

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4734328号
(P4734328)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl. F I
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 W

請求項の数 9 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2007-528298 (P2007-528298)	(73) 特許権者	000006770
(86) (22) 出願日	平成18年5月10日 (2006.5.10)		ヤマサ醤油株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/309374		千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
(87) 国際公開番号	W02006/121064	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成18年11月16日 (2006.11.16)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成20年7月7日 (2008.7.7)	(74) 代理人	100068700
(31) 優先権主張番号	特願2005-138113 (P2005-138113)		弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成17年5月11日 (2005.5.11)	(74) 代理人	100077562
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺サーファクタント蛋白質の安定化法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カルシウムイオンと、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上の酸化還元に関わる物質とを共存させ、肺サーファクタント蛋白質を安定化する方法。

【請求項 2】

肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質D (rSP-D) である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

カルシウムイオンと、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上の酸化還元に関わる物質を併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液。

【請求項 5】

肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、請求項4記載の水溶液。

【請求項 6】

肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質D (rSP-D) である、請求項4記載の水溶液。

【請求項 7】

抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットであって、カルシウムイオンと、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上の酸化還元に関わる物質とを併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として含有することを特徴とする、肺サーファクタント蛋白質測定用キット。

【請求項8】

肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、請求項7記載のキット。

【請求項9】

肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質D (r S P - D) である、請求項7記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺サーファクタント蛋白質の安定化法、安定化された肺サーファクタント蛋白質含有溶液、及び安定化された肺サーファクタント蛋白質含有溶液を構成試薬として含有する肺サーファクタント蛋白質測定用キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

肺サーファクタント蛋白質は、肺サーファクタントに特異的なアポタンパク質 (S P) であり、現在までに親水性の S P - A と S P - D 及び疎水性の S P - B と S P - C の4種類が報告されている。その中でも、S P - D は気道 - 肺胞系における生体防御機構において重要な役割を果たしていると考えられており、抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル (血清など) 中の S P - D を測定し、特発性間質性肺炎などの肺疾患を診断できることが報告されている (非特許文献1) 。

20

【0003】

上記報告書で報告されている方法は、組換えDNA手法により取得されるリコンビナント S P - D (r S P - D) を標準物質として使用しており、この r S P - D が不安定であるために、カルシウム、バリウム、マグネシウムなどの周期表2族a亜族に属する金属イオンを共存させることによって r S P - D 等の肺サーファクタント蛋白質の安定性が向上することが報告されている (特許文献1) 。

30

【非特許文献1】医学と薬学、36 (4)、803 - 808 (1996)

【特許文献1】特許第3573330号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、確かにカルシウムイオンを共存させることで、肺サーファクタント蛋白質の抗原活性は安定化するものの、長期間の安定性には今なお問題を有していた。すなわち、特許文献1の実施例1～3に示されているように、カルシウムイオンは6時間程度の比較的短時間の肺サーファクタント蛋白質の安定性に関しては非常に効果を示すものの、10時間以上、あるいは数日間の中長期的な肺サーファクタント蛋白質の安定性に関して

40

は、カルシウムイオン単独では必ずしも十分でなく、更なる温度に対する安定性の向上が切望されていた。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記問題点を解決すべくランダムスクリーニングを行った結果、肺サーファクタント蛋白質に、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を共存させるだけで、37 の条件下でも48時間以上抗原活性が失活せずに安定化されることを見出し、本発明を完成させた。したがって、本発明は以下の通りである。

【0006】

[1] カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを共存させ、肺サーファクタント蛋白質

50

質を安定化する方法。

[2] 肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させる、上記 [1] 記載の方法。

[3] 肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質 D (r S P - D) である、上記 [1] 記載の方法。

[4] 酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上のものである、上記 [1] 記載の方法。

【 0 0 0 7 】

[5] カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液。

[6] 肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、上記 [5] 記載の水溶液。 10

[7] 肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質 D (r S P - D) である、上記 [5] 記載の水溶液。

[8] 酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上のものである、上記 [5] 記載の水溶液。

【 0 0 0 8 】

[9] 抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットであって、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として含有することを特徴とする、肺サーファクタント蛋白質測定用キット。

【 0 0 0 9 】 20

[1 0] 肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、上記 [9] 記載のキット。

[1 1] 肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質 D (r S P - D) である、上記 [9] 記載のキット。

[1 2] 酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上のものである、上記 [9] 記載のキット。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

肺サーファクタント蛋白質（たとえば、r S P - D）を安定化する際、カルシウムイオンと酸化還元に関する物質、具体的には過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び/又は1価の銅を共存させるだけで、後述実施例に示すように、肺サーファクタント蛋白質の抗原活性をカルシウムイオン単独の時よりもさらに安定化することができる。 30

【 0 0 1 1 】

このことにより、短期間のもとより、中長期間の常温（25℃）保管であっても肺サーファクタント蛋白質を失活させることなく保存流通が可能になるとともに、測定時の反応も常温から37℃で行うことができ、肺サーファクタント蛋白質の免疫学的測定の操作性、汎用性をこれまで以上に向上させることが可能となった。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】 40

本発明における肺サーファクタント蛋白質には、S P - A、S P - B、S P - C及びS P - Dのいずれも含まれるが、診断項目として有用性が確認されているS P - A又はS P - Dが好ましい。また、本発明においては、肺サーファクタント蛋白質は、生体組織から単離精製されたネイティブの蛋白質であっても、組換えDNA技術を用いて調製したりコンビナント蛋白質のいずれであっても使用可能である。

【 0 0 1 3 】

本発明においては、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを共存させることにより、肺サーファクタント蛋白質を安定化することができる。

共存させる酸化還元に関わる物質としては、酸化作用を有する物質及び還元作用を有する物質のいずれでもよいが、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1 50

価の銅から選ばれた1又は2以上の物質を例示することができ、特に過酸化水素又は2価のマンガンイオンが好適である。

【0014】

酸化還元に関わる物質の使用濃度は、特に制限されるものではないが、肺サーファクタント蛋白質含有水溶液中、過酸化水素等の物質の場合、0.001~5% (w/v)、さらに0.01~1% (w/v) が好ましい。また、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン、1価の銅などの金属イオンの場合には、0.001~1000mM、さらに0.01~100mM が好ましい。併用されるカルシウムイオンの使用濃度は、肺サーファクタント蛋白質含有水溶液中、0.001~100mM、さらに0.01~100mM が好ましい。

10

【0015】

酸化還元に関わる物質が金属イオンの場合、塩化物、酢酸塩、硝酸塩等の水溶性金属塩を用いるのが好ましい。またカルシウムイオンも、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム等の水溶性カルシウム塩を用いるのが好ましい。

【0016】

カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を併用し安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液の調製は、水又はHEPESなどの緩衝液にカルシウム塩(例えば、塩化カルシウムなど)と酸化還元に関わる物質(過酸化水素、又はマンガン、鉄もしくは銅の塩(例えば、塩化マンガン、塩化鉄など))を上記濃度になるように溶解後、肺サーファクタント蛋白質を所定量(例えば、1~200ng/mL)溶解することで実施することができる。なお、溶解する順番は、特に制限されるものではなく、肺サーファクタント蛋白質を先に溶解してもよく、あるいは同時であってもかまわない。

20

【0017】

このようにして調製した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液は、抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットの肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として有用である。このようなキットは、免疫比濁法(turbidimetric immunoassay: TIA)、免疫比濁法(nephelometric immunoassay: NIA)、酵素免疫測定法(enzyme immunoassay: EIA)、蛍光免疫測定法(fluoro immunoassay: FIA)、ラテックス光学測定法(latex photometric immunoassay: LPIA)、化学発光測定法(chemiluminescent immunoassay: CLIA)、電気化学発光測定法(electrochemiluminescent immunoassay: ECLIA)、ラジオイムノアッセイ(radio immunoassay: RIA)など採用したアッセイに適する試薬を適宜含有し、必須の試薬としては、抗肺サーファクタント蛋白質抗体が含まれ、さらに必要に応じて標識抗肺サーファクタント蛋白質抗体、標識第2抗体等が含まれる。そのようなキットとして、ELISA法によるSP-D測定キットを例に挙げ、具体的に説明すれば、たとえば以下のキットを例示することができる。

30

【0018】

(本発明のキット)

固相化抗SP-D抗体試薬

酵素標識化抗SP-D抗体試薬

SP-D標準抗原溶液(カルシウムイオンとマンガンイオン含有)

40

【0019】

さらに、上記診断用キットに通常添付されている酵素反応基質液、酵素反応停止液、洗浄液などを添付してもよい。このようなキットの使用法は、例えば、医学と薬学、36(4), 804-808(1996)などに記載の公知の測定方法に準じて行えばよい。

【実施例】

【0020】

以下、実施例に基づき、詳細に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らか

50

である。

【0021】

実施例1：37 での安定化の検討

緩衝液（10 mM HEPES、150 mM塩化ナトリウム、10 mM塩化カルシウム、1.0%（w/v）ウシ血清アルブミン、0.5%（w/v）トライトンX-100、pH7.4）に、最終濃度で0.1%（w/v）となるように過酸化水素、10 mMとなるように塩化マンガン、5 mMとなるように塩化鉄（II）、1 mMとなるように塩化鉄（III）、あるいは1 mMとなるように塩化第一銅を添加し、この緩衝液を希釈用緩衝液とした。

【0022】

次に、この希釈用緩衝液にrSP-Dを一定量添加し、37 で24～48時間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお、対照として過酸化水素、塩化マンガン、塩化鉄（II）、塩化鉄（III）、又は塩化第一銅を添加しない無添加の緩衝液についても同様の処理を行った。

【0023】

インキュベーション後、これらのサンプル液及び対照液をヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、医学と薬学、36（4）、804-808（1996）に記載の測定法（以下、標準操作法という）に従ってSP-Dを測定した。その結果を表1に記す。表1から明らかなように、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質、特に鉄イオンやマンガンイオンを併用することで、SP-Dの抗原活性の安定に有効であることが明らかとなった。

【0024】

【表1】

0時間における測定値を100とした場合の 24時間後あるいは48時間後の測定値の割合（%）		
添加物	24時間後	48時間後
対照（無添加）	61	44
塩化マンガン	98	91
塩化鉄（II）	96	94
塩化鉄（III）	96	96
塩化第一銅	80	71
過酸化水素	83	79

【0025】

実施例2：25 での安定化の検討

緩衝液（10 mM HEPES、150 mM塩化ナトリウム、10 mM塩化カルシウム、1.0%（w/v）ウシ血清アルブミン、0.5%（w/v）トライトンX-100、pH7.4）に、最終濃度で0.1%（w/v）となるように過酸化水素、あるいは10 mMとなるように塩化マンガンを添加し、この緩衝液を希釈用緩衝液とした。

【0026】

次に、この希釈用緩衝液にrSP-Dを一定量添加し、25 で3日から5日間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお、過酸化水素又は塩化マンガンを添加しない無添加の緩衝液についても同様の処理を行った。

【0027】

インキュベーション後、標準操作法に従って、サンプル液又は対照液中のSP-Dを測定した。その結果を表2に記す。表2に示されているように、過酸化水素や塩化マンガン添加サンプルは25、5日間処理後も同等の抗原性を保持することが認められた。一方、無添加のカルシウムイオン単独の場合には、25、5日間処理で20%以上抗原性の

10

20

30

40

50

失活が確認された。

【0028】

このように、カルシウムイオンと過酸化水素もしくは塩化マンガンを併用することにより大幅に熱安定性が向上し、25 ならば5日間処理しても90%以上抗原活性が保持できることが明らかとなった。

【0029】

【表2】

0日における測定値を100とした場合の 3日後および5日後の測定値の割合(%)		
添加剤	3日後	5日後
対照(無添加)	85	78
塩化マンガン	95	96
過酸化水素	98	98

10

【0030】

実施例3：塩化カルシウム無しでの添加効果

緩衝液(10mM HEPES、150mM塩化ナトリウム、1.0%ウシ血清アルブミン、0.5%トライトンX-100、pH7.4)に、最終濃度で10mMになるように塩化カルシウム、50mM、10mM、1mMとなるように塩化マンガン、1%、0.1%、0.01%(W/V)となるように過酸化水素、あるいは1mMとなるように塩化鉄(II)を添加した。この緩衝液を希釈用緩衝液とする。

20

【0031】

また、当該希釈用緩衝液にリコンビナントSP-Dを一定量添加し、25 又は37で表3又は表4に記載の時間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお対照として、緩衝液に上記のものを添加しない無添加のものについても同様の処理を行った。

【0032】

このような対照液、サンプル液を用い、ヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、標準操作法に従ってサンプル液中のSP-Dを測定した。

【0033】

その結果、25 (表3)の場合には、マンガンイオン単独でも安定に保持できるものの、37 (表4)では、マンガンイオンあるいはカルシウムイオン単独ではSP-Dの抗原活性を安定に保持できないことが明らかとなった。

30

【0034】

【表3】

添加剤	0日における測定値に対する割合(%)		
	3日後	5日後	7日後
無添加	33	31	26
50mM 塩化マンガン	95	104	98
10mM 塩化マンガン	93	105	97
1mM 塩化マンガン	98	101	89
1% 過酸化水素	—	80	67
0.1% 過酸化水素	—	<25	<25
0.01% 過酸化水素	—	<25	<25
1mM 塩化鉄(II)	95	85	44
10mM 塩化カルシウム	84	81	76

40

—は未測定

【0035】

50

【表4】

添加剤	0時間における測定値に対する割合(%)		
	24時間後	48時間後	120時間後
無添加	25	<25	<25
50mM 塩化マンガン	97	90	89
10mM 塩化マンガン	91	92	79
1mM 塩化マンガン	48	51	<25
1% 過酸化水素	<25	<25	<25
0.1% 過酸化水素	<25	<25	<25
0.01% 過酸化水素	<25	<25	<25
1mM 塩化鉄(II)	<25	<25	<25
10mM 塩化カルシウム	72	63	35

10

【0036】

実施例4：塩化カルシウムを含む状態での添加効果

緩衝液(10mM HEPES、150mM塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、1.0%ウシ血清アルブミン、0.5%トライトンX-100、pH7.4)に、最終濃度で50mM、10mM、1mMとなるように塩化マンガン、5mM、1mMとなるように塩化鉄(II)、1mMとなるように塩化鉄(III)、1mMとなるように塩化第一銅、あるいは1%、0.1%、0.01%(W/V)となるように過酸化水素を添加した。この緩衝液を希釈用緩衝液とする。

20

【0037】

また、当該希釈用緩衝液にリコンビナントSP-Dを一定量添加し、25又は37で表5及び6に記載の時間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお対照として、緩衝液に上記のものを添加しない無添加のもの(塩化カルシウムを含む)についても同様の処理を行った。

【0038】

このような対照液、サンプル液を用い、ヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、標準操作法に従ってサンプル液中のSP-Dを測定した。

30

【0039】

その結果、25(表5)の場合、37(表6)の場合、いずれにおいても、カルシウムイオンと併用することで、SP-Dの抗原活性を安定に保持できることが明らかとなった。

【0040】

【表5】

添加剤1	添加剤2	0時間における測定値に対する割合(%)			
		3日後	5日後	7日後	14日後
10mM 塩化カルシウム	無添加	76	75	56	51
	50mM 塩化マンガン	92	106	101	88
	10mM 塩化マンガン	89	99	89	76
	1mM 塩化マンガン	84	91	81	62
	1% 過酸化水素	84	95	88	—
	0.1% 過酸化水素	95	95	96	91
	0.01% 過酸化水素	83	90	103	68
	1mM 塩化鉄(II)	—	102	86	88
	1mM 塩化鉄(III)	—	104	93	99

40

—は未測定

50

【 0 0 4 1 】

【 表 6 】

添加剤 1	添加剤 2	0 時間における測定値に対する割合 (%)		
		24時間後	48時間後	120時間後
10mM 塩化カルシウム	無添加	61	44	31
	50mM 塩化マンガン	95	95	97
	10mM 塩化マンガン	98	91	78
	1mM 塩化マンガン	80	76	36
	1% 過酸化水素	93	76	—
	0.1% 過酸化水素	94	93	102
	0.01% 過酸化水素	86	55	—
	5mM 塩化鉄(Ⅱ)	96	94	—
	1mM 塩化鉄(Ⅱ)	93	85	67
	1mM 塩化鉄(Ⅲ)	99	94	87
	1mM 塩化第一銅	80	71	—

10

—は未測定

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 誠仁
千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 ヤマサ醤油株式会社内
- (72)発明者 濱沖 勝
千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 ヤマサ醤油株式会社内

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特許第3573330(JP, B2)
特開平03-044332(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - G01N 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	肺表面活性蛋白的稳定化方法		
公开(公告)号	JP4734328B2	公开(公告)日	2011-07-27
申请号	JP2007528298	申请日	2006-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	山佐株式会社		
申请(专利权)人(译)	山佐公司		
当前申请(专利权)人(译)	山佐公司		
[标]发明人	田中誠仁 濱沖勝		
发明人	田中 誠仁 濱沖 勝		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6884 C07K14/785 G01N2333/785		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.W		
代理人(译)	村田正树		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	2005138113 2005-05-11 JP		
其他公开文献	JPWO2006121064A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及肺表面活性蛋白的长期稳定化方法，稳定的含肺表面活性蛋白的水溶液和用于肺表面活性蛋白测定的试剂盒，其包含稳定的含肺表面活性蛋白的水溶液作为构成试剂。本发明提供了一种通过钙离子和参与氧化还原的物质的共存来稳定肺表面活性蛋白的方法。另外，本发明提供一种稳定的含肺表面活性蛋白的水溶液，其中组合使用钙离子和参与氧化还原的物质。此外，它是用于通过使用抗原 - 抗体反应的免疫学技术测量样品中肺表面活性蛋白的试剂盒，其是含有肺表面活性蛋白的稳定水溶液，其结合了钙离子和参与氧化和还原的物质。作为肺表面活性蛋白的标准溶液提供，提供了用于测量肺表面活性蛋白的试剂盒。

添加剤	0日における測定値に対する割合(%)		
	3日後	5日後	7日後
無添加	33	31	26
50mM 塩化マンガン	95	104	98
10mM 塩化マンガン	93	105	97
1mM 塩化マンガン	98	101	89
1% 過酸化水素	—	80	67
0.1% 過酸化水素	—	<25	<25
0.01% 過酸化水素	—	<25	<25
1mM 塩化鉄(II)	95	85	44
10mM 塩化カルシウム	84	81	76

—は未測定