

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4593665号  
(P4593665)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int.Cl. F 1  
**GO 1 N 33/531 (2006.01)** GO 1 N 33/531 B

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2008-281574 (P2008-281574)	(73) 特許権者	000002288
(22) 出願日	平成20年10月31日(2008.10.31)		三洋化成工業株式会社
(65) 公開番号	特開2009-258081 (P2009-258081A)		京都府京都市東山区一橋野本町11番地の
(43) 公開日	平成21年11月5日(2009.11.5)		1
審査請求日	平成20年12月9日(2008.12.9)	(72) 発明者	加藤 隆史
(31) 優先権主張番号	特願2008-83410 (P2008-83410)		京都市東山区一橋野本町11番地の1 三
(32) 優先日	平成20年3月27日(2008.3.27)		洋化成工業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	審査官	浅野 美奈

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミオグロビン含有水溶液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ミオグロビン、アジ化水素酸のアルカリ金属塩、チオシアン酸のアルカリ金属塩及び水を含むこととなり、pHが7.0～8.5であることを特徴とする免疫測定法によるミオグロビンの含有量測定に用いる標準液用のミオグロビン含有水溶液。

【請求項2】

ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、前記ミオグロビンの濃度が1～5000 ng/g、前記アジ化水素酸のアルカリ金属塩の濃度が0.01～0.1重量%、前記チオシアン酸のアルカリ金属塩の濃度が0.1～1重量%である請求項1記載のミオグロビン含有水溶液。

【請求項3】

更に、ヘモグロビン及び/又はpHが7.5～8.0の間に緩衝能を有する緩衝剤を含む請求項1又は2記載のミオグロビン含有水溶液。

【請求項4】

ミオグロビン含有水溶液の重量を基準とする前記ヘモグロビンの含有量が1～50 μg/gであり、ミオグロビン含有水溶液の体積を基準とする前記緩衝剤の含有量が1～100 mMである請求項3記載のミオグロビン含有水溶液。

【請求項5】

前記緩衝剤が、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸である請求項3又は4記載のミオグロビン含有水溶液。

10

20

## 【請求項 6】

更に、タンパク質保護剤及び/又は塩化ナトリウムを含有する請求項 1 ~ 5 のいずれか記載のミオグロビン含有水溶液。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はミオグロビンを含有する水溶液に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ミオグロビンは、動物の骨格筋組織中に存在するヘムタンパク質で酸素を貯蔵する役割を担っている。ヒトミオグロビンは、分子量約 17500 を持ち、153 アミノ酸残基で構成される、1本のペプチド鎖に1つのヘム分子を付加した構造を有する。心筋梗塞のような筋肉組織の損傷が生じると、数時間の内に血中や尿中のミオグロビン濃度が顕著に上昇する。近年では、筋肉組織の損傷に伴うミオグロビン濃度の上昇が腎障害をもたらすことも指摘されている。

10

従ってミオグロビン濃度を高い精度で測定することは、心臓疾患や腎疾患を診断する上で極めて重要な意義がある。

## 【0003】

免疫測定を行う際には、抗原を含有した標準液をキャリブレーターとして用いるのが一般的である。しかし、ミオグロビン標準水溶液は、保存温度等の保存条件によって変性が促進されたり、分解してしまうことも多い。このような変性・分解の結果、ミオグロビンの立体構造が破壊されて抗原性の低下を招くことになる。このため、免疫学的なミオグロビンの測定方法において、ミオグロビン標準水溶液に含まれるミオグロビンの変性・分解は誤った診断結果を生ずる原因となる。

20

## 【0004】

抗原性の低下を防止する方法として、標準水溶液を凍結乾燥などの方法で水分を除去した形態で保存し、使用時に水を加えてこの固体を溶解し標準水溶液とする方法や、凍結保存する方法、牛血清アルブミンや動物血清などのタンパク質やグリセロールを添加して水溶液中での安定性を確保する方法などがとられている（非特許文献 1 及び 2）。

しかし、従来の凍結乾燥による方法では、保存安定性は良いが使用時に水を加えなければならないため操作が煩雑となり、結果として標準液中の抗原濃度に誤差を生じやすい。また、凍結保存する方法では繰り返しの凍結融解操作によって抗原性が低下したり、融解状態によって測定値にバラツキが生ずる可能性がある。更に、牛血清アルブミンや動物血清などのタンパク質やグリセロールを添加しても、室温での液状保存では十分な安定性を保つことができない。

30

【非特許文献 1】佐々木 實著、「免疫化学的同定法（第 3 版）」、東京化学同人、1993 年、p 82 - p 98

【非特許文献 2】石川榮治著、「超高感度酵素免疫測定法」、学会出版センター、1993 年、p 131 - p 178

## 【発明の開示】

40

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明は上記問題点に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、凍結乾燥等による操作の煩雑さが解消されると共に測定値のバラツキの少なく、室温での液状保存安定性に優れるミオグロビン含有水溶液を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者は、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、本発明に到達した。即ち本発明は、ミオグロビン、アジ化水素酸のアルカリ金属塩、チオシアン酸のアルカリ金属塩及び水を含有してなり、pH が 7.0 ~ 8.5 であることを特徴とする免疫測定法によるミ

50

オグロビンの含有量測定に用いる標準液用のミオグロビン含有水溶液である。

【発明の効果】

【0007】

本発明の抗原含有水溶液は以下の効果を奏する。

- (1) ミオグロビン含有水溶液を、溶液状態で長期間安定して保存することができる。
- (2) 従来行われた凍結乾燥や凍結保存しなくとも安定性を長期間維持できるようになり、抗原を溶解するという煩雑な調製操作により生じる濃度の誤差や、融解状態の違いによる測定値のバラツキを生ずることなく、測定精度と再現性が良い免疫測定ができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明におけるミオグロビンは、約17500の分子量を持ち、153アミノ酸残基で構成される、1本のペプチド鎖に1つのヘム分子を付加した構造を有する。

本発明に使用するミオグロビンの由来には特に限定が無く、組織より抽出された天然物以外にも、遺伝子組み換え物や化学合成物を使用することが出来る。

ミオグロビンは、Biodesign社やBioChain Institute社等より市販されている。

【0009】

本発明におけるアジ化水素酸のアルカリ金属塩としては、アジ化リチウム、アジ化ナトリウム及びアジ化カリウム等が挙げられる。これらの内、ミオグロビンの安定性の観点から好ましいのは、アジ化ナトリウムである。

20

【0010】

本発明におけるチオシアン酸のアルカリ金属塩としては、チオシアン酸リチウム、チオシアン酸ナトリウム及びチオシアン酸カリウム等が挙げられる。これらの内、ミオグロビンの安定性の観点から好ましいのは、チオシアン酸ナトリウムである。

【0011】

本発明における水は、特に限定されないが、ミオグロビンの安定性の観点から、イオン交換水を用いることが好ましい。

【0012】

本発明のミオグロビン含有水溶液は、ヘモグロビンを含有することにより、ミオグロビンの安定性が更に向上する。

30

【0013】

本発明におけるヘモグロビンは、特に制限されないが、ミオグロビンの安定性の観点から、哺乳動物の血液より分離精製されたものが好ましく、その具体例としては、ヒト、牛、馬、羊、ヤギ、ウサギ及びブタからなる群から選択される少なくとも1種の哺乳動物の血液から分離精製されたものが挙げられる。

【0014】

本発明のミオグロビン含有水溶液のpHは、ミオグロビンの保存安定性を向上させる観点から、7.5~8.0が好ましく、更に好ましくは7.7~7.9である。尚、pHは、JIS K0400-12-10:2000に記載の方法で測定できる(測定温度25)。

40

【0015】

本発明のミオグロビン含有水溶液のpHを上記の好ましい範囲に調整するために、無機アルカリ(水酸化リチウム、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウム等)又は無機酸(塩酸等)を用いることもできるが、pHを一定に保つ観点から、pH7.5~8.0の間に緩衝能を有する緩衝剤を使用することが好ましい。

【0016】

pH7.5~8.0の間に緩衝能をもつ緩衝剤としては、N,N-ビス(2-ヒドロエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(

50

MOPS)、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(TESS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、2-ヒドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPSO)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)2水和物(POPSO)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸1水和物(HEPPSO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(EPPS)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(Tricine)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)及びN-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)等が挙げられる。これらの内、水溶液中のミオグロビンの安定性の観点から、HEPESが好ましい。

10

緩衝剤は2種以上を併用してもよいが、ミオグロビンの安定性の観点から、1種を使用することが好ましい。

#### 【0017】

ミオグロビン含有水溶液のpHを、更に好ましい範囲である7.7~7.9に調整する方法としては、前記のpHが7.5~8.0の間に緩衝能を有する緩衝剤を添加した後、更に無機アルカリ(水酸化リチウム、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウム等)又は無機酸(塩酸等)を添加してpHを調整する方法が好ましい。

#### 【0018】

本発明のミオグロビン含有水溶液は、公知のタンパク質保護剤を含有することにより、ミオグロビンの安定化効果がより一層高まる。

20

タンパク質保護剤としては、アルブミンやゼラチンに代表される不活性タンパク質等が挙げられる。

#### 【0019】

アルブミンは、任意のものを使用することができるが、ミオグロビンの安定性の観点から、特に動物の血清や卵白に由来するアルブミンが好ましく、その具体例としては、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウサギ及びこれらの動物の幼獣又は胎児の血液に由来するアルブミンが挙げられる。このアルブミンには、上記したもの以外にその酵素分解物も知られているが、本発明におけるアルブミンには、このようなアルブミンの酵素分解物等、アルブミンから誘導される蛋白質も含まれる。

30

#### 【0020】

本発明のミオグロビン含有水溶液は、塩化ナトリウムを含有することにより、ミオグロビンの安定化効果がより一層高まる。

#### 【0021】

本発明におけるミオグロビンの濃度(ng/g)は、任意の濃度に設定することが出来るが、血液中のミオグロビンを定量する際に必要な濃度域の観点から、ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、1~5000が好ましい。

#### 【0022】

アジ化水素酸のアルカリ金属塩の濃度(重量%)は、ミオグロビンの安定性及び防腐剤としての適正な使用量の観点から、ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、0.01~0.1が好ましく、更に好ましくは0.05~0.1、特に好ましくは0.07~0.09である。

40

#### 【0023】

チオシアン酸のアルカリ金属塩の濃度(重量%)は、ミオグロビンの安定性の観点から、ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、0.1~1が好ましく、更に好ましくは0.25~0.75であり、特に好ましくは0.4~0.6である。

#### 【0024】

本発明のミオグロビン含有水溶液がヘモグロビン含有する場合、その濃度(μg/g)は、ミオグロビンの安定性の観点から、ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、1~50が好ましく、更に好ましくは10~40、特に好ましくは20~30である。

50

## 【0025】

本発明のミオグロビン含有水溶液が、pHが7.5～8.0の間に緩衝能を有する緩衝剤を含有する場合、その濃度(mM)は、ミオグロビンの安定性の観点から、ミオグロビン含有水溶液の体積を基準として、1～100が好ましく、更に好ましくは25～75、特に好ましくは、40～60である。

## 【0026】

本発明のミオグロビン含有水溶液がタンパク質保護剤を含有する場合、その濃度(重量%)はミオグロビンの安定性の観点から、ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、0.1～3が好ましく、更に好ましくは0.5～1.5、特に好ましくは0.8～1.2である。

10

## 【0027】

本発明のミオグロビン含有水溶液が塩化ナトリウムを含有する場合、その濃度(重量%)は、ミオグロビンの安定性の観点から、ミオグロビン含有水溶液の重量を基準として、0.1～2が好ましく、更に好ましくは0.5～1、特に好ましくは0.8～0.9である。

## 【0028】

本発明のミオグロビン含有水溶液は、水、ミオグロビン、アジ化水素酸のアルカリ金属塩、チオシアン酸のアルカリ金属塩並びに必要によりヘモグロビン、緩衝剤、タンパク質保護剤及び塩化ナトリウムを混合することで得られる。

混合方法としては、従来ミオグロビン含有水溶液を製造する際と同様の方法でよい。

20

本発明のミオグロビン含有水溶液の製造において、混合の順序は、製造のし易さや、製造時におけるミオグロビンの失活防止の観点から、水(又は、必要により緩衝剤と混合した緩衝液)に、タンパク質保護剤及び塩化ナトリウムを必要に応じて添加混合して溶解させ、次いでアジ化水素酸のアルカリ金属塩、チオシアン酸のアルカリ金属塩及び必要によりヘモグロビンを添加混合し、次いでミオグロビンを添加混合する方法が好ましい。

## 【実施例】

## 【0029】

以下、実施例により、本発明を更に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

<実施例1～20及び比較例1～2>

30

## (a) 抗原含有水溶液の調製

表1に記載の各成分を、表1に記載の濃度となるようにイオン交換水に溶解して実施例1～20及び比較例1～2のミオグロビン含有溶液を調製した。

具体的には、イオン交換水又は必要により2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)とイオン交換水とを混合した緩衝液に、アルブミン及び塩化ナトリウムを必要に応じて添加混合して溶解させ、次いでアジ化ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム及び必要によりヘモグロビンを添加混合し、均一溶解を確認後、ミオグロビンを添加混合した。

更に、実施例1、3～6、17及び比較例1のミオグロビン含有水溶液については水酸化ナトリウムを用いて、また、実施例18のミオグロビン含有水溶液については塩酸を用いて、pHを表1に記載の値に調整した。

40

## (b) 保存安定性の評価

調製した各ミオグロビン含有水溶液を4及び40で保存し、作製時、3日目、7日目及び14日目のミオグロビン濃度を測定し、濃度の変化を調べた。結果を表2に示す。

ミオグロビンの濃度は、全自動化学発光免疫測定装置[スフィアライト(登録商標)180、オリンパス株式会社製]により発光量を測定し、検量線から求めた。検量線は4で冷蔵保存しておいたミオグロビンを使用し、測定日毎に作製した。

## 【0030】

【表 1】

	ミオグロビン の濃度 (ng/g)	アジ化ナトリ ウムの濃度 (重量%)	チオシアン酸 ナトリウムの濃度 (重量%)	ヘモグロビン の濃度 (μg/g)	HEPES の濃度 (mM)	アルブミン の濃度 (重量%)	塩化ナトリウ ムの濃度 (重量%)	pH (25°C)
1	1000	0.08	0.5	-	-	-	-	7.8
2	1000	0.08	0.5	-	-	-	-	7.0
3	1000	0.08	0.5	-	-	-	-	8.5
4	1000	0.08	0.5	1	-	-	-	7.8
5	1000	0.08	0.5	25	-	-	-	7.8
6	1000	0.08	0.5	50	-	-	-	7.8
7	1000	0.08	0.5	-	1	-	-	7.8
8	1000	0.08	0.5	-	50	-	-	7.8
9	1000	0.08	0.5	-	100	-	-	7.8
10	1000	0.08	0.5	25	50	-	-	7.8
11	1000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.85	7.8
12	5000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.85	7.8
13	1	0.08	0.5	25	50	1.0	0.85	7.8
14	1000	0.08	1	25	50	1.0	0.85	7.8
15	1000	0.08	0.5	25	100	1.0	0.85	7.8
16	1000	0.08	0.5	25	1	1.0	0.85	7.8
17	1000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.85	8.0
18	1000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.85	7.5
19	1000	0.1	0.5	25	50	1.0	0.85	7.8
20	1000	0.01	0.5	25	50	1.0	0.85	7.8
1	1000	0.08	-	-	-	-	-	7.8
2	1000	0.08	-	-	50	1.0	0.85	7.8

実施例

比較例

10

20

30

40

【表 2】

	ミオグロビンの濃度 (ng/mL)	保存温度	ミオグロビンの濃度の測定値 (ng/mL)			
			作製時	3日目	7日目	14日目
実施例	1	4°C	1000	998	1023	978
		40°C	1000	980	955	902
	2	4°C	1000	1030	1011	1002
		40°C	1000	998	922	841
	3	4°C	1000	987	1001	1027
		40°C	1000	983	910	825
	4	4°C	1000	1003	972	989
		40°C	1000	979	961	930
	5	4°C	1000	979	1031	988
		40°C	1000	987	1003	970
	6	4°C	1000	973	1025	1009
		40°C	1000	978	967	959
	7	4°C	1000	1010	971	1041
		40°C	1000	978	961	920
	8	4°C	1000	989	1020	1019
		40°C	1000	987	968	940
	9	4°C	1000	978	1002	981
		40°C	1000	981	968	936
	10	4°C	1000	1021	967	991
		40°C	1000	1010	989	995
11	4°C	1000	1003	972	989	
	40°C	1000	1020	1009	979	
12	4°C	5000	5029	4985	5011	
	40°C	5000	4958	4991	5022	
13	1	4°C	1	1	1	1
		40°C	1	1	1	1
14	1000	4°C	1000	1030	1011	1002
		40°C	1000	998	1031	989
15	1000	4°C	1000	991	1041	1011
		40°C	1000	1022	1005	993
16	1000	4°C	1000	1021	967	991
		40°C	1000	992	1025	1012
17	1000	4°C	1000	978	1002	981
		40°C	1000	1011	1029	988
18	1000	4°C	1000	1020	1000	1018
		40°C	1000	999	973	989
19	1000	4°C	1000	1010	1042	971
		40°C	1000	993	982	1021
20	1000	4°C	1000	967	983	991
		40°C	1000	1025	1009	1012
比較例	1	4°C	1000	991	1041	1011
		40°C	1000	512	231	43
	2	4°C	1000	1005	985	1010
		40°C	1000	610	331	119

## 【産業上の利用可能性】

## 【0032】

本発明のミオグロビン含有水溶液は、溶液状態で長期間安定して保存することができるため、従来行われた凍結乾燥や凍結保存を行う必要がなく、抗原を溶解するという煩雑な調製操作により生じる濃度の誤差や、融解状態の違いによる測定値のバラツキを生ずることなく、測定精度と再現性が良い免疫測定ができる。

よって、本発明のミオグロビン含有水溶液は、臨床検査の分野において酵素免疫測定法、放射線免疫測定法、或いは免疫比濁法等の免疫測定を行う時に用いることができる。特に、抗原を含有した溶液中の抗原の失活を防止し、安定して保存することができることか

10

20

30

40

50

ら、標準液として好適に使用できる。

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平11-060600(JP,A)  
特開2001-221789(JP,A)  
特開2000-256399(JP,A)  
特開2007-212343(JP,A)  
特表2001-517799(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/531

专利名称(译)	含肌红蛋白的水溶液		
公开(公告)号	<a href="#">JP4593665B2</a>	公开(公告)日	2010-12-08
申请号	JP2008281574	申请日	2008-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	加藤隆史		
发明人	加藤 隆史		
IPC分类号	G01N33/531		
FI分类号	G01N33/531.B		
优先权	2008083410 2008-03-27 JP		
其他公开文献	JP2009258081A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：提供含有肌红蛋白的水溶液，其能够减少由于冷冻，干燥等操作引起的并发症，测量值变化很小，并且在室温下具有优异的液体保存稳定性。ZSOLUTION：含肌红蛋白的水溶液含有肌红蛋白，叠氮化氢的碱金属盐，硫氰酸的碱金属盐和水。含有肌红蛋白的水溶液优选还含有血红蛋白，缓冲能力为pH7.5-8.0的缓冲剂，蛋白质保护剂和/或氧化钠。Z

	ミトコンドリアの濃度 (mg/g)	アジチナリウムの濃度 (重量%)	チオンアンモニウムナトリウムの濃度 (重量%)	ヘモグロビンの濃度 (g/g)	HEPESの濃度 (mM)	アルブミンの濃度 (重量%)	酸化ナトリウムの濃度 (重量%)	pH (25°C)
1	1000	0.08	0.5	-	-	-	-	7.8
2	1000	0.08	0.5	-	-	-	-	7.0
3	1000	0.08	0.5	-	-	-	-	8.5
4	1000	0.08	0.5	1	-	-	-	7.8
5	1000	0.08	0.5	25	-	-	-	7.8
6	1000	0.08	0.5	50	-	-	-	7.8
7	1000	0.08	0.5	-	1	-	-	7.8
8	1000	0.08	0.5	-	50	-	-	7.8
9	1000	0.08	0.5	-	100	-	-	7.8
10	1000	0.08	0.5	25	50	-	-	7.8
11	1000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.05	7.8
12	5000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.05	7.8
13	1	0.08	0.5	25	50	1.0	0.05	7.8
14	1000	0.08	1	25	50	1.0	0.05	7.8
15	1000	0.08	0.5	25	100	1.0	0.05	7.8
16	1000	0.08	0.5	25	1	1.0	0.05	8.0
17	1000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.05	7.5
18	1000	0.08	0.5	25	50	1.0	0.05	7.8
19	1000	0.1	0.5	25	50	1.0	0.05	7.8
20	1000	0.01	0.5	25	50	1.0	0.05	7.8
比較例 1	1000	0.08	-	-	-	-	-	7.8
比較例 2	1000	0.08	-	-	50	1.0	0.05	7.8