を調製した。

【0023】

中和液として使用する界面活性剤を含む溶液は、防腐剤を含む0.2Mリン酸緩衝溶液に、ノニデッドP-40をそれぞれ0重量%(試薬A)、0.001重量%(試薬B)、0.005重量%(試薬C)、0.01重量%(試薬D)、0.02重量%(試薬E)、0.05重量%(試薬F)、0.1重量%(試薬G)になるように添加して7種類を調製した。

【0024】

測定用の血液試料として血清に25-ヒドロキシビタミンD₃を80、160ng/mL添加して2種類の血清サンプルを調製した。

【0025】

次に、上記のように調製したアルカリ剤と中和液として試薬A、B、C、D、E、F、Gを用い、前記自動免疫測定装置と当該装置用25-ヒドロキシビタミンD免疫反応試薬で血清サンプル2種類を測定し、アルカリフォスファターゼの蛍光基質である4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度の増加速度[nM/s]をそれぞれ測定した。なお、各試薬(中和液)で各血清サンプルを3回ずつ測定した。このとき血清サンプルはアルカリ剤を混合してアルカリ処理し、次いで界面活性剤を含む中和液を混合した後、分離・抽出することなく免疫測定を行った。

【0026】

結果を表1, 2に示す。なお表1, 2に示す測定精度の指標となるCV(Coefficient of Variation)は、以下の式に基づき算出している。

【0027】

$CV[\%] = [(3 \text{ 回測定した蛍光強度増加速度の標準偏差}) \div (3 \text{ 回測定した蛍光強度増加速度の平均値})] \times 100$

【0028】

10

20

30

40

【表 1】

25-ヒドロキシビタミンD ₃ 濃度 80 ng/mL		
中和液 (ノニデッド P-40 濃度 (重量%))	蛍光強度増加速度 (nM/sec)	CV (%)
試薬A (0)	16.841	9.8
	14.690	
	14.002	
試薬B (0.001)	15.762	2.1
	16.452	
	15.934	
試薬C (0.005)	15.737	1.8
	15.311	
	15.221	
試薬D (0.01)	13.990	1.8
	13.541	
	13.580	
試薬E (0.02)	13.879	1.0
	13.597	
	13.737	
試薬F (0.05)	12.017	1.3
	11.805	
	11.719	
試薬G (0.1)	7.263	3.8
	6.957	
	6.730	

10

20

30

【0029】

【表 2】

25-ヒドロキシビタミンD ₃ 濃度 160 ng/mL		
中和液 (ノニデッドP-40濃度 (重量%))	蛍光強度増加速度 (nM/sec)	CV (%)
試薬A (0)	7.243	6.9
	7.553	
	6.585	
試薬B (0.001)	7.855	1.5
	7.628	
	7.702	
試薬C (0.005)	7.463	1.0
	7.427	
	7.567	
試薬D (0.01)	6.363	1.1
	6.483	
	6.369	
試薬E (0.02)	6.395	1.8
	6.198	
	6.192	
試薬F (0.05)	5.379	2.4
	5.332	
	5.143	
試薬G (0.1)	3.190	3.6
	3.009	
	3.213	

ノニデッドP-40が未添加(0重量%：試薬A)の場合は2サンプルのCVがそれぞれ9.8%、6.9%であったが、ノニデッドP-40を添加した場合(試薬B~G)は、CVは1.0~3.8%であり、明らかにCVが低くなる傾向が見られた。これはノニデッドP-40を添加したことで測定精度が向上したことを示している。但し、ノニデッドP-40を0.1重量%添加すると蛍光強度増加速度が低下し、CVもわずかながら高くなったため、0.001~0.05重量%が最も好ましいと考えられる。このことからノニデッドP-40の濃度を上げすぎると免疫測定に影響を与えると推測される。つまり、ノニデッドP-40を添加する場合、免疫測定に影響を与えるような高濃度は好ましくないが、適当な濃度を添加することで血液試料中に含まれるビタミン類を精度よく測定することができることが確認された。

10

20

30

40

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2005-503534(JP,A)
特表2013-501919(JP,A)
特開2011-117779(JP,A)
国際公開第2012/090493(WO,A1)
米国特許出願公開第2004/0132104(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/531

G01N 33/53

专利名称(译)	制备样品的方法和维生素的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP6331413B2	公开(公告)日	2018-05-30
申请号	JP2014008763	申请日	2014-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
当前申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	堀田秀樹		
发明人	堀田 秀樹		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.H		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2015137891A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种精确测量碱处理的血液样品中维生素浓度的方法。一通过将表面活性剂（优选非离子表面活性剂，如Nonidat P-40等）与碱处理的血液样品混合，将维生素（优选25-羟基维生素D 3，25-羟基维生素D 2维生素D代谢物，维生素B 12或叶酸）测量制备血液样品混合物，并且通过免疫学测量方法直接测量用于测量的血液样品混合物而不分离或提取，并且测量维生素。发明背景

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6331413号 (P6331413)
(45) 発行日 平成30年5月30日(2018.5.30)	(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)	
(51) Int. Cl. G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)	F I G O I N 33/531 G O I N 33/53	B H
請求項の数 4 (全 7 頁)		
(21) 出願番号 特願2014-8763 (P2014-8763)	(73) 特許権者 000003300 東ソー株式会社	
(22) 出願日 平成26年1月21日(2014.1.21)	山口県周南市開成町4560番地	
(65) 公開番号 特開2015-137891 (P2015-137891A)	(72) 発明者 堀田 秀樹	
(43) 公開日 平成27年7月30日(2015.7.30)	神奈川県横浜市早川2743番地1 東ソ ー株式会社 東京研究センター内	
審査請求日 平成28年12月21日(2016.12.21)	審査官 三木 隆	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 試料の調製方法及びビタミン類の免疫測定方法		