

(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2006-38594

(P2006-38594A)

(43) 公開日 平成18年2月9日(2006.2.9)

(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 S	2GO45
GO 1 N 33/493 (2006.01)	GO 1 N 33/493 A	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 B	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 581D	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-217804 (P2004-217804)	(71) 出願人	000231394 アルフレッサファーマ株式会社 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号
(22) 出願日	平成16年7月26日 (2004.7.26)	(74) 代理人	100104673 弁理士 南條 博道
		(72) 発明者	川喜田 正夫 東京都新宿区下落合3-11-15
		(72) 発明者	平松 恭子 東京都葛飾区新小岩2-18-6
		(72) 発明者	榎本 昌泰 大阪府高槻市奈佐原1-1-408-204
		(72) 発明者	小坂 美恵子 大阪府茨木市西河原1-18-613
		Fターム(参考)	2G045 BB52 CB03 DA19 FA29 FB03 FB15 GC10

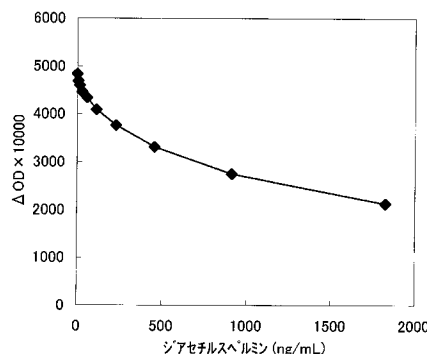
(54) 【発明の名称】 ジアセチルスベルミンの測定方法および測定試薬キット

(57) 【要約】

【課題】 測定感度が良好で、測定時間が短縮された、B / F分離を必要としない自動化に適したジアセチルスベルミンの測定法およびそのための測定キットを提供すること。

【解決手段】 本発明の検体中のジアセチルスベルミンの量を測定する方法は、(a) 該検体と、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬とを混合する工程、(b) 該混合液に抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を添加して混合する工程、および(c) 該ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質と該抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの免疫反応凝集による吸光度変化を、450~580nmで2回以上測定した吸光度、または、450nm~580nmを主波長および620nm~800nmを副波長とする二波長で2回以上測定した吸光度より求める工程を含む。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体中のジアセチルスペルミンの量を測定する方法であって、(a)該検体と、塩およびジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬とを混合する工程、(b)該混合液に抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を添加して混合する工程、および(c)該ジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質と該抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイドの免疫反応凝集による吸光度変化を、450~580nmで2回以上測定した吸光度、または、450nm~580nmを主波長および620nm~800nmを副波長とする二波長で2回以上測定した吸光度より求める工程を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記工程(a)から(c)が15分以内で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第1試薬が、終濃度として、0.3~10%の塩、10~1000mMの緩衝剤、および5~3000ng/mLのジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質を含有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記ジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質がアセチルスペルミン結合ウシ血清アルブミンである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第1試薬が、平均分子量5,000から500,000の水溶性高分子物質を0.01W/V%~10W/V%含有する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイドの抗ジアセチルスペルミン抗体が、アセチルスペルミン結合ウシ血清アルブミンを動物に投与することによって生成されたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、そして前記ジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質の蛋白質部分と反応しない、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記検体が、尿である、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 8】

請求項1から7のいずれか1項に記載の方法を実施するために使用される、ジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬、および抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を含む、ジアセチルスペルミン測定用試薬キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、金コロイド凝集反応を利用するジアセチルスペルミンの測定方法に関する。より詳細には、検体中のジアセチルスペルミンをng/mL単位で高感度にかつ短時間に測定することを可能にする技術に関する。

40

【背景技術】**【0002】**

ジアセチルスペルミンは、尿中ポリアミン成分の1種であり、健常者尿中では尿中総ポリアミンの0.6%を占めるにすぎない微量成分である。しかし、癌患者の尿中においては、他の成分と比較して高い頻度で排泄量が増加し、しかも増加の割合も際立って高い。そのため、ジアセチルスペルミンは腫瘍マーカーとして注目されている(非特許文献1および2参照)。さらに、悪性腫瘍の治療効果の判定や予後予測の指標としても期待されている(非特許文献2)。

【0003】

近年、臨床検査などの各種検査では自動化および測定時間の短縮が図られている。例え

50

ば、臨床検査においては、生体試料中の微量物質を測定するために免疫反応を利用する免疫測定方法が広く用いられている。免疫測定法としては、RIA法、EIA法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法などの多くの方法がある。この中でもラテックス凝集法および金属コロイド凝集法は、反応液の分離や洗浄を行う必要がないため、自動化に適している。しかし、ジアセチルスベルミンなどの低分子物質（以下、ハプテンという）の測定においては、通常の免疫測定とは異なり競合法による免疫反応を利用するため、その測定を高感度かつ短時間に行うには困難が伴い、自動化の妨げとなっている。そのため、従来、生体試料中のng/mL濃度のハプテンを測定する場合、RIA法やEIA法で測定されることが多く、自動化に適さず、簡便に測定できなかった。このように、ハプテン測定においても、高感度かつ短時間で測定が可能な、自動化に適した技術が望ま

10

【0004】

金属コロイド凝集法によるハプテンの測定用試薬として、血中ハロペリドール測定用試薬「マーケット（登録商標）Gハロペリドール」および血中プロムペリドール測定用試薬「マーケット（登録商標）Gプロムペリドール」が、大日本製薬株式会社（製造、株式会社アズウェル）より販売されている。これらによれば、血液中のハロペリドールおよびプロムペリドールを自動分析機により、高感度かつ短時間に測定することができる（非特許文献3および4）。しかしながら、腫瘍マーカーとして注目されているジアセチルスベルミンを金属コロイド凝集法により測定する方法については未だ知られていない。

【0005】

20

尿中のジアセチルスベルミンの測定については、ELISAに用いるためのジアセチルスベルミン特異抗体の製法が報告されている（非特許文献5）。また、ジアセチルスベルミンの測定用試薬の一つとして、「尿中ジアセチルスベルミン測定試薬用ELISAキット」が、株式会社トランスジェニック（販売、フナコシ株式会社）より市販されている。このキットは、ELISA法を行うための試薬であり、構成品も10種と多く、測定操作方法は煩雑であり、自動化および短時間での測定は困難である。

【0006】

以上のとおり公知の測定法では、ジアセチルスベルミンを高感度かつ短時間で測定を行うことができず、自動化も困難であった。

【非特許文献1】スギモト（Sugimoto, M.）ら，ジャーナル・オブ・キャンサー・リサーチ・クリニカル・オンコロジー（J. Cancer Res. Clin. Oncol.），1995年，第121巻，p. 317 - 319 30

【非特許文献2】ヒラマツ（Hiramatsu, K.）ら，ジャーナル・オブ・キャンサー・リサーチ・クリニカル・オンコロジー（J. Cancer Res. Clin. Oncol.），1997年，第123巻，p. 539 - 545

【非特許文献3】血中ハロペリドール測定用試薬「マーケット（登録商標）Gハロペリドール」添付文書

【非特許文献4】血中プロムペリドール測定用試薬「マーケット（登録商標）Gプロムペリドール」添付文書

【非特許文献5】ヒラマツ（Hiramatsu, K.）ら，ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.），1998年，第124巻，p. 231 - 236 40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、測定感度が良好で、測定時間が短縮された、B/F分離を必要としない自動化に適したジアセチルスベルミンの測定法およびそのための測定キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記の目的を達成するために鋭意検討した結果、まず、ジアセチルスベルミンを含有す

50

る検体と、塩とジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬とを混合した後、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を添加して混合し、金コロイドの免疫反応凝集による吸光度変化を測定することによって、 ng/mL 濃度のジアセチルスベルミン測定を、高感度かつ短時間に行うことが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

詳細には、本発明においては、予め検体とジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質とを混合し、次いで抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを添加することによって抗原抗体反応を開始し、検体中の被測定物質であるジアセチルスベルミンとジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質との間で抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドが競合反応する、一段階のみの免疫競合反応とした。

10

【0010】

本発明は、検体中のジアセチルスベルミンの量を測定する方法を提供し、この方法は、(a)該検体と、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬とを混合する工程、(b)該混合液に、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を添加して混合する工程、および(c)該ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質と抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの免疫反応凝集による吸光度変化を、 $450 \sim 580 \text{ nm}$ で2回以上測定した吸光度、または、 $450 \text{ nm} \sim 580 \text{ nm}$ を主波長および $620 \text{ nm} \sim 800 \text{ nm}$ を副波長とする二波長で2回以上測定した吸光度より求める工程を含む。

20

【0011】

好適な実施態様では、上記工程(a)から(c)が15分以内で行われる。さらに好適な実施態様では、10分以内で行われる。

【0012】

他の好適な実施態様では、上記混合液中に終濃度として、 $0.3 \sim 10\%$ の塩、 $10 \sim 1000 \text{ mM}$ の緩衝剤、および $5 \sim 3000 \text{ ng/mL}$ のジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有するように、これら物質が第1試薬に含有される。

【0013】

好適な実施態様では、ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質は、アセチルスベルミン結合ウシ血清アルブミンである。

30

【0014】

好適な実施態様では、上記第1試薬は、平均分子量 $5,000$ から $500,000$ の水溶性高分子物質を $0.01\% \sim 10\%$ (W/V)含有する。

【0015】

他の好適な実施態様では、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの抗ジアセチルスベルミン抗体は、アセチルスベルミン結合ウシ血清アルブミンを動物に投与することによって生成されたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、そして上記ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質の蛋白質部分と反応しない。

【0016】

好適な実施態様では、上記検体は、尿である。

40

【0017】

本発明はまた、上記の方法を実施するために使用される、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬、および抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を含むジアセチルスベルミン測定用試薬キットを提供する。

【発明の効果】

【0018】

本発明の検体中のジアセチルスベルミンの量を測定する方法は、(a)該検体と、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬とを混合する工程、(b)該混合液に抗ジアセチルスベルミン類似化合物抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を添加して混合する工程、および(c)該ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質

50

質と抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの免疫凝集による吸光度変化を、450 nm ~ 580 nm および 620 nm ~ 800 nm の二波長で2回以上測定した吸光度変化量より求める工程を含み、この方法によれば、ng/mL のジアセチルスベルミンが短時間に精度良く測定できる。また、洗浄などの工程が不要であるため、自動化に適している。したがって、本発明の方法は、ジアセチルスベルミン測定の臨床検査分野などでの迅速化および省力化に寄与することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の検体中のジアセチルスベルミンの量を測定する方法は、(a) 該検体と、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬とを混合する工程、
(b) 該混合液に、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を添加して混合する工程、および(c) 該ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質と抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの免疫反応凝集による吸光度変化を、450 nm ~ 580 nm で2回以上測定した吸光度、または、450 nm ~ 580 nm を主波長および620 nm ~ 800 nm を副波長とする二波長で2回以上測定した吸光度より求める工程を含む。

10

【0020】

(検体)

本発明において、測定に供する検体としては、血清、血漿、尿、または髄液などの生体試料、あるいは環境中より得られたサンプルまたはその抽出物などが挙げられる。本発明においては、尿が特に好適である。

20

【0021】

(第1試薬)

本発明の方法で使用される第1試薬は、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する。

【0022】

本発明において、ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質とは、ジアセチルスベルミン類似化合物と免疫原性蛋白質との結合物をいう。ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質(結合蛋白質)は、測定対象のジアセチルスベルミンと抗ジアセチルスベルミン抗体に対して競合反応し得るものであれば、ジアセチルスベルミン類似化合物として、どのような物質が蛋白質に結合したものであってもよい。蛋白質と結合させるジアセチルスベルミン類似化合物としては、結合蛋白質中のジアセチルスベルミン相当部分の化学構造が可能な限り本来のジアセチルスベルミンの構造に類似しているものを選択することが望ましい。また、ジアセチルスベルミン類似化合物としては、ジアセチルスベルミンと担体タンパク質との結合に伴って、ジアセチルスベルミン分子の一部が担体分子上の官能基と化学結合を生じることにより、必然的に遊離のジアセチルスベルミンとは一部異なる構造を有するようになった化合物も含む。本発明においては、ジアセチルスベルミン類似化合物として、N-アセチルスベルミンを用いることが好ましい。また、ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質には、蛋白質1分子当たり、4~40程度のジアセチルスベルミン類似化合物が結合していることが好ましい。

30

40

【0023】

ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質の蛋白質は、ハプテンを結合させるために当該技術分野で通常用いられる免疫原性蛋白質であり、各種動物由来のアルブミン、ヘモシアニン、サイログロブリン、フィブリノーゲン、酵素などから適宜選択される。これらの蛋白質は、天然に存在する形態でジアセチルスベルミン類似化合物を結合させることもできるが、該蛋白質のアミノ酸側鎖の一部を化学修飾して改変蛋白質とした後に、ジアセチルスベルミン類似化合物との結合に供してもよい。本発明においては、ウシ血清アルブミン(BSA)のリシン残基の側鎖にメルカプトサクシニル基が付加されているメルカプトサクシニルBSAが好ましい。

【0024】

50

上記ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質は、当業者が通常用いる方法により製造することができる。このような製造方法は、ジアセチルスベルミン類に存在するアミノ基、カルボキシル基またはチオール基などの官能基を利用して、ジアセチルスベルミン類似化合物と蛋白質とを直接または結合剤を介して化学結合させるものであり、ジアセチルスベルミン類似化合物類の構造に応じて種々のものが知られている（生化学実験法 11 エンザイムイムノアッセイ、P. Tijssen 著、石川栄治編、252頁、1989年、東京化学同人）。化学結合を形成させるための試薬としては、アシル化剤、アルキル化剤などが挙げられる。好ましくは、カルボキシル基を活性化することにより得られる N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、弱アルカリ条件下で用いられるマレイミド類などである。本発明においては、N-アセチルスベルミンの 1 級アミノ基の部分と二価性架橋剤 G M B S (N - (4 - マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド) のエステル部分とをアミド結合させ、生成した付加物のマレイミド部分を利用して、メルカプトサクシニル B S A に結合させることが好ましい。

10

20

【0025】

第 1 試薬に含有されるジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質は、反応最終液中に、蛋白質濃度として、5 ~ 3000 ng/mL、好ましくは 20 ~ 500 ng/mL、さらに好ましくは 30 ~ 200 ng/mL 含有される。ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質の量が少なすぎると、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドとの凝集反応が生じ難い。一方、ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質の量が多すぎると、被測定物質のジアセチルスベルミンとジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質との競合反応が生じ難い。

【0026】

第 1 試薬は、塩も含む。塩としては、塩化ナトリウムや塩化カリウムなどの無機塩類が挙げられる。これらは、単独で用いても、組み合わせて用いてもよい。これらの無機塩類の濃度は、終濃度として、通常 0.3 ~ 10%、好ましくは 1 ~ 7%、より好ましくは 2 ~ 5% である。塩濃度が 0.3% よりも少ないとハプテンとの競合反応が進行し難い。一方、10% より多すぎると反応抑制が強くなり好ましくない。

【0027】

また、十分な測定感度得られるという点において、第 1 試薬は、凝集促進剤として、平均分子量 5,000 から 500,000 の水溶性高分子を含有することが好ましい。含有量は、通常 0.01% ~ 10% (W/V)、好ましくは 0.01 ~ 5.0% (W/V) より好ましくは 0.1 ~ 3.0% (W/V)、さらに好ましくは 1.0 ~ 2.0% (W/V) である。水溶性高分子物質としては、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ポリアクリル酸、プルランなどが挙げられる。

30

【0028】

第 1 試薬には、pH の維持のために適切な緩衝剤が含有され得る。緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、コハク酸緩衝液、あるいはグリシルグリシン、MES (2 - (N - モノホリノ)エタンスルホン酸)、HEPES (N - 2 - ヒドロキシエチル - ピペラジン - N' - エタンスルホン酸)、TES (N - トリス(ヒドロキシメチル)メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸)、MOPS (3 - (N - モノホリノ)プロパンスルホン酸)、PIPES (ピペラジン - 1, 4 - ビス(2 - エタンスルホン酸)) などのグッド緩衝液が好適に用いられる。pH は、好ましくは 5.0 ~ 9.0、より好ましくは 5.5 ~ 8.0、さらに好ましくは 6.0 ~ 7.0 である。緩衝剤の使用濃度は、終濃度として、好ましくは 10 ~ 1000 mM、より好ましくは 50 ~ 400 mM である。

40

【0029】

さらに、第 1 試薬は、アジ化ナトリウム、有機酸類、糖類、アミノ酸類、EDTA などのキレート剤、DTT などの SH 試薬、各種動物由来のアルブミン、動物血清、 γ -グロブリン、ヒト IgG や IgM に対する抗体、非イオンおよびイオン性の界面活性剤などを含有してもよい。これらの添加濃度は適宜選択できる。

50

【0030】

(第2試薬)

本発明の方法で使用される第2試薬は、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する。

【0031】

上記抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドは、金コロイドに抗ジアセチルスベルミン抗体を結合または吸着させたものであり、当業者が通常用いる方法により製造され得る。抗体はそのまま結合させても、化学処理や酵素処理後に結合させてもよい。また、金コロイドと抗ジアセチルスベルミン抗体とは、ビオチン・アビジンのような親和性のある物質や修飾PEGのような化合物を介して結合してもよい。通常、抗ジアセチルスベルミン抗体を金コロイドに結合させた後、アルブミンなどの蛋白質でブロッキング処理を行う。そのブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン(BSA)が好ましい。

10

【0032】

抗ジアセチルスベルミン抗体は、測定対象のジアセチルスベルミンに対して特異的な免疫反応性を有するものであれば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもよい。通常は、測定対象のジアセチルスベルミン類似化合物と担体との結合物を動物に投与することにより産生させたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質の蛋白質部分と反応しない抗体である。ジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質の蛋白質部分と反応する抗体が含まれている場合は、吸着処理などによって除くことができる。また、抗ジアセチルスベルミン抗体が、測定対象のジアセチルスベルミンに類似の化合物と反応し、測定値に影響を及ぼす場合には、その類似化合物と反応する抗体を除くことができる。このような類似化合物としては、例えば、N¹-アセチルスベルミジン、N⁸-アセチルスベルミジン、N-アセチルスベルミン、N¹、N⁸-ジアセチルスベルミジンなどが挙げられる。これらの類似化合物と反応する抗体を除くためには、例えば、各種のポリアミン誘導体を結合させた樹脂を用いた親和性クロマトグラフィーを利用することができる。特に好適な実施態様においては、非特許文献5に記載の方法に準じて、目的の抗体の親和性精製を行うことができる。

20

【0033】

抗ジアセチルスベルミン抗体を製造するための上記化合物における担体としては、該化合物が免疫原となり得るものであればいずれでもよく、例えば、蛋白質やポリペプチドなどが挙げられる。具体的には、アルブミン、グロブリン、ヘモシアニン、サイログロブリン、エデスチンなどが挙げられる。その中でも、好ましいのはアルブミンであり、特に好ましいのはBSAである。また、抗ジアセチルスベルミン抗体を製造するためのハプテンと担体との結合物として、上記第1試薬に含有されるジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質、具体的には、N-アセチルスベルミンを1級アミノ基の部分で二価性架橋剤の一端にアミド結合させたのち、架橋剤の他端で担体蛋白質と結合させたものも使用され得る。本発明においては、二価性架橋剤としてGMB Sを利用し、そして担体タンパク質として、BSAのリシン残基をメルカプトサクシニル化したBSA誘導体を利用することが特に好ましい。

30

【0034】

ポリクローナル抗体は、上記のジアセチルスベルミン類似化合物と担体との結合物を抗原として使用し、この結合物を適切なアジュバントと混合して、ウサギ、モルモット、羊、山羊などのヒト以外の動物に非経口的に投与(免疫)し、血清を採取して当業者が通常用いる方法で処理することによって製造し得る。

40

【0035】

モノクローナル抗体は、上記のように免疫された動物の脾臓細胞を採取し、当業者が通常用いるミルシュタインらの方法によって、ミエローマ細胞との細胞融合、抗体産生細胞スクリーニング、およびクローニングを行い、抗ジアセチルスベルミン抗体を産生する細胞株を樹立し、これを培養することにより製造することができる。

【0036】

50

このようにして得られた抗ジアセチルスベルミン抗体を、上述のように金コロイドに結合または吸着させることにより、抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドが得られる。こうして得られた抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドは、特定のジアセチルスベルミンおよびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質と特異的に結合する。

【0037】

上記抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドは、反応液中での終濃度として、540 nm（光路長1 cm）での吸光度が1.5～3.0となる金コロイド量であることが好ましい。金コロイドはその粒子径によって極大吸収が多少変化するが、540 nm付近で極大吸収を示すため、この540 nmでの吸光度に基づいて金コロイド濃度を規定することができる。より好ましい金コロイド量は、540 nmでの吸光度で、1.9～2.8であり、さらに好ましい金コロイド量は2.1～2.6である。反応液中の抗ジアセチルスベルミン結合金コロイド量が、540 nmでの吸光度で1.5より少ないと反応が進行し難く、一方、3.0より多いと試薬コストや測定精度面で好ましくない。

10

【0038】

第2試薬には、必要に応じて、アジ化ナトリウム、糖類、有機酸類、アミノ酸類、緩衝剤、EDTAなどのキレート剤、各種動物由来のアルブミンや界面活性剤などをさらに含有させてもよい。これらの添加濃度は適宜選択できる。

【0039】

（ジアセチルスベルミン量の測定方法）

本発明の方法による検体中のジアセチルスベルミン量の測定は、検体と上記第1試薬とを混合し、一定の時間後、上記第2試薬を添加して混合し、金コロイドの凝集による吸光度を、450 nm～580 nmおよび620 nm～800 nmの二波長で2回以上測定し、吸光度変化量を求めることによって行われる。

20

【0040】

吸光度の測定は、好ましくは、第2試薬の添加後2分以内に一回目の吸光度測定を行い、一回目の測定より8分以内に二回目の吸光度測定を行って、一回目と二回目との吸光度差を求める。あるいは、第2試薬添加後、2分以内より吸光度測定を開始し、測定開始後8分より短い時間内での吸光度変化（時間当たり）を求めてもよい。検体と第1試薬とを混合してから全ての測定が終了するまでに要する時間は、好ましくは15分以内であり、より好ましくは10分以内である。測定温度は、好ましくは20～45℃であり、より好ましくは30～40℃、さらに好ましくは37℃である。

30

【0041】

通常、ジアセチルスベルミン標準品（2濃度以上）を試料と同様の測定操作で測定して検量線を作成し、試料中のジアセチルスベルミン濃度を求める。

【0042】

（ジアセチルスベルミン測定用試薬キット）

本発明のジアセチルスベルミン測定用試薬キットは、塩およびジアセチルスベルミン類似化合物結合蛋白質を含有する第1試薬、および抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドを含有する第2試薬を含む。第2試薬中の抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドは、好ましくは、終濃度として540 nmでの吸光度が1.5～3.0となるように含まれる。また、本発明のジアセチルスベルミン測定用試薬キットは、検量線作成用のジアセチルスベルミンの標準品を含んでいてもよい。本発明のジアセチルスベルミン測定用測定キットは、上記測定方法において使用することが好ましく、特に好ましくは、尿中ジアセチルスベルミンの測定に使用される。

40

【実施例】**【0043】**

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。なお、以下の実施例において、%は、特に記載がない限り、W/V%を表す。

【0044】

50

実施例 1 : アセチルスペルミン結合 B S A の調製

アセチルスペルミン結合 B S A は、非特許文献 5 に記載の方法に準じて作製した。まず、担体蛋白質である B S A 200 mg と S - アセチルメルカプト無水コハク酸 15 mg とを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で混合し、室温で 30 分間攪拌して、S - アセチルメルカプトコハク酸 (A M S) - B S A 複合体を作製した。これとは別に、二価性架橋試薬である G M B S 45 mg と N - アセチルスペルミン・3 塩酸塩 147 mg とをテトラヒドロフラン / 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 : 1 (v / v)) 中で室温にて 30 分間混合して、アセチルスペルミン - G M S 結合物を作製した。次いで、A M S - B S A 200 mg にヒドロキシルアミン塩酸塩 4.2 mg を加え、メルカプトスクシニル - B S A (M S - B S A) とした。次いで、アセチルスペルミン - G M B 結合物と M S - B S A とを混合して、N - アセチルスペルミンがアシルアミド結合した免疫抗原アセチルスペルミン - G M B - B S A を作製した。このようにしてアセチルスペルミンを担体にアシルアミド結合させることにより、ジアセチルスペルミン類似化合物を側鎖として多数持つ免疫抗原を作製した。

10

【0045】

アセチルスペルミン結合 B S A の濃度は、1 mg / mL の B S A 溶液の 280 nm における吸光度 (光路長 1 cm)、 A_{280} を 0.66 とし、 A_{280} 値に基づいて算出した。

【0046】

実施例 2 : 抗ジアセチルスペルミン抗体の調製

(抗体作成)

上記実施例 1 で得たアセチルスペルミン結合 B S A とアジュバント (初回免疫 : コンプリートアジュバント、追加免疫 : インコンプリートアジュバント) とを等量混和したエマルジョンを、ウサギ (New Zealand White 種) 背部皮下に注射することにより免疫を行った。初回免疫は 1 mg / 羽で、そして追加免疫は 1 mg / 羽の投与量で 2 週間おきに 5 ~ 6 回行った。

20

【0047】

(抗体精製)

上記の方法で免疫したウサギから採血し、得られた抗血清から、段階的な親和性精製によって高度にジアセチルスペルミン特異的な抗体を分画精製した。親和性精製については、非特許文献 5 に記載の方法に準じた。すなわち、抗血清を N^1 - アセチルスペルミン結合カルボキシトヨパールに吸着させ、樹脂に吸着する成分を溶出・回収し、この成分をさらに N^8 - アセチルスペルミン結合カルボキシトヨパールに吸着させ、この樹脂に吸着しない成分を溶出し、部分精製抗体を得た。次いで、得られた部分精製抗体を、再度アセチルスペルミン結合カルボキシトヨパールに吸着させ、2 mM の N^1 - アセチルスペルミンを添加してもなお溶出されず、アセチルスペルミン結合カルボキシトヨパールに吸着したまま残留する成分を回収して精製抗体とした。この抗体は、ジアセチルスペルミンの類似物質として尿中に約 30 倍も多く存在して尿中ジアセチルスペルミンの定量を妨害する可能性がある N^1 - アセチルスペルミンとの交差反応性が 0.1% 以下であった。

30

【0048】

実施例 3 : 金コロイド液の調製

95 の蒸留水 1 L に 10% 塩化金酸溶液 2 mL を攪拌しながら加え、1 分後に 2% クエン酸ナトリウム溶液 10 mL を加え、さらに 20 分間攪拌した後 30 に冷却した。冷却後、0.1 M 炭酸カリウム溶液で pH 7.1 に調節した。

40

【0049】

実施例 4 : 第 1 試薬の調製

上記実施例 1 で調製したジアセチルスペルミン結合 B S A、塩化ナトリウム、およびポリエチレングリコール 20000 (PEG) をそれぞれ種々の濃度で含む、0.2% EDTA、0.3% トリトン X - 100、0.1% B S A、0.5% ウサギ血清、および 0.1% アジ化ナトリウムを含む 200 mM MES (pH 6.2) を調製し、アセチルスペ

50

ルミン結合 B S A の濃度、塩化ナトリウム濃度、および P E G 濃度がそれぞれ異なる種々の第 1 試薬を調製した。

【 0 0 5 0 】

実施例 5 : 抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイド試薬 (第 2 試薬) の調製

上記実施例 2 で調製した抗ジアセチルスベルミン抗体を、0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 1 0 m M H E P E S (p H 7 . 1) で希釈し、4 0 μ g / m L の濃度にした。この液 1 0 0 m L を上記実施例 3 で調製した金コロイド液 1 L に加え、冷蔵下で 2 時間攪拌した。この混合物に、5 . 4 6 % マンニトール、0 . 5 % B S A 、および 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 1 0 m M H E P E S (p H 7 . 1) を 1 1 0 m L 添加し、3 7 ° C で 9 0 分間攪拌し、8 , 0 0 0 回転で 4 0 分間遠心分離し、上清を除去した。得られた残渣に、3 % マンニトール、0 . 1 % B S A 、および 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 5 m M H E P E S (p H 7 . 5) (A 溶液) を約 1 L 加え、抗体結合金コロイドを分散させた後、8 , 0 0 0 回転で 4 0 分間遠心分離し、上清を除去した。残渣を A 溶液に分散させ、この抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの分散液を精製水で 3 0 倍希釈したときに 5 4 0 n m での吸光度が 1 . 0 となるように A 溶液を添加し、抗体結合金コロイド原液とした。

10

【 0 0 5 1 】

さらに、抗体結合金コロイド原液を A 溶液で希釈して、種々の抗体結合金コロイド濃度を有する抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイド試薬を調製した。

【 0 0 5 2 】

実施例 6 : ジアセチルスベルミン添加尿の調製

ジアセチルスベルミン 1 m g / m L を健常人ヒト尿で希釈し、種々の濃度のジアセチルスベルミンを含有する尿を調製した。

20

【 0 0 5 3 】

実施例 7 : 第 1 試薬および第 2 試薬における各成分の濃度の検討

本実施例においては、第 1 試薬および第 2 試薬における各成分の濃度の検討を以下のように行った。まず、上記実施例 6 で調製したジアセチルスベルミン添加尿検体 2 0 μ L および上記実施例 4 の第 1 試薬 2 0 0 μ L を混合・攪拌し、3 7 ° C で約 5 分加温した。次いで、上記実施例 5 で調製した第 2 試薬 5 0 μ L を添加・攪拌した後、日立 7 0 7 0 形自動分析装置により主波長 5 4 6 n m および副波長 6 6 0 n m で測光ポイント 1 8 から 3 1 の二ポイント測定を行って、二ポイント間の吸光度差を求めた。測定時間は約 1 0 分間であった。

30

【 0 0 5 4 】

(塩濃度および P E G 濃度についての検討)

5 0 n g / m L のアセチルスベルミン結合 B S A を含む第 1 試薬中の塩として、塩化ナトリウムを 0 % ~ 7 % の間で変化させ、尿中ジアセチルスベルミンを測定したときの吸光度変化を検討した。結果を表 1 に示す。なお、このとき、第 1 試薬中の P E G 濃度は 1 . 6 % または 1 . 8 % であり、アセチルスベルミン結合 B S A 量は 5 0 n g / m L であり、そして第 2 試薬中の抗ジアセチルスベルミン抗体結合金コロイドの測定液中での吸光度は (5 4 0 n m (光路長 1 c m)) は 2 . 2 2 であった。

40

【 0 0 5 5 】

【表 1】

PEG濃度	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.8%	1.8%				
	0%	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	1.8%	7%					
NaCl濃度	0%	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	1.8%	7%	1.8%				
ジアセチルス スペルミン 濃度	0M (0 ng/mL)	3103	1978	1634	1594	1535	3285	3060	1594	1520	1042	1036	2548	2423	1281
	100nM (36.5 ng/mL)	6691	1855	1550	1520	1434	3142	2921	1520	1042	1036	2548	2423	1281	
	1 μM (365 ng/mL)	6745	1286	1092	1042	1036	2548	2423	1042	1036	2548	2423	1281		
	10 μM (3650 ng/mL)	6788	500	384	415	420	1331	1281	415	420	1331	1281			

表の値は $\Delta OD \times 10000$

10

20

30

40

50

【0056】

塩化ナトリウム濃度が0%の場合は、ジアセチルススペルミン濃度に依存した吸光度変化が認められず、測定できなかつた。塩化ナトリウム濃度が1%~5%と増加するに従って、ジアセチルススペルミンが0Mのときの吸光度差が小さくなつた。塩化ナトリウム濃度が6%および7%の場合は、PEG濃度を1.8%にすることにより、ジアセチルススペルミンが0Mのときの吸光度差が大きくなつた。このように、塩濃度が高すぎると、抗原抗体反応が抑制されるため、凝集促進のためにPEGなどの水溶性高分子物質を多く使用する必要が生じ、さらに好ましい塩濃度および好ましいPEG(水溶性高分子物質)濃度の厳密な設定が必要であつた。これらのことから、塩化ナトリウム濃度が約2%の場合、ジアセチルススペルミン濃度に依存して明瞭に吸光度差が変化することがわかつた。

【0057】

(抗ハプテン抗体結合金コロイド量についての検討)

2%の塩化ナトリウム、1.6%のPEG、および100ng/mLのアセチルスペルミン結合BSAを含む第1試薬を用い、そして測定液における540nm(光路長1cm)の吸光度が1.5~3.0となるような量で抗ハプテン抗体結合金コロイド(抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイド)を含む第2試薬を用いて、尿中ジアセチルスペルミンを測定した。結果を表2に示す。

【0058】

【表2】

尿中ジアセチルスペルミン濃度		金コロイド濃度(測定液における540nm(光路長1cm)の吸光度)								
nM	ng/mL	1.5	1.7	1.9	2.1	2.3	2.5	2.7	2.9	3.0
0	0	1059	1269	1487	1836	2175	2389	2673	2874	3094
39	14	1032	1265	1447	1801	2123	2341	2616	2811	3066
78	28	1011	1203	1410	1742	2067	2267	2534	2748	3007
157	57	959	1144	1340	1649	1953	2158	2419	2633	2812
313	114	863	1067	1224	1505	1816	1973	2211	2408	2557
625	228	763	948	1067	1344	1712	1794	1998	2200	2373
1250	456	650	791	923	1176	1488	1537	1727	1844	2028
		ΔOD×10000の差								
0-78nM		48	66	77	94	108	122	139	126	87
0-313nM		196	202	263	331	359	416	462	466	537

表の値はΔOD×10000

【0059】

ジアセチルスペルミンが0Mのときの吸光度差が、抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイド量の増加に従って大きくなった。金コロイド量が少ない場合は、ジアセチルスペルミン濃度に依存的な吸光度差の変化(競合反応の進行)が小さいため好ましくない。金コロイド量が多い場合は使用可能であるが、試薬のコストや測定精度の面で好ましくない。これらの結果から、第2試薬中の金コロイド量は、測定液における540nm(光路長1cm)の吸光度が約2.5となる場合が好適であることがわかった。

【0060】

(ジアセチルスペルミン類似化合物結合蛋白質の量についての検討)

第1試薬中の競合物質であるハプテン結合蛋白質(アセチルスペルミン結合BSA)量を50ng/mL~200ng/mLまで変化させて、尿中ジアセチルスペルミンを測定した。結果を表3に示す。このときの抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイド量は、測定反応液中で540nm(光路長1cm)の吸光度が2.5となる濃度であった。

【0061】

10

20

30

40

【表 3】

尿中ジアセチルスペルミン濃度		アセチルスペルミン結合BSA濃度(ng/mL)			
nM	ng/mL	50	100	150	200
0	0	2777	3334	4035	4753
39	14	2752	3276	4038	4704
78	28	2659	3199	3921	4580
157	57	2501	3135	3754	4481
313	114	2330	2902	3519	4198
625	228	2089	2599	3177	3897
1250	456	1738	2190	2740	3347
		△OD×10000の差			
0-78nM		118	135	114	173
0-313nM		447	432	516	555

表の値は△OD×10000

【0062】

アセチルスペルミン結合BSA量に依存して、ジアセチルスペルミンが0Mのときの吸光度差が大きくなったが、いずれの濃度においても尿中ジアセチルスペルミン濃度に応じた吸光度差の低下が認められ、測定可能であることがわかった。

【0063】

実施例8：尿中ジアセチルスペルミンの測定

100ng/mLのアセチルスペルミン結合BSA、2%の塩化ナトリウム、および1.8%のPEGを含む第1試薬と、測定反応液中で540nm(1cm)の吸光度が2.5となる濃度の抗ジアセチルスペルミン抗体結合金コロイドを含む第2試薬とを用いて、尿中ジアセチルスペルミンを測定した。結果を図1に示す。図1から明らかのように、尿中ジアセチルスペルミン濃度に応じた吸光度差の低下が認められた。このように、ジアセチルスペルミンをng/mLからμg/mLまでの範囲で測定できることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0064】

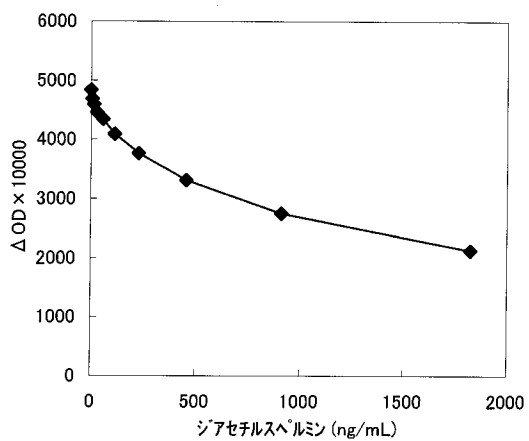
本発明の方法によれば、ng/mLからμg/mLまでの範囲のジアセチルスペルミンが短時間に精度良く測定できる。また、洗浄などの工程が不要であるため、自動化に適している。したがって、本発明の方法は、ジアセチルスペルミン測定の臨床検査分野などでの迅速化および省力化に寄与することができる。さらに、ジアセチルスペルミンは、腫瘍マーカーとしてだけでなく、悪性腫瘍の治療効果の判定や予後予測の指標としても期待されているため、本発明の方法は、臨床検査分野において非常に有用であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】尿中ジアセチルスペルミンの濃度と本発明の方法によって測定した吸光度差との関係を示すグラフである。

【 図 1 】



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 33/553	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 8 3	
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/553		
		G 0 1 N	33/574		Z

专利名称(译)	测量二乙酰精胺的方法和用于测量的试剂盒		
公开(公告)号	JP2006038594A	公开(公告)日	2006-02-09
申请号	JP2004217804	申请日	2004-07-26
申请(专利权)人(译)	Alfresa制药社		
[标]发明人	川喜田正夫 平松恭子 榎本昌泰 小坂美惠子		
发明人	川喜田 正夫 平松 恭子 榎本 昌泰 小坂 美惠子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/493 G01N33/50 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/493.A G01N33/50.B G01N33/531.A G01N33/543.581.D G01N33/543.583 G01N33/553 G01N33/574.Z		
F-TERM分类号	2G045/BB52 2G045/CB03 2G045/DA19 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB15 2G045/GC10		
其他公开文献	JP4490197B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种不需要自动化分离，测定灵敏度高，测定时间短的，适合自动化的二乙酰精胺的测定方法及其测定试剂盒。 解决方案：测量本发明样品中二乙酰精胺含量的方法包括 (a) 将样品与含有盐和二乙酰精胺类似物结合蛋白的第一试剂混合的步骤，(b) 向混合溶液中添加含有结合有抗二乙酰基精胺抗体的金胶体的第二试剂并混合，以及 (c) 结合有二乙酰基精胺类似物化合物的蛋白质和结合有抗二乙酰基精胺抗体的金胶体的免疫反应性聚集的步骤。 该方法包括从在450至580 nm处两次或更多次测量的吸光度或在主波长为450 nm至580 nm且副波长为620 nm至800 nm的两个波长下测量两次或更多次吸光度确定吸光度变化的步骤。 [选型图]图1

