

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265816号  
(P5265816)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/34	(2006.01)	C 1 2 Q 1/34	
C 1 2 Q 1/42	(2006.01)	C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/28	(2006.01)	C 1 2 Q 1/28	
G O 1 N 33/536	(2006.01)	G O 1 N 33/536	C
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A

請求項の数 15 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2012-533408 (P2012-533408)  
 (86) (22) 出願日 平成24年3月23日 (2012.3.23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/057422  
 (87) 国際公開番号 W02012/128338  
 (87) 国際公開日 平成24年9月27日 (2012.9.27)  
 審査請求日 平成24年9月13日 (2012.9.13)  
 (31) 優先権主張番号 特願2011-63559 (P2011-63559)  
 (32) 優先日 平成23年3月23日 (2011.3.23)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 507100649  
 伊藤 悦朗  
 香川県さぬき市志度1079-204  
 (74) 代理人 110000109  
 特許業務法人特許事務所サイクス  
 (72) 発明者 伊藤 悦朗  
 香川県さぬき市志度1079-204  
 審査官 小金井 悟

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質および核酸の超高感度測定法およびキット、並びに新規な酵素基質

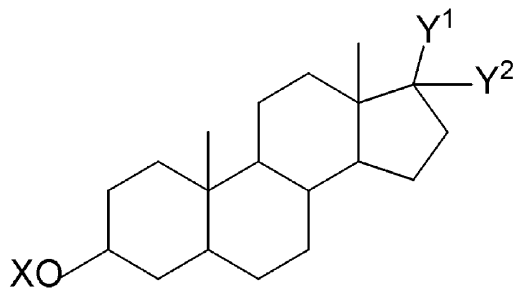
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体酵素複合体を用いる酵素活性測定方法であって、抗体酵素複合体の酵素としてアルカリホスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼを用い、

上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用い、

【化1】



(i) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(ii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(iii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

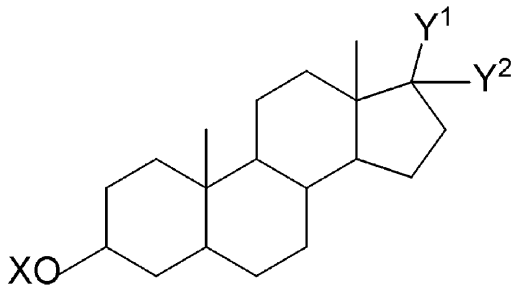
前記酵素反応の生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法。

【請求項2】

酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、

酵素標識核酸プローブの酵素としてアルカリホスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼを用い、上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用い、

【化2】



(1)

(i) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(ii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(iii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

前記酵素反応の反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる

色の変化を計測することで行う、前記方法。

【請求項3】

前記酵素がアルカリホスファターゼであり、

一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記酵素がグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼであり、一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

前記酵素がペルオキシダーゼであり、一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、の基質として用いる場合は、

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、請求項1または2に記載の方法。

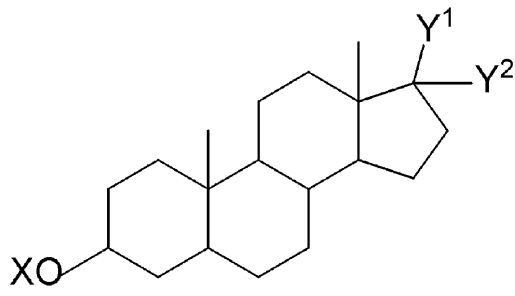
【請求項6】

以下の(1)~(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したアルカリホスファターゼ

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化3】



(式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

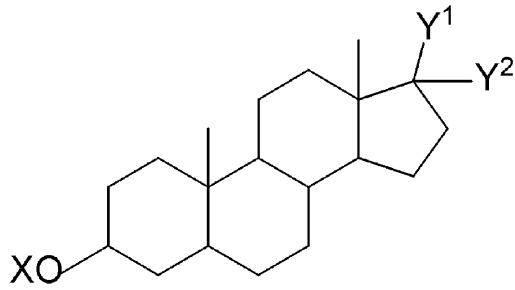
【請求項7】

以下の(1)~(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

## 【化4】



(1)

10

(式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4)NADHおよび/またはNADPH、

(5)チオNADおよび/またはチオNADP

## 【請求項8】

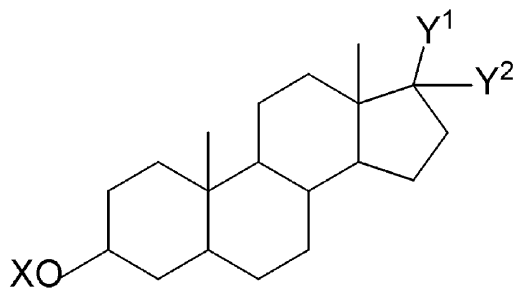
以下の(1)~(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1)標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したペルオキシダーゼ、

20

(2)上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

## 【化5】



(1)

30

(式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4)NADHおよび/またはNADPH、

(5)チオNADおよび/またはチオNADP

## 【請求項9】

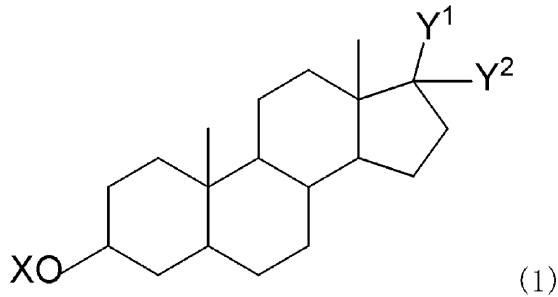
以下の(1)~(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1)標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したアルカリホスファターゼ、

40

(2)上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

## 【化6】



10

(式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

## 【請求項10】

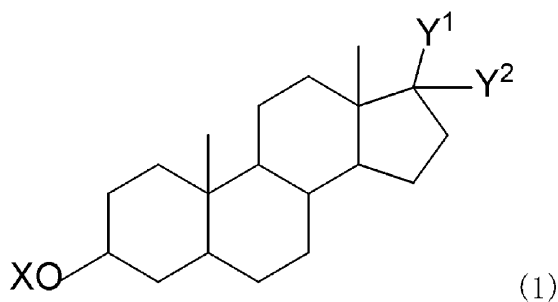
以下の(1)～(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1) 標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ、

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

20

## 【化7】



30

(式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

## 【請求項11】

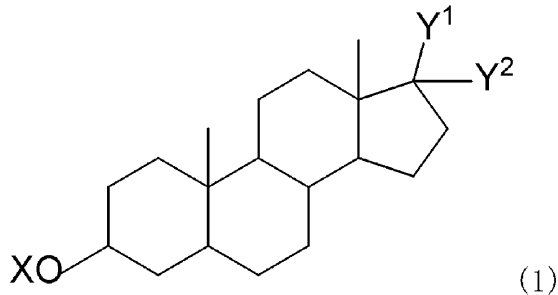
以下の(1)～(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1) 標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したペルオキシダーゼ、

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

40

## 【化8】



10

(式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

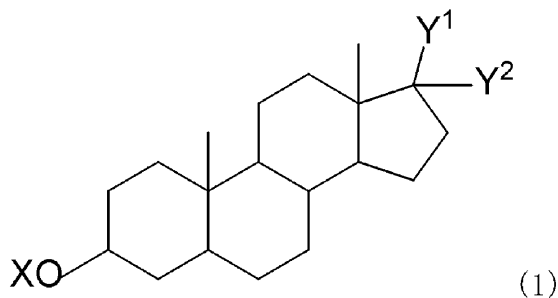
(4)NADHおよび/またはNADPH、

(5)チオNADおよび/またはチオNADP

## 【請求項12】

下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体。

## 【化9】



20

(式中、X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、以下の(A)、(B)および(C)のいずれかである。

(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、

(B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、

(C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。)

## 【請求項13】

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、請求項12に記載のアンドロステロン誘導体。

30

40

## 【請求項14】

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、請求項12に記載のアンドロステロン誘導体。

## 【請求項15】

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、請求項12に記載のア

50

ンドロステロン誘導体。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2011年3月23日出願の日本特願2011-63559号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、酵素免疫測定法および核酸プローブ測定法を利用するタンパク質と核酸の高感度測定法およびキットに関する。特に本発明は、抗体または核酸プローブに標識する酵素に対して特定の酵素基質を用いることで、これらの酵素の活性測定に用いるチオNADサイクリング法における阻害を回避して、標的タンパク質および核酸の超高感度測定を可能にする方法に関する。さらに本発明は、上記タンパク質と核酸の高感度測定法およびキットに用いることができる新規な酵素基質も提供する。

10

【背景技術】

【0003】

タンパク質や核酸の高感度測定法としてラジオイムノアッセイ(RIA)法が技術的に確立されているが、検出装置の感度を上げる以外に、現状では $10^{-16}$  mole程度以上の高感度化は技術的に不可能である。しかも、RIA法では測定の場合アイソトープ実験施設に限定されるだけでなく、短寿命の核種を使用すれば試薬の使用期限が極端に短くなる上に、測定感度も急激に低下する。さらに、放射能測定法に特有の放射性廃棄物の問題も抱えている。特に長寿命の核種を使用する場合の廃棄の問題は大きい。したがって、近年、タンパク質や核酸の高感度測定法の開発研究は「非放射性」をキーワードとして展開されてきた。それゆえ、RIA法に関する研究開発や技術的改良はほとんど行われていない現状である。

20

【0004】

RIA法に代わる高感度測定法として、タンパク質の測定には酵素免疫測定法(ELISA法)[図1]が、核酸の測定にはPCR法がある。酵素免疫測定法は開発当初の比色法( $10^{-13}$  mole)から蛍光法、発光法へと高感度化( $10^{-15}$  mole)が進められ、専用測定装置の開発・改良も進んでいる。しかし、測定操作が簡便になっただけで感度的には限界に達している。

30

【0005】

また、核酸の高感度測定法としてのPCR法では、ターゲット特異的なシグナル検出の問題、増幅効率の問題、PCR産物がプラトーに達する条件等を考え合わせると、核酸の定量は厳密には難しい。

【0006】

WO2008/117816(特許文献1)には、チオNADサイクリング法を利用する抗体酵素複合体を用いる酵素測定方法及び酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法が記載されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

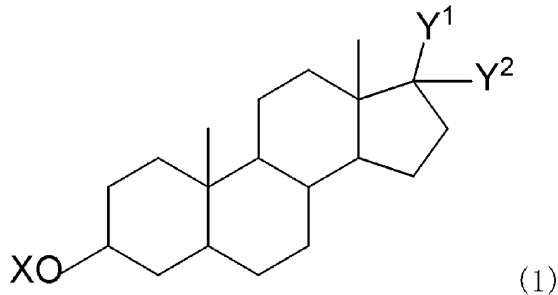
【0007】

本発明は以下の通りである。

[1]

抗体酵素複合体を用いる酵素活性測定方法であって、抗体酵素複合体の酵素としてアルカリホスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼを用い、上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用い、

## 【化1】



10

(i) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(ii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

20

(iii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

前記酵素反応の生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法。

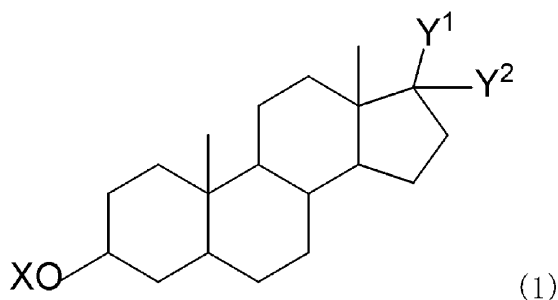
30

## [2]

酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、

酵素標識核酸プローブの酵素としてアルカリホスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼを用い、上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用い、

## 【化2】



40

(i) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(ii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、グルコシダーゼ、ガラクトシダー

50

ぜ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、  
 式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマン  
 ノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、また  
 は、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基  
 であり、

(iii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として  
 用いる場合は、

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1～6のアルキル基またはフェニル基である)であり、  
 Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6の  
 アルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基であり、

10

前記酵素反応の反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/または  
 チオNADP、並びにヒドロキステロイド脱水素酵素(HSD)を用いて、酵素サイクリング反  
 応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/また  
 はチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる  
 色の变化を計測することで行う、前記方法。

[3]

前記酵素がアルカリホスファターゼであり、

一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>  
 は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である、[1]または[2]  
 に記載の方法。

20

[4]

前記酵素がグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ  
 であり、一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマン  
 ノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、また  
 は、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基  
 である、[1]または[2]に記載の方法。

[5]

前記酵素がペルオキシダーゼであり、一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、  
 の基質として用いる場合は、

30

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1～6のアルキル基またはフェニル基である)であり、  
 Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6の  
 アルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である、[1]または[2]に記載の方法。

[6]

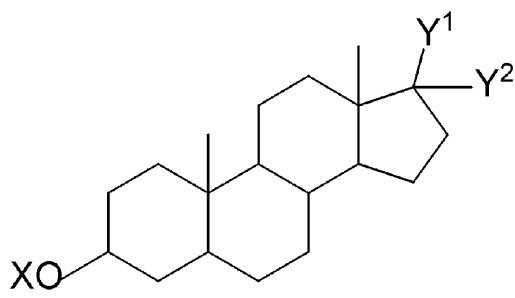
以下の(1)～(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したアルカリホスファターゼ

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化3】

40



(1)

(式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、  
 Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)、

50

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

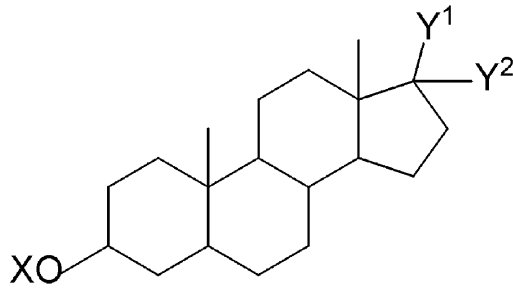
[7]

以下の(1)～(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化4】



(式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

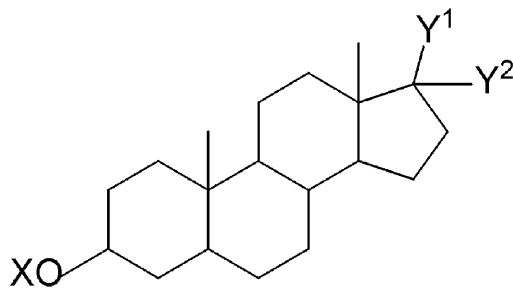
[8]

以下の(1)～(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したペルオキシダーゼ、

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化5】



(式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1～6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

[9]

以下の(1)～(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1) 標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したアルカリホスファターゼ、

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

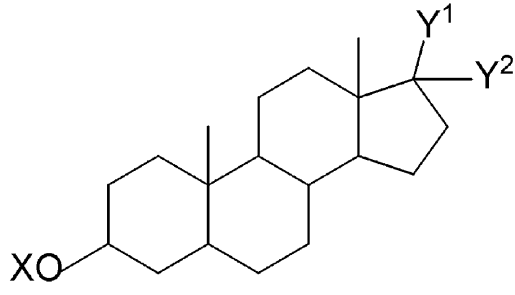
10

20

30

40

## 【化6】



10

(式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4)NADHおよび/またはNADPH、

(5)チオNADおよび/またはチオNADP

[10]

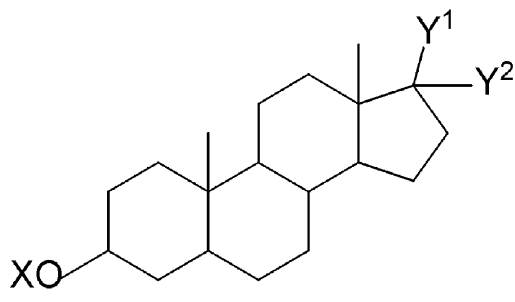
以下の(1)～(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1)標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ、

(2)上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

20

## 【化7】



30

(式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1～6のアルコキシ基、または炭素数1～6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4)NADHおよび/またはNADPH、

(5)チオNADおよび/またはチオNADP

[11]

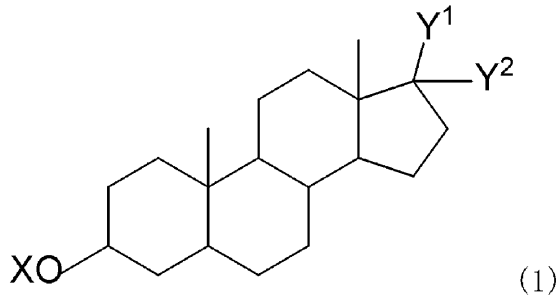
以下の(1)～(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1)標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したペルオキシダーゼ、

40

(2)上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

## 【化8】



10

(式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4)NADHおよび/またはNADPH、

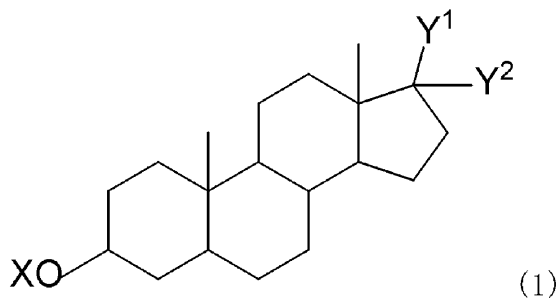
(5)チオNADおよび/またはチオNADP

[12]

下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体。

## 【化9】

20



(式中、X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、以下の(A)、(B)および(C)のいずれかである。

(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、

30

(B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、

(C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。)

[13]

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、[12]に記載のアンドロステロン誘導体。

40

[14]

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[12]に記載のアンドロステロン誘導体。

[15]

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[12]に記載のアンド

50

ロステロン誘導体。

【0008】

そこで本発明の目的は、酵素免疫測定法を酵素免疫測定法で用いる標識酵素の生成物を基質とする酵素サイクリング法を組み合わせた特許文献1に記載の方法において、上記標識酵素に対する基質の問題点を解決した、タンパク質または核酸の比色測定による高感度測定法検出方法が最も簡便な比色法を用い、感度を幾何級数的に高めた測定法を提供することである。具体的には感度を $10^{-18}$ moles 以上に高めた測定法を提供することである。

【0009】

そこで、本発明者らは、上記課題を解決した標識酵素に対する基質となり得る化合物を見出したりは新たな化合物を提供し、さらにこれらの基質を用いることで、上記課題を解決できることを見いだして、本発明を完成させた。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は以下の通りである。

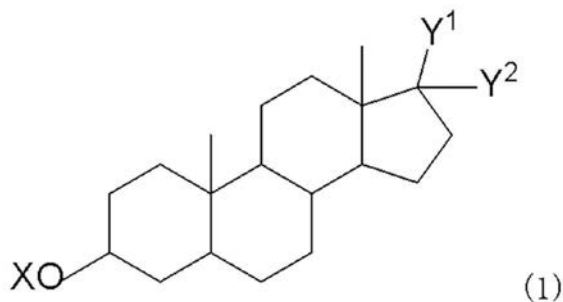
[1]

抗体酵素複合体を用いる酵素活性測定方法であって、抗体酵素複合体の酵素としてアルカリホスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼを用い、

上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用い、

【化1】

20



(i) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、

30

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(ii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

40

(iii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として用いる場合は、

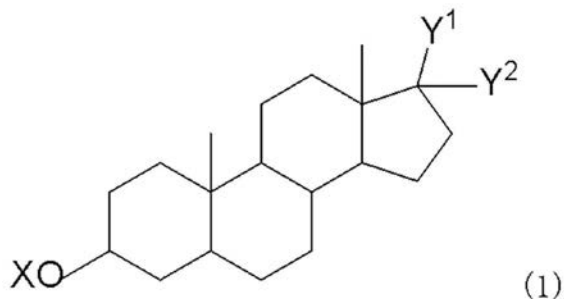
式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、前記酵素反応の生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法。

50

[2]

酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、  
酵素標識核酸プローブの酵素としてアルカリホスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼを用い、上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用い、

【化2】



10

(i)一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり

20

(ii)一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、

(iii)一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として用いる場合は、

式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基であり、前記酵素反応の反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法。

30

[3]

前記酵素がアルカリホスファターゼであり、

一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、

式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[1]または[2]に記載の方法。

40

[4]

前記酵素がグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼであり、一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、

式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[1]または[2]に記載の方法。

[5]

50

前記酵素がペルオキシダーゼであり、一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[1]または[2]に記載の方法。

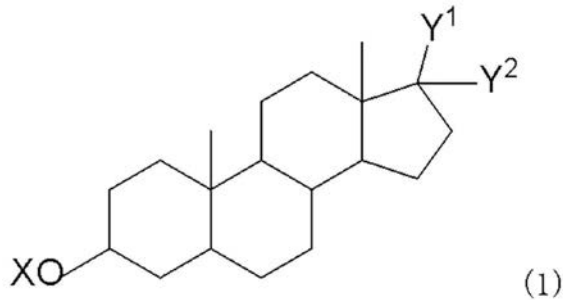
[6]

以下の(1)~(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したアルカリホスファターゼ

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化3】



(式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

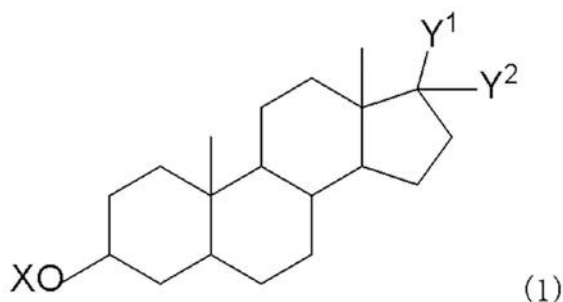
[7]

以下の(1)~(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化4】



(式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

[8]

以下の(1)~(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キット。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識したペルオキシダーゼ、

10

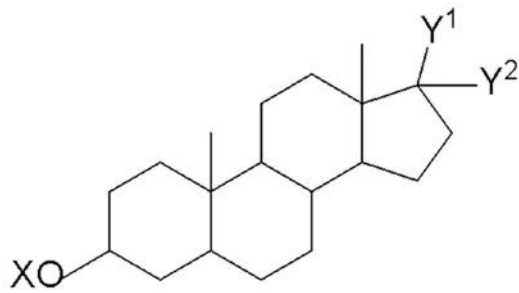
20

30

40

50

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体  
【化5】



10

(式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

[9]

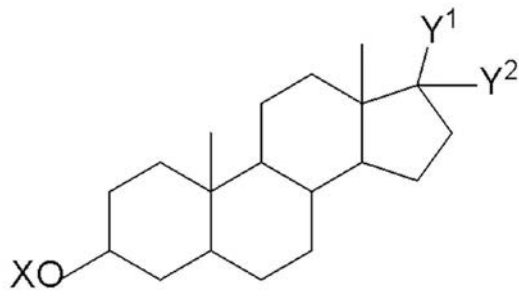
以下の(1)~(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1) 標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したアルカリホスファターゼ、

20

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

【化6】



30

(式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)

(3) ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

[10]

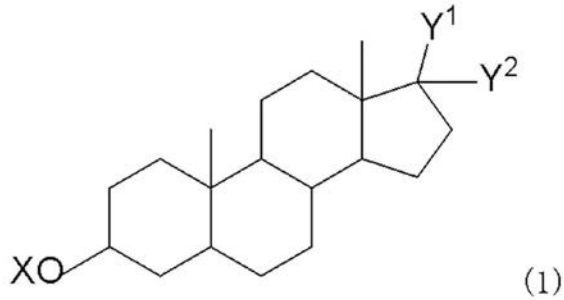
以下の(1)~(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1) 標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼ、

40

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

## 【化7】



10

(式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4)NADHおよび/またはNADPH、

(5)チオNADおよび/またはチオNADP

[11]

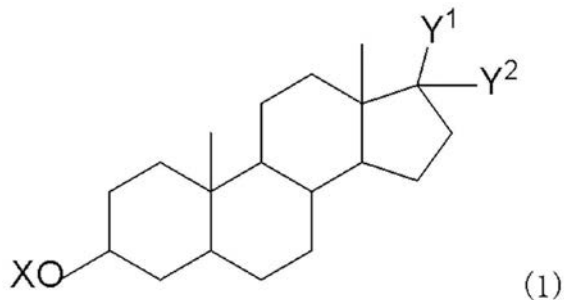
以下の(1)~(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キット。

(1)標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識したペルオキシダーゼ、

(2)上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体

20

## 【化8】



30

(式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である)、

(3)ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)、

(4)NADHおよび/またはNADPH、

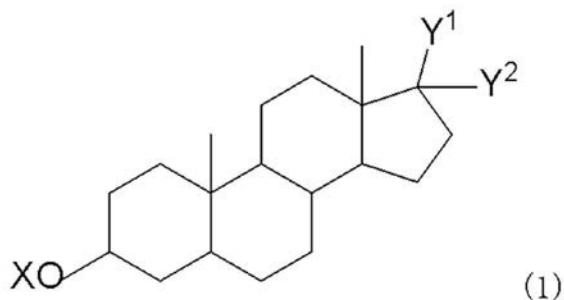
(5)チオNADおよび/またはチオNADP

[12]

下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体。

## 【化9】

40



(式中、X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、以下の(A)、(B)および(C)のいずれかである。

50

(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、  
 (B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水素、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、  
 (C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。)

[13]

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、[12]に記載のアンドロステロン誘導体。

10

[14]

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水素、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[12]に記載のアンドロステロン誘導体。

[15]

X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、(C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、[12]に記載のアンドロステロン誘導体。

20

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、測定感度を $10^{-18}$  moles以上に高めた酵素免疫測定法を提供することができ、標的タンパク質や標的核酸の高感度測定が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】酵素免疫測定法(ELISA法)の測定原理。

【図2】比較例1で得られたPumilio検量線。

30

【図3】比較例2で得られたPumilio検量線。

【図4】比較例3で得られたPumilio検量線。

【図5】比較例4で得られたPumilio検量線。

【図6】3-ヒドロキシアンドロスタン類の例示。

【図7】実施例1で得られたAlkaline phosphatase検量線。

【図8】実施例2で得られたAlkaline phosphatase検量線。

【図9】実施例3で得られたPumilio検量線。

【図10】実施例4で得られたPumilio検量線。

【図11】実施例5で得られた-Galactosidase検量線。

【図12】実施例6で得られた-Galactosidase検量線。

40

【図13】実施例7で得られた-Galactosidase検量線。

【図14】実施例8で得られた-Galactosidase検量線。

【図15】実施例9で得られた-Galactosidase検量線。

【図16】実施例10で得られたPumilio検量線。

【図17】実施例11で得られたPumilio検量線。

【図18】実施例12で得られたPumilio検量線。

【図19】実施例13で得られたPumilio検量線。

【図20】参考例7で得られたPumilio検量線。

【図21】参考例8で得られた-Galactosidase検量線。

【図22】実施例14で得られたHorseradish peroxidase検量線。

50

【図23】実施例15で得られたPumilio検量線。

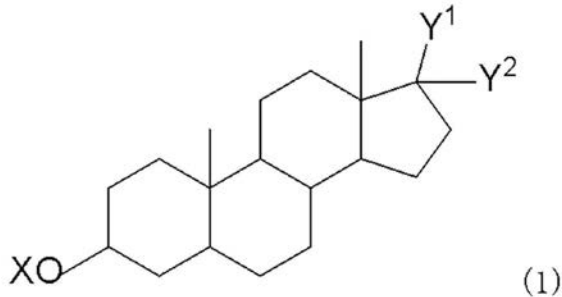
【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

〔新規基質〕

本発明は下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体に関する。

【化10】



10

(式中、X、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>の定義は、以下の(A)、(B)および(C)のいずれかである。

(A)Xはリン酸基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基または炭素数1~6のアルキル基である、

(B)Xはグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種の糖残基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水素、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である、

20

(C)Xは-O-CO-Rであり、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。)

【0014】

Y<sup>2</sup>の例である炭素数1~6のアルコキシ基は、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基などであることができ、炭素数1~6のアルキル基は、例えば、メチル基、エチル基、iso-プロピル基、n-プロピル基、tert-ブチル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などであることができる。

【0015】

糖残基の糖は、グルコース、ガラクトース、フルクトースまたはマンノースであることができ、使用する標識酵素により適宜選択することができる。

30

【0016】

-O-CO-Rにおける-CO-は、-(C=O)-を意味し、Rにおける炭素数1~6のアルキル基は、例えば、メチル基、エチル基、iso-プロピル基、n-プロピル基、tert-ブチル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などであることができる。またRはフェニル基であってもよく、官能基を有していても良い。

【0017】

Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>が共同で酸素原子である場合は、Xは糖残基または-O-CO-Rであり、具体的には5 $\beta$ -アンドロステロンまたは5 $\alpha$ -アンドロステロンの糖誘導体、例えば、グルコシド、ガラクトシド、フルクトシドまたはマンノシドである。尚、グルコシド、ガラクトシド、フルクトシド及びマンノシドは、正式にはそれぞれグルコピラノシド、ガラクトピラノシド、フルクトピラノシド及びマンノピラノシドと呼称される。

40

【0018】

上記本発明の化合物の具体例は、後述の表1に示す。但し、表1には、本発明の化合物の具体例以外に、本発明の方法およびキットで使用できる化合物も含まれている。

【0019】

上記本発明の化合物は、実施例に記載の方法に基づいてまたは実施例に記載の方法を参照して合成できる。

【0020】

50

## 〔酵素サイクリング法〕

本発明は、抗体酵素複合体を用いる酵素測定方法であって、抗体酵素複合体の酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法に関する。

## 【0021】

上記抗体酵素複合体は、標的タンパク質抗原に特異的な抗体とこの抗体で標識した酵素とからなり、前記標的タンパク質の測定に用いられる。

10

## 【0022】

さらに本発明は、酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化を計測することで行う、前記方法に関する。

## 【0023】

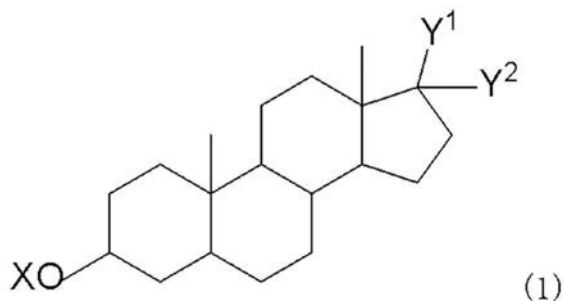
上記酵素標識核酸プローブは、標的核酸に特異的に結合する核酸プローブとこの核酸プローブで標識した酵素とからなり、前記標的核酸の測定に用いられる。

20

## 【0024】

上記本発明の方法で用いられている抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの酵素(標識酵素)は、アルカリホスファターゼ(ALP)、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、フルクトシダーゼ、マンノシダーゼまたはペルオキシダーゼである。上記酵素の基質として下記一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体を用いる。

## 【化11】



30

## 【0025】

(i)一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、アルカリホスファターゼの基質として用いる場合には、式中、Xはリン酸基、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。(i)に含まれるアンドロステロン誘導体は、上記本発明の新規化合物を含むと共に、さらにY<sup>2</sup>が、水素である化合物も含む。Y<sup>2</sup>が、水素である化合物はTetrahedron, 1999, Vol.55, No.17, p.5465-5482に記載されている。この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。

40

## 【0026】

(ii)一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、フルクトシダーゼまたはマンノシダーゼの基質として用いる場合は、式中、Xは糖残基であり、糖残基はグルコース、ガラクトース、フルクトースおよびマンノースから成る群から選ばれる1種であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。(ii)に含まれるアンドロステロン誘導体は、上記本発明の新規

50

化合物を含むと共に、さらにY<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同で酸素原子である化合物も含む。Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同で酸素原子である化合物の内、Xがグルコースである化合物はCarbohydrate Research, 1971, Vol.17, No.1, p.199-207に記載されている。この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。Y<sup>2</sup>が水酸基である、化合物の内、Xがグルコースである化合物はPhytochemistry, 1974, Vol.13, No.10, p.2135-2142に記載されている。この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。

【0027】

(iii) 一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体は、ペルオキシダーゼの基質として用いる場合は、式中、Xは-O-CO-R(但し、Rは炭素数1~6のアルキル基またはフェニル基である)であり、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は共同でメチレン基または酸素原子であるか、または、Y<sup>1</sup>は水素であり、Y<sup>2</sup>は、水素、水酸基、炭素数1~6のアルコキシ基、または炭素数1~6のアルキル基である。(iii)に含まれるアンドロステロン誘導体は、上記本発明の新規化合物である。

10

【0028】

本発明の超高感度測定法は、通常の酵素免疫測定法や核酸プローブ法と同様に実施することができる。例えば、被検体に特異的に結合する抗体や核酸プローブを表面に固着させた固相担体、例えば、マイクロプレートやプラスチックチューブ、磁気ビーズ等、通常の測定に用いられている固相担体を用いることができる。

【0029】

抗体および核酸プローブ-酵素複合体は、常法により調製できる。

20

【0030】

抗体酵素複合体を構成する抗体は、本発明の酵素免疫測定方法により測定されるべき被検体に特異的に結合する抗体から適宜選択することができる。例えば、本発明の酵素免疫測定方法は、タンパク質の分析に用いられるが、その場合、抗体酵素複合体の抗体は、被検体であるタンパク質に特異的に結合する抗体である。また、この場合、被検体であるタンパク質に特異的に結合する抗体を表面に固着させた基板を用いる。また、抗体酵素複合体を構成する抗体および基板に固着させる抗体は、抗体の断片であっても良い。本発明の酵素免疫測定方法における、被検体は、タンパク質に限定されず、通常の酵素免疫測定方法が測定対象とするタンパク質以外のすべての物質であることができる。

【0031】

核酸プローブ酵素複合体も同様に測定対象となる核酸に相補的なプローブを適宜選択することができる。

30

【0032】

本発明の方法において、抗体酵素複合体の酵素または酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび/またはNADPH、チオNADおよび/またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび/またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う。

【0033】

本発明の方法において、各成分の濃度は以下の範囲にすることができる。

40

(1) 抗体酵素複合体または酵素標識核酸プローブの濃度範囲

0.01 μg/ml ~ 1 mg/ml

(2) 標識酵素の基質の濃度範囲

1 μM ~ 500 mM

(3) NADHおよび/またはNADPHの濃度範囲

0.01 mM ~ 50 mM

(4) チオNADおよび/またはチオNADPの濃度範囲

0.01 mM ~ 100 mM

(5) デヒドロゲナーゼ(DH)の濃度範囲

50

0.01 u/ml ~ 5000 u/ml

【0034】

反応条件は、標識酵素およびデヒドロゲナーゼ(DH)の最適温度範囲を考慮して適宜決定できる。例えば、反応温度は、操作が簡便であることから、室温で実施することが好ましい。但し、標識酵素およびデヒドロゲナーゼ(DH)の最適温度範囲を考慮して室温より高い温度または低い温度で実施することもできる。

【0035】

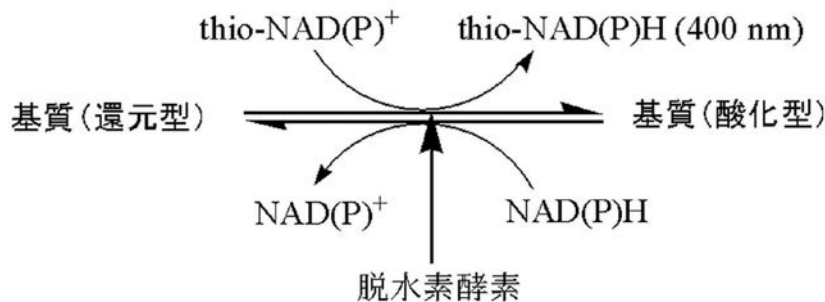
反応時間は、生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHの量の測定、または生成したチオNADHおよび/またはチオNADPHによる色の变化の計測が可能な程度まで、チオNADHおよび/またはチオNADPHが蓄積するに十分な時間とすることができる。但し、測定または計測に必要なチオNADHおよび/またはチオNADPHの蓄積量は、測定または計測条件により変化するので、条件に応じて適宜決定できる。

【0036】

酵素サイクリング系の中でチオNAD(P)を利用するサイクリング系は比較的最近になって登場したユニークなサイクリング系である。この系ではNAD(P)/NAD(P)Hを補酵素として利用する脱水素酵素(Dehydrogenase;DH)を用い、NAD(P)/NAD(P)HとそのアナログであるチオNAD(P)/チオNAD(P)Hが共存する条件下でサイクリングを行い、脱水素酵素の基質をチオNAD(P)H(極大吸収波長:400 nm、モル吸光係数=11,900)として増幅定量する。チオNAD(P)サイクリング法の測定原理は以下の通りである。

【0037】

【化12】



【0038】

NADHの極大吸収が340 nm(モル吸光係数=6,200)であるのに対し、チオNAD(P)Hは可視域に吸収を示すため(極大吸収波長:400 nm、モル吸光係数=11,900)、普及型の吸光光度計や比色測定用マイクロプレートリーダーを用いて測定できることをその長所としている。

【0039】

チオNAD(P)を利用するサイクリング系は、普及型の吸光光度計や比色測定用マイクロプレートリーダーを用いて測定できるという長所を利用して、NADHの吸収増加に基づく脱水素酵素活性測定やその基質の定量法などの従来法のいくつかがチオNADを用いる方法に改良されている。しかしながら、このサイクリング系を酵素免疫測定法等の検出系として高感度化に利用した報告は未だない。

本発明では、標識酵素とサイクリング系を組み合わせることにより、初めて増幅反応を幾何級数的な反応とすることが可能となり、十分な高感度化を行うことが可能となった。

【0040】

本発明の測定法では、酵素免疫測定法の例で示したとおり、酵素複合体とそれに組み合わせた基質で産生された生成物を次の酵素サイクリング反応の基質として用い、酵素サイクリング反応により生成したチオNAD(P)Hの吸収を比色定量するものである。この反応では1種の脱水素酵素で酵素サイクリングを行うため、酵素サイクリング反応の基質としては、還元型基質でも酸化型基質でもよい。

【0041】

本発明で用いる上記酵素複合体として用いる標識酵素とその基質およびそれに続くサイクリング反応に用いる脱水素酵素は以下のような性質を持っている。

- ( 1 ) 標識酵素の生成物がアンドロステロンまたはその誘導体
- ( 2 ) 市販および汎用されている標識酵素が使用できる
- ( 3 ) 酵素サイクリングのターンオーバー数が大きい
- ( 4 ) 酵素サイクリング反応に使用する脱水素酵素に標識酵素のコンタミや標識酵素と同様の活性がない

【 0 0 4 2 】

デヒドロゲナーゼ(DH)としては、例えば、3 -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを上げることができる。

【 0 0 4 3 】

本発明に使用可能な代表的な標識酵素、基質及び酵素サイクリング用の脱水素酵素の組合わせの一例として以下のものがあげられるが、もちろんこの組み合わせに限られるわけではない。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

標識酵素	基質	デヒドロゲナーゼ
$\alpha$ -グルコシターゼ	5 $\alpha$ -アントロステロン 3 $\alpha$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\alpha$ -グルコシターゼ	5 $\beta$ -アントロステロン 3 $\alpha$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\alpha$ -グルコシターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\alpha$ アントロスタン 3- $\alpha$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\alpha$ -グルコシターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\beta$ アントロスタン 3- $\alpha$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -グルコシターゼ	5 $\alpha$ -アントロステロン 3- $\beta$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -グルコシターゼ	5 $\beta$ -アントロステロン 3- $\beta$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -グルコシターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\alpha$ アントロスタン 3- $\beta$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -グルコシターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\beta$ アントロスタン 3- $\beta$ -グルコシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -ガラクトシターゼ	5 $\alpha$ -アントロステロン 3- $\beta$ -ガラクトシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -ガラクトシターゼ	5 $\beta$ -アントロステロン 3- $\beta$ -ガラクトシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -ガラクトシターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\alpha$ -アントロスタン 3- $\beta$ -ガラクトシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
$\beta$ -ガラクトシターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\beta$ -アントロスタン 3- $\beta$ -ガラクトシト	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メチル-5 $\alpha$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メチル-5 $\beta$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\alpha$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メキシ-5 $\beta$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -ジヒドロキシ-17 $\beta$ -メチル-5 $\alpha$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -ジヒドロキシ-17 $\beta$ -メチル-5 $\beta$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -ジヒドロキシ-17 $\beta$ -エチル-5 $\alpha$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
アントホスファターゼ	3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -ジヒドロキシ-17 $\beta$ -エチル-5 $\beta$ -アントロスタン 3-リン酸	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ

10

20

30

40

アシトホスファターゼ	17β-アセトキシ-3α-ヒドロキシ-5α-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アシトホスファターゼ	17β-アセトキシ-3α-ヒドロキシ-5β-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	3α-ヒドロキシ-17β-メチル-5α-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	3α-ヒドロキシ-17β-メチル-5β-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	10
アルカリホスファターゼ	3α-ヒドロキシ-17β-メトキシ-5α-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	3α-ヒドロキシ-17β-メトキシ-5β-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	3α,17α-ジヒドロキシ-17β-メチル-5α-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	3α,17α-ジヒドロキシ-17β-メチル-5β-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	20
アルカリホスファターゼ	3α,17α-ジヒドロキシ-17β-エチル-5α-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	3α,17α-ジヒドロキシ-17β-エチル-5β-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	20
アルカリホスファターゼ	5β-アンドロステロン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	17β-アセトキシ-3α-ヒドロキシ-5α-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
アルカリホスファターゼ	17β-アセトキシ-3α-ヒドロキシ-5β-アンドロスタン 3-リン酸	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	30
スルファターゼ	5α-アンドロステロン 3-スルフェート	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
スルファターゼ	5β-アンドロステロン 3-スルフェート	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
ペルオキシダーゼ	3α-tert-ブチル-ペルオキシ-5α-アンドロステロン	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
ペルオキシダーゼ	3α-tert-ブチル-ペルオキシ-5β-アンドロステロン	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
ペルオキシダーゼ	3α-ベンゾイルペルオキシ-5α-アンドロステロン	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
ペルオキシダーゼ	3α-ベンゾイルペルオキシ-5β-アンドロステロン	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	40
ペルオキシダーゼ	3α-アセチルペルオキシ-5α-アンドロステロン	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	
ペルオキシダーゼ	3α-アセチルペルオキシ-5β-アンドロステロン	3α-ヒドロキシステロイドテヒドロゲナーゼ	

## 【 0 0 4 5 】

例えば、上記記載の組合せの中でサイクリング酵素として3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを用いる場合、使用可能な基質の候補としては、アンドロステロン、11-ヒドロキシアンドロステロン、11-オキソアンドロステロン、11-ヒドロキシアンドロステロンが挙げられる。

## 【0046】

サイクリング用の基質としては、酵素の反応速度が速く(基質に対する活性が高い)、低濃度でも反応する( $K_m$ 値が小さい)ものが好ましい。また、脱水素酵素として好ましい性質は、補酵素としてチオNAD(P)を用いた場合の反応速度である。多くの脱水素酵素では、補酵素としてチオNADを用いた場合の反応速度がNADを用いた場合の数%以内であるのに対し、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼによるアンドロステロンの脱水素反応では、チオNADでの反応速度がNADでの反応速度の約59%もあり、本発明のサイクリング酵素として、好ましい性質を有している。しかも組み合わせる標識酵素として、汎用されているアルカリホスファターゼ(ALP)を用いることが可能であり、アルカリホスファターゼの基質となるアンドロステロン誘導体の3位リン酸エステルの合成が容易であることも好ましい組み合わせである。

10

## 【0047】

また、同じように標識酵素として汎用されているグルコシダーゼとアンドロステロン誘導体のグルコシド、ガラクトシダーゼとアンドロステロン誘導体のガラクトシドも合成が容易で好ましい組み合わせである。

## 【0048】

また、同じように標識酵素として汎用されているペルオキシダーゼとアンドロステロン誘導体のペルオキシド、例えば、tert-ブチルペルオキシドも合成が容易で好ましい組み合わせである。

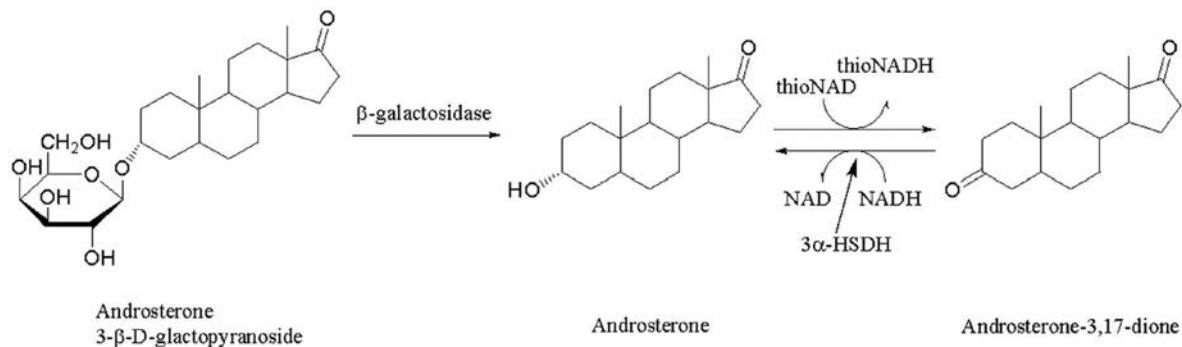
## 【0049】

アンドロステロン 3-β-Dガラクトシドを基質とした反応例を以下に示す。

20

## 【0050】

## 【化13】



30

## 【0051】

抗体酵素複合体の酵素としてアルカリホスファターゼ(ALP)を用いる酵素免疫測定方法を例にして、以下に説明する。アルカリホスファターゼ(ALP)は、標識酵素として広く用いられている酵素であり、このALPを用いる酵素免疫測定方法では、新規化合物のアンドロステロン誘導体をALPの基質とすると、生成物としてアンドロステロンが生成する。そして、ALPの反応生成物を基質とするデヒドロゲナーゼである、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3-HSD)を酵素サイクリング反応に使用する。

40

## 【0052】

チオNADサイクリングは適切な脱水素酵素反応を選択すれば1分当たり数百サイクルという効率で脱水素酵素基質を増幅定量することができる。したがって、このような基質を反応生成物として与える酵素の活性はチオNADサイクリングによって超高感度に測定できることになる。

## 【0053】

## [酵素サイクリング用キット]

本発明は、反応性担体に標識化された酵素およびその基質とサイクリング反应用的酵素とその補酵素のチオNADとNADHを含む酵素サイクリング法用キットを包含する。

反応性担体とは測定対象物と結合する活性を持った抗体・核酸プローブ・レクチン等を

50

表す。

反応性担体は測定対象物に適した物を用いればよく、標識酵素およびその基質も適した物を用いればよく特に限定はされない。

【0054】

より具体的には、本発明は、標識酵素及びその基質とサイクリング反応の酵素とその補酵素のチオNADとNADHを含む酵素サイクリング法用キットを包含する。

【0055】

本発明のキットは、以下の(1)～(5)の試薬を含む酵素免疫測定用キットである。

(1) 標的タンパク質抗原に特異的な抗体を標識した酵素であるアルカリホスファターゼ(ALP)またはグルコシダーゼまたはガラクトシダーゼまたはフルクトシダーゼまたはマンノシダーゼまたはペルオキシダーゼ、

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体、

(3) デヒドロゲナーゼ(DH)、

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

【0056】

さらに本発明は、以下の(1)～(5)の試薬を含む核酸プローブ測定用キットである。

(1) 標的核酸に特異的に結合する核酸プローブで標識した酵素であるアルカリホスファターゼ(ALP)またはグルコシダーゼまたはガラクトシダーゼまたはフルクトシダーゼまたはマンノシダーゼまたはペルオキシダーゼ、

(2) 上記酵素の基質である一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体、

(3) デヒドロゲナーゼ(DH)、

(4) NADHおよび/またはNADPH、

(5) チオNADおよび/またはチオNADP

【0057】

標識酵素、デヒドロゲナーゼ(DH)および一般式(1)で表されるアンドロステロン誘導体については、上記本発明の方法で説明したものをそのまま利用できる。

【0058】

本発明のキットは、市販の酵素標識抗体等をこのキットの構成試薬と組合わせて使用することも可能である。このキットは、酵素サイクリング法を用いる酵素免疫測定方法に利用できる。

【実施例】

【0059】

以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明がこれら実施例のみに限定されるべきでないことは云うまでもない。

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0060】

Alkaline phosphatase (ALP) と Androsterone 3-phosphate (A3P) の系のチオNADサイクリングを検出系とする、Alkaline phosphatase と Pumilio (プミリオ) の測定。

【0061】

参考例1

ALP標識抗体の作製

抗原に特異的反応性を有するマウス由来のモノクローナル抗体を0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 3.5) で30分間の透析を3回行った。その抗体溶液に抗体量に対し0.5%になるようにペプシンを添加し、37℃で1時間静置した後、1.5 Mトリス緩衝液 (pH 8.8) で中性に調整した。この混合反応液をsuperdex 200を充填したカラム (Amersham Biosciences社) を用いてゲルろ過し、F(ab')<sub>2</sub>を得た。

このF(ab')<sub>2</sub>を100 μg用いて、ALP-labeling kit (同仁化学社) によりALPを標識した。

。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

## 参考例2

不溶性担体固定化抗体の調製1

抗原に特異的反応性を有するモルモット由来のポリクローナル抗体を50 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) に100 µg/mlの濃度で溶解した溶液を、平底マイクロプレート (Nunc社) の各ウェルに50 µlずつ添加し、室温で1時間静置した後抗体溶液を回収し、2%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有TBSを300 µl添加して室温で2時間静置してブロッキング処理を行い、ポリクローナル抗体固定化マイクロプレートを得た。

## 【 0 0 6 3 】

## 参考例3

不溶性担体固定化抗体の調製2

抗原に特異的反応性を有するモルモット由来のポリクローナル抗体を50 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) に10 µg/mlの濃度で溶解した溶液を、平底マイクロプレート (Nunc社) の各ウェルに50 µlずつ添加し、室温で1時間静置した後ウェル内の溶液を吸引除去し、0.1 %ウシ血清アルブミン (BSA) 含有TBSを300 µl添加して室温で2時間静置してブロッキング処理を行い、0.05 % Tween 20含有TBSで洗浄し、ポリクローナル抗体固定化マイクロプレートを得た。

## 【 0 0 6 4 】

< 比較例1 > 5 -Androsterone 3-phosphateを用いた1ステップ法によるPumilio (プミリオ) の測定

反応試液

- 0.2 M グリシン緩衝液 (pH 8.8)
- 1.5 mM thio-NAD
- 1 mM NADH
- 0.5 mM 5 -Androsterone 3-phosphate
- 20 U/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

## 【 0 0 6 5 】

測定試料

- 0.1、0.5、1、2、5、10、50、100、200 ng/ml Pumilio

## 【 0 0 6 6 】

測定方法

参考例2の方法で調製した抗Pumilioモルモットポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~200 ng/mlの範囲で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl添加し、室温で1時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.05 % Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例1の方法で作製したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を2.5 µg/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl加え、1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.05 % Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液を100 µlずつ添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製 MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図2に示す。

## 【 0 0 6 7 】

ここで、酵素 (Alkaline phosphatase) と基質 (Androsterone 3-phosphate) の反応性が悪いこと、基質がサイクリング反応を阻害することが問題点として浮上したため、酵素反応とサイクリング反応を分ける2ステップ法を試した。また、サイクリング反応の酵素である3 -Hydroxysteroid dehydrogenase中にphosphatase活性があり、ブランクの原因となることがわかったため、2ステップ法のサイクリング反応時にはリン酸を含有する緩衝液を使用することにした。

## 【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

< 比較例2 > 5 -Androsterone 3-phosphateを用いた2ステップ法によるPumilio ( プミリオ ) の測定

反応試液A

0.1 M トリス緩衝液 ( pH 8.3 )  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.1 mM 5 -Androsterone 3-phosphate

【 0 0 6 9 】

反応試液B

0.2 M リン酸水素二ナトリウム含有0.2 M グリシン緩衝液 ( pH 9.6 )  
3 mM thio-NAD  
1 mM NADH  
40 U/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

10

【 0 0 7 0 】

測定試料

0.5、0.75、1、2.5、5、7.5、10、12.5、20、50、75、100 ng/ml Pumilio

【 0 0 7 1 】

測定方法

参考例3の方法で調製した抗Pumilioモルモットポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio ( 標準物質 ) を0 ~ 100 ng/mlの範囲で含有する、0.1 % BSA含有TBS ( pH 7.5 ) 溶液を50 μl添加し、室温で1時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.05 % Tween 20含有TBS ( pH 7.5 ) で洗浄し、参考例1の方法で作製したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を2.5 μg/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS ( pH 7.5 ) 溶液を50 μl加え、1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.05 % Tween 20含有TBS ( pH 7.5 ) で洗浄、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液Aを50 μlずつ添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。続いてそのウェルに反応試液Bを50 μl添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー ( コロナ社製MTP-500 ) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図3に示す。

20

【 0 0 7 2 】

2ステップ法を試したが、期待するほど感度が上がらないので、Alkaline phosphataseとの反応性を向上させるため、ここまで用いていた、5 -Androsterone 3-phosphateとは立体構造の異なる、5 -Androsterone 3-phosphateを使用することにした。

30

【 0 0 7 3 】

< 比較例3 > 5 -Androsterone 3-phosphateを用いた1ステップ法によるPumilio ( プミリオ ) の測定

【 0 0 7 4 】

反応試液

0.1 M トリス緩衝液 ( pH 8.6 )  
0.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1.5 mM thio-NAD  
0.5 mM NADH  
0.5 mM 5 -Androsterone 3-phosphate  
20 U/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

40

【 0 0 7 5 】

試料

0.1、0.5、1、2、5、8、10、20、50 ng/ml Pumilio

【 0 0 7 6 】

測定方法

参考例3の方法で調製した抗Pumilioモルモットポリクローナル抗体を固定化したマイク

50

ロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~50 ng/mlの範囲で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l添加し、室温で1時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.05% Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例1の方法で作製したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を2.5  $\mu$ g/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l加え、1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.05% Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液を50  $\mu$ lずつ添加し、37  $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図4に示す。

10

## 【0077】

<比較例4> 5  $\beta$ -Androsterone 3-phosphateを用いた2ステップ法によるPumilio (プミリオ) の測定

## 【0078】

反応試液A

- 0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.3)
- 1 mM  $MgCl_2$
- 0.1 mM 5  $\beta$ -Androsterone 3-phosphate

## 【0079】

反応試液B

- 0.2 M リン酸水素二ナトリウム含有0.2 M グリシン緩衝液 (pH 9.6)
- 3 mM thio-NAD
- 1 mM NADH
- 40 U/ml 3  $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

20

## 【0080】

試料

0.005、0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1、2.5、5、10、25、50 ng/ml Pumilio

## 【0081】

測定方法

参考例3の方法で調製した抗Pumilioホルモトポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~50 ng/mlの範囲で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l添加し、室温で1時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.05% Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例1の方法で作製したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を2.5  $\mu$ g/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l加え、1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.05% Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液Aを50  $\mu$ lずつ添加し、37  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。続いてそのウェルに反応試液Bを50  $\mu$ l添加し、37  $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して10分間吸光度を測定した。10分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図5に示す。

30

40

## 【0082】

ここまでで、Androsterone 3-phosphateがサイクリング反応の基質になっていることがわかり、また、この現象によるブランク上昇も問題点となった。その原因が17位のケトンにあることが判明したので、17位のケトンを除去もしくは置換した基質を使用することにした。合成した3  $\beta$ -ヒドロキシアンドロスタン類は図6に示す。また、これらを基質としたサイクリング反応の回転数を比較すると、表2のようになった。この中では5  $\beta$ -Androsteroneの回転数が最大で、それに近い基質は3  $\beta$ -Hydroxy-17  $\beta$ -methoxy-5  $\beta$ -Androstane、5  $\beta$ -Dihydrotestosteroneであったので、まずは前者のリン酸エステル、3  $\beta$ -Hydroxy-17

50

-methoxy-5 $\beta$ -Androstane 3-phosphate合成してチオNADサイクリングへ応用した。

【 0 0 8 3 】

【表 2】

3 $\alpha$ -ヒドロキシアンドロスタン類のサイクリング回転率

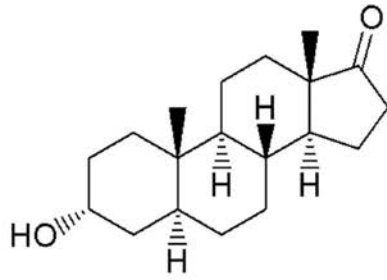
	Cycle/min	相対値 (%)
5 $\alpha$ -Androsterone	623	100
5 $\beta$ -Androsterone	384	62
5 $\alpha$ -17-CH <sub>3</sub>	200	32
5 $\alpha$ -17-deoxo	241	39
5 $\alpha$ -17-CH <sub>2</sub>	308	49
5 $\beta$ -17-CH <sub>3</sub>	114	18
5 $\beta$ -17 $\beta$ -OCH <sub>3</sub>	458	74
5 $\alpha$ -DHT	535	86
Glycochenodeoxycholate(参考例)	129	21

10

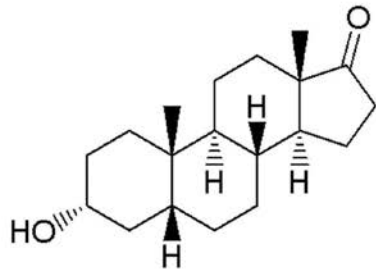
【 0 0 8 4 】

20

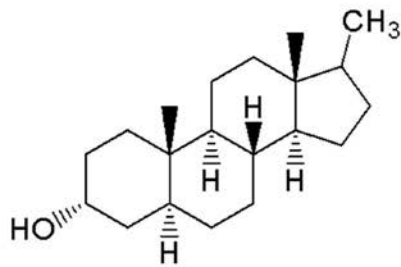
【化 1 4】

5 $\alpha$ -Androsterone

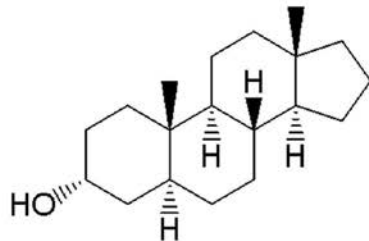
10

5 $\beta$ -Androsterone

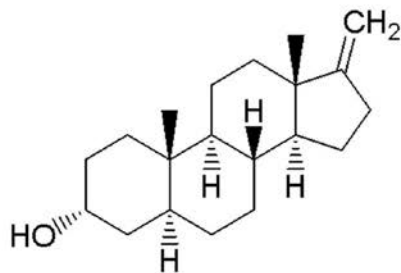
20

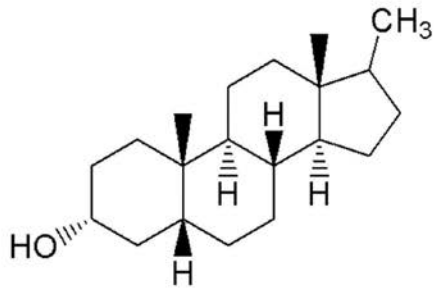
3 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methyl-5 $\alpha$ -  
Androstane (5 $\alpha$ -17-CH<sub>3</sub>)

30

3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -Androstane  
(5 $\alpha$ -17-dexo)

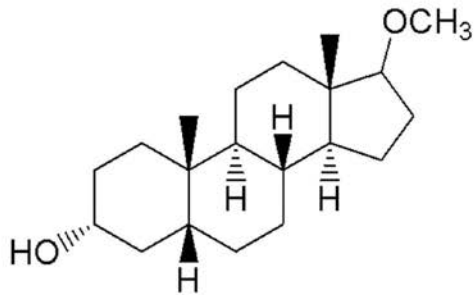
40

3 $\alpha$ -Hydroxy-17-methylene-  
5 $\alpha$ -Androstane (5 $\alpha$ -17-CH<sub>2</sub>)



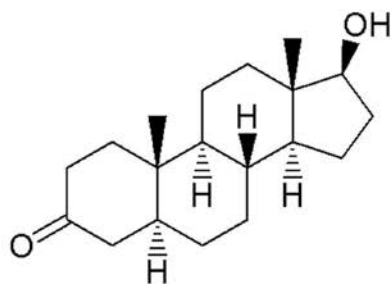
3 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methyl-5 $\beta$ -  
Androstane (5 $\beta$ -17-CH<sub>3</sub>)

10



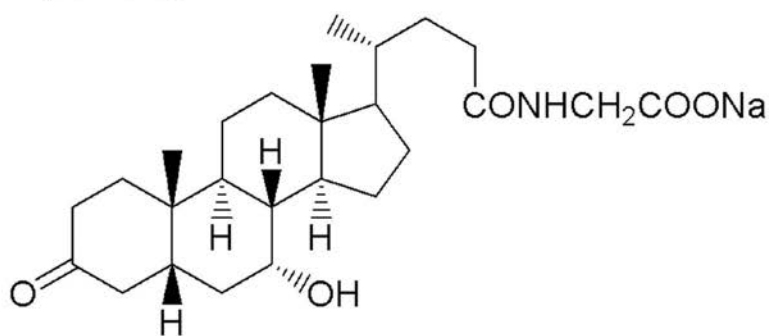
3 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\beta$ -  
Androstane (5 $\beta$ -17-OCH<sub>3</sub>)

20



5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone  
(5 $\alpha$ -DHT)

30



Sodium glycochenodoxycholate

40

【 0 0 8 5 】

< 実施例 1 > 3 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\beta$ -Androstane 3-phosphateを用いた1ステップ法によるAlkaline phosphataseの測定

【 0 0 8 6 】

3 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\beta$ -Androstane 3-phosphateの合成方法

オキシ塩化リン(0.26mL)の無水ピリジン溶液(4 mL)に、氷冷下で3 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\beta$ -androstane (200mg)の無水ピリジン溶液(4mL)を滴下し、氷冷下でさらに1時間

50

攪拌した。反応液を氷水に注ぎ、溶液を強アルカリ性 (pH 約11)とした後、エーテルで洗浄した。次いで、水層に濃塩酸を加えpHを約2に調整した後、エーテルで抽出した。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。残渣をテトラヒドロフラン - ヘキサンで再結晶し無色結晶 (210 mg) を得た。

【 0 0 8 7 】

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ ) = 0.73 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0.95 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3.19 (1H, t,  $J=8.6$  Hz, 17 -H), 3.32 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 4.18 (m, 1H, 3 -H)

ESI-HR-MS Calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{P-H}$ :  $m/z$  385.2149  $[\text{M-H}]^-$ . Found  $m/z$  385.2157  
m.p. 187-188

【 0 0 8 8 】

反応試液

0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.5)  
0.2 mM  $\text{MgCl}_2$   
0.6 mM thio-NAD  
4 mM NADH  
0.5 mM 3 -Hydroxy-17 -methoxy-5 -Androstane 3-phosphate  
20 U/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

【 0 0 8 9 】

試料

0.1、0.2、0.5、1、2 mU/ml Alkaline phosphatase (最終濃度 0.05、0.1、0.25、0.5、1 mU/ml)

【 0 0 9 0 】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 (Alkaline phosphatase) を0~2 mU/mlの範囲で含有するトリス緩衝溶液 (pH 9.5) を50  $\mu\text{l}$  添加し、続いてそのウェルに反応試液Bを50  $\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに添加し、37 で加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して60分間吸光度を測定した。60分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図7に示す。

【 0 0 9 1 】

続いて2ステップ法の検討について、サイクリング反応の酵素である3 -Hydroxysteroid dehydrogenase中のphosphatase活性の阻害のため、サイクリング反応時にはリン酸を含有する緩衝液で反応を行うことはすでに述べたが、リン酸緩衝液よりも、よりこのphosphatase活性を阻害するものとして、ピロリン酸緩衝液を採用することにした。

【 0 0 9 2 】

<実施例2> 3 -Hydroxy-17 -methoxy-5 -Androstane 3-phosphateを用いた2ステップ法によるAlkaline phosphataseの測定

【 0 0 9 3 】

反応試液A

0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.5)  
0.2 mM  $\text{MgCl}_2$   
1 mM 3 -Hydroxy-17 -methoxy-5 -Androstane 3-phosphate

【 0 0 9 4 】

反応試液B

0.15 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.5)  
3 mM thio-NAD  
1 mM NADH  
40 U/ml 3 -Hydroxysteroid dehydrogenase

【 0 0 9 5 】

試料

10

20

30

40

50

1、5、10、15、20  $\mu\text{U/ml}$  Alkaline phosphatase (最終濃度 0.5、2.5、5、7.5、  
10  $\mu\text{U/ml}$ )

【0096】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 (Alkaline phosphatase) を0~20  $\mu\text{U/ml}$ の  
範囲で含有するトリス緩衝溶液 (pH 9.5) を25  $\mu\text{l}$ 添加し、続いてそのウェルに反応試液A  
を25  $\mu\text{l}$ ずつ添加して混合し、37 °Cのインキュベーターで1時間静置する。次に反応試液B  
を50  $\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ  
社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して20分間吸光度を測定した。20分間の吸光  
度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直  
線を図8に示す。

10

【0097】

参考例4

Alkaline phosphatase (ALP) 標識抗体の精製

参考例1のように得た $\text{F(ab')}_2$ を150  $\mu\text{g}$ 用いてALP-labeling-kit (同仁化学) によりAL  
P標識抗体を作製した。このALP標識抗体液中にはALPとFabの様々な分子量の複合体が存  
在し、活性にバラつきがあるので、作製したALP標識抗体液を1 mM  $\text{MgI}_2$ 、0.1 mM  $\text{ZnCl}_2$ 、  
0.01 % BSAを含有するトリス緩衝液 (pH 7.0) を溶出液としてsuperdex 200を充填したカ  
ラム (Amersham Biosciences社) を用いてゲルろ過し、各フラクションの活性を比較した  
上で、S/N比の大きいALP標識抗体のみを回収した。

20

【0098】

参考例5

不溶性担体固定化抗体の調製

抗原に特異的反応性を有するモルモット由来のポリクローナル抗体を50 mM炭酸ナトリ  
ウム緩衝液 (pH 9.6) に10  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で溶解した溶液を、平底マイクロプレート (Nunc  
社) の各ウェルに50  $\mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で1時間静置した後ウェル内の溶液を吸引除去し  
、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄を行った。次に5 %ウシ血清アルブミン (BSA)  
含有TBSを200  $\mu\text{l}$ 添加して4 °Cで2時間から一晩静置してブロッキング処理を行い、0.  
5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、ポリクローナル抗体固定化マイクロプレ  
ートを得た。

30

【0099】

<実施例 3> 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane 3-phosphateを用いた1ステッ  
プ法によるPumilio (プミリオ) の測定

反応試液

- 0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.5)
- 1.5 mM thio-NAD
- 2.5 mM NADH
- 0.1 mM 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane 3-phosphate
- 20 U/ml 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

【0100】

試料

- 0.1、0.5、2、5、10、25 ng/ml Pumilio

40

【0101】

測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioモルモットポリクローナル抗体を固定化したマイク  
ロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~25 ng/mlの範囲で含有する、0.1 % BS  
A含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu\text{l}$ 添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶  
液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例4の方法で作製  
したALP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体をおよそ0.8  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含有する、0  
.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu\text{l}$ 加え、4 °Cで2時間振とうさせた。ウェル内の溶液

50

を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液を50  $\mu$ lずつ添加し、37  $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して60分間吸光度を測定した。60分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図9に示す。

#### 【0102】

<実施例4> 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane-3-phosphateを用いた2ステップ法によるPumilio (プミリオ) の測定

##### 反応試液A

0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.5)

0.1mM MgCl<sub>2</sub>

0.2 mM 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane 3-phosphate

##### 反応試液B

0.15 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.5)

3 mM thio-NAD

1 mM NADH

40 U/ml 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

##### 試料

0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5 ng/ml Pumilio

#### 【0103】

##### 測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~0.5 ng/mlの範囲で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例4の方法で作製したALP標識抗Pumilioモノクローナル抗体をおよそ0.2  $\mu$ g/ml、ウサギF(ab')<sub>2</sub>を1 mg/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l加え、4  $^{\circ}$ Cで2時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液Aを50  $\mu$ lずつ添加し、37  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。続いてそのウェルに反応試液Bを50  $\mu$ l添加し、37  $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図10に示す。

#### 【0104】

このように17位を修飾した基質を使用してもブランク反応は完全には除去できなかった。そこで、ELISAの標識酵素に $\beta$ -Galactosidaseを用い、その基質として、Androsterone-3 $\beta$ -D-Galactosideを合成し、検討を進めた。

#### 【0105】

$\beta$ -GalactosidaseとAndrosterone 3 $\beta$ -D-Galactosideの系のチオNADサイクリングを検出とする、 $\beta$ -GalactosidaseとPumilio (プミリオ) の測定。

#### 【0106】

<参考例 a> 5 $\alpha$ -Androsterone 3 $\beta$ -D-Galactosideを用いた2ステップ法による $\beta$ -Galactosidaseの測定

#### 【0107】

5 $\alpha$ -Androsterone 3 $\beta$ -D-Galactoside(正式名: 5 $\alpha$ -Androsterone 3 $\beta$ -D-galactopyranoside)の合成方法

5 $\alpha$ -Androsterone (290mg)のジクロロメタン溶液(15 mL)に、MS4A (1.25 g)、Phenyl 2,3,4,6-O-tetrabenzoyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (1.03g)を加えて-20  $^{\circ}$ Cで15分間攪拌した。次いで、N-ヨードスクシンイミド (435mg)、トリフルオロメタンスルホン酸 (15mg)を加え-20  $^{\circ}$ Cで2時間攪拌した後、室温にてさらに2時間反応した。反応液にトリ

10

20

30

40

50

エチルアミン250  $\mu$ Lを添加し反応を停止し、反応液を飽和炭酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムの3:1の混液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をメタノール(15 mL)に溶解し、28% ナトリウムメトキシド(500  $\mu$ L)を加え2時間攪拌した。反応液に酢酸を加えて中和した後、減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (24  $\times$  240 mm, 10% メタノール - クロロホルム)にて精製後、メタノールで再結晶し無色結晶(360mg)を得た。

【 0 1 0 8 】

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ ) = 0.85 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0.97 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3.44-3.49 (bm, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.70 (d, 1H, H-6'a), 3.72 (d, 1H, H-6'b), 3.73 (m, 1H, 3'-H), 3.81 (d, 1H, H-4'), 4.33 (d, 1H, H-1',  $J_{1,2'} = 6.2$  Hz)

ESI-HR-MS Calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{-H}$ :  $m/z$  451.2701  $[\text{M-H}]^-$ . Found  $m/z$  451.2711  
m.p. 130-135

【 0 1 0 9 】

反応試液A

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3)  
0.2 mM  $\text{MgCl}_2$   
0.1 mM 5 $\alpha$ -Androsterone -D-Galactoside

【 0 1 1 0 】

反応試液B

0.1 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.0)  
1.2 mM thio-NAD  
3.6 mM NADH  
40 U/ml 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

【 0 1 1 1 】

試料

1、4、10、40、100、200 pg/ml 5 $\alpha$ -Galactosidase (最終濃度 0.5、2、5、20、50、100 pg/ml)

【 0 1 1 2 】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 (5 $\alpha$ -Galactosidase) を0~200 pg/mlの範囲で含有するリン酸緩衝溶液 (pH 7.3) を25  $\mu$ l添加し、続いてそのウェルに反応試液Aを25  $\mu$ lずつ添加して混合し、37 $^\circ\text{C}$  で60分間インキュベートした。次に反応試液Bを50  $\mu$ lずつ各ウェルに添加し、37 $^\circ\text{C}$  で加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図11に示す。

【 0 1 1 3 】

<参考例 b> 5 $\alpha$ -Androsterone -D-Galactosideを用いた1ステップ法による 5 $\alpha$ -Galactosidaseの測定

【 0 1 1 4 】

反応試液

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.7)  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
6 mM thio-NAD  
1 mM NADH  
0.1 mM 5 $\alpha$ -Androsterone -D-Galactoside  
40 U/ml 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

【 0 1 1 5 】

試料

10

20

30

40

50

5、10、25、50、100、250 pg/ml  $\beta$ -Galactosidase (最終濃度 2.5、5、12.5、25、50、125 pg/ml)

【0116】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 ( $\beta$ -Galactosidase) を0~250 pg/mlの範囲で含有するリン酸緩衝溶液 (pH 7.7) を50  $\mu$ l 添加し、続いてそのウェルに反応試液Bを50  $\mu$ l ずつ各ウェルに添加し、37  $^{\circ}$ C で加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して120分間吸光度を測定した。120分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図12に示す。

10

【0117】

<参考例c> 5  $\beta$ -Androsterone  $\beta$ -D-Galactosideを用いた2ステップ法による  $\beta$ -Galactosidaseの測定

【0118】

反応試液A

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.1 mM 5  $\beta$ -Androsterone  $\beta$ -D-Galactoside

【0119】

反応試液B

0.1 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.0)  
4.8 mM thio-NAD  
0.4 mM NADH  
40 U/ml 3  $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

20

【0120】

試料

1、4、10、40、100、200 pg/ml  $\beta$ -Galactosidase (最終濃度 0.5、2、5、20、50、100 pg/ml)

【0121】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 ( $\beta$ -Galactosidase) を0~200 pg/mlの範囲で含有するリン酸緩衝溶液 (pH 7.5) を25  $\mu$ l 添加し、続いてそのウェルに反応試液Aを25  $\mu$ l ずつ添加して混合し、37  $^{\circ}$ C で60分間インキュベートした。次に反応試液Bを50  $\mu$ l ずつ各ウェルに添加し、37  $^{\circ}$ C で加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図13に示す。

30

【0122】

<実施例8> 3  $\beta$ -Hydroxy-17  $\beta$ -methoxy-5  $\alpha$ -Androstane  $\beta$ -D-Galactosideを用いた1ステップ法による  $\beta$ -Galactosidaseの測定

40

【0123】

3  $\beta$ -Hydroxy-17  $\beta$ -methoxy-5  $\alpha$ -Androstane  $\beta$ -D-Galactoside(正式名: 3  $\beta$ -Hydroxy-17  $\beta$ -methoxy-5  $\alpha$ -Androstane 3- $\beta$ -D-galactopyranoside)の合成方法

3  $\beta$ -Hydroxy-17  $\beta$ -methoxy-5  $\alpha$ -Androstane (306mg)のジクロロメタン溶液(15 mL)に、MS4A (1.25 g)、Phenyl 2,3,4,6-O-tetrabenzoyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (1.03 g)を加えて -20  $^{\circ}$ C で15分間攪拌した。次いで、N-ヨードスクシンイミド(435mg)、トリフルオロメタンスルホン酸 (15mg)を加え -20  $^{\circ}$ C で2時間攪拌した後、室温にてさらに2時間反応した。反応液にトリエチルアミン250  $\mu$ lを添加し反応を停止し、反応液を飽和炭酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムの3:1の混液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をメタノール(15 mL)に溶解

50

し、28% ナトリウムメトキシド(500 μL)を加え2時間攪拌した。反応液に酢酸を加えて中和した後、減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(24×240 mm, 10%メタノール-クロロホルム)にて精製後、アセトン-ヘキサンで再結晶し無色結晶(383mg)を得た。

## 【0124】

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>) = 0.73 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0.95 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3.26 (t, 1H, J=8.6 Hz, 17-H), 3.32 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.45-3.51 (bm, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.71 (s, 1H, H-6' a), 3.73 (d, 1H, H-6' b), 3.74 (m, 1H, 3-H), 3.81 (d, 1H, H-4'), 4.33 (d, 1H, H-1', J<sub>1,2</sub> = 7.5 Hz)

ESI-HR-MS Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub>-H: m/z 467.3014 [M-H]<sup>-</sup>. Found m/z 451.3026

m.p. 197-199

10

## 【0125】

反応試液

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.5)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

6 mM thio-NAD

1 mM NADH

0.2 mM 3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactoside

20 U/ml 3-Hydroxysteroid dehydrogenase

## 【0126】

20

試料

5、10、25、50、100、250 pg/ml 3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactosidase (最終濃度 2.5、5、12.5、25、50、125 pg/ml)

## 【0127】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質(3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactosidase)を0~250 pg/mlの範囲で含有するリン酸緩衝溶液(pH 8.5)を50 μl添加し、続いてそのウェルに反応試液Bを50 μlずつ各ウェルに添加し、37℃で加温しながらマイクロプレートリーダー(コロナ社製MT-500)で405 nmのフィルターを使用して120分間吸光度を測定した。120分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図14に示す。

30

## 【0128】

<実施例9> 3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactosideを用いた2ステップ法による3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactosidaseの測定

## 【0129】

反応試液A

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)

4 mM MgCl<sub>2</sub>

0.1 mM 3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactoside

## 【0130】

40

反応試液B

0.1 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.8)

1.2 mM thio-NAD

1 mM NADH

40 U/ml 3-Hydroxysteroid dehydrogenase

## 【0131】

試料

1、4、10、40、100、200 pg/ml 3-Hydroxy-17-methoxy-5-Androstane-3-O-β-D-Galactosidase (最終濃度 0.5、2、5、20、50、100 pg/ml)

## 【0132】

50

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質（ $\beta$ -Galactosidase）を0～200 pg/mlの範囲で含有するリン酸緩衝溶液（pH 7.5）を25  $\mu$ l添加し、続いてそのウェルに反応試液Aを25  $\mu$ lずつ添加して混合し、37℃で60分間インキュベートした。次に反応試液Bを50  $\mu$ lずつ各ウェルに添加し、37℃で加温しながらマイクロプレートリーダー（コロナ社製MTP-500）で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図15に示す。

## 【0133】

Androsterone  $\beta$ -D-Galactosideを用いたPumilioの測定の実施例を以下に示す。但し、抗原に特異的反応性をもつ抗体に直接  $\beta$ -Galactosidaseを標識したものがいないため、Labeled StreptAvidin-Biotin (LSAB) 法を試している。

10

## 【0134】

## 参考例6

ビオチン標識抗体の作製

参考例1のように得たF(ab')<sub>2</sub>を50  $\mu$ g用いてbiotin-labeling-kit（同仁化学）によりビオチン標識抗体を作製した。

## 【0135】

<実施例 10>  $\beta$ -Androsterone  $\beta$ -D-Galactosideを用いた1ステップ法によるPumilio（プミリオ）の測定

20

## 【0136】

反応試液

- 0.1 Mリン酸緩衝液（pH 7.7）
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1.2 mM thio-NAD
- 0.8 mM NADH
- 0.05 mM  $\beta$ -Androstane  $\beta$ -D-Galactoside
- 20 U/ml  $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

## 【0137】

試料

- 0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5 ng/ml Pumilio

30

## 【0138】

測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio（標準物質）を0～2.5 ng/mlの範囲で含有する、0.1% BSA含有TBS（pH 7.5）溶液を50  $\mu$ l添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS（pH 7.5）で洗浄し、参考例6の方法で作製したビオチン標識抗Pumilioモノクローナル抗体をおよそ0.1  $\mu$ g/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS（pH 7.5）溶液を50  $\mu$ l加え、室温で1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS（pH 7.5）で洗浄し、 $\beta$ -Galactosidase標識ストレプトアビジン（Roche社）を0.1 U conjugate/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS（pH 7.5）溶液を50  $\mu$ l添加し、室温で30分間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS（pH 7.5）で洗浄し、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液を50  $\mu$ lずつ添加し、37℃で加温しながらマイクロプレートリーダー（コロナ社製MTP-500）で405 nmのフィルターを使用して60分間吸光度を測定した。60分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図16に示す。

40

## 【0139】

<参考例 d>  $\beta$ -Androsterone  $\beta$ -D-Galactosideを用いた2ステップ法によるPumilio（プミリオ）の測定

50

## 【 0 1 4 0 】

反応試液A

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)  
 0.1mM MgCl<sub>2</sub>  
 0.05 mM 5 $\beta$ -Androsterone -D-Galactoside

## 【 0 1 4 1 】

反応試液B

0.1 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.0)  
 3 mM thio-NAD  
 2 mM NADH  
 40 U/ml 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

10

## 【 0 1 4 2 】

試料

0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 ng/ml Pumilio

## 【 0 1 4 3 】

測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioホルモトポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~5 ng/mlの範囲で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l 添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例6の方法で作製した

20

ピオチン標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体をおよそ0.1  $\mu$ g/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l 加え、室温で1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、 $\beta$ -Galactosidase 標識ストレプトアビジン (Roche社) を0.1 U conjugate/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l 添加し、室温で30分間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液Aを50  $\mu$ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。続いてそのウェルに反応試液Bを50  $\mu$ l 添加し、37 $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性の

30

よい直線を図17に示す。

## 【 0 1 4 4 】

<実施例 12> 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane -D-Galactosideを用いた1ステップ法によるPumilio (プミリオ) の測定

## 【 0 1 4 5 】

反応試液

0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 8.5)  
 1.2 mM thio-NAD  
 0.8 mM NADH  
 0.05 mM 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane -D-Galactoside  
 20 U/ml 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

40

## 【 0 1 4 6 】

試料

0.1、0.5、1、2.5、5、10 ng/ml Pumilio

## 【 0 1 4 7 】

測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioホルモトポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~10 ng/mlの範囲で含有する、0.1% BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50  $\mu$ l 添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例6の方法で作製し

50

たビオチン標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体をおよそ0.1 µg/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl加え、室温で1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、 $\beta$ -Galactosidase 標識ストレプトアビジン (Roche社) を0.1 U conjugate/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl添加し、室温で30分間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液を50 µlずつ添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して60分間吸光度を測定した。60分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図18に示す。

10

## 【0148】

<実施例13> 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane-3-one-D-Galactosideを用いた2ステップ法によるPumilio (プミリオ) の測定

## 【0149】

反応試液A

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)

0.05 mM 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -methoxy-5 $\alpha$ -Androstane-3-one-D-Galactoside

## 【0150】

反応試液B

0.1 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.0)

2.4 mM thio-NAD

2 mM NADH

40 U/ml 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

20

## 【0151】

試料

0.25、0.5、1、2.5、5、10 ng/ml Pumilio

## 【0152】

測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~10 ng/mlの範囲で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例6の方法で作製したビオチン標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体をおよそ0.3 µg/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl加え、室温で1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、 $\beta$ -Galactosidase標識ストレプトアビジン (Roche社) を0.1 U conjugate/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl添加し、室温で30分間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5 % Triton X-100含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、さらにTBSで洗浄した。次に各ウェルに反応試液Aを50 µlずつ添加し、37 °Cで60分間インキュベートした。続いてそのウェルに反応試液Bを50 µl添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図19に示す。

30

40

## 【0153】

<参考例7> p-Nitrophenyl phosphate (p-NPP) を用いたPumilio (プミリオ) の測定

## 【0154】

反応試液

0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.3)

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM ZnCl<sub>2</sub>

50

1 mg/ml p-NPP

【 0 1 5 5 】

測定試料

0、1、2.5、5、10、25 ng/ml Pumilio

【 0 1 5 6 】

測定方法

参考例3の方法で調製した抗Pumilioモルモットポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio (標準物質) を0~25 ng/mlの範囲で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl添加し、室温で1時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.05 % Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、参考例1の方法で作製したA  
LP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体を1 µg/mlの濃度で含有する、0.1 % BSA含有TBS (pH 7.5) 溶液を50 µl加え、1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.05 % Tween 20含有TBS (pH 7.5) で洗浄し、各ウェルに反応試液を100 µl添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405 nmのフィルターを使用して30分間吸光度を測定した。30分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図20に示す。

10

【 0 1 5 7 】

<参考例8> o-Nitrophenyl -D-Galactopyranoside (ONPG) を用いた -Galactosidase の測定

【 0 1 5 8 】

反応試液

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3)

0.2 mM 2-mercaptoethanol

1 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM ONPG

【 0 1 5 9 】

測定試料

2、10、20、50 ng/ml -Galactosidase (最終濃度 1、5、10、25 ng/ml)

【 0 1 6 0 】

測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 (-Galactosidase) を0~25 ng/mlの範囲で含有するリン酸緩衝液 (pH 7.3) を50 µl添加し、続いてそのウェルに反応試液を50 µlずつ各ウェルに添加し、37 °Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で415 nmのフィルターを使用して60分間吸光度を測定した。60分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性のよい直線を図21に示す。

30

【 0 1 6 1 】

検出限界および定量限界の算出方法

各測定結果の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットし、直線上に並ぶ濃度のみを抽出して近似曲線を作成する。次にブランク (標準物質を含まない; n = 3) の標準偏差を算出し、その3倍値および10倍値を近似曲線の傾きで割り、得られる数値をそれぞれ検出限界および定量限界とする。

40

各実験結果より算出した検出限界および定量限界を表3、4、5にまとめた。

【 0 1 6 2 】

【表 3】

Alkaline phosphatase および  $\beta$ -Galactosidase の検出限界および定量限界

ALP および $\beta$ -Gal 活性測定 (単位は mol)				
酵素	基質	方法	検出限界	定量限界
ALP	17-OMe 5 $\beta$ -A3P	1ステップ法	$3.25 \times 10^{-18}$	$1.08 \times 10^{-17}$
		2ステップ法	$8.19 \times 10^{-20}$	$2.73 \times 10^{-19}$
$\beta$ -Gal	5 $\alpha$ -AG	2ステップ法	$3.89 \times 10^{-19}$	$1.3 \times 10^{-18}$
	5 $\beta$ -AG	1ステップ法	$3.31 \times 10^{-19}$	$1.1 \times 10^{-18}$
		2ステップ法	$7.48 \times 10^{-20}$	$2.49 \times 10^{-19}$
	17-OMe 5 $\beta$ -AG	1ステップ法	$3.21 \times 10^{-19}$	$1.07 \times 10^{-18}$
		2ステップ法	$1.09 \times 10^{-19}$	$3.64 \times 10^{-19}$
	ONPG			$4.5 \times 10^{-17}$
4-MUG			$9.76 \times 10^{-18}$	$3.25 \times 10^{-17}$

10

【表 4】

Pumilio タンパク質の検出限界および定量限界 ( $\beta$ -Galactosidase の系)  
ELISA 測定 (単位は mol)

		検出限界	定量限界
5 $\beta$ -AG	連続法	$2.21 \times 10^{-17}$	$7.35 \times 10^{-17}$
	二段階法	$1.65 \times 10^{-17}$	$5.51 \times 10^{-17}$
17-OMe 5 $\beta$ -AG	連続法	$3.24 \times 10^{-17}$	$1.08 \times 10^{-16}$
	二段階法	$3.17 \times 10^{-17}$	$1.06 \times 10^{-16}$
4-MUG		$2.07 \times 10^{-16}$	$6.91 \times 10^{-16}$

20

30

【表 5】

Pumilio タンパク質の検出限界および定量限界 (Alkaline phosphatase の系)

ELISA 測定			
基質		検出限界	定量限界
5 $\alpha$ -A3P	1ステップ法	$3.57 \times 10^{-14}$	$7.3 \times 10^{-14}$
	2ステップ法	$2.63 \times 10^{-16}$	$8.76 \times 10^{-16}$
5 $\beta$ -A3P	1ステップ法	$3.96 \times 10^{-15}$	$1.32 \times 10^{-14}$
	2ステップ法	$1.2 \times 10^{-16}$	$4 \times 10^{-16}$
17-OMe 5 $\beta$ -A3P	1ステップ法	$4.0 \times 10^{-17}$	$1.3 \times 10^{-16}$
	2ステップ法	$2.45 \times 10^{-18}$	$8.17 \times 10^{-18}$
<i>p</i> -NPP		$3.97 \times 10^{-16}$	$1.32 \times 10^{-15}$

40

【 0 1 6 3 】

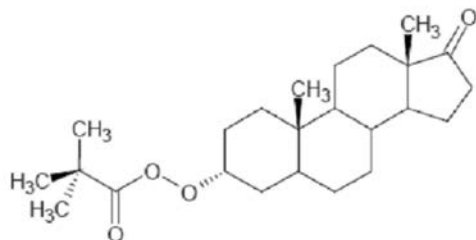
&lt; 参考例 e &gt;

50

### 3-*tert*-butyl-peroxy-5 $\beta$ -Androsteroneを用いた1ステップ法によるHorseradish peroxidaseの測定

#### 【化15】

#### 3 $\alpha$ -*tert*-butyl-peroxy-5 $\beta$ -Androsterone



10

#### 【0164】

#### 3-*tert*-butyl-peroxy-5 $\beta$ -Androsteroneの合成方法

3-chloro-5 $\beta$ -Androsterone (100mg) をジクロロメタン溶液 (15mL) に溶解させ、反応試液を調製した。本溶液に対し、20%の水酸化ナトリウム水溶液 (15mL) に *tert*-butylhydroperoxide (30mg) を溶解した溶液を加え、室温にて2時間攪拌させて反応させた。反応液から有機層を回収し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (24×240 mm, 10%メタノール-クロロホルム) にて精製後、本化合物8

20

8mgを得た。本化合物の同定は、<sup>1</sup>H-NMR、ESI-HR-MS およびm.p.(融点)により行った。

#### 【0165】

#### 反応試液

- 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)
- 10mM MgCl<sub>2</sub>
- 6mM thio-NAD
- 1mM NADH
- 0.1mM 3-*tert*-butyl-peroxy-5 $\beta$ -Androsterone
- 40U/ml 3-Hydroxysteroid dehydrogenase

30

#### 試料

5、10、25、50、100、250 pg/ml Horseradish peroxidase (最終濃度 2.5、5、12.5、25、50、125pg/ml)

#### 【0166】

#### 測定方法

平底のマイクロプレートウェルに標準物質 (Horseradish peroxidase) (以下HRPと称する。) を0~250pg/mlの範囲で含有するリン酸緩衝液 (pH7.0) を50 $\mu$ l添加し、続いてそのウェルに反応試液を50 $\mu$ lずつ各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで加温しながらマイクロプレートリーダー (コロナ社製MTP-500) で405nmのフィルターを使用して120分間吸光度を測定した。120分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性の良い直線を図22に示す。

40

#### 【0167】

#### <参考例 f>

#### 3-*tert*-butyl-peroxy-5 $\beta$ -Androsteroneを用いた1ステップ法によるPumilio (プミリオ) の測定

#### 反応試液

- 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)
- 10mM MgCl<sub>2</sub>

50

6mM thio-NAD  
 1mM NADH  
 0.1mM 3-tert-butyl-peroxy-5-Androsterone  
 40U/ml 3-Hydroxysteroid dehydrogenase

#### 試料

0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5 ng/ml Pumilio

【0168】

#### 測定方法

参考例5の方法で調製した抗Pumilioホルモントポリクローナル抗体を固定化したマイクロプレートに、精製したPumilio（標準物質）を0~2.5ng/mlの範囲で含有する、0.1%BSA含有TBS（pH7.5）溶液を50μl添加し、室温で2時間振とうさせた。次にウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS（pH7.5）で洗浄し、HRP標識抗Pumilioマウスモノクローナル抗体をおよそ0.1μg/mlの濃度で含有する、0.1% BSA含有TBS（pH7.5）溶液を50μl加え、室温で1時間振とうさせた。ウェル内の溶液を吸引除去後、0.5% Triton X-100含有TBS（pH7.5）で洗浄した。次に各ウェルに反応試液を50μlずつ添加し、37℃で加温しながらマイクロプレートリーダー（コロナ社製MTP-500）で405nmのフィルターを使用して60分間吸光度を測定した。60分間の吸光度変化量を標準物質濃度に対してプロットすることにより得られた、濃度依存性の良い直線を図23に示す。

【0169】

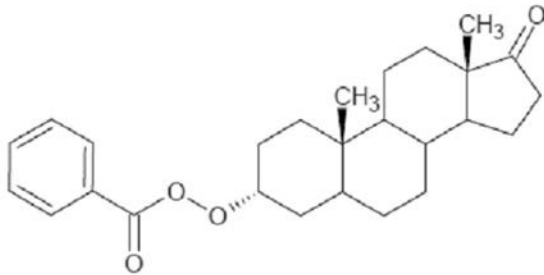
<参考例9>

3-benzoyl-peroxy-5-Androsteroneおよび3-acetyl-peroxy-5-Androsteroneの合成方法

実施例14に示した3-tert-butyl-peroxy-5-Androsteroneの合成方法において、tert-butyl-hydroperoxideをbenzoyl-hydroperoxideまたはacetyl-hydroperoxideに替えた以外は同様にして表題化合物を得た。

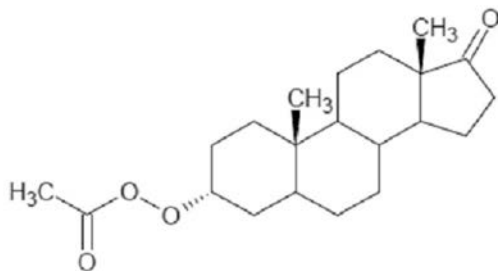
【化16】

### 3α-benzoyl-peroxy-5β-Androsterone



【化17】

### 3α-acetyl-peroxy-5β-Androsterone



【産業上の利用可能性】

【0170】

本発明は、高感度かつ簡便な測定が要求される臨床検査分野や食品検査分野において好

10

20

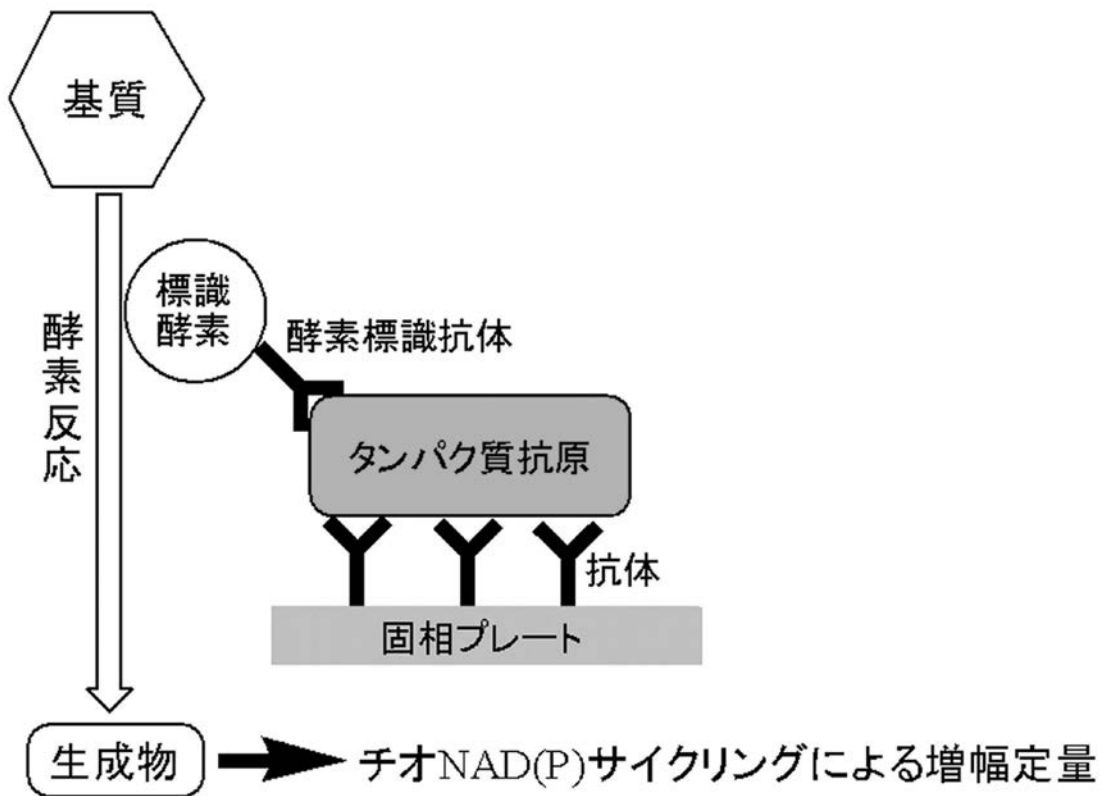
30

40

50

適に利用可能である。

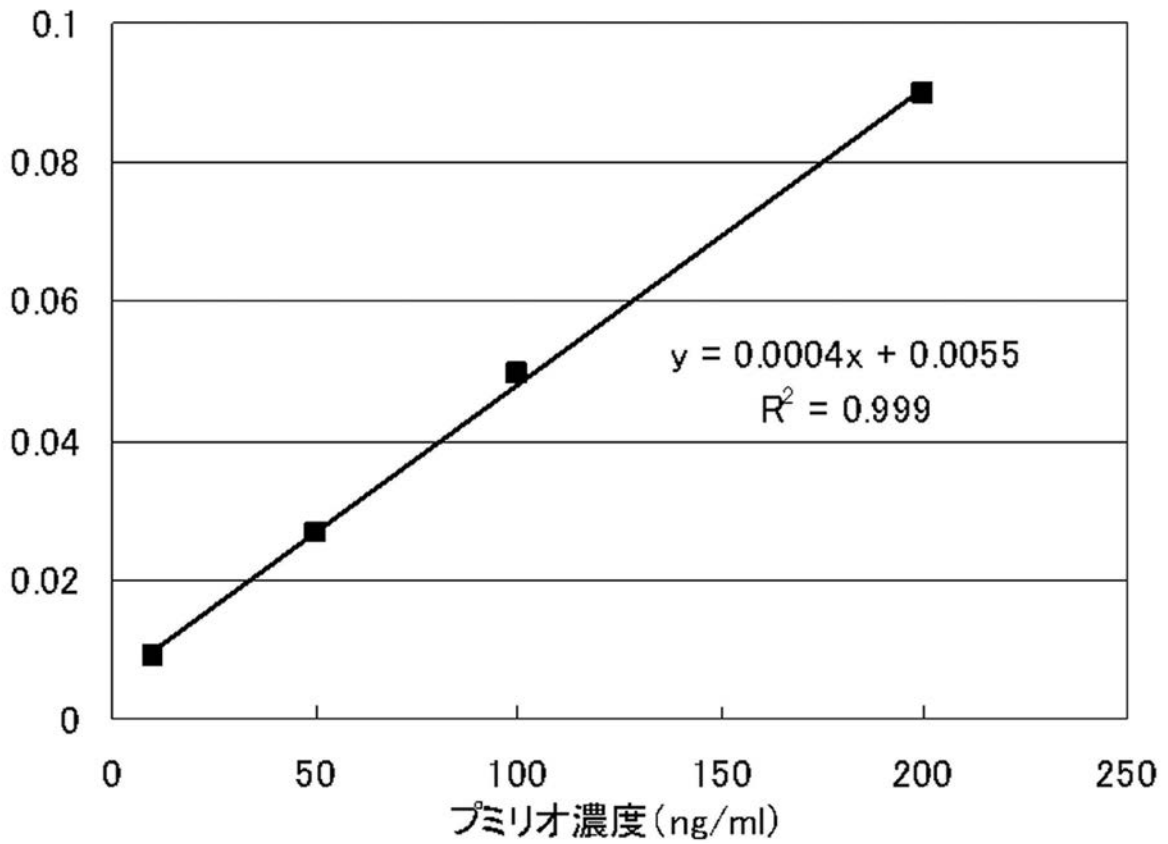
【図1】



【図2】

吸光度変化  
(Abs)

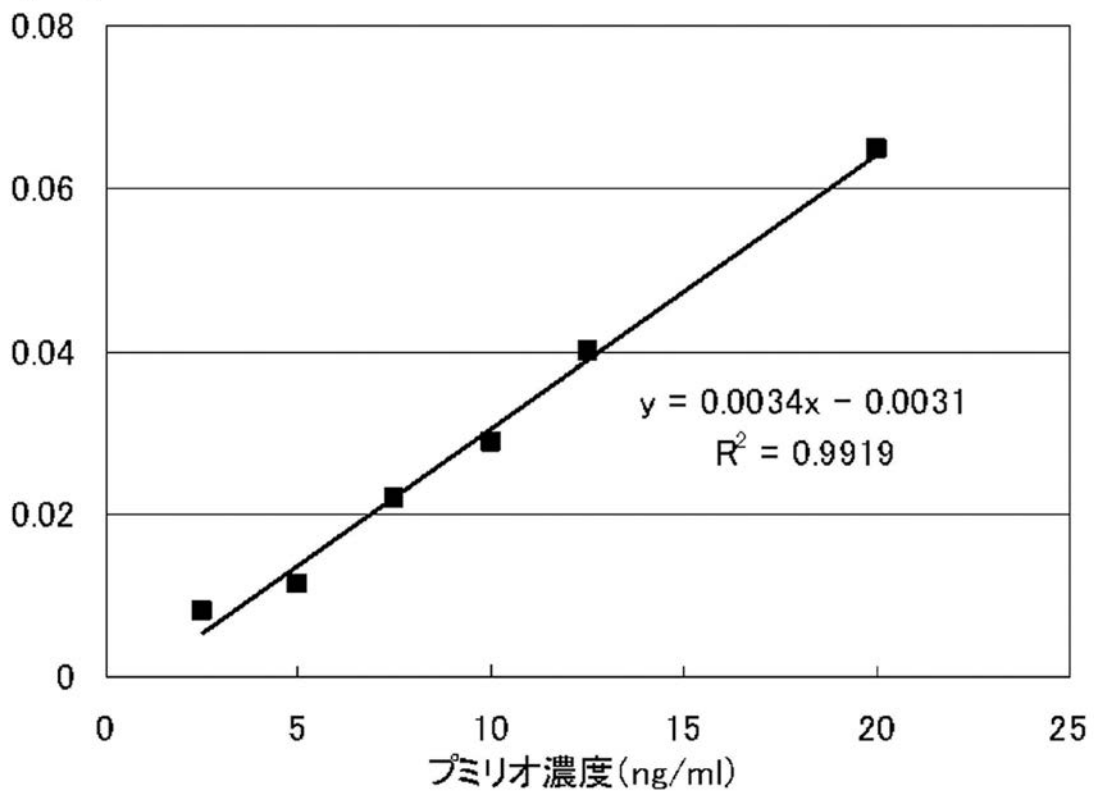
図2



【図3】

吸光度変化  
(Abs)

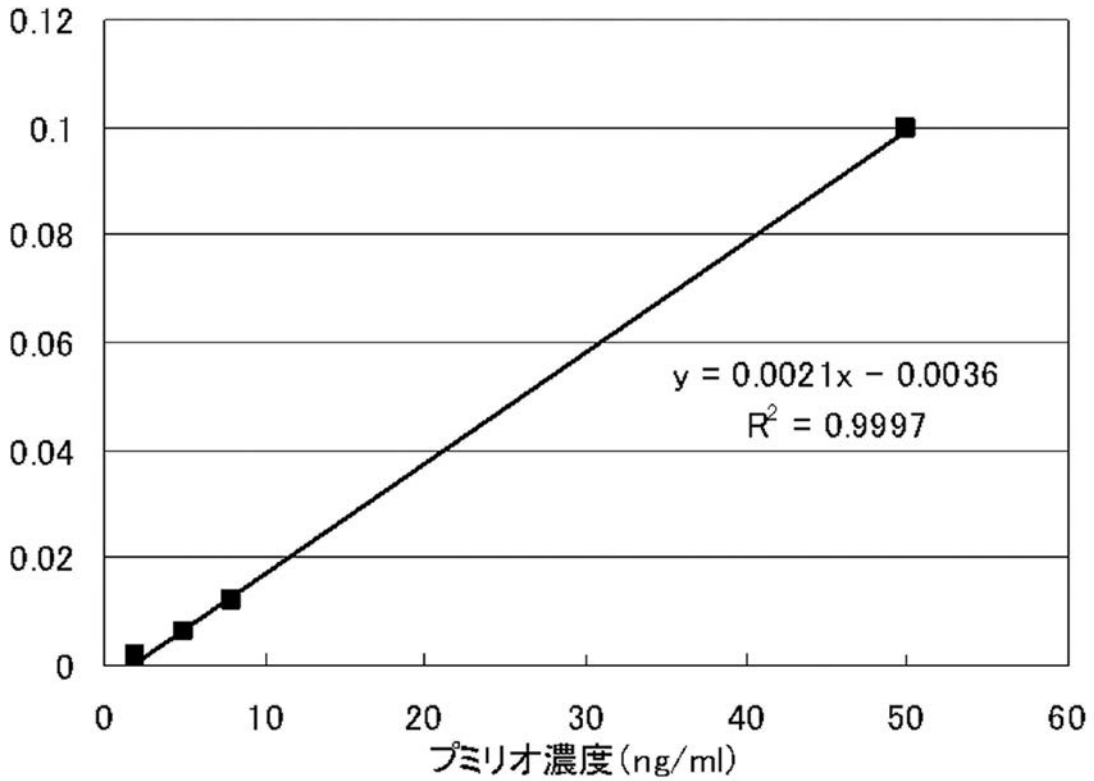
図3



【図4】

吸光度変化  
(Abs)

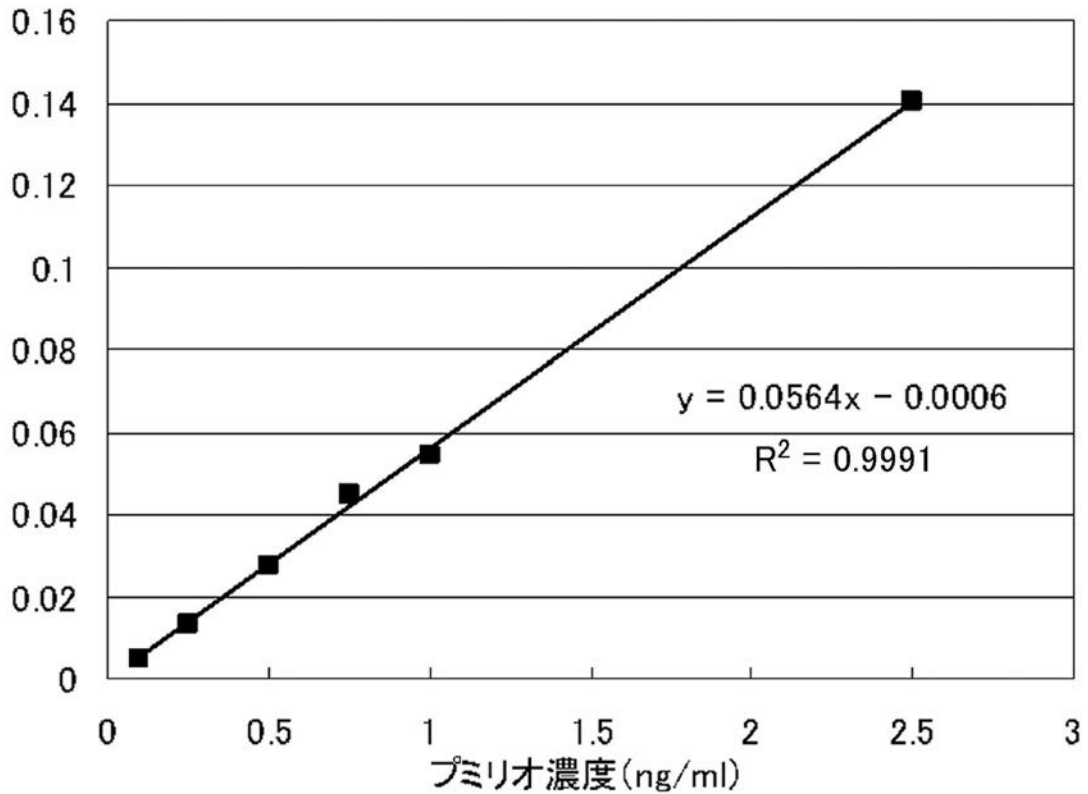
図4



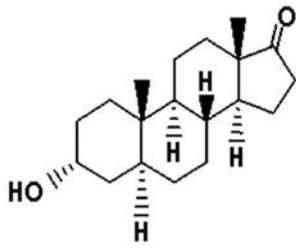
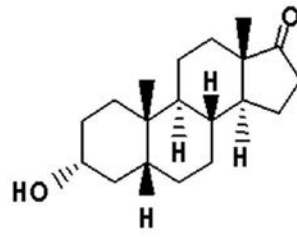
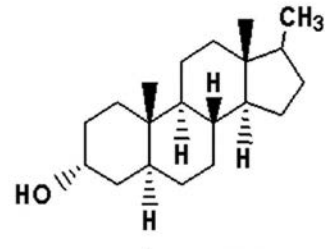
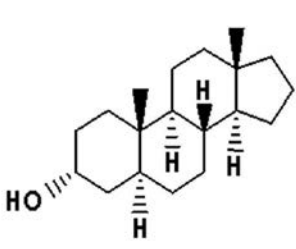
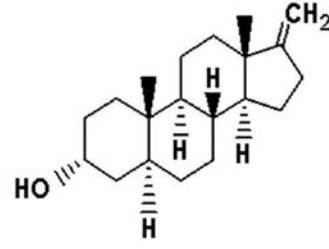
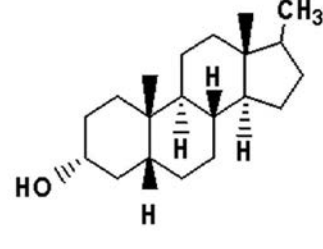
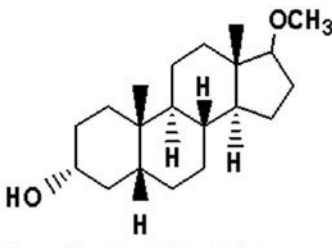
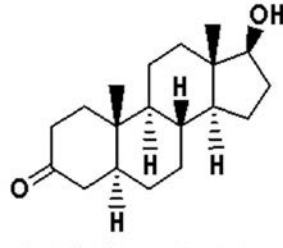
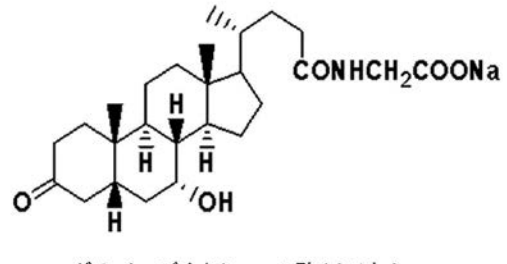
【図5】

吸光度変化  
(Abs)

図5



【 図 6 】

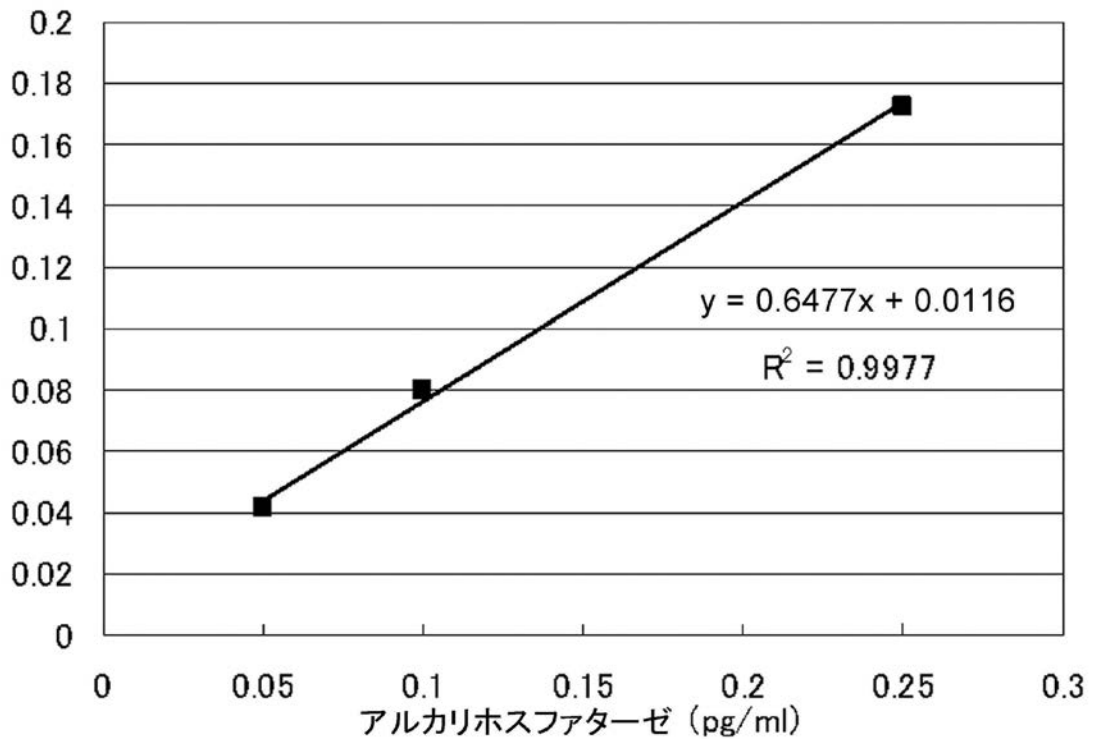
5 $\alpha$ -アンドロステロン5 $\beta$ -アンドロステロン3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メチル-  
5 $\alpha$ -アンドロスタン(5 $\alpha$ -17-CH<sub>3</sub>)3 $\alpha$ -ヒドロキシ-5 $\alpha$ -アンドロスタン  
(5 $\alpha$ -17-dexo)3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17-メチレン-  
5 $\alpha$ -アンドロスタン(5 $\alpha$ -17-CH<sub>2</sub>)3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メチル-  
5 $\beta$ -アンドロスタン(5 $\beta$ -17-CH<sub>3</sub>)3 $\alpha$ -ヒドロキシ-17 $\beta$ -メトキシ-  
5 $\beta$ -アンドロスタン(5 $\beta$ -17-OCH<sub>3</sub>)5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン  
(5 $\alpha$ -DHT)

グリコケノデオキシコール酸ナトリウム

【図7】

吸光度変化  
(Abs)

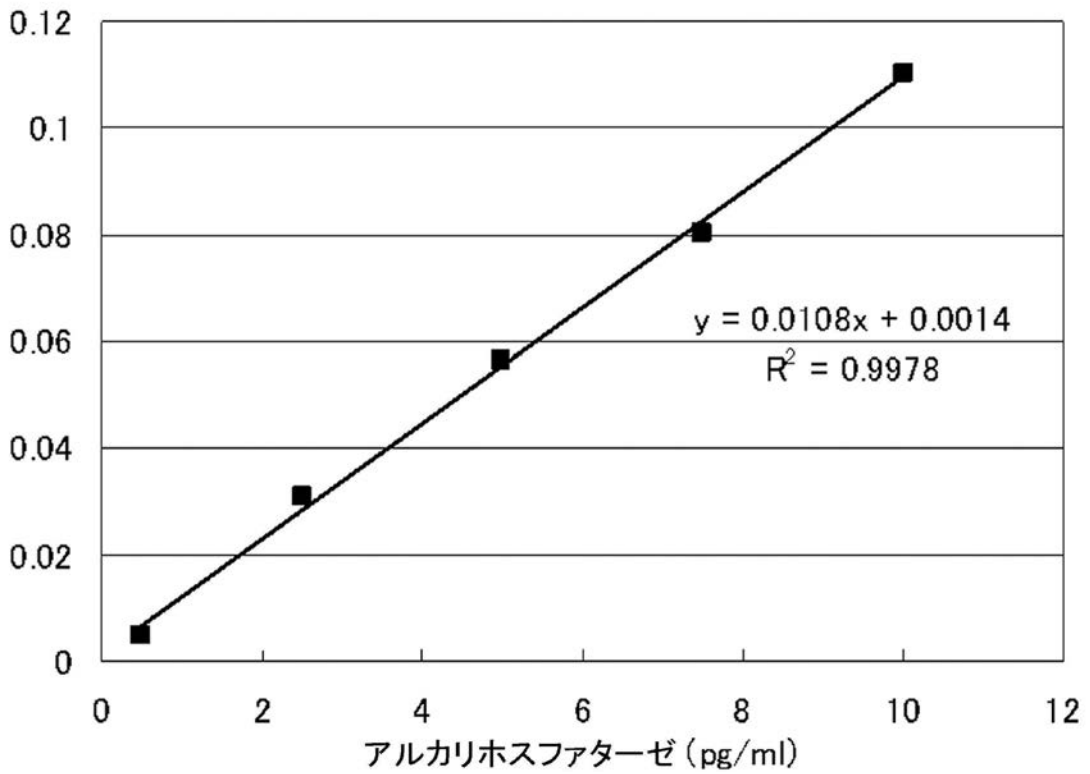
図7



【図8】

吸光度変化  
(Abs)

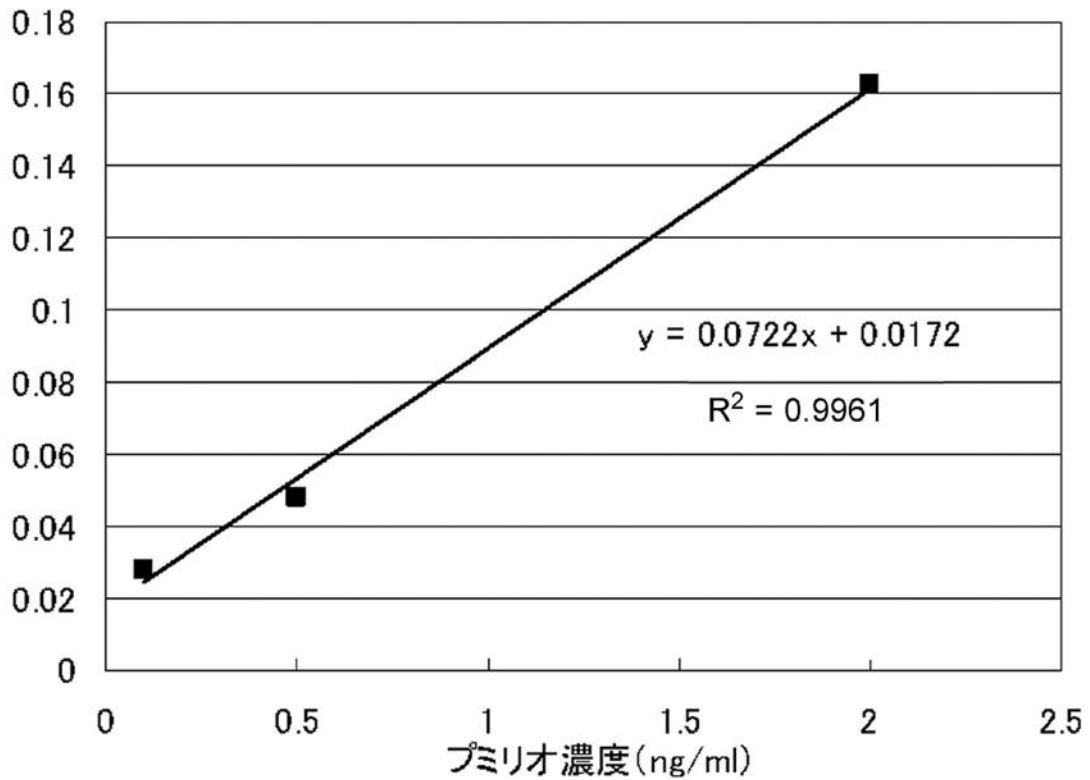
図8



【図9】

吸光度変化  
(Abs)

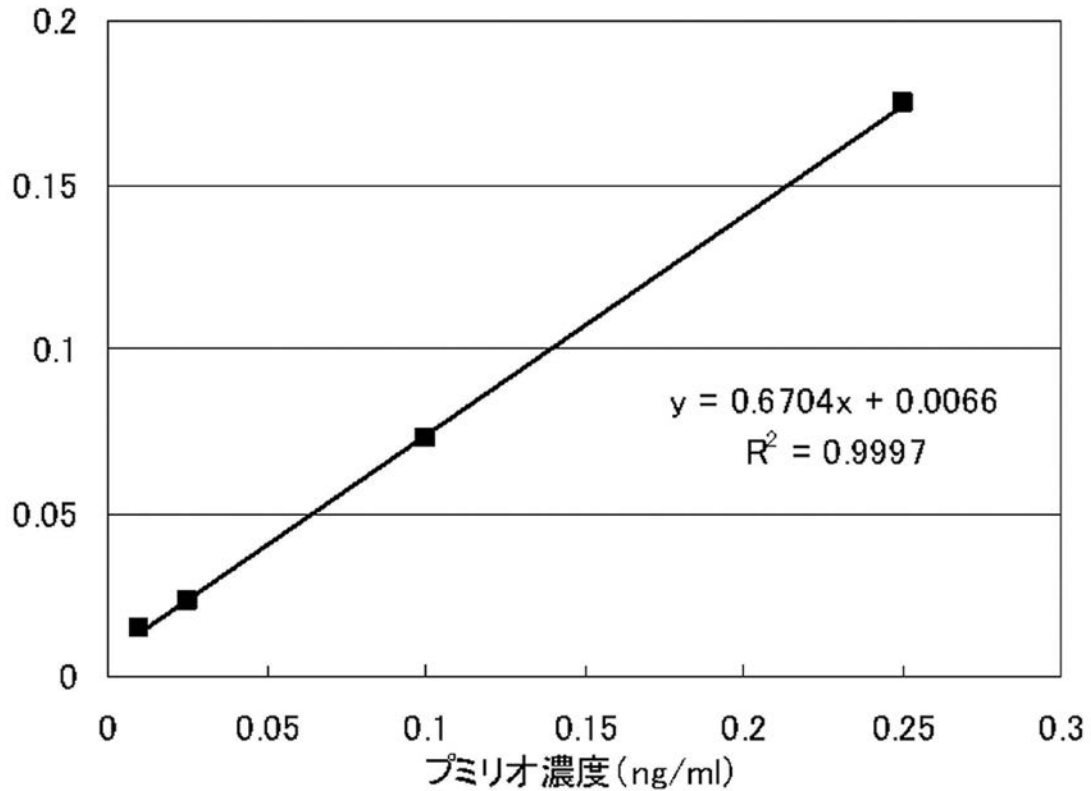
図9



【図10】

吸光度変化  
(Abs)

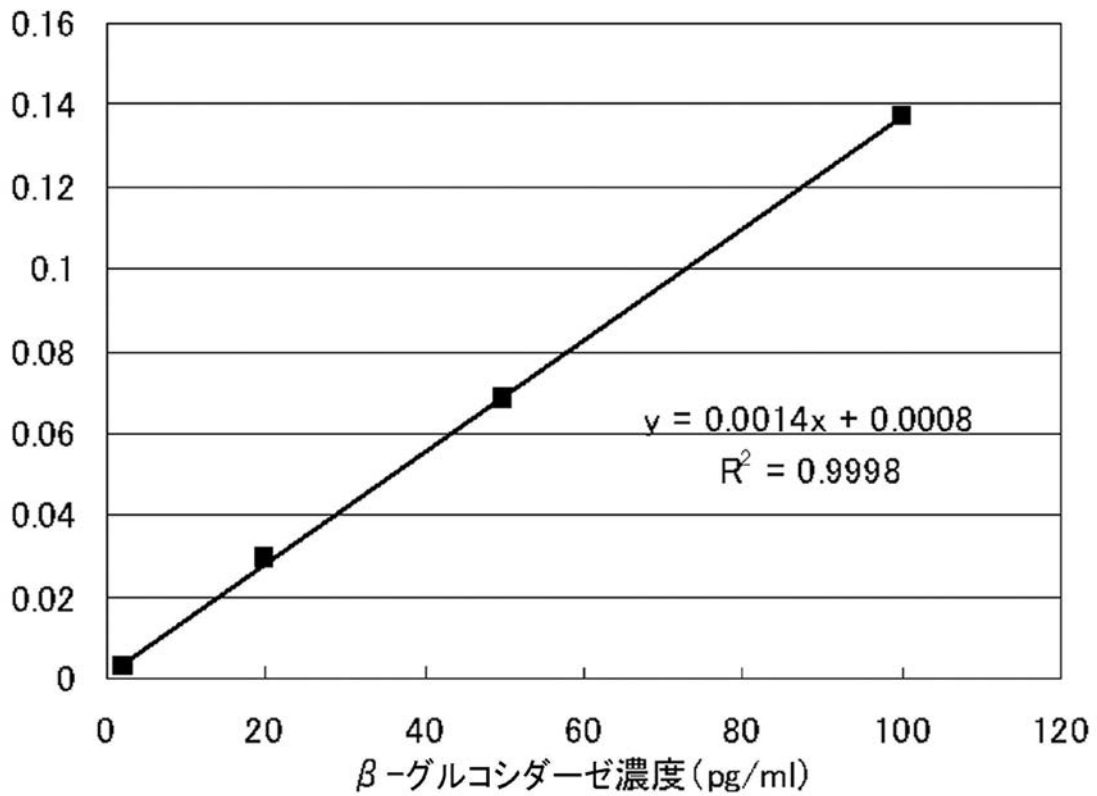
図10



【図11】

吸光度変化  
(Abs)

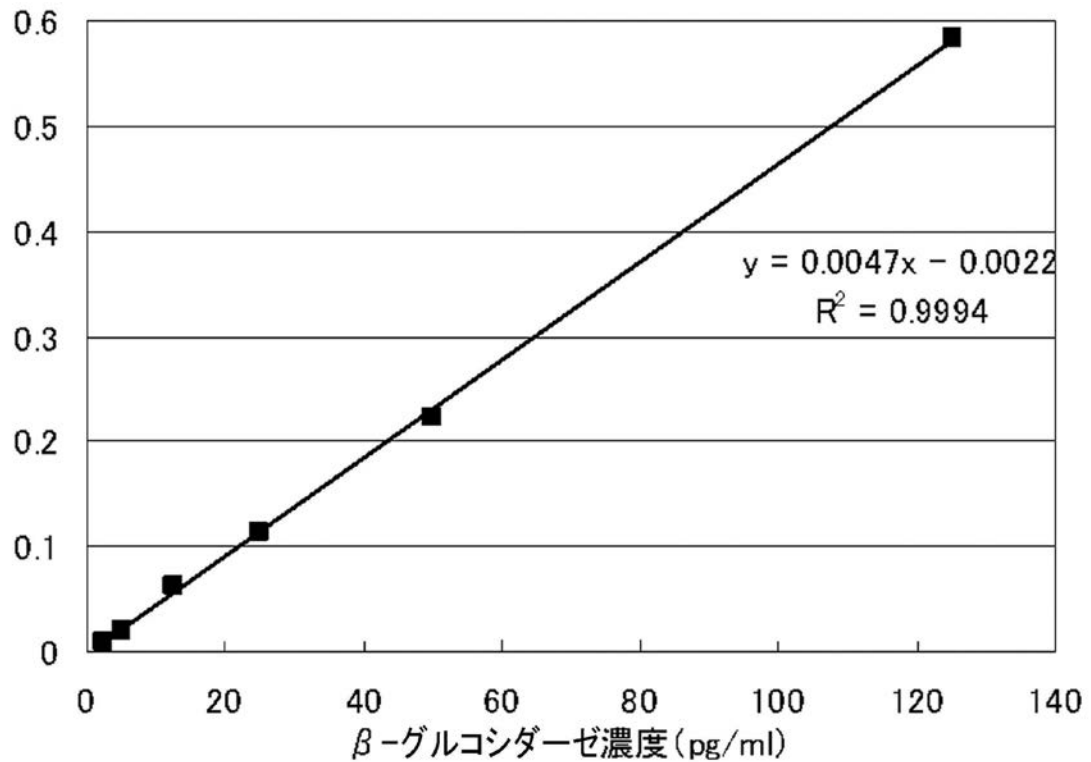
図11



【図12】

吸光度変化  
(Abs)

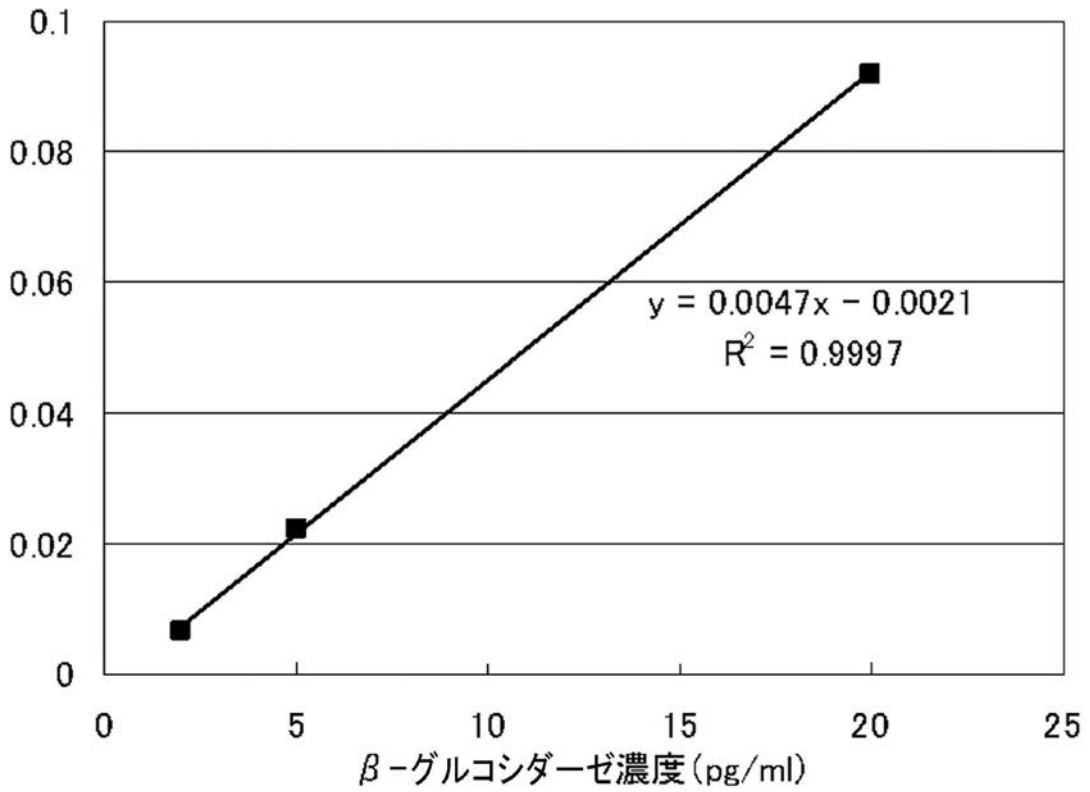
図12



【図13】

吸光度変化  
(Abs)

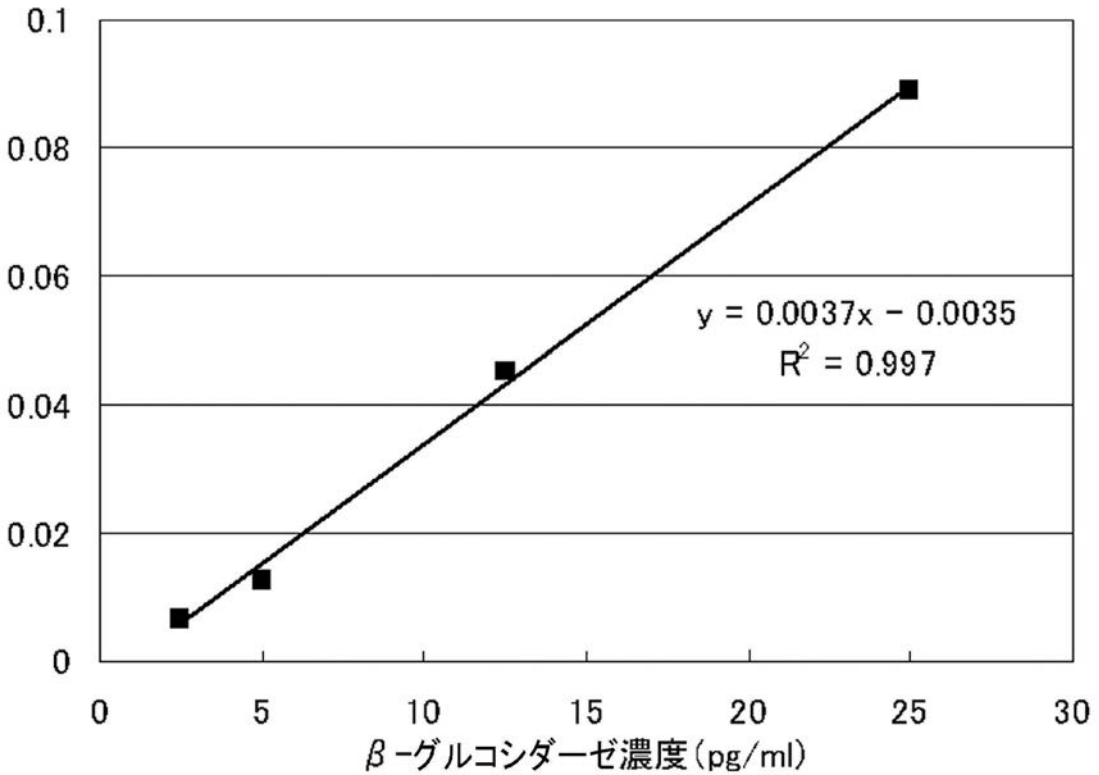
図13



【図14】

吸光度変化  
(Abs)

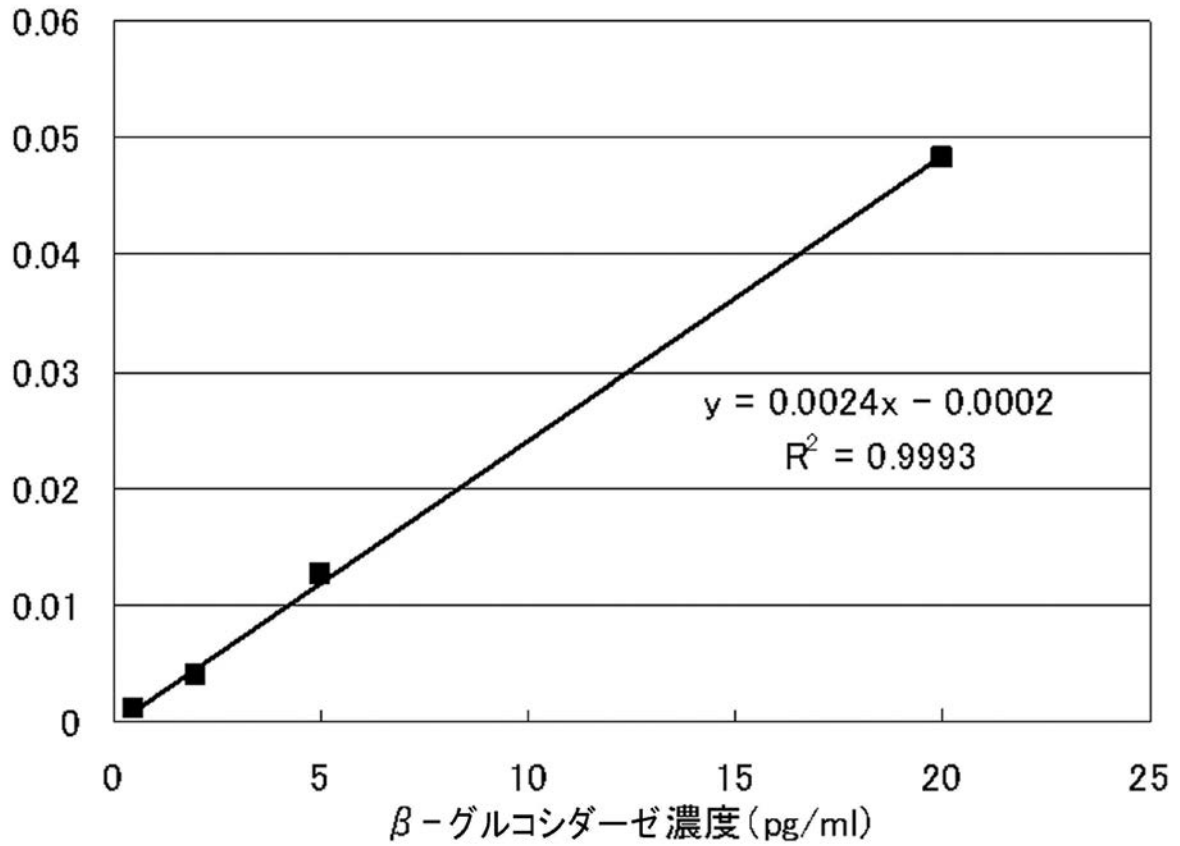
図14



【図15】

吸光度変化  
(Abs)

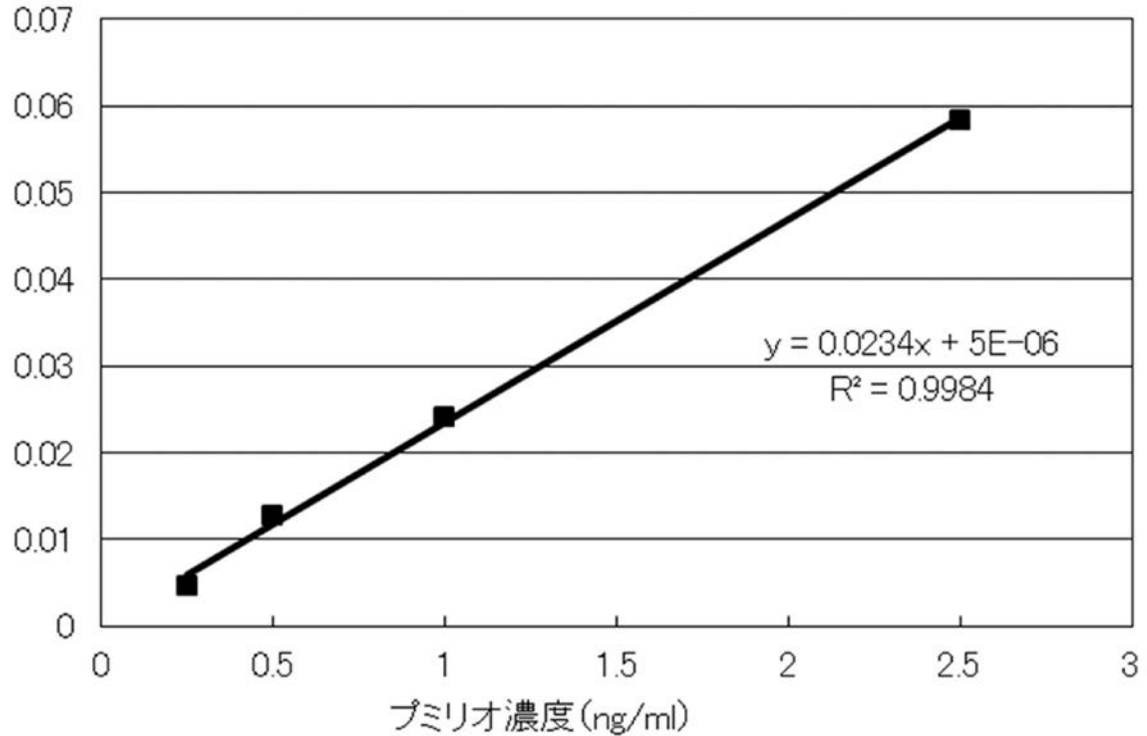
図15



【図16】

吸光度変化  
(Abs)

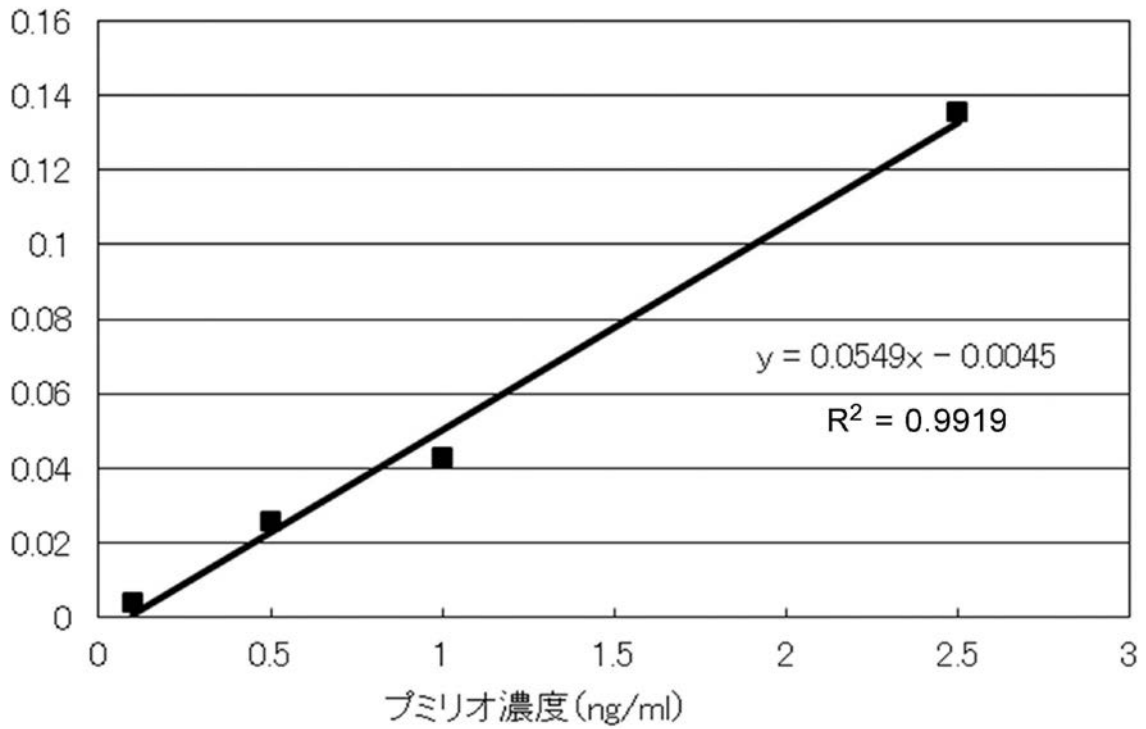
図16



【図17】

吸光度変化  
(Abs)

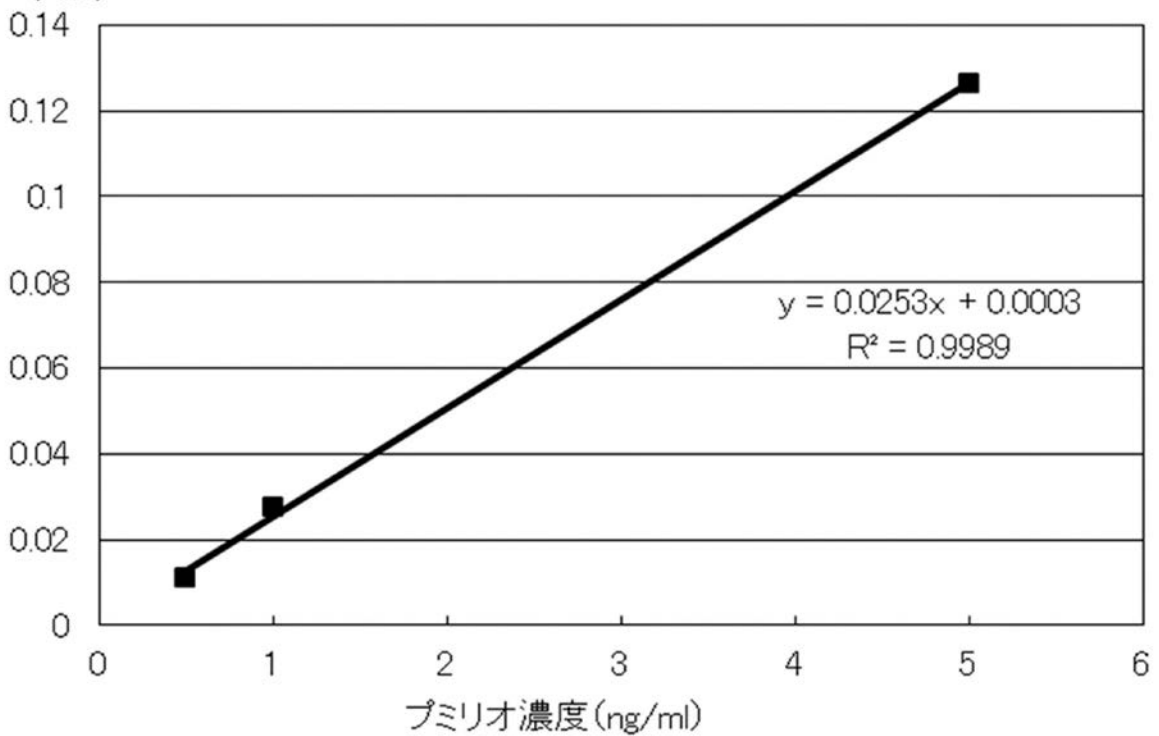
図17



【図18】

吸光度変化  
(Abs)

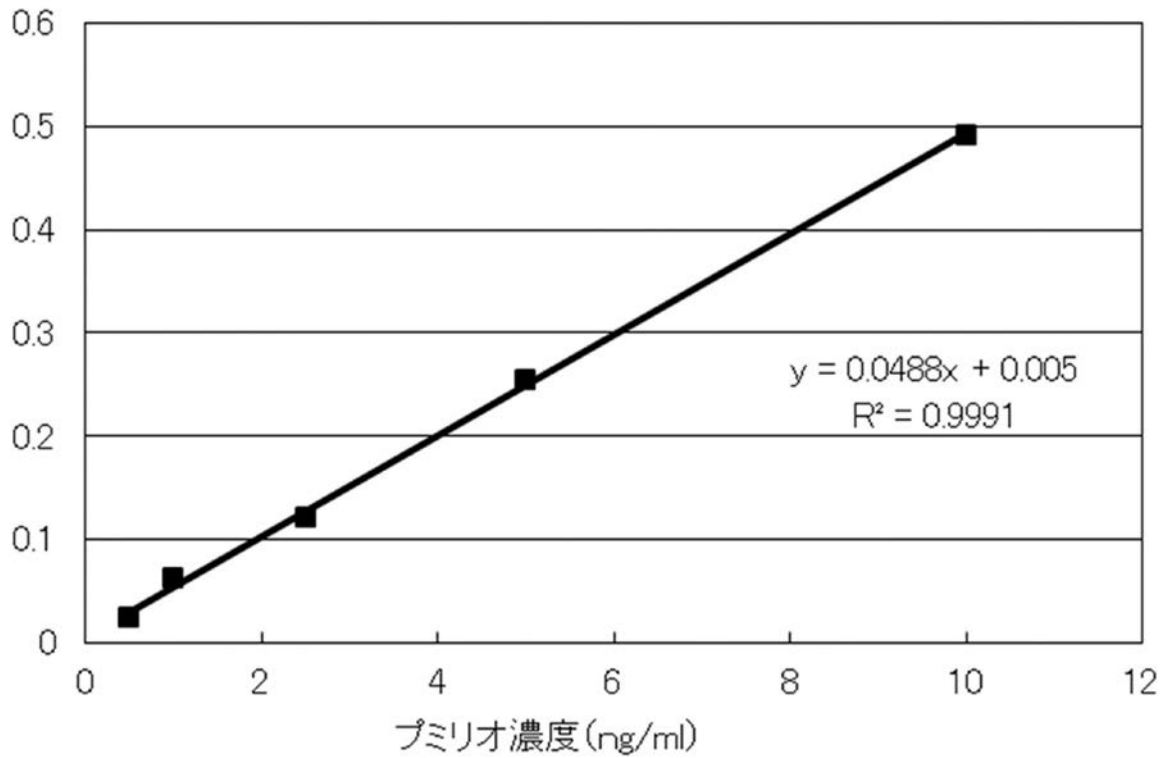
図18



【図19】

吸光度変化  
(Abs)

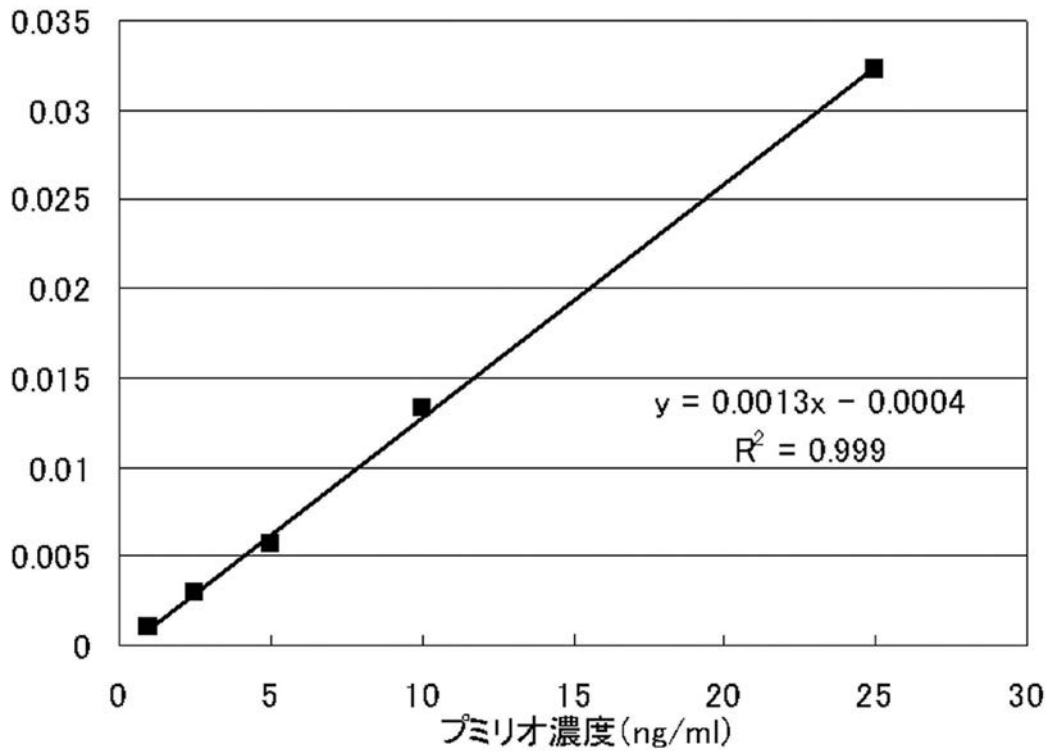
図19



【図20】

吸光度変化  
(Abs)

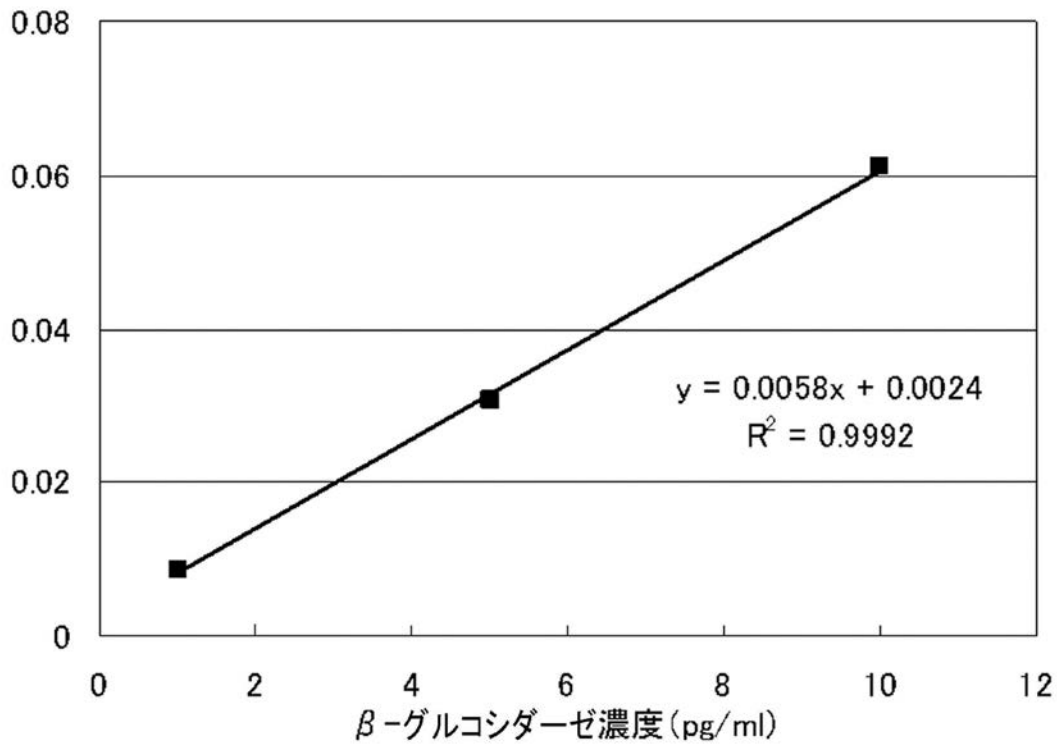
図20



【図21】

吸光度変化  
(Abs)

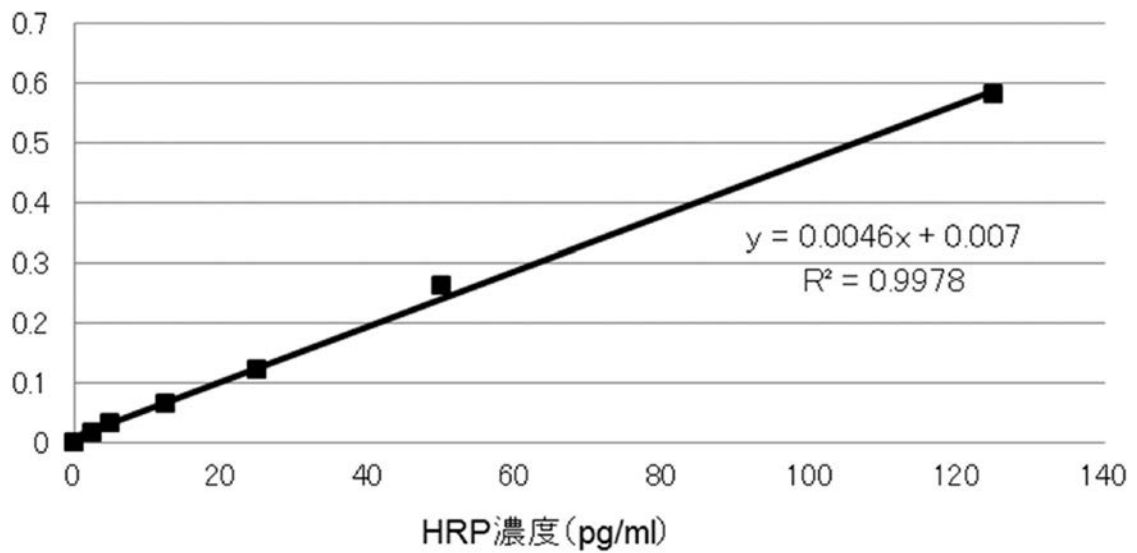
図21



【図22】

吸光度変化  
(Abs)

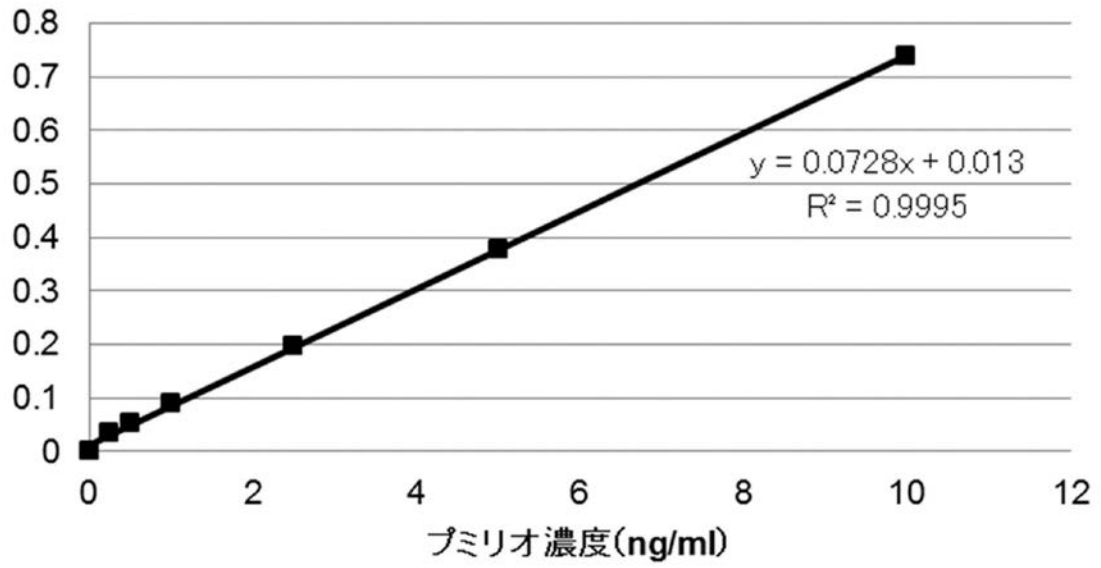
図22



【図23】

吸光度変化  
(Abs)

図23



---

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2008/117816(WO, A1)

特開2009-207396(JP, A)

岩井敦 他, チオNADサイクリングを利用する - ガラクトシダーゼの高感度活性測定法, 化学系学協会北海道支部2010年冬季研究発表会 講演要旨集, 2010年 1月26日, p.65  
SK LHEGG B.A., 3-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*: kinetic properties with NAD and its, *Eur. J. Biochem.*, 1975年 1月15日, Vol.50, No.3, pp.603-609

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

G01N 33/536

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	超高灵敏度测定和蛋白质和核酸试剂盒，以及新型酶底物		
公开(公告)号	<a href="#">JP5265816B2</a>	公开(公告)日	2013-08-14
申请号	JP2012533408	申请日	2012-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	伊藤 悦朗		
申请(专利权)人(译)	伊藤 悦朗		
当前申请(专利权)人(译)	伊藤 悦朗		
[标]发明人	伊藤悦朗		
发明人	伊藤 悦朗		
IPC分类号	C12Q1/34 C12Q1/42 C12Q1/28 G01N33/536 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/008 C12Q1/28 G01N21/25 G01N21/78 G01N2333/90209 C12Q1/34 C12Q1/42 G01N2333/916 G01N2333/924		
FI分类号	C12Q1/34 C12Q1/42 C12Q1/28 G01N33/536.C C12Q1/68.A		
优先权	2011063559 2011-03-23 JP		
其他公开文献	JPWO2012128338A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了一种超高灵敏度测定法，其中可以在常用的测定装置例如吸光光度计和读板器上或用肉眼进行测定。可以通过组合使用硫代-NAD ( P ) 作为辅酶的酶循环方法，标记酶和用于其的底物来提供可以在常用的测定装置上或用肉眼进行测定的高灵敏度测定。最佳标记酶，并通过扩增作为信号物质的硫代-NAD ( P ) H，以指数方式然后比色地量化硫代-NAD ( P ) H。

