

(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2006-258673  
(P2006-258673A)

(43) 公開日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 B	4 B O 6 3
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 H O 4 5
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	
CO 7 K 14/65 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28	
GO 1 N 33/12 (2006.01)	CO 7 K 14/65	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-78307 (P2005-78307)  
(22) 出願日 平成17年3月18日 (2005.3.18)

(71) 出願人 501168814  
独立行政法人水産総合研究センター  
神奈川県横浜市西区みなとみらい二丁目3  
番3号  
(74) 代理人 100090941  
弁理士 藤野 清也  
(74) 代理人 100076244  
弁理士 藤野 清規  
(74) 代理人 100113837  
弁理士 吉見 京子  
(74) 代理人 100133905  
弁理士 石井 良夫  
(74) 代理人 100127421  
弁理士 後藤 さなえ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 魚類の I G F - I 濃度の測定方法及びその方法に用いる測定キット

(57) 【要約】

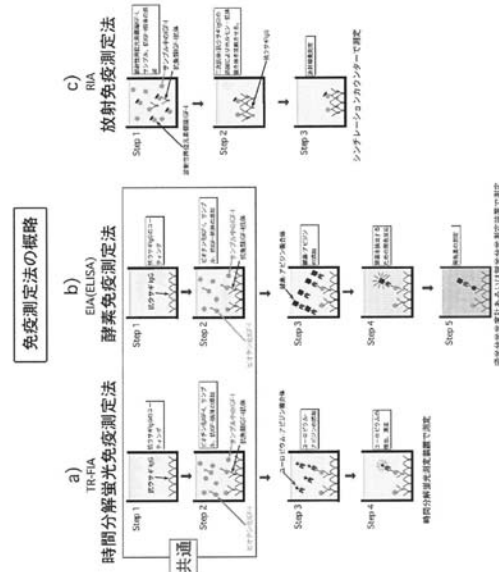
【課題】

安全かつ容易に実施できる魚類の I G F - I 濃度の測定方法及び測定キットの提供。

【解決手段】

ビオチン化 I G F - I を用いた時間分解蛍光免疫測定法又は酵素免疫測定法による魚類の I G F - I 濃度の測定方法及びその方法に用いる測定キット。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ビオチン化 IGF - I を用いることを特徴とする魚類の IGF - I 濃度の測定方法。

## 【請求項 2】

ビオチン化 IGF - I を HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で分離し、抗体と結合させた状態で最も高い蛍光強度が得られる分画を使用する請求項 1 に記載の測定方法。

## 【請求項 3】

測定方法が時間分解蛍光免疫測定法又は酵素免疫測定法のいずれかである請求項 1 又は 2 に記載の測定方法。

## 【請求項 4】

ビオチン化 IGF - I にユーロピウム - アビジン複合体を作用させて、ユーロピウムの蛍光強度を測定することによる時間分解蛍光免疫測定法を用いる請求項 3 に記載の測定方法。

## 【請求項 5】

ビオチン化 IGF - I に酵素 - アビジン複合体を作用させて、酵素の活性を蛍光基質を用いることにより測定することによる酵素免疫測定法を用いる請求項 3 に記載の測定方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の測定方法に用いる魚類のビオチン化 IGF - I。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の測定方法に用いる魚類 IGF - I 濃度の測定キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ビオチン化 IGF - I (インスリン様成長因子 - 1) を用いる魚類の IGF - I 濃度の測定方法及びその方法に用いる測定キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、ヒラメ、マグロ、タイ等の養殖において、これらの成長に有効な環境条件を検討するために、各環境における魚類の体長の変化をノギス等で測定する数週間の飼育実験が行われてきた。近年、哺乳類等で成長誘導を仲介する成長ホルモンとして IGF - I が知られるようになり、魚類においてもその成長と血中 IGF - I 濃度が高い相関があることが示されている (例えば、非特許文献 1 参照)。また、魚類への IGF - I の投与により成長が促進されることも示されており (例えば、非特許文献 2 参照)、魚類の成長に有効な環境条件の検討や、その成長促進のための効率的な IGF - I の投与量の決定において、血中 IGF - I 濃度を測定することが有効であると考えられる。

## 【0003】

近年では、IGF - I の生理的作用機序の解明等を目的として、様々な生理的状态下にある魚類の血中 IGF - I 濃度の測定が行われている。しかし、この測定には放射性同位元素を用いた方法のみが開発されている。また、放射性同位元素以外にアルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼ等の酵素、ユーロピウム等の蛍光物質を用いるという示唆はあるものの、実施には至っていない (例えば、特許文献 1 参照)。放射性同位元素の使用は、放射性同位元素に曝された使用済みの試験管類の処理コスト、測定者の健康への悪影響、測定場所が専用施設である必要性、放射性元素取扱主任者資格の必要性、定期的な使用状況の検査・報告等について、特別な対策、処置を行うことが法律上の義務として生じるため、容易ではなかった。

そこでこれらの煩雑な対策、処置、測定場所の限定性を解決するために、放射性同位元素を用いず、安全かつ容易に実施できる魚類の IGF - I 濃度の測定方法や測定キットの開発が望まれていた。

【特許文献 1】特開平 8 - 145998 号公報

【非特許文献 1】Beckman, B. R., Shearer, K. D., Coop

10

20

30

40

50

er, K. A., and Dickhoff, W. W. (2001) Comparative Biochemistry and Physiology A, 129, 585 - 593.

【非特許文献2】McCormick, S. D., Kelly, K. M., Young, G., Nishida, R. S., and Bern, H. A. (1992) General and Comparative Endocrinology, 86, 398 - 406.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記の状況に鑑み、本発明は、放射性同位元素を用いず、安全かつ容易に実施できる魚類のIGF-I濃度の測定方法及びその方法に用いる測定キットの提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、魚類のIGF-I濃度の測定において、その標識ホルモンとしてビオチン化IGF-Iを用い、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジンの特異的かつ強力な結合を利用することで、時間分解免疫測定法又は酵素免疫測定法のいずれの測定方法についても実用的な感度で測定ができることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明の測定方法では、放射性同位元素で標識したIGF-Iを使用せず、ビオチン化IGF-Iを用いることで、市販品の抗魚類IGF-I抗体やユーロピウム-アビジン複合体又はユーロピウム-ストレプトアビジン複合体、酵素-アビジン複合体等を用い、時間分解蛍光免疫測定法や酵素免疫測定法等により魚類のIGF-I濃度を測定することができる。さらに、本発明において、魚類のIGF-I濃度の測定に最適な試薬や抗体等を組合せ、測定キットとすることで、簡単かつ容易に魚類のIGF-I濃度を測定することができる。

【0006】

即ち、本発明は次の(1)~(6)に関する。

(1) ビオチン化IGF-Iを用いることを特徴とする魚類のIGF-I濃度の測定方法。

(2) ビオチン化IGF-IをHPLC(高速液体クロマトグラフィー)で分離し、抗体と結合させた状態で最も高い蛍光強度が得られる分画を使用する上記(1)に記載の測定方法。

(3) 測定方法が時間分解蛍光免疫測定法又は酵素免疫測定法のいずれかである上記(1)又は(2)に記載の測定方法。

(4) ビオチン化IGF-Iにユーロピウム-アビジン複合体を作用させて、ユーロピウムの蛍光強度を測定することによる時間分解蛍光免疫測定法を用いる上記(3)に記載の測定方法。

(5) ビオチン化IGF-Iに酵素-アビジン複合体を作用させて、酵素の活性を蛍光基質を用いることにより測定することによる酵素免疫測定法を用いる上記(3)に記載の測定方法。

(6) 上記(1)から(5)のいずれかに記載の測定方法に用いる魚類のビオチン化IGF-I。

(7) 上記(1)から(5)のいずれかに記載の測定方法に用いる魚類のIGF-I濃度の測定キット。

【発明の効果】

【0007】

本発明のビオチン化IGF-Iを用いる魚類のIGF-I濃度の測定方法及びその方法に用いる測定キットは、放射性同位元素を用いないため、時間分解蛍光測定装置あるいは蛍光プレートリーダーさえあれば、特別な制限なく、容易に魚類のIGF-I濃度の測定が可能となる。本発明により、魚類のIGF-I濃度を測定することで、魚類の成長の度合

10

20

30

40

50

いの調査や、魚類の成長促進のための IGF-I の投与量の決定に有効に利用することができる。

【0008】

なお、放射性元素は高額である上に使用期限は数ヶ月程度である。例えば Moriyama らのサケ IGF-I 用放射免疫測定法 (Moriyama, S., Swanson, P., Nishii, M., Takahashi, A., Kawachi, H., Dickhoff, W.W., Plisetskaya, E.M. (1994) General and Comparative Endocrinology 96, 149-161.) では、標識 IGF-I は 1ヶ月間使用可能と記述されている。これに対して、ビオチン化 IGF-I はかなり安定的で冷蔵すれば数年間は使用可能であり、冷凍状態では半永久的に保存できる。本発明の方法は、魚類の IGF-I 濃度をこのよう

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の、「ビオチン化 IGF-I」とは、ビオチンを結合させた IGF-I のことをいい、ユーロピウム-アビジン複合体及び酵素-アビジン複合体のいずれにも結合することができるビオチン化 IGF-I であれば、時間分解蛍光免疫測定法又は酵素免疫測定法のいずれの測定方法にも用いることができるため、より好ましい。

ビオチン化 IGF-I を用いて魚類の IGF-I 濃度を測定するには、魚類のビオチン化 IGF-I を用いることが特に好ましい。

20

【0010】

本発明の「魚類のビオチン化 IGF-I」とは、ビオチンを結合させた魚類の IGF-I のことをいう。魚類のビオチン化 IGF-I は、測定の対象魚の種類に応じて、例えば Gropep 社製のような市販の魚類の IGF-I に、例えば Pierce 社製の EZ-link Sulfo-LC-biotin のような市販のビオチン化試薬を用いて、ビオチンを結合させたものを用いることができる。

【0011】

本発明の「抗体と結合させた状態で最も高い蛍光強度が得られる分画」とは、ビオチン化 IGF-I 作製において、抗体と結合させた状態で最も高い蛍光強度が得られる分画のことをいい、高い検出感度を有するビオチン化 IGF-I として用いることができる。ビオチン化 IGF-I の作製において、IGF-I の 1 分子あたりビオチンが 0-3 個結合した混合物が得られる。この混合物は、そのまま測定に用いることもできるが、高い検出感度を安定して得るためには、さらに HPLC (高速液体クロマトグラフィー) により精製することが好ましい。

30

精製により IGF-I の 1 分子あたりビオチンが 1-3 個結合したビオチン化 IGF-I を分離し、それぞれの分画について抗体と結合させ、この状態で最も高い蛍光強度が得られる分画を選別し、その分画を高い検出感度を有するビオチン化 IGF-I として、測定に用いることが好ましい。

【0012】

本発明の測定方法は、マグロ、ヒラメ、タイ、ティラピア、スズキ、カレイ、マツカワ (カレイ科) 等の IGF-I 濃度を測定するために、例えば、Gropep 社製のような市販されている抗魚類 IGF-I 抗体を用いることができる。市販されている抗体以外にも、測定の対象魚に合わせて作製された抗 IGF-I 抗血清、抗 IGF-I 抗体を用いることができる。また、当該抗体の対象種であればどのような魚類の IGF-I 濃度であっても測定することができる。

40

【0013】

本発明の測定方法では、時間分解蛍光免疫測定法又は酵素免疫測定法により測定を行うことができる。時間分解蛍光免疫測定法には「ユーロピウム-アビジン複合体」を用いるが、ユーロピウム-アビジン複合体とは、ビオチン化 IGF-I を検出できる程度のユーロピウムがアビジンやストレプトアビジンに結合して複合体を形成しているものことで

50

あり、例えば、パーキンエルマー社製のユーロピウム - ストレプトアビジン複合体等を用いることができる。

【0014】

また、酵素免疫測定法には「酵素 - アビジン複合体」を用いるが、酵素 - アビジン複合体とは、ビオチン化 IGF - I を検出できる程度のペルオキシダーゼ等の酵素がアビジンやストレプトアビジンに結合して複合体を形成しているものである。酵素 - アビジン複合体としては、例えば、D A K O 社製のペルオキシダーゼ - アビジン複合体等の市販のものを用いることができる。

【0015】

また、本発明における、ビオチン化 IGF - I 及び、ユーロピウム又は酵素が結合したアビジン複合体と、測定に最適な試薬や抗体、洗浄液、マイクロウェルプレート等を組み合わせることによりキットとすることもできる。洗浄液は例えば、パーキンエルマー社製の市販のものを用いても良いが、20 mM Tris - HCl (pH 7.8, 0.05% Tween 20 及び 150 mM NaCl を含む) 等を用いても良い。参考として本発明の実施例及び試験例に用いる試薬溶液類の組成を表 1 に示した。

10

【0016】

【表 1】

## 試薬溶液類の組成

試薬	洗浄液	抗ウサギ IgG 溶液	競合反応液	抗 IGF-I 抗血清 溶液	ユーロピウム-アビジン複合体 溶液	増強試薬	ペルオキシダーゼ-アビジン複合体 溶液	ペルオキシダーゼ発色 溶液	ペルオキシダーゼ発色停止 溶液	過酸化水素水 溶液
Tris-HCl	20 mM	50 mM	50 mM	50 mM			50 mM			
pH	7.8	7.8	7.8	7.8	無調整	無調整	7.8	7.0	10.3	無調整
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM			150 mM			
EDTA			25 mM	25 mM			25 mM			
NaN <sub>3</sub>		0.05%	0.05%	0.05%						
Tween20	0.05%									
ウシ血清アルブミン /シグマ社製							1.0%			
ブロックエース /大日本製薬社製			25%	25%						
アッセイ緩衝液 /パーキンエルマー社製					原液					
アフィニティー精製 済み抗ウサギ IgG /ロックランド社製		10 μg/ml								
ビオチン化 IGF-I /実施例 1 にて作製			3.3 μL/ml							
抗 IGF-I 抗血清 /GroPep 社製				0.106%						
ユーロピウム-ストレプトアビジン複合体 溶液 /パーキンエルマー社製					0.04%					
増強試薬 /パーキンエルマー社製						原液				
ペルオキシダーゼ-アビジン複合体 溶液 /DAKO 社製							1/50000 (DAKO 社製の場合)			
3-p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸 /Sigma 社製								5 mg/ml		
リン酸緩衝液								100 mM		
グリシン-NaOH 緩衝液									100 mM	
過酸化水素										0.027%

10

20

30

40

## 【0017】

従来の放射性同位元素を用いた放射免疫測定法は、例えば競合法に基づく場合では、濃度が既知の放射性同位元素を結合させたホルモン（標識ホルモン）とサンプル中のホルモンを、ホルモン特異抗体をめぐって競合させた後、洗浄操作を行い、抗体と結合した標識ホルモンのみを分離し、その放射線量を測定することで標識ホルモンの量を調べ、この量

50

との比較により、サンプル中のホルモン濃度を調べる方法である。

【0018】

図1は免疫測定法の概略図であり、図1において、a)は時間分解蛍光免疫測定法を、b)は酵素免疫測定法を示している。また、c)は放射免疫測定法を示している。この図に示すように、図1a)・b)の方法はサンプル中のIGF-Iとビオチン化IGF-Iを競合させて抗魚類IGF-I抗体に結合させた後、さらにa)ではユーロピウム-アビジン複合体を作用させ、b)では酵素-アビジン複合体を作用させるステップを必要とする。一方、図1c)の方法はサンプル中のIGF-Iと放射性同位元素標識IGF-Iを競合させて抗魚類IGF-I抗体に結合させた後、結合した放射性同位元素標識IGF-Iの放射線量を測定することでサンプル中に含まれるIGF-I濃度を測定することができる。

10

従って、放射免疫測定法は時間分解蛍光免疫測定や酵素免疫測定法に比較して、作業ステップが少ないという利点はあるが、放射性同位元素を使用するため、測定実施に際し、多くの法的・施設の制限がかかるという問題点がある。

【0019】

図1a)に示すように、本発明の「時間分解蛍光免疫測定法」は、ビオチン化IGF-Iを用い、さらにビオチンと特異的かつ強力に結合するアビジンにユーロピウムを結合させたユーロピウム-アビジン複合体を用い、両者を結合させ、洗浄操作の後、ユーロピウムを時間分解蛍光測定法で測定することにより、ビオチン化IGF-Iの抗体との結合量を測定し、サンプル中のIGF-I濃度を決定する方法である。

20

本発明の方法は、免疫測定法の分類では競合法と呼ばれる測定原理に基づいたものであり、本発明の測定方法においてユーロピウムの時間分解蛍光強度はサンプル中のIGF-I濃度上昇に依存して減少する。これにより、サンプル中のIGF-I濃度を容易に調べることができる。

本発明の「時間分解蛍光免疫測定法」に用いるユーロピウムは希土類元素の一つで紫外線をあてると赤い蛍光を長時間にわたって発することが知られており、高感度で特異的な測定が可能となる。この方法は、放射免疫測定法と比較して一段階多い作業ステップを必要とするが、非放射性でありかつ毒性もないことから、人体及び環境に対して安全であり、使用にあたり制限がない。

【0020】

30

また、図1b)に示すように、本発明の「酵素免疫測定法」は、ビオチン化IGF-Iを用い、さらにビオチンと特異的かつ強力に結合するアビジンに酵素を結合させた酵素-アビジン複合体を用い、両者を結合させることにより、サンプル中のIGF-I濃度を酵素活性の測定によって調べる方法である。

この方法で検出に用いる酵素にはペルオキシダーゼ等を用いることができる。この方法も放射免疫測定法と比較して2段階多い作業ステップを必要とするが、非放射性であることから、安全であり、時間分解蛍光免疫測定法と同様に使用にあたり制限がない。本発明のこれらの測定方法を用いることにより、魚類におけるサンプル中の1~100ng/mlのIGF-I濃度を十分に検出することができる。

さらに、時間分解蛍光免疫測定法及び酵素免疫測定法では、測定可能上限を超える場合にはサンプルを希釈して測定することができる。以下、本発明の詳細を試験例及び実施例によって示すが、本発明はこれらによって制限されない。

40

【実施例1】

【0021】

<時間分解蛍光免疫測定法>

1. 魚類のIGF-I濃度測定用試薬の調製

(1) ビオチン化IGF-Iの作製

20μgのヒラメのIGF-I(GroPep社製)と3μgのEZ-link Sulfo-LC-biotin(Pierce社製)を500μLのリン酸緩衝液(pH8.8、150mM NaClを含む)で2時間、室温で反応させた後、さらに76mgの

50

グリシンを加え、過剰のEZ-link Sulfo-LC-biotinをグリシンと3時間以上反応させた。

この反応物に、0.8 μLのトリフルオロ酢酸を加えて酸性化し、この溶液100 μLを0.1%トリフルオロ酢酸と70%アセトニトリルを用いたHPLCにかけ、ヒラメのビオチン化IGF-Iを精製・分離した。カラムには逆相液体クロマトグラフィー用C18担体を充填したカラム(ワイエムシー社製、ODS-AM 粒子径3 μm、2.1 mm × 150 mm)を用い、カラム温度は30、流速は100 μL/分に設定した。分画採取を50 μLずつの定容量分画として行った。

#### 【0022】

##### (2) ビオチン化IGF-Iの抗体交差性測定

上記(1)により分離したヒラメのビオチン化IGF-Iを含む分画をサンプルとして、抗体交差性を調べ、抗体と結合させた状態で最も高い蛍光強度が得られるビオチン化IGF-I分画を選別した。

96穴マイクロプレート(ヌンク社製)に抗ウサギIgG溶液(ロックランド社製)を各ウェルに200 μL分注し、2時間以上、静置することにより抗ウサギIgG抗体でマイクロプレートをコーティングした。これを洗浄液(パーキンエルマー社製)を用いて3回洗浄後、競合反応用溶液からビオチン化IGF-Iを除いたものを100 μLずつ各ウェルに分注し、さらにこの溶液で10倍に希釈した上記(1)で得られた分画を1 μLずつ各ウェルに分注した。そして、抗IGF-I抗血清溶液を各ウェルに8 μLずつ分注し、室温で一晩静置した。

#### 【0023】

これを洗浄液を用いて3回洗浄後、ユーロピウム-ストレプトアビジン複合体溶液(パーキンエルマー社製)を0.04%にアッセイ緩衝液(パーキンエルマー社製)で希釈し、各ウェルに100 μLずつ分注し、1-2時間室温で静置した。さらに、これを洗浄液を用いて4回洗浄し、増強試薬(パーキンエルマー社製)を各ウェルに100 μLずつ分注し、5分間攪拌した後、時間分解蛍光測定装置(パーキンエルマー社製)でユーロピウム濃度を測定した。測定結果を図2に示した。

#### 【0024】

図2は、横軸に各分画の溶出時間を示し、縦軸に分画に用いたアセトニトリルの濃度と、IGF-I量を示す紫外線(214 nm)の吸光度と各分画におけるユーロピウム-ストレプトアビジン複合体との結合の程度を示す蛍光強度を示している。このうち抗体と結合させた状態で最も蛍光強度が高い分画(図2、溶出時間50.0-50.5分の分画)をIGF-I濃度の測定方法に用いた。図2ではビオチン化IGF-Iの相対的濃度を示す紫外線吸光度と時間分解蛍光強度が一致しておらず、時間分解蛍光強度をインディケータとして使用に最適なビオチン化IGF-I分画を選択することの重要性が示されている。

#### 【0025】

##### 2. 魚類のIGF-I濃度の測定

96穴マイクロプレート(ヌンク社製)に抗ウサギIgG溶液を各ウェルに200 μL分注し、2時間以上、室温で静置することにより抗ウサギIgGでマイクロプレートをコーティングした。このマイクロプレートを洗浄液を用いて3回洗浄後、競合反応用溶液を各ウェルに100 μLずつ分注し、さらに10 μLのサンプルを分注した。

次にIGF-I抗血清溶液を各ウェルに8 μL分注し、一晩室温で静置した。この段階でビオチン化IGF-Iとサンプル中のIGF-I間で抗IGF-I抗血清溶液中の抗体をめぐって競合反応が行われ、さらに抗IGF-I抗体はビオチン化IGF-Iあるいはサンプル中のIGF-Iを結合した状態でマイクロプレート上の抗ウサギIgGにトラップされた。

#### 【0026】

このマイクロプレートを洗浄液を用いて3回洗浄後、ユーロピウム-ストレプトアビジン複合体溶液を100 μLずつ各ウェルに分注し、1-2時間室温で静置した。

これを洗浄液を用いて4回洗浄後、増強試薬を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ分注し、5分間攪拌した後、時間分解蛍光測定装置で蛍光強度を測定することによりユーロピウム濃度を計算し、濃度既知の標準品系列から計算される標準曲線からIGF-I濃度を決定した。

【試験例1】

【0027】

<各魚類のIGF-I、インスリンとの結合活性>

実施例1に記載の時間分解蛍光免疫測定法を用い、ヒラメIGF-I(マグロIGF-Iと同一物質)(GroPep社製)を標準曲線として、タイIGF-I(GroPep社製)、IGF-Iと生体内物質の中で最も構造が類似するウシのインスリン(Sigma社)及び本発明者らの方法(Andoh, T. and Nagasawa, H. (1998) Zoological Science, 15, 939-943.)に従って精製したマツカワのインスリン-II、ヒトIGF-I(Sigma社製)及びIGF-II(Sigma社製)との結合活性の違いを検討した。

マツカワのインスリン-IIの精製は、具体的には、次の工程により行った。マツカワの臍臓に塩酸エタノールを加えてすりつぶしてよく混合し、溶液中にインスリンを溶解させ、これから遠心分離により上清を得て、次にアンモニア水を加えて中和し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清のpHを調整すると共にインスリンを含むペプチドをエーテルとエタノールを加えることにより沈殿させ、このペプチドの混合物を酢酸水溶液に溶解し、逆相クロマトグラフィーでインスリンと他のペプチドを分離した。逆相クロマトグラフィーの分離溶液には0.1%トリフルオロ酢酸と0.1%トリフルオロ酢酸-50%アセトニトリルを使用した。表2は試験に用いる各サンプルのホルモンの濃度を示した表である。

【0028】

【表2】

試験例	ホルモンの種類	ホルモンの濃度 (pg/ウェル*)														
		—	50000	—	—	5000	2500	1250	625	312	156	78	39	19	9	4
試験例 1	ヒラメ IGF-I	—	50000	—	—	5000	2500	1250	625	312	156	78	39	19	9	4
	タイ IGF-I	—	50000	—	—	—	3125	1560	781	391	195	97	48	24	12	6
	ウシ インスリン	100000	50000	20000	10000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	マツカワ インスリン	100000	—	—	—	5000	2500	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒト IGF-I	100000	50000	25000	12500	6250	3130	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒト IGF-II	100000	50000	25000	12500	6250	3130	—	—	—	—	—	—	—	—	—
実施例 2	ヒラメ IGF-I	—	—	—	12500	5000	2500	1250	625	312	156	78	39	19	9	4

\*本発明の実施例において、10pg/ウェル=1ng/mLと換算する。

【0029】

結合活性の違いは図3に示した。図3は、縦軸に蛍光強度を示し、横軸にサンプルに含まれるホルモンの濃度(pg/ウェル)を示しており、本発明で測定が可能なホルモンについては量が多くなるに従って、蛍光強度が下がることを示している。

図3において、ヒラメIGF-IとタイIGF-Iの時間分解蛍光強度を示す曲線はどちらも濃度依存的に減少し、完全に一致することが示された。このことから両者のIGF-I濃度を本発明により測定できることが確認できた。

一方で、IGF-Iと生体内物質の中で最も構造が類似するウシのインスリン及びマツカワのインスリン-IIは濃度依存的な時間分解蛍光強度の減少傾向を示さなかった。よっ

て、本測定方法はヒラメ IGF - I 及びタイ IGF - I に対し、高い特異性を有することが示された。

また、ヒトの IGF - I 及び IGF - II とも濃度依存的減少傾向を示したが、ヒラメ IGF - I と比較して 100 倍以上の結合活性の違いが認められた。このことにより、ヒトの IGF - I 及び IGF - II 濃度の測定にもこの測定方法を使用できることが示唆された。しかしながら、ヒラメ IGF - I と比較してビオチン化 IGF - I の置換に 2 桁ほど多量の濃度が必要とされることから、応用範囲は限定的であることが示唆された。

[ 試験例 2 ]

【 0030 】

< 希釈マツカワ血漿の標準曲線との平行性 >

10

実施例 1 に記載の時間分解蛍光免疫測定法を用い、マツカワの血漿 ( A , B の 2 個体 ) を倍ずつ希釈してヒラメ IGF - I の各濃度における標準曲線との平行性を検討した。

なお、血漿からの IGF - I の抽出法は Shimizu の酸エタノール抽出法に従った。具体的には、18.75  $\mu$ L の血漿に 75  $\mu$ L の酸 - エタノール溶液 ( 100 % エタノールと 2 規定塩酸を体積比 87.5 : 12.5 の割合で混合したもの ) を加え、十分に攪拌した後、室温で 1 時間静置し、その後、遠心分離により ( 15000 g、10 分間、4 度 ) 沈殿を除去し、62.5  $\mu$ L の上清と 25  $\mu$ L の Tris 水溶液 ( 0.855 M ) を混合した。次に冷凍庫で冷凍した後、前述の遠心操作により沈殿を除去し、測定用サンプルとした ( Shimizu, M., Swanson, P., Fukada, H., Hara, A., and Dickhoff, W.W. ( 2000 ) General and Comparative Endocrinology, 119, 26 - 36 . )。

20

【 0031 】

標準曲線の平行性は図 4 に示した。図 4 は、縦軸に蛍光強度を示しており、ホルモンの濃度上昇に伴い、時間分解蛍光強度が低下することを示し、ヒラメ IGF - I の標準曲線は典型的な右下がりの曲線を呈した。

ここで希釈したマツカワの血漿がこの標準曲線と平行性を示せば、この測定方法がマツカワの血漿 IGF - I 濃度の測定に使用できることを示す。これは血漿中に存在する IGF - I 以外の物質は抗体と結合しないか、結合係数が低いため、仮に蛍光強度の濃度依存的減少が認められても測定値から得られる曲線は IGF - I の標準曲線とは平行性を示さないことによる。図 4 において、マツカワの希釈血漿は濃度依存的に減少すると共にヒラメ IGF - I と十分な平行性を示したことから、本測定方法がマツカワの血漿 IGF - I 濃度の測定に使用できることが示された。

30

[ 試験例 3 ]

【 0032 】

< 魚類の IGF - I 濃度の測定方法の添加回収試験 >

実施例 1 に記載の時間分解蛍光免疫測定法を用い、マツカワの血漿に濃度既知のヒラメ IGF - I を加え、IGF - I 濃度に応じた測定値が得られるかどうかを検討した。これにより、血漿に他種類かつ多量に含まれた物質による測定値の影響の有無を調べることができる。なお、血漿から IGF - I の抽出は試験例 2 と同様の方法により行った。

40

表 3 は、魚類の IGF - I 濃度の時間分解蛍光免疫測定法における添加回収試験の結果として、血漿 1 ~ 3 に対するヒラメ IGF - I の濃度におけるそれぞれの測定値と回収率を示している。

表 3 に示したように、結果は平均で 90 % 程度の回収率が得られ、他の測定方法に比較して十分なものであった。他の測定方法における添加回収率を参考として表 5 に挙げた。表 5 では、公知の文献におけるアッセイ内及びアッセイ間での変動係数及び添加回収率を示している。

【 0033 】

【表 3】

## 魚類の IGF-I 濃度の時間分解蛍光免疫測定法の添加回収試験

ヒラメ IGF-I 添加量 (ng/mL)	血漿 1 (37.4 ng/mL)		血漿 2 (50.5 ng/mL)		血漿 3 (48.4 ng/mL)		平均回収率 (%)
	測定値 (ng/mL)	回収率 (%)	測定値 (ng/mL)	回収率 (%)	測定値 (ng/mL)	回収率 (%)	
+18.2	52.3	81.9	67.3	92.4	64.4	88.3	87.5
+36.4	72.1	95.3	83.7	91.3	84.0	98.0	94.9
+72.7	101.5	88.1	119.5	94.9	121.5	100.5	94.5
+145.5	165.4	88.0	183.7	91.6	193.4	99.7	93.1
平均回収率 (%)	-	88.3	-	92.5	-	96.6	92.5

10

3 個体のマツカワの血漿に濃度既知のヒラメ IGF-I を加えて血漿 IGF-I 濃度を測定した。

[ 試験例 4 ]

【 0 0 3 4 】

< 魚類の IGF-I 濃度の測定方法の測定値の正確性の検討 >

実施例 1 に記載の時間分解蛍光免疫測定法における測定値の正確性を、変動係数 (100 × 標準偏差 / 平均値) を求めることで検討した。表 4 はアッセイ内及びアッセイ間での各濃度における測定値の変動係数を示している。

表 4 に示すように、1 回のアッセイ内、及び異なるアッセイ間における変動係数を調べた。本発明の測定方法は他の測定方法に比較して変動係数は十分に小さいものだった。他の測定方法における変動係数を参考として表 5 に挙げた。

20

【 0 0 3 5 】

【表 4】

## アッセイ内及びアッセイ間での測定値の変動係数

濃度 (ng/mL)	アッセイ内*		アッセイ間*	
	53.2	119.8	52.5	118.6
変動計数 (%)	4.6	3.9	7.2	4.7

\*変動係数はそれぞれアッセイ内では 11 測定、アッセイ間では 7 測定に基いて算出した。

30

【 0 0 3 6 】

【表 5】

他の方法における変動係数及び添加回収率

測定対象	測定方法	変動係数 (%)		添加回収率 (%)	文献
		アッセイ内	アッセイ間		
ギンザケ IGF-I	放射免疫 測定法	3.6	3.3	-	Moriyama, S., Swanson, P., Nishii, M., Takahashi, A., Kawauchi, H., and Dickhoff, W. W., Plisetskaya, E. M. (1994) <i>General and Comparative Endocrinology</i> 96, 149-161.
ニジマス IGF-II	放射免疫 測定法	4.04	4.56	-	Gentil, V., Martin, P., Smal, J., and Le Bail, P.-Y. (1996) <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 104, 156-167.
スズキ、マグ ロ、ティラピ ア、サケ IGF-I	放射免疫 測定法	3.0	16.0	82.0-100 (平均 93.7)	Dyer, A. R., Upton, Z., Stone, D., Thomas, P. M., Soole, K. L., Hoggs, N., Quinn, K., and Carragher, J. F. (2004) <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 135, 268-275.
マツカワ インスリン (本発明者)	時間分解 蛍光免疫 測定法	4.4-5.4	7.3-8.3	100.5-114.7	Andoh, T., and Nagasawa, H. (2002) (本発明者) <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 125, 365-374.
ヒト セクレチン	時間分解 蛍光免疫 測定法	5%以下	13.7	80.2	伊藤克彦、児玉亮子、前田昌子、辻章夫(1995) <i>薬学雑誌</i> 115, 985-991.
ウシ ゴナドトロピ ン	時間分解 蛍光免疫 測定法	3.54-8.05	1.75-13.06	80.1-107.9	Iwasawa, A., Tomizawa, K., Kato, T., Wakabayashi, K., and Kato, Y. (1994) <i>Experimental and Clinical Endocrinology</i> 102, 39-43.

10

20

## 【実施例 2】

## 【0037】

## &lt; 酵素免疫測定法 &gt;

30

## 1. 測定用試薬の調製

## (1) ビオチン化 IGF-I の作製

ヒラメ IGF-I (GroPep 社製) と EZ-link Sulfo-LC-biotin (Pierce 社製) を用い、実施例 1 の (1) と同様の方法により、ビオチン化 IGF-I を作製した。

## 【0038】

## (2) ビオチン化 IGF-I の抗体交差性測定

(1) により分離したビオチン化 IGF-I を含む分画をサンプルとして、実施例 1 の (2) と同様の方法で抗体交差性を調べ、最も活性が高いビオチン化 IGF-I 分画を選別した。測定結果より、このうち結合させた状態で最も高い蛍光強度が得られる分画を IGF-I 濃度の測定方法に用いた。測定に用いる IGF-I の濃度は表 2 に示した。

40

## 【0039】

## 2. 魚類の IGF-I 濃度の測定

検出感度を高めるために、マイクロプレートとして、グライナー社製のイミュロン 600 処理済みブラックプレートを用い、各ウェルに抗ウサギ IgG 溶液を 200 μL ずつ分注し、一晚室温で静置した後、洗浄液を用いて 3 回洗浄した。次に実施例 1 の 2. と同様にサンプルとビオチン化 IGF-I の抗 IGF-I 抗体をめぐる競合反応を行った。洗浄液により 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ-アビジン複合体溶液を各ウェルに 100 μL ずつ分注し、碎水中に 2 時間静置した。これを洗浄液により 4 回洗浄後、各ウェルにペルオキシダーゼ発色溶液を 75 μL、過酸化水素水溶液を 15 μL ずつ分注し、室温で 90 分間

50

静置した。その後、ペルオキシダーゼ発色停止溶液を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ分注し、発色反応を停止させ、蛍光強度の測定を行った。測定には、蛍光測定装置として蛍光マイクロプレートリーダー（ラボシステム社製；フルオロスキャン）を使用し、励起波長320nm、測定波長405nmとした。酵素免疫測定法によって得られたヒラメIGF-I溶液の標準曲線を図5に示した。図5は、縦軸に蛍光強度を示し、横軸にサンプルに含まれるホルモンの濃度（pg/ウェル）を示しており、ホルモンの量が多くなるにつれ、蛍光強度が下がることを示している。

図5において酵素免疫測定法を用いた場合でも時間分解蛍光免疫測定法と同様にIGF-I濃度依存的に蛍光強度が減少する曲線が得られることが示され、本発明のビオチン化IGF-Iは、酵素免疫測定法でも十分に利用できることが示された。

10

### 【実施例3】

#### 【0040】

<マツカワへの成長ホルモン投与による血漿IGF-I濃度上昇変化の測定>

実施例1に記載の時間分解蛍光免疫測定法を用い、それぞれが8個体のマツカワから構成される3実験区（無処理群、対照群、成長ホルモン注射群）を設定し、血漿IGF-I濃度を測定した。実験に用いたマツカワは48時間絶食した。無処理群は実験開始の時に特に処理を行わなかった群、対照群は0.9%生理食塩水に0.1%ウシ血清アルブミンを溶解させたものをグラム体重あたり10 $\mu$ L腹腔内に注射した群、成長ホルモン投与群は対照群に注射した溶液にグラム体重あたり0.05IUのブタ成長ホルモン（Sigma社）を加えて注射した群である。血漿は無処理群から実験開始時に、対照群及び成長ホル

20

モン注射群から注射24時間後に採取した。なお、血漿からIGF-Iの抽出は試験例2と同様の方法により行った。

なお、実験期間中、飼育水温は17度に保ち、給餌を行わなかった。各実験群の体長の平均値はそれぞれ94.6mm、94.1mm、93.0mmだった。

測定結果を表6に示した。表6は実験前のマツカワと成長ホルモンを注射したマツカワの血漿IGF-I濃度の変化を示している。成長ホルモンは脊椎動物においてIGF-Iの分泌を促すことが知られている。従って、成長ホルモンをマツカワに投与すると血漿IGF-I濃度が上昇することが予想され、分散分析（ANOVA、Fisher's PLSD）を行ったところ予想通り成長ホルモン投与群（アルブミン+成長ホルモン）に実験前及び対照群（アルブミンのみ注射）に比較して血漿IGF-I濃度の有意な上昇が認められた（ $P < 0.005$ ）。また、マツカワにおける生理的变化に対応する血漿IGF-I濃度の変化を捉える目的にこの測定方法が十分有効であることが示された。なお、無

30

#### 【0041】

#### 【表6】

成長ホルモンを注射したマツカワの血漿IGF-I濃度の変化

	無処理群	24時間後	
		成長ホルモン	
		対照群	注射群
血漿IGF-I濃度 (ng/mL)	32.2 $\pm 1.5$	35.1 $\pm 0.8$	42.8 $\pm 1.5$

40

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示している。

### 【産業上の利用可能性】

#### 【0042】

本発明の魚類のIGF-I濃度の測定方法及びその方法を行うための測定キットを用いることにより、容易かつ安全に血液中IGF-I濃度を測定することで成長の適否等の特定の生理状態にある魚類を選別したり、その生理的状态を把握したりすることができる。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0043】

50

【図1】 a . 時間分解蛍光免疫測定法、 b . 酵素免疫測定法、 c . 放射免疫測定法の概要を示した図である。

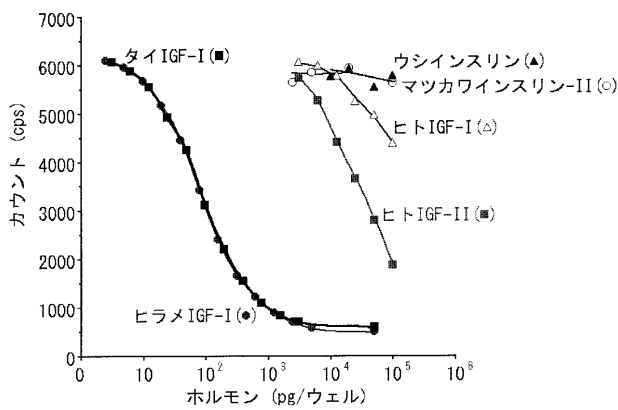
【図2】 HPLCで分離したヒラメビオチン化IGF-Iの各分画における抗魚類IGF-I抗体と結合させた状態における蛍光強度(カウント)を示した図である(実施例1)

【図3】 時間分解蛍光免疫測定法におけるヒラメIGF-Iの標準曲線と各魚類のIGF-I、インスリンとの結合活性を示した図である(試験例1)。

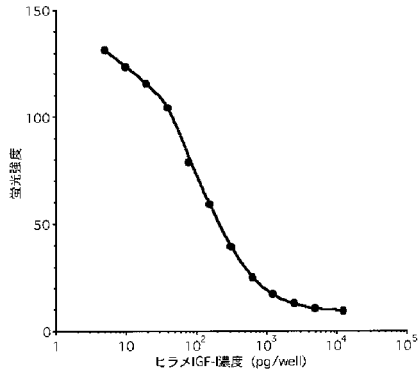
【図4】 時間分解蛍光免疫測定法における希釈マツカワ血漿の標準曲線との平行性を示した図である(試験例2)。

【図5】 酵素免疫測定法におけるヒラメIGF-Iの標準曲線を示した図である(実施例2)。

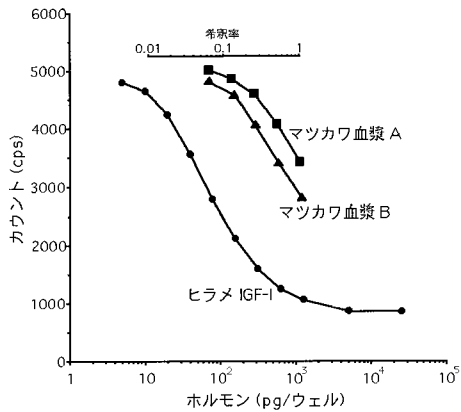
【図3】



【図5】

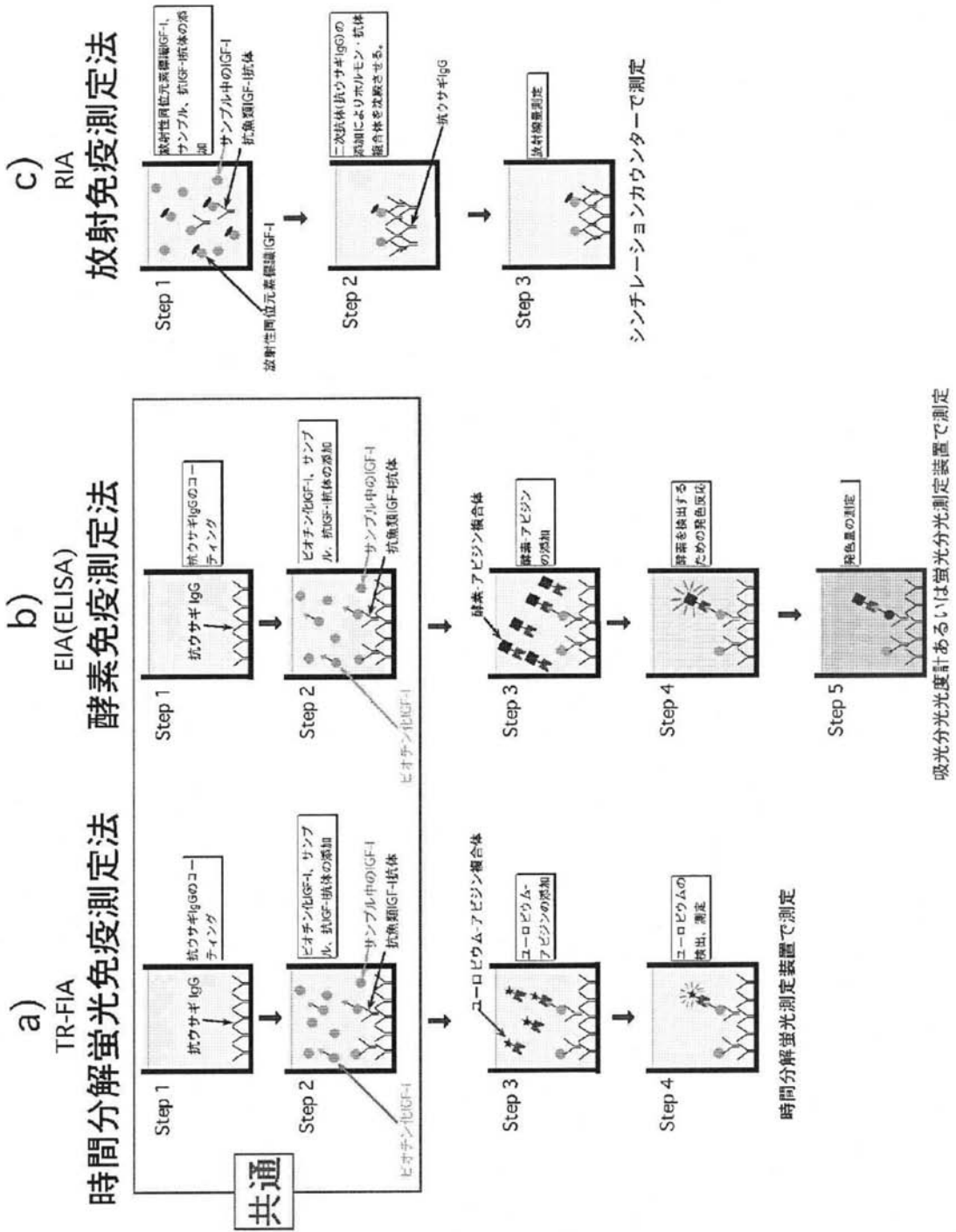


【図4】

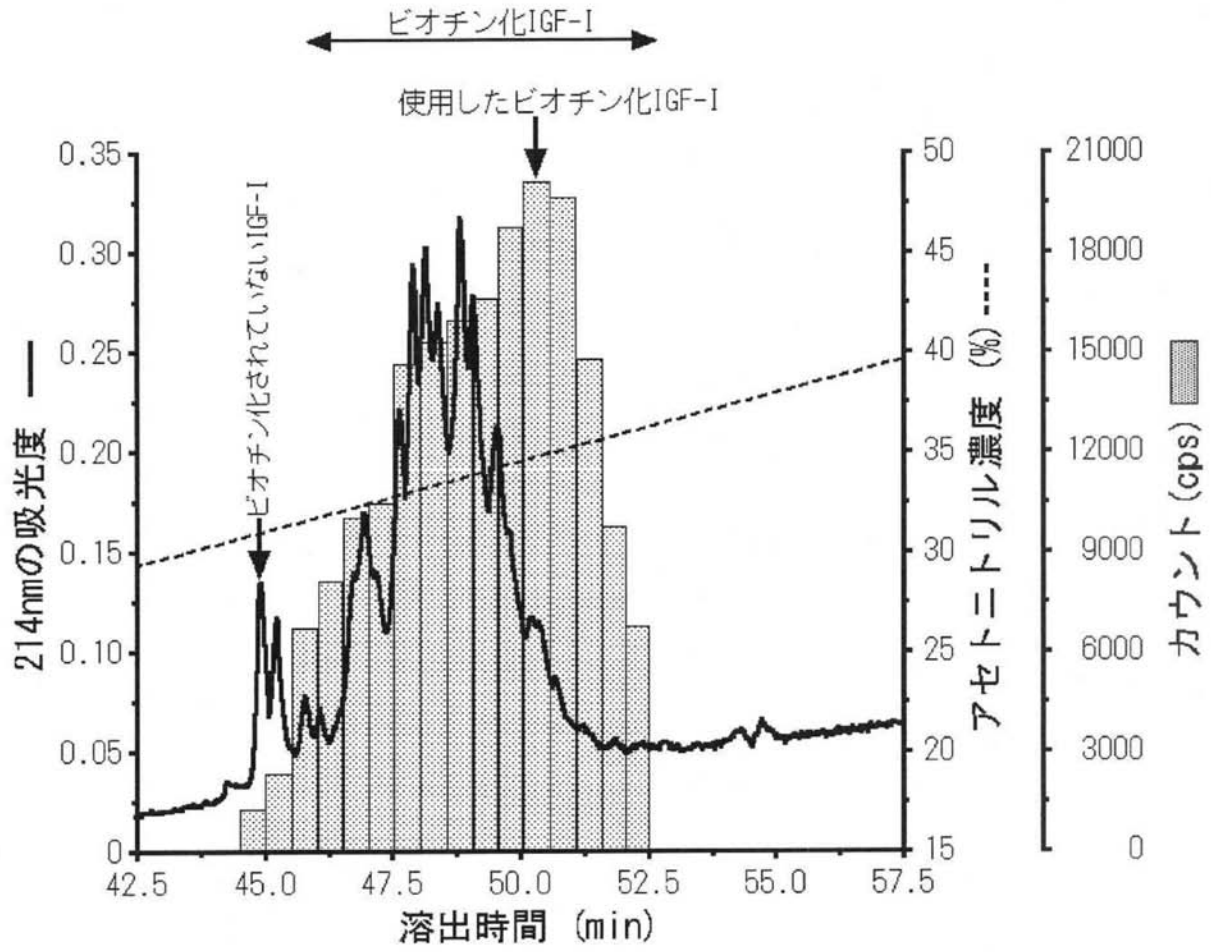


【 図 1 】

免疫測定法の概略



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/12

(72)発明者 安藤 忠

北海道釧路市桂恋 1 1 6 番地 独立行政法人水産総合研究センター 北海道区水産研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ79 QR02 QR48 QR66 QR77 QS03 QX02

4H045 AA10 AA30 BA10 CA52 DA38 EA50

专利名称(译)	鱼中igf-i浓度的测定方法及所用的测定试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006258673A</a>	公开(公告)日	2006-09-28
申请号	JP2005078307	申请日	2005-03-18
申请(专利权)人(译)	渔业研究中心研究所		
[标]发明人	安藤忠		
发明人	安藤 忠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 C12Q1/28 C07K14/65 G01N33/12		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/53.U G01N33/536.D C12Q1/28 C07K14/65 G01N33/12		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA52 4H045/DA38 4H045/EA50		
代理人(译)	石井雄 后藤早苗		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[问题] 提供一种可以安全，简便地测量鱼中IGF-I浓度的方法和试剂盒。  
 [解决方案] 通过使用生物素化的IGF-I的时间分辨荧光免疫测定或酶免疫测定来测定鱼中IGF-I浓度的方法，以及用于该方法的测定试剂盒。 [选型图]图1

