

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 264328

(P2001 - 264328A)

(43)公開日 平成13年9月26日 (2001.9.26)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	A 4 B 0 6 3
	33/00	33/00	U
	33/548	33/548	D
// C 1 2 Q 1/42		C 1 2 Q 1/42	A
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 数)			

(21)出願番号 特願2000 - 76348(P2000 - 76348)

(22)出願日 平成12年3月14日(2000.3.14)

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 丸尾 直子

神奈川県横浜市西区戸部本町49 - 15 - 408

(72)発明者 山田 雅士

神奈川県横浜市鶴見区豊岡町21 - 5プライム

コート鶴見604

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA20 QQ18 QQ19 QQ33

QQ75 QQ91 QQ94 QR13 QR48

QR51 QR58 QR82 QS03 QS33

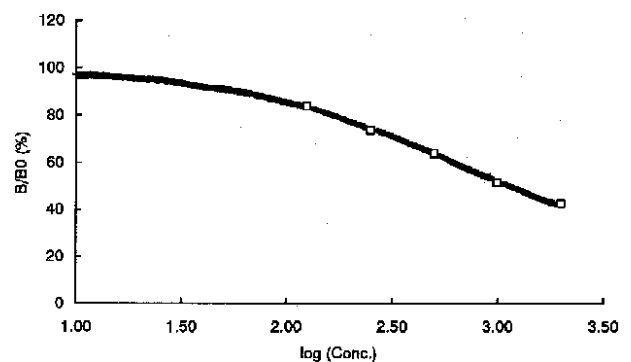
QX02

(54)【発明の名称】 エチニルエストラジオールの酵素免疫測定法

(57)【要約】

【課題】エチニルエストラジオールを簡単に特異的に検出でき、環境サンプル中の本物質の測定が簡便かつ高感度を実施できる方法を提供する。

【解決手段】試料中のエチニルエストラジオールと、酵素標識エチニルエストラジオールを、固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化される抗エチニルエストラジオール抗体上で競合させ、該抗体に結合した又はしなかった酵素標識エチニルエストラジオールを検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】試料中のエチニルエストラジオールと、酵素標識エチニルエストラジオールを、固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化される抗エチニルエストラジオール抗体上で競合させ、該抗体に結合した又はしなかった酵素標識エチニルエストラジオールを検出することを特徴とするエチニルエストラジオールの測定法。

【請求項2】請求項1に記載の方法において、抗エチニルエストラジオール抗体の固相への間接的固定化が、

(1) 抗エチニルエストラジオール抗体に結合しうる異種動物抗体を介して行われる、(2) 抗エチニルエストラジオール抗体が低分子物質により修飾されており、その低分子物質に結合する抗体を介して行われる、(3) スレプトアビジン及びビオチンを介して行われる、又は、(4) 免疫グロブリンに対して特異的に結合する物質を介して行われることを特徴とする方法。

【請求項3】請求項1又は2に記載の方法において、標識酵素がアルカリ性ホスファターゼであることを特徴とする方法。

【請求項4】請求項1～3いずれかに記載の方法において、試料が生体外に存在する水、土、または大気に由来するものであることを特徴とする方法。

【請求項5】酵素標識エチニルエストラジオール、及び固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化される抗エチニルエストラジオール抗体からなることを特徴とする、エチニルエストラジオールの競合法測定キット。

【請求項6】請求項5に記載のキットにおいて、標識酵素がアルカリ性ホスファターゼであることを特徴とする

キット。

【請求項7】請求項5または6に記載のキットにおいて、測定対象が生体外に存在する水、土、または大気に由来するものであることを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中に含まれるエチニルエストラジオール(Ethinyl-1,3,5[10]-estratriene-3,17-diol)の酵素免疫測定法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】17-エチニルエストラジオール(17-Ethinyl-1,3,5[10]-estratriene-3,17-diol)は合成卵胞ホルモンの一種であり、従来合成黄体ホルモンとともに避妊薬(ピル)として用いられており、低用量ピルの場合1錠に約30～40μg含まれている。合成型ピルは長期持続性注射薬やホルモンの皮下移植による避妊法と異なり、ほぼ24時間以内で血中レベルのホルモン量が消失するため、排卵日におけるLH、FSHのピークを消

失させ排卵を阻止する働きより避妊作用があると考えられている(ホルモンと臨床46巻No.5(1998年)57-63ページ、ピルによる避妊の基礎と実際、廣井正彦)。低用量ピルが最近正式に認可されたことから、本剤の使用量は飛躍的に上昇することが考えられ、それとともに、本剤の廃棄量も増加すると考えられる。すでに、イギリスの河川水では、天然エストロゲンとともに17-エチニルエストラジオールが発見されたとの報告がある(ぶんせき1999年2月号、94-98ページ、環境ホルモン問題と分析化学、井口泰泉)。

【0003】経口投与された17-エチニルエストラジオールは、肝臓で抱合化されて尿中に排泄されるとされているが、17-エチニルエストラジオールの生物活性は、バイオアッセイ(エストロゲン依存性増殖を示す乳腺腫瘍細胞(MCF-7)をエストロゲンフリー培養液中で培養し、エストロゲン様作用を持つ化学物質曝露による増殖活性をみる評価方法)の結果からはエストラジオールと同等であるため、本物質の環境中への放出・残存は生態系特に生殖機能とりわけ胎児発育に重篤な影響を与える危険性がある。従って、環境水、土壌などに本物質が残存していないことを定期的にモニターすることが望ましく、さらに本物質が検出された場合には、速やかに除去措置を講じる必要がある。

【0004】従来本物質の測定としては、GC/MS、先述のバイオアッセイ及びRIAがある。GC/MSは質量数により物質の特定は容易で、また内部標準添加により定量性もあるが、他に多数のステロイドが含まれている試料においてはクリーンアップ操作が必須であり、測定サンプル調製までに要する時間及び労力が大きい。特に河川水、土壌、大気などの環境から得られたサンプルのように、汚染状況を把握するため多地点からサンプリングを行いサンプル数が多い場合は、測定までに要する作業量は膨大であり、時間を要するため、結果を取得できた時点では本物質による汚染の拡大が起きている危険性がある。バイオアッセイについては、細胞上のエストロゲンレセプターを用いた測定のためエストロゲン作用を直接に把握することはできるが、17-エチニルエストラジオールに特異的ではなく、生物活性を有する他物質の影響を除去することはできない。また、細胞増殖で評価するため、評価に1週間程度の時間が必要であり、さらに細胞の状態を一定に保つために技術と労力が必要であり、特定の技術者でなければ測定が不可能である。また、生物反応を指標とするため、再現性に乏しいという欠点がある。

【0005】免疫測定は、交叉反応性が低く特異性の高い抗体を選択すれば、特別なクリーンアップを必要とせず、また類似構造を有するステロイドの影響を受けずに測定が可能であるとともに、サンプルの処理能力が高い。また、短時間で高感度に再現性よく17-エチニルエストラジオールのみを測定することが可能であるこ

とから、本物質の定量において有効な方法である。ところが、通常実施されるラジオイムノアッセイ(RIA)は放射性同位元素を使用するため、特別な場所と設備を必要とする上、放射性廃棄物が生じ、廃棄物の保管及び処理を厳重に行う必要があることから、多点測定とフィールドワークの必要な環境サンプルの測定には適さない。酵素免疫測定法はその点特別な設備を必要とせず、比較的短時間で高感度に測定対象を検出できるため、環境サンプルのように一度に多数のサンプルを測定する場合に適している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】17-エチニルエストラジオールはエストラジオールと同等の強い女性ホルモン活性を有しており、その環境中への放出は生態系に影響を与え、生殖機能の変化、特に胎児においてはオスの雌化を惹起する原因となる。さらに、動物脂肪中で蓄積し、これを摂取した食物連鎖上位の個体体内でさらに濃縮されていくため、毒性が増強される。従って河川、土壌など環境中の17-エチニルエストラジオールの測定を行って本物質の環境中濃度の上昇を監視し、17-エチニルエストラジオール濃度上昇を未然に防ぐとともに、万が一異常高値が認められた場合、適切な除去措置を講じる必要がある。そのためには、定期的に決められた地点のモニタリングを行うことが有効であり、高感度で処理能力の高い簡便な定量法の構築が望まれる。

【0007】本発明の目的は、エチニルエストラジオールを簡単に特異的に検出でき、環境サンプル中の本物質の測定が簡便かつ高感度に実施できる方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題に関して鋭意検討した結果、本発明に到達した。すなわち、本発明は、試料中のエチニルエストラジオールと、酵素標識エチニルエストラジオールを、固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化されうる抗エチニルエストラジオール抗体上で競合させ、該抗体に結合した又はしなかった酵素標識エチニルエストラジオールを検出することを特徴とする、エチニルエストラジオールの測定法である。

【0009】また本発明は、酵素標識エチニルエストラジオール、及び固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化されうる抗エチニルエストラジオール抗体からなることを特徴とする、エチニルエストラジオールの競合法測定キットである。以下本発明をさらに詳細に説明する。

【0010】本発明による測定法は、17-エチニルエストラジオール、17-エチニルエストラジオールのどちらの測定にも用いることができ、それぞれに特異的に結合する抗体、及び酵素標識体を用いればよい。一般的には、17-エチニルエストラジオールを測定す

ることが多いので、その際には、17-エチニルエストラジオールに特異的に結合する抗体、及び酵素標識17-エチニルエストラジオールを用いればよい。

【0011】本発明で使用される酵素標識は、通常免疫反応において用いられる酵素であれば限定はなく、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼ標識をあげることができる。

【0012】酵素標識エチニルエストラジオールの作製方法は特に限定されないが、エチニルエストラジオールと酵素との結合については、活性化エステル法にて結合させることが好ましい。この際エチニルエストラジオールと標識酵素との間のスペーサはあってもなくてもよい。

【0013】本発明で使用される抗体は、エチニルエストラジオールに対して特異的に反応するものであれば特に限定はなく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよい。また遺伝子工学的に作製されたものや、抗体フラグメントであってもよい。さらに抗体の製法に関しても特に限定はなく、エチニルエストラジオールをそのまま免疫してもかまわないが、エチニルエストラジオールの特異的な構造(抗原決定基)とタンパク質結合部位としてのカルボキシル基を有するエチニルエストラジオール誘導体(ハプテン)を作製し、これをウシ血清アルブミンなどのタンパク質と結合した免疫原を用いて製造してもよい。

【0014】本発明に用いられる抗エチニルエストラジオール抗体は、固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化されうるものである。抗エチニルエストラジオール抗体の固相への間接的固定化は、例えば

(1)抗エチニルエストラジオール抗体に結合しうる異種動物抗体を介して行われる、(2)抗エチニルエストラジオール抗体が低分子物質により修飾されており、その低分子物質に結合する抗体を介して行われる、(3)ストレプトアビジン及びビオチンを介して行われる、又は、(4)免疫グロブリンに対して特異的に結合する物質を介して行われる等が例示される。

【0015】(2)の低分子物質としては、例えばフルオレッセイン、ルミノールなどが例示される。また(3)のストレプトアビジン及びビオチンは、どちらが抗体側に結合してもよい。さらに(4)の免疫グロブリンに対して特異的に結合する物質としては、プロテインAなどが例示される。

【0016】抗体が固相に間接的に固定化される時期には特に限定はない。抗体は競合反応前にあらかじめ固相に間接的に固定化されていてもよいが、競合反応中または競合反応後に固定化されることが好ましい。

【0017】酵素標識エチニルエストラジオールを検出するには、酵素基質を添加し、その反応の程度から求めればよい。

【0018】本発明に用いられる試料としては特に限定

されるものではないが、とりわけ非血清試料、例えば体外に存在する水、土壌、大気などの環境から得られた試料であっても、好ましく測定できる。この場合、試料は測定前に適宜濃縮することが好ましい。

【0019】また本発明は、上述の測定法を行うためのキットに関するものであり、酵素標識エチニルエストラジオール、及び固相に間接的に固定化された又は固相に間接的に固定化される抗エチニルエストラジオール抗体からなる。このキットには、その他に抗体を固定化するための固相などが含まれていてもよい。

【0020】

【発明の効果】本発明によれば、簡便で特異性が高く、また再現性と感度の良好なエチニルエストラジオール測定法を提供することができる。環境中には非常に多種類のステロイドが存在している。1つ1つのステロイドの含有量はごく微量であり、測定のためにはその方法の検出限界に見合った濃縮が必要であるが、測定方法の感度が本発明のように高めれば、試料の濃縮前の容量を減らすことができ、測定前濃縮作業量の減少が期待できる。また、濃縮することで測定対象であるエチニルエストラ

ジオールの濃度を高めることができるが、同時に他の共存ステロイドの濃度もまた高まるため、本発明の方法のようにエチニルエストラジオール特異性の高い方法は共存物質の影響を受けず真の測定値を得ることができる。【0021】また含有量が微量であることから、本発明のように再現性よい測定方法であれば、測定値の信頼性が高まり測定回数を減らすことができる。本発明の方法は簡便であり、特殊な技能を必要としないため、現場において短時間に測定値を得て、速やかな除去処理に結びつけることが可能である。特に17-エチニルエストラ

【0022】

【実施例】以下実施例により本発明を記述する。しかし、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0023】実施例1 アルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオールの合成

(a) エチニルエストラジオール(Ethynyl-E2とする)活性エステルの合成

(1) Ethynyl-E2-6CMO[1,3,5(10)-Estratrien-17-ethynyl-3,17-diol-6-(O-carboxymethyl)oxime]からEthynyl-E2-6CMO-NHS[1,3,5(10)-Estr

atrien-17-ethynyl-3,17-diol-6-(O-carboxymethyl)oxime-N-hydroxysuccinimide]の合成。

【0024】Ethynyl-E2-6CMO 20.75mg(54.12mmol)にN,N-ジメチルホルムアミド(和光純薬社製)0.415mLを加え攪拌して完全に溶解した。さらに、これを氷浴につけ5分以上放置した。氷冷下において、これにN-ヒドロキシサクシミド10.05mg(87.32mmol)を加え攪拌して完全に溶解した。さらに氷冷下において、これに1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide HCl 17.35mg(90.51mmol)を加え攪拌して完全に溶解した。氷冷下において6時間反応熟成後、さらに冷蔵庫に移し一晩放置し反応を完結させた。反応チェックはHPLCにて行った。原料消失確認後、反応液を分液ロートに移し酢酸エチルと水にて抽出を行った。さらに有機層を水にて2回洗浄後、減圧下において濃縮した。得られた透明オイル状物質に少量の水を加え固体とした。この固体を減圧下において乾燥することにより、Ethynyl-E2-6CMO-NHS白色の粉末を得た。この時の収量は18.35mg、収率は70.6%であった。

【0025】(b)アルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオール(Ethynyl-E2-6CMO-ALP)の作製

ウシ小腸由来アルカリ性ホスファターゼ(ALP)10mg(0.73mL)(バイオザイム社製)を透析チューブに入れ、50mMほう酸緩衝液(pH9.0)に対して2~8で透析を行った。1回に5Lの緩衝液を用い、4時間以上、3回透析を行った。透析終了後、0.45µmフィルターを装着したシリンジにALP溶液をとり、ろ過を行った。この時の体積は2.26mL、濃度は4.43mg/mLであった。

【0026】この溶液を反応容器に移し4±1に制御された恒温槽15分に浸漬した。これにEthynyl-E2-6CMO-NHSのN,N-ジメチルホルムアミド溶液(濃度:12.9mg/mL)を0.0226mL投入した。磁気攪拌子を用いて滴下終了後30±1分静かに攪拌した後攪拌を止め、24時間恒温槽に放置した。

【0027】反応終了後、反応溶液を透析チューブに移し、5mMリン酸緩衝液(pH7.0)に対して2~8で透析を行った。1回に10Lのリン酸緩衝液を用い、5時間以上、2回透析を行った。

【0028】透析終了後、DEAE-セルロースカラムにて精製を行った。20mM NaClを含む5mMリン酸緩衝液にて未反応のALPを溶出した後、100mM NaClを含む5mMリン酸緩衝液(pH7.0)を

カラムに流してアルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオールを溶出させた。アルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオールが溶出した区分を回収し、これを透析チューブに入れ、5 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM $ZnCl_2$ 、0.1% $NaNO_3$ を含む2.5 mMトリス塩酸(pH 7.5)に対して2~8で透析を行った。1回に5 Lの緩衝液を用い、4時間以上、3回透析を行った。

【0029】透析終了後、0.22 μm フィルターを装着したシリンジに上で作製したアルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオールをとり、ろ過を行った。この結果、1.8 mLのアルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオールが得られ、その濃度は1848 mA(ただし、1Aは吸光度278 nmで1.0)であった。

【0030】実施例2

17-エチニルエストラジオールのワンステップ酵素免疫測定法の構築ポリスチレンビーズ80000個にヤギ抗ウサギIgG(ケミコン社製)を16 mg、0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を160 mL加えて、ゆるやかに回転しながら30で16時間放置し、抗体固定化を行った。16時間後、抗体液を除去し、0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)にてビーズを洗浄後、0.5%ウシ血清アルブミンを含む0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を200 mL加えて53時間ブロッキング処理を実施した。終了後、ブロッキング液を除去し、0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄して、0.5%ウシ血清アルブミン含有0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、使用時まで4にて保存した。

【0031】カップ内に上記で作製したビーズを12個入れ、さらに実施例1で作製したアルカリ性ホスファターゼ標識17-エチニルエストラジオールを0.2 mA含むコンジュゲート希釈液を50 μL 加え凍結した。ここでいうコンジュゲート希釈液とは、50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、2.5%グリゼート(ベクトンディッキンソン社製)、2%シュクロース(和光純薬製)、5 mM塩化マグネシウム、0.1 mM塩化亜鉛、0.1%アジ化ナトリウムからなる溶液である。凍

結コンジュゲート含有液50 μL の上に、ウサギ抗17-エチニルエストラジオール抗血清をコンジュゲート希釈液で12000倍に希釈した液を50 μL 加えて凍結した。その後凍結乾燥を行い、凍結乾燥物を作製して測定開始まで4にて保存した。

【0032】測定時は、凍結乾燥物に水75 μl 、50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)75 μl を加えて溶解し、あわせて抗体への競合的免疫反応を開始した。測定装置は市販の全自動免疫診断装置(AIA-21、東ソー(株)製)を用い、40分インキュベーション後、B/F分離を行い、ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ量を、4-メチルウンベリフェリルリン酸を基質として測定した。既知濃度の17-エチニルエストラジオールを用いて作製した標準曲線により、試料中の17-エチニルエストラジオール量を求めることができる。

【0033】本方法により作製した標準曲線を図1に示す。図中、縦軸はB/B0を示す。ただし、B:各標準液濃度における4-メチルウンベリフェロンリン酸分解活性(エストラジオールを含まない標準液は除く)、B0:エストラジオールを含まない標準液における4-メチルウンベリフェロンリン酸分解活性である。また横軸は、17-エチニルエストラジオール濃度(log)である。またその際得られた測定値を表1に示す。測定値は、結合したアルカリ性ホスファターゼの基質分解活性で示す(単位:nM/s)。2SD法により求めた最小検出限界は5.3 pg/mLとなり、高感度に17-エチニルエストラジオールを測定できることが明らかとなった。

【0034】また、本測定系に及ぼす各種ステロイドの影響を検討するために、エストロン、エストラジオール、エストリオール、及び植物由来ステロイドであるジェニステインを測定したところ、表2に示すように、エストラジオール及びエストリオールについて交叉反応性がそれぞれ0.11%、0.18%とわずかに検出されたものの、非常に特異的に17-エチニルエストラジオールを検出していることが明らかとなった。

【0035】

【表1】

	エチニルエストロジオール濃度	4-MU分解速度平均値	標準偏差	910	4-MU分解速度1	4-MU分解速度2	4-MU分解速度3
				変動係数(%)			
1	0.000	33.012	0.322	0.97	32.698	33.341	32.997
2	125.00	27.625	0.963	3.49	26.832	28.697	27.347
3	250.0	24.341	1.016	4.17	25.342	23.311	24.371
4	500.0	21.096	0.533	2.53	20.539	21.146	21.602
5	1000.0	16.994	1.114	6.56	18.146	15.922	16.913
6	2000.0	14.034	0.194	1.38	13.924	14.258	13.921

【0036】

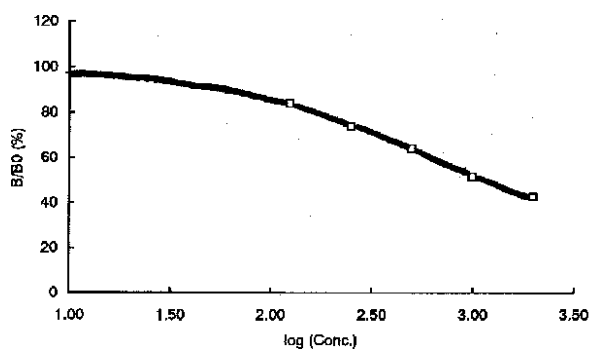
【表2】

ステロイド名	ステロイド濃度 (pg/ml)	エチニルエストロジオール測定系における測定値 (pg/mL)	交叉反応性 (%)
エストロン	20000	0	0.000
エストラジオール	20000	19.392	0.114
エストリオール	20000	38.364	0.187
ジェニステイン	20000	0	0.000

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で作製した標準曲線を示す図である

【図1】



专利名称(译)	乙炔雌二醇的酶免疫测定		
公开(公告)号	JP2001264328A	公开(公告)日	2001-09-26
申请号	JP2000076348	申请日	2000-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	丸尾直子 山田雅士		
发明人	丸尾 直子 山田 雅士		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/42 G01N33/00 G01N33/548		
FI分类号	G01N33/53.A G01N33/53.U G01N33/00.D G01N33/548.A C12Q1/42		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ18 4B063/QQ19 4B063/QQ33 4B063/QQ75 4B063/QQ91 4B063/QQ94 4B063/QR13 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR58 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够简单而特异地检测乙炔雌二醇的方法，并且能够以高灵敏度简单地测量环境样品中的乙炔雌二醇。溶液：使样品中的乙炔雌二醇和酶标记的乙炔雌二醇在间接固定于固相的抗乙炔雌二醇抗体上相互竞争，或者能够间接固定在固相上以检测结合或未结合的酶标记的乙炔雌二醇。抗体。

