

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4753740号
(P4753740)

(45) 発行日 平成23年8月24日(2011.8.24)

(24) 登録日 平成23年6月3日(2011.6.3)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531		B
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48		A

請求項の数 4 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2006-39118 (P2006-39118)	(73) 特許権者	000195524 生化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
(22) 出願日	平成18年2月16日(2006.2.16)	(74) 代理人	100124512 弁理士 堀口 努
(65) 公開番号	特開2007-218721 (P2007-218721A)	(72) 発明者	石丸 剛 東京都東大和市立野三丁目1253 生化学工業株式会社 中央研究所内
(43) 公開日	平成19年8月30日(2007.8.30)	審査官	山村 祥子
審査請求日	平成21年1月28日(2009.1.28)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 反応性増強剤とその応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記群から選択される1又は2以上のシクロデキストリン誘導体を有効成分として含有する、50乃至130の加熱処理がされた血液、血清、血漿及び尿から選ばれる試料中に含まれるタンパク質又はポリペプチドの免疫学的測定用の反応性増強剤；

ヒドロキシエチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシエチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシエチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシメチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシメチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシメチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシブチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシブチル化 - シクロデキストリン、ヒドロキシブチル化 - シクロデキストリン。

【請求項2】

20における溶解性が、水100mLに対して25g以上であるシクロデキストリン誘導体を有効成分として含有する、50乃至130の加熱処理がされた血液、血清、血漿及び尿から選ばれる試料中に含まれるタンパク質又はポリペプチドの免疫学的測定用の反応性増強剤。

【請求項3】

試料が、界面活性剤を含有するものである、請求項1又は2に記載の反応性増強剤。

【請求項4】

10

20

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の反応性増強剤を用いることを特徴とする、試料中に含まれる物質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シクロデキストリン誘導体を有効成分として含有する反応性増強剤、並びにこれを用いた検出方法及び免疫学的測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

シクロデキストリン（以下、「CD」と略記する）は、D-グルコピラノースが 1 4 結合した非還元性の環状オリゴ糖であり、これを化学修飾した化合物としては、ヒドロキシアルキル化した種々の CD 誘導体等が知られている。

【0003】

特許文献 1 には、CD 誘導体の存在下で行うコレステロールの定量法が記載されている。しかしながら、免疫学的測定方法において CD 誘導体を使用することについては記載されていない。

【0004】

【特許文献 1】特許第 3091230 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、免疫学的測定用の反応性増強剤、並びにこれを用いた検出方法及び免疫学的測定キット提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、特定の CD 誘導体が、免疫学的測定における反応性を増強することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち本発明は、下記のものを提供する。

(1) 下記群から選択される 1 又は 2 以上の CD 誘導体を有効成分として含有する、試料中に含まれる物質の免疫学的測定用の反応性増強剤（以下、「本発明反応性増強剤 1」という）；

ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD。

(2) 20 における溶解性が、水 100 mL に対して 25 g 以上である CD 誘導体を有効成分として含有する、試料中に含まれる物質の免疫学的測定用の反応性増強剤（以下、「本発明反応性増強剤 2」という）。

(3) 試料が界面活性剤を含有するものである、上記 (1) 又は (2) に記載の反応性増強剤。

(4) 試料が生体由来の試料である、上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 つに記載の反応性増強剤。

(5) 上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 つに記載の反応性増強剤を用いることを特徴とする、試料中に含まれる物質の検出方法（以下、「本発明検出方法」という）。

(6) 上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の反応性増強剤を少なくとも含む、免疫学的測定キット（以下、「本発明免疫学的測定キット」という）。

【発明の効果】

【0008】

10

20

30

40

50

本発明は、免疫学的測定において用いる非常に優れた反応性増強剤、並びにこれを用いた検出方法及び免疫学的測定キットを提供することから極めて有用である。また本発明は、生体由来の試料中に存在する物質の、非常に高感度な検出に応用できることから、極めて有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、発明を実施するための最良の形態により本発明を詳説する。

< 1 > 本発明反応性増強剤 1

本発明反応性増強剤 1 は、下記群から選択される 1 又は 2 以上の CD 誘導体を有効成分として含有する、試料中に含まれる物質の免疫学的測定用の反応性増強剤である。

ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD

ここで、上記で選択される CD 誘導体としては、単一種類の CD 誘導体であってもよく、複数種類の CD 誘導体であってもよい。なかでも、上記において選択される CD 誘導体には、ヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD 及びヒドロキシブチル化 - CD から選択される 1 又は 2 以上の CD 誘導体が含まれることが、より顕著な反応性増強効果が期待できるといった観点から好ましい。

【0010】

上記の CD 誘導体は、グルコースの分子中に存在する水酸基が、それぞれ種々の置換基に置換されていることを構造的な特徴としている。ここで、それぞれの CD 誘導体が有する上記のような置換基の種類は、単数であっても良く、複数であっても良い。置換基の種類が単数である場合、ヒドロキシエチル化 - CD、ヒドロキシエチル化 - CD 及びヒドロキシエチル化 - CD における置換基はヒドロキシエチル基、ヒドロキシメチル化 - CD、ヒドロキシメチル化 - CD 及びヒドロキシメチル化 - CD における置換基はヒドロキシメチル基、ヒドロキシプロピル化 - CD 及びヒドロキシプロピル化 - CD における置換基はヒドロキシプロピル基、ヒドロキシブチル化 - CD、ヒドロキシブチル化 - CD 及びヒドロキシブチル化 - CD における置換基はヒドロキシブチル基となる。また、置換基の種類が複数である場合、例えば上記に例示した置換基のうち複数の置換基を有していても良いが、上記以外の置換基として、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、硫酸基等、その他の置換基を有していても良い。あるいは CD 誘導体の水酸基がマルトシル化、ガラクトシル化、グルコシル化されたものであっても良い。

【0011】

なお、上記のような CD 誘導体の構造あるいは物性を示す一つの指標としては、1 分子中に存在する置換基の平均数を示す置換度という概念が挙げられる。上記の CD 誘導体は、このような置換度によって限定されるものではないが、以下に CD 誘導体が有する置換基の種類が単数である場合について、好ましい置換度の例を示す。

【0012】

例えば単数の種類の置換基を有するヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD 又はヒドロキシプロピル化 - CD において、置換度、すなわちヒドロキシプロピル化 - CD、ヒドロキシプロピル化 - CD 又はヒドロキシプロピル化 - CD 1 分子中に存在するヒドロキシプロピル基の平均数が、それぞれ 1 ~ 10 であることが好ましく、2 ~ 8 であることが好ましく、4 ~ 6 であることが最も好ましい。

【0013】

また、以上のような CD 誘導体は、置換基を有しない CD に比べ、優れた溶解性を有することを一つの特徴としている。上記の CD 誘導体は、このような溶解性によって限定されるものではないが、20 における溶解性が、水 100 mL に対して 25 g 以上であることが好ましい溶解性として例示され、同条件において 50 g 以上であることがより好ま

10

20

30

40

50

しい溶解性として例示され、同条件において100g以上であることが最も好ましい溶解性として例示される。

【0014】

なお本明細書において、20における溶解性は、水100mLに対してある重量のCD誘導体を混合し、目視により溶解したか否かを確認することにより測定することができる。

【0015】

本発明反応性増強剤1の状態は特に限定されず、溶液状態であっても、固体状態であってもよい。また必要に応じて、上記CD誘導体以外の他の成分をさらに添加したものであってもよい。このような成分としては、例えば、リン酸緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤、グッド緩衝剤及びホウ酸緩衝剤等に例示される緩衝剤、安定化剤、防腐剤、糖類等の添加剤が例示される。

10

【0016】

また、本発明反応性増強剤1において「試料」とは、免疫学的測定によって検出され得る物質を含有するか、これを含有する可能性がある試料である限りにおいて特に限定されないが、血液、血清、血漿、尿、唾液、関節液、組織液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物、菌体培養液、菌体抽出物及びこれらの調製物等に例示される、生体由来の試料であることが好ましく、なかでも血液、血清若しくは血漿、尿、又はこれらの調製物であることがより好ましい。

【0017】

20

ここで、上記の調製物としては、例えば緩衝剤、安定化剤、防腐剤、糖類及び界面活性剤等の添加剤を添加した調製物、上記の各種生体由来の試料を、加熱等の処理により、滅菌又は除菌した調製物等が例示される。

【0018】

上記の加熱における加熱温度は特に限定されないが、例えば50乃至130であることが好ましく、50乃至80であることがより好ましく、50乃至70であることが極めて好ましく、60乃至65であることが最も好ましい。また、加熱時間についても特に限定されないが、例えば50乃至70にて加熱を行う場合、1乃至20時間であることが好ましく、10乃至20時間であることがより好ましい。また、例えば60乃至65にて加熱を行う場合、1乃至30時間であることが好ましく、6乃至24時間であることがより好ましく、10乃至20時間であることが最も好ましい。また加熱は、加圧処理等の他の処理と組み合わせて行うこともできる。このような例としては、例えば60乃至130にて5分間乃至2時間加熱加圧を行う、オートクレーブ処理等が例示される。

30

【0019】

このような処理は、試料中に、例えばドデシル硫酸ナトリウム（以下、「SDS」と略記する）、ドデシル硫酸リチウム、ドデカンスルホン酸ナトリウム、テトラデシル硫酸ナトリウム等に例示される界面活性剤を添加した上で行うことが、蛋白の変質・変性に伴う試料の凝固を防止するといった観点から好ましい。なお、このような場合において、試料中における界面活性剤の濃度は特に限定されないが、良好な凝固防止効果が期待できるといった観点から、0.1重量%～5重量%であることが好ましく、0.1重量%～3重量%であることがより好ましく、約1重量%であることが最も好ましい。

40

【0020】

上記のような加熱及び/又は加圧処理は、一般に、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ及びトリ等の人畜共通感染症を有する動物に由来する試料中の被験物質の検出を行う際に、作業者の安全を確保する目的等で行われる。

【0021】

しかしこのような処理は、被験物質の検出感度の低下の原因となることがある。本発明反応性増強剤1は、このような検出感度の低下を補い、検出感度を改善する役割を果たすことから、加熱及び/又は加圧処理がなされた試料中の被験物質の測定において、特に有効に用いることができる。

50

【0022】

一方、ある種の界面活性剤については、界面活性剤の存在自体が、被験物質の検出感度の低下を招くことがある。したがって本発明反応性増強剤1は、界面活性剤を含む試料中の被験物質の測定、とりわけ加熱及び/又は加圧処理がなされ、且つ界面活性剤を含む試料中の被験物質の測定においても、特に有効に用いることができる。

【0023】

加熱及び/又は加圧処理、界面活性剤の添加等に伴う検出感度の低下は、被験物質によっても異なる。本発明反応性増強剤1は、検出感度の低下を補い、検出感度を向上する役割を果たすことから、加熱及び/又は加圧処理、界面活性剤の添加による検出感度の低下が懸念される物質の検出に、特に有効に用いることができる。このような物質としては、
10 具体的には例えばレプチン、インスリン、インターロイキン（インターロイキン1～18等）、アンジオテンシン、免疫グロブリン（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgT、IgY等）、サイトカイン類、キモカイン類、細胞外基質タンパク、感染物質（菌、ウイルス等）由来のタンパク質等のタンパク質、ポリペプチド、コレステロール等が例示される。

【0024】

本発明反応性増強剤1は、免疫学的測定において用いる。

【0025】

ここで、免疫学的測定としては、例えばEIA法及びELISA法等のエンザイムイムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法（FIA法）及びラジオイムノアッセイ法（RIA法）等の標識イムノアッセイ、化学発光酵素免疫測定法（CLIA法）、ラテックス凝集反応法、レーザーイムノアッセイ等の非標識イムノアッセイ法等の、公知の免疫学的測定が例示される。
20

【0026】

免疫学的測定においては、検出の対象である上記の試料中に存在する物質（本明細書において、「被験物質」という）と、当該被験物質に特異的に結合する物質との間に惹起される、免疫学的な反応に基づいて被験物質を検出する。ここで、例えば被験物質が抗原である場合、当該抗原と特異的に反応する抗体を用いることにより、上記抗原を検出することができる。逆に、例えば被験物質が抗体である場合は、当該抗体と特異的に反応する抗原を用いることにより、上記抗体を検出することができる。
30

【0027】

上記の抗体としては、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体及びファージディスプレイ法などによって作製される抗体、並びにその活性断片、固相化物及び標識物質等が例示される。

【0028】

本発明反応性増強剤1は、上記のような抗原と抗体との間の反応において、反応試料中でこれら二者と共存することにより、上記反応を増強する効果を発揮することができる。

【0029】

反応試料中に共存させる本発明反応性増強剤1の濃度は特に限定されず、用いるCD誘導体の種類、試料の種類、被験物質の種類、希望する反応性の増強の程度等によって適宜選択することができるが、反応性増強効果及びCD誘導体の溶解性等の観点から、0.1～30重量%であることが好ましく、0.2～20重量%であることがより好ましい。より具体的には、加熱処理がなされた試料中の被験物質の検出においてヒドロキシプロピル化 - CDを用いる場合、0.2～10重量%であることが好ましく、0.8～6重量%であることがより好ましく、約6重量%であることが最も好ましい。また、加熱処理がなされた試料中の被験物質の検出においてヒドロキシプロピル化 - CDを用いる場合、0.2～20重量%であることが好ましく、0.8～10重量%であることがより好ましく、5～6重量%であることが最も好ましい。一方、加熱処理がなされていない試料中の被験物質の検出においてヒドロキシプロピル化 - CDを用いる場合、0.2～20重量%であることが好ましく、0.5～10重量%であることがより好ましく、5～6重量%で
40
50

あることが最も好ましい。また、加熱処理がなされていない試料中の被験物質の検出においてヒドロキシプロピル化 - CDを用いる場合、0.2 ~ 20重量%であることが好ましく、0.5 ~ 20重量%であることがより好ましく、6 ~ 10重量%であることが最も好ましい。

【0030】

また、本発明反応性増強剤1を反応試料中に共存させるタイミングについても特に限定されないが、免疫学的測定に先立って、被験物質を含む試料、又は被験物質を検出するために用いる溶液等（特に被験物質と特異的に結合する抗体を含む溶液等）に、予め本発明反応性増強剤1を混合させておくことが好ましい。

【0031】

また、免疫学的測定の際の試料の温度も特に限定されないが、20 ~ 50 °Cであることが好ましく、30 ~ 40 °Cであることがより好ましく、37 °Cであることが最も好ましい。

【0032】

本発明反応性増強剤1において、「反応性を増強する」との用語は、上述したような免疫学的な反応が惹起される程度を増大させることを意味する。反応が惹起された程度は、例えば後述する実施例1に記載のように、吸光度に基づいて確認することができる。

【0033】

ここで、強度の増大の程度は特に限定されないが、本発明反応性増強剤1を使用しない場合の反応の強度を100%とした場合における、本発明反応性増強剤1を使用した場合の相対的な反応の強度が、110%以上であることが好ましく、120%であることが好ましく、130%以上であることが極めて好ましく、150%以上であることが最も好ましい。

< 2 > 本発明反応性増強剤2

本発明反応性増強剤2は、20 °Cにおける溶解性が、水100 mLに対して25 g以上であるCD誘導体を有効成分として含有する、試料中に含まれる物質の免疫学的測定用の反応性増強剤である。

【0034】

上記におけるCD誘導体の20 °Cにおける溶解性は、水100 mLに対して25 g以上である限りにおいて特に限定されないが、50 g以上であることがより好ましく、100 g以上であることが最も好ましい。

【0035】

本発明反応性増強剤2における具体的なCD誘導体の例としては、例えば上記< 1 > 本発明反応性増強剤1で具体的に列挙したCD誘導体の一部又は全部の他、MCT - CD及びメチル - CD（ともに、横浜国際バイオ研究所製）等が例示される。

【0036】

本発明反応性増強剤2の状態は特に限定されず、溶液状態であっても、固体状態であってもよい。また必要に応じて、上記CD誘導体以外の他の成分をさらに添加したものであってもよい。このような成分としては、例えば、リン酸緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤、グッド緩衝剤及びホウ酸緩衝剤等に例示される緩衝剤、安定化剤、防腐剤、糖類等の添加剤が例示される。

【0037】

また、上記において、「試料」、「試料中に含まれる物質」及び「免疫学的測定」なる用語の意義、反応性増強剤として用いる方法、並びに「反応性を増強する」との用語の意義等は、上記< 1 > 本発明反応性増強剤1の説明を参照されたい。

< 3 > 本発明検出方法

本発明検出方法は、本発明反応性増強剤1又は2を用いることを特徴とする、試料中に含まれる物質の検出方法である。

【0038】

上記の「試料」、「試料中に含まれる物質」及び「検出」との用語の意義については、前

10

20

30

40

50

記< 1 >本発明反応性増強剤 1 に記載の通りである。

【 0 0 3 9 】

また、試料中に含まれる物質の検出において本発明反応性増強剤 1 又は 2 を用いる方法についても、< 1 >本発明反応性増強剤 1 及び< 2 >本発明反応性増強剤 2 で説明した通りである。

< 4 >本発明免疫学的測定キット

本発明免疫学的測定キットは、本発明反応性増強剤 1 又は 2 を少なくとも含む免疫学的測定キットである。

【 0 0 4 0 】

本発明免疫学的測定キットを用いることにより、上述した本発明検出方法をより効率的且つ簡便に行うことができる。本発明免疫学的測定キットに含まれる本発明反応性増強剤 1 又は 2 の状態、形態等も特に限定されないが、具体的には、例えば固体状態又は溶液状態の本発明反応性増強剤 1 又は 2 を容器に収容し、本発明免疫学的測定キットの構成成分とすることができる。

10

【 0 0 4 1 】

また本発明免疫学的測定キットは、本発明反応性増強剤 1 又は 2 以外の構成成分として、例えば抗体固相化担体（固相としては、プレート、ビーズ、メンブレン等が例示される）、検出用抗体（1次抗体、2次抗体、標識抗体）、反応バッファー、洗浄液、反応基質、基質溶解液、反応基質液、発色停止液、抗原標準溶液、緩衝剤、血清添加剤、界面活性剤等に例示される添加剤等のその他の構成成分を含むものであってもよい。

20

【 0 0 4 2 】

以下、本発明を実施例により具体的に詳説する。なお、実施例においては以下の略号を用いる。

H P - - C D : ヒドロキシプロピル化 - C D

H P - - C D : ヒドロキシプロピル化 - C D

H P - - C D : ヒドロキシプロピル化 - C D

H B - - C D : ヒドロキシブチル化 - C D

H B - - C D : ヒドロキシブチル化 - C D

H B - - C D : ヒドロキシブチル化 - C D

【実施例 1】

30

【 0 0 4 3 】

1) C D 類の反応性増強効果の検証 - その 1

マウス血清に、10重量%のSDS溶液をSDS濃度が1重量%となるように添加し、加熱処理（60、18時間）を行った。

【 0 0 4 4 】

マウスレプチン測定キット（森永生科学研究所製）の検体希釈液に、8g/LのNaCl及び0.05%のプロクリン300を含む、50mM トリス塩酸緩衝液（pH7.3~7.7）溶液（以下、「TBS」と略記する）を用いて5%となるように調製した表1に記載のCD類（日本食品化工製）を、表1記載の試験濃度になる様に添加した。この反応液を用い、下記の手順でマウスレプチン測定キットを用いて反応性の測定を行った。

40

【 0 0 4 5 】

すなわち、抗体固相化プレートをフレームにセットし、各ウェルを300μLの洗浄液で2回洗浄した。続いて、各ウェルに検体希釈液を45μL、モルモット抗マウスレプチン抗血清を50μLずつ添加した後、各ウェルに上記で調製した試験物質添加群の試料を5μL添加し、4で16~20時間静置した（第一反応）。第二反応の後、各ウェルを300μLの洗浄液で5回洗浄した。その後、各ウェルに酵素標識抗モルモットIgG抗体原液を100μLずつ添加し、4で3時間静置した（第二反応）。第二反応の後、各ウェルを300μLの洗浄液で洗浄した。続いて、各ウェルに酵素基質（TMB）液を100μLずつ添加し、常温（15~25）で30分間静置させ、発色させた（発色反応）。発色反応の後、各ウェルに反応停止液を100μLずつ添加し、発色反応を停止させ、

50

プレートリーダーで各ウェルの吸光度（測定波長：450nm、対照波長：630nm）を測定した。

【0046】

CD類無添加の反応液で測定した場合の吸光度差を100%とした場合における、CD類を添加した反応液で測定した場合の吸光度差の割合（%）を求めた。なお、上記の吸光度差は、各測定により得られた吸光度から、検体希釈液の吸光度（ブランク）を減算することにより得た。結果を表1に示す。HP- α -CD、HP- β -CD、HB- β -CD、並びにHP- α -CD、HP- β -CD及びHP- γ -CDの混合物が、顕著な反応性増強効果を有することが確認された。

[表1] CD類の反応性増強効果

試験物質	試験濃度 (%)	反応性 (%)
無添加	-	100
α -CD	0.05	108
β -CD	0.05	104
γ -CD	0.5	108
HP- α -CD	0.5	134
HP- β -CD	0.5	126
HP- γ -CD	0.5	86
HB- β -CD	0.5	129
HP- α -CD+HP- β -CD+HP- γ -CD	0.5* ¹	124

* 1 HP- α -CD、HP- β -CD及びHP- γ -CDそれぞれの濃度を示す。

2) CD誘導体の濃度検討 - その1

マウス血清に、10重量%のSDS溶液をSDS濃度が1重量%となるように添加し、加熱処理（60℃、18時間）を行った。

【0047】

HP- α -CD及びHP- β -CDを、それぞれTBSを用いて100%溶液（100mLに対し、100g溶解した溶液を100%溶液とした）を作製し、表2に記載の各試験濃度の5倍濃度となるようにTBSで調製し、更に、マウスレプチン測定キットの検体希釈液で5倍希釈し、各試験物質溶液を、表2に記載の試験濃度となるように調製した。この反応液を用いることその他、上記1)と同様の方法により、上記試料中に存在するマウスレプチンを測定した。

【0048】

HP- α -CD及びHP- β -CD無添加の反応液で測定した場合の吸光度差を100%とした場合における、HP- α -CD又はHP- β -CDを各濃度に添加した反応液で測定した場合の吸光度差の割合（%）を求めた。

【0049】

HP- α -CD又はHP- β -CDの各濃度における反応性を表2に示す。HP- α -CDについては0.2~10%、HP- β -CDについては0.2~20%の範囲において、反応性増強効果が確認された。

[表2]

試験濃度 (%)	反応性 (%)	
	HP- α -CD	HP- β -CD
20	84	102
10	113	122
6	144	134
5	131	129
1	143	123
0.8	135	119
0.5	115	108
0.2	114	106
0	100	

10

【実施例 2】

【0050】

1) CD類の反応性増強効果の検証 - その2

マウス血清に、10重量%のSDS溶液をSDS濃度が1重量%となるように添加した。

【0051】

表3に記載のCD類を、それぞれTBSを用いて表3に記載の試験濃度の10倍の濃度となるように調製し、試験物質溶液を得た。

20

【0052】

マウスレプチン測定キットの検体希釈液に、各試験物質溶液を、表3に記載の試験濃度となるように添加した。この反応液を用い、上述した実施例1と同様の方法により、上記のマウス血清由来の試料中に存在するマウスレプチンを測定した。

【0053】

CD類無添加の反応液で測定した場合の吸光度差を100%とした場合における、CD類を添加した反応液で測定した場合の吸光度差の割合(%)を求めた。結果を表3に示す。HP- α -CD、HP- β -CD、HB- β -CD、並びにHP- α -CD、HP- β -CD及びHP- α -CDの混合物が、反応性増強効果を有することが確認された。

30

[表3]

試験物質	試験濃度 (%)	反応性 (%)
無添加	-	100
α -CD	0.05	109
β -CD	0.05	119
γ -CD	0.5	115
HP- α -CD	0.5	209
HP- β -CD	0.5	161
HP- γ -CD	0.5	94
HB- β -CD	0.5	158
HP- α -CD+HP- β -CD+HP- γ -CD	0.5	175

40

【0054】

2) CD誘導体の濃度検討 - その2

マウス血清に、10重量%のSDS溶液をSDS濃度が1重量%となるように添加した。

【0055】

50

HP- α -CD及びHP- β -CDを、それぞれTBSを用いて表4に記載の各試験濃度の5倍の濃度となるように調製し、更に、マウスレプチン測定キットの検体希釈液で5倍希釈し、各試験物質溶液を、表4に記載の試験濃度となるように調製した。この反応液を用いることの他、上述した実施例1と同様の方法により、上記のマウス血清に由来する試料中に存在するマウスレプチンを測定した。

【0056】

HP- α -CD及びHP- β -CD無添加の反応液で測定した場合の吸光度差を100%とした場合における、HP- α -CD又はHP- β -CDを各濃度に添加した反応液で測定した場合の吸光度差の割合(%)を求めた。

【0057】

HP- α -CD又はHP- β -CDの各濃度における反応性を表4に示す。HP- α -CD及びHP- β -CDについて、0.2~20%の範囲で反応性増強効果が確認された。

[表4]

試験濃度 (%)	反応性 (%)	
	HP- α -CD	HP- β -CD
20	121	147
10	166	178
6	189	187
5	195	156
1	160	149
0.8	177	148
0.5	150	137
0.2	122	110
0 (無添加)	100	

【実施例3】

【0058】

トウモロコシペプチドを、TBSを用いて10%に調製した。このトウモロコシペプチド溶液をマウス血清に添加し、更に10重量%のSDSをSDS濃度が1%となるように添加した後、加熱処理(65℃、18時間)を行った。

【0059】

また、HP- α -CDを、TBSを用いて60%及び8%に調製した。これらの溶液を6%、0.8%となるようにキット検体希釈液に添加した。この反応液を用いることの他、実施例1と同様の方法により、上記試料中に存在するマウスレプチンを測定した。

【0060】

トウモロコシペプチド無添加のマウス血清を用い、且つHP- α -CDを添加しない検体希釈液を用いて測定した場合の吸光度差を100%とした場合における、トウモロコシペプチド及びHP- α -CDを用いた場合の吸光度差の割合(%)を求めた。結果を下記表5に示す。トウモロコシペプチド及びHP- α -CDを併用することにより、さらに高い検出感度でレプチンを測定できることが明らかになった。

[表5] トウモロコシペプチド及びHP- α -CDを用いたマウスレプチンの測定

			測定系		
			HP- α -CD		
			無添加	0.8%	6%
血清処理	トウモロコシペプチド	無添加	100 %	135 %	120 %
		1%	97 (100) %	150 (155) %	140 (145) %

【実施例 4】

【0061】

(参考例 1)

下記に加熱によって検出感度が低下するおそれのある被験物質の例について、参考例を示す。

【0062】

ヒトアンギオテンシンII (31.25 pg/ml)、ラットインスリン (320 pg/ml)、マウスレプチン (6400 pg/ml)、ヒトIL-1 (ヒトインターロイキン-1、250 pg/ml)、ラットIgE (32 ng/ml) を含む標準溶液を60、18時間処理した後、下記のキットを用いて試料中に含まれる上記の各被験物質を測定した。測定には、ヒトアンギオテンシンII測定キット (SPLBIO製)、ラットインスリン測定キット (森永生科学研究所製)、マウスレプチン測定キット (森永生科学研究所製)、ヒトIL-1測定キット (Cayman製)、ラットIgE測定キット (森永生科学研究所製) を用い、キットに添付の操作方法に準じて測定した。なお、加熱によって試料が凝固した場合には、遠心 (12,000 rpm、15分) を行い、得られた上清を測定に用いた。上記試料中に含まれるそれぞれの被験物質について、加熱処理を行わなかった場合 (未処理) の吸光度差を100%とした場合における、吸光度差の割合 (%) を求めた。結果を下記表6に示す。

[表 6]

	反応性 (%)	
	未処理	加熱処理
アンギオテンシンII	100	75
インスリン	100	38
レプチン	100	0
IL-1 α	100	0
IgE	100	0

【0063】

以上のことから、特にインスリン、レプチン、IL-1、IgEにおいては、加熱処理によって著しく検出感度が低下することが明らかになった。

10

20

30

40

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2004-109062(JP,A)
特開平11-248706(JP,A)
米国特許出願公開第2005/0100935(US,A1)

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

专利名称(译)	反应性增强剂及其应用		
公开(公告)号	JP4753740B2	公开(公告)日	2011-08-24
申请号	JP2006039118	申请日	2006-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
[标]发明人	石丸剛		
发明人	石丸 剛		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/48.A		
F-TERM分类号	2G045/CA00 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07		
代理人(译)	堀口勉		
其他公开文献	JP2007218721A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为免疫测定提供反应增强剂，使用它的检测方法和免疫测定试剂盒。ZSOLUTION：包含在样本中的物质免疫测定的反应性增强剂含有一种或两种或多种选自羟乙基化 α -CD，羟乙基化 β -CD，羟乙基化 γ -CD的环糊精(CD)衍生物，羟甲基化的 α -CD，羟甲基化的 β -CD，羟甲基化的 γ -CD，羟丙基化的 α -CD，羟丙基化的 β -CD，羟丙基化的 γ -CD，羟基丁基化的 α -CD，羟基丁基化的 β -CD和羟基丁基化的 γ -CD作为有效成分。Z

[表1] CD類の反応性增強効果

試験物質	試験濃度 (%)	反応性 (%)
無添加	-	100
α -CD	0.05	108
β -CD	0.05	104
γ -CD	0.5	108
HP- α -CD	0.5	134
HP- β -CD	0.5	126
HP- γ -CD	0.5	86
HB- β -CD	0.5	129
HP- α -CD+HP- β -CD+HP- γ -CD	0.5 ^{*1}	124