

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6434843号
(P6434843)

(45) 発行日 平成30年12月5日 (2018.12.5)

(24) 登録日 平成30年11月16日 (2018.11.16)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50	F
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	A
GO 1 N 33/72	(2006.01)	GO 1 N 33/72	A

請求項の数 10 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2015-70762 (P2015-70762)	(73) 特許権者	000120456 栄研化学株式会社 東京都台東区台東4丁目19番9号
(22) 出願日	平成27年3月31日 (2015.3.31)	(72) 発明者	坂田 梢 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内
(65) 公開番号	特開2016-191580 (P2016-191580A)	(72) 発明者	諏合 伸 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内
(43) 公開日	平成28年11月10日 (2016.11.10)	(72) 発明者	安居 良太 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内
審査請求日	平成30年2月26日 (2018.2.26)	審査官	磯田 真美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハロアルカンスルホン酸又はその塩を含むヘムタンパク質の保存液。

【請求項 2】

前記ハロアルカンスルホン酸の置換ハロゲン原子が塩素原子である請求項 1 に記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 3】

前記ハロアルカンスルホン酸が、ヒドロキシ基が置換している炭素数 1 乃至 5 のハロアルカンスルホン酸である請求項 1 又は 2 に記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 4】

前記ハロアルカンスルホン酸又はその塩が、クロロメタンスルホン酸、2 - クロロエタンスルホン酸、3 - クロロ - 1 - プロパンスルホン酸、2 - クロロ - 1 - ヒドロキシエタンスルホン酸、3 - クロロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸、又はその塩からなる群より選択される少なくとも 1 種である請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 5】

前記ハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度が 0.001 mol/L 以上 0.3 mol/L 以下である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 6】

N - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - N' - エタンスルホン酸をさらに含む請求

項 1 乃至 5 のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 7】

ヘムタンパク質を含む標準試料又はコントロール試料として用いられる請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 8】

免疫学的測定に用いられる請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。

【請求項 9】

ヘムタンパク質を含む試料中に、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を共存させるヘムタンパク質の安定化方法。

10

【請求項 10】

前記ハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度が 0.001 mol/L 以上 0.3 mol/L 以下である請求項 9 記載のヘムタンパク質の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法に関する。特に、免疫学的測定法において有用なヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

近年、がんの罹患率が増加していることに伴い、大腸がん検診の一次検査や下部消化管疾患のスクリーニング法として、糞便中の血液を検出する便潜血検査が広く行われている。便潜血検査は、ヘムタンパク質であるヘモグロビンの持つペルオキシダーゼ様活性を利用した化学的な発色反応に基づく化学的測定法や、ヒトヘモグロビンに特異的な抗体を利用した免疫学的測定法によって行われており、特に、免疫学的測定法は、化学的測定法と比較して検査前の食事制限や服薬制限を必要とせず、簡便で迅速な測定が可能であるため、便潜血検査の主な検査方法として定着している。

30

【0003】

しかしながら、ヘモグロビンは溶液中で非常に不安定であり、変性あるいは分解しやすいことが知られている。このヘモグロビンの変性あるいは分解によって、ヘモグロビンの立体構造が破壊され、その抗原性が低下するため、ヘモグロビンの免疫学的測定法において誤った検査結果が導かれてしまう。ヘモグロビンの変性あるいは分解の原因としては、保存温度の上昇、時間経過、細菌や酵素等様々なものが挙げられるが、例えば、保存温度について、溶液中のヘモグロビンは凍結又は冷蔵状態では比較的安定するが、室温又はそれ以上の温度では変性あるいは分解が進むことが知られている。

【0004】

特に、便潜血検査においては、被験者自身が自宅等で糞便を採取し、便検体用希釈液を含む密閉容器に糞便を懸濁して検査に供する 경우가多く、この場合、糞便中のヒトヘモグロビンは、溶液中で数日間放置され、郵便等の輸送手段を利用することによって高温下に置かれることもある。さらに、病院や検査機関では、多数の検体及び他項目の検査を実施しているため、測定結果を得るまでに多くの時間を要することもある。それゆえ、便潜血検査では、温度上昇や時間経過等の原因が重なり合い、ヘモグロビンの変性あるいは分解が生じやすい。

40

【0005】

さらに、便潜血検査では、多くの検体を正確かつ迅速に測定できる自動分析装置を用いて測定が行われることが多い。自動分析装置を用いた測定では、試薬や装置の変化等が検査結果の精度に影響するため、既知濃度のヘモグロビンを含む標準試料及び既知濃度のヘ

50

モグロビンを含むコントロール試料を用いて定期的に自動分析装置のキャリブレーションや精度管理が行われている。キャリブレーションでは、複数の既知濃度の測定対象物質を含む標準試料を自動分析装置で測定して、検量線を作成し、自動分析装置の校正を行い、精度管理では、既知濃度の測定対象物質を含むコントロール試料を自動分析装置で測定し、測定値が所定範囲内に収まっているか否かにより、分析精度を判定する。しかしながら、標準試料及びコントロール試料中に含まれるヘモグロビンが変性あるいは分解していると、キャリブレーションや精度管理を正確に行うことができず、測定の誤りを招くこととなる。

【0006】

従って、ヘモグロビンの変性あるいは分解を抑制し、正確な測定結果を得るために、これまで、ヘモグロビンを安定化するための様々な方法が提案されてきた。例えば、チメロサルやクロルヘキシジン等抗菌剤を添加する方法（例えば、特許文献1参照）、ヒト以外の動物ヘモグロビンを添加する方法（例えば、特許文献2参照）、ヒト以外の動物血清を添加する方法（例えば、特許文献3参照）、グリコシダーゼ型溶菌酵素を添加する方法（例えば、特許文献4参照）、亜硫酸や二亜硫酸等を添加する方法（例えば、特許文献5参照）、アシルアルギニンエステル及びカチオン性界面活性剤を添加する方法（例えば、特許文献6参照）、グリオキシル酸を添加する方法（例えば、特許文献7参照）等が提案されている。

【0007】

さらに、本出願人は、水溶性遷移金属錯体を添加する方法（例えば、特許文献8参照）、フェロシアン化合物を添加する方法（例えば、特許文献9参照）、ヘモグロビンの酵素分解産物を添加する方法（例えば、特許文献10参照）、遷移金属類を添加する方法（例えば、特許文献11参照）、リンゴ酸等の有機酸を添加する方法（例えば、特許文献12参照）、脱脂アルブミンを添加する方法（例えば、特許文献13参照）、イミノカルボン酸を添加する方法（例えば、特許文献14参照）等を既に提案している。

【0008】

しかしながら、ヘモグロビンは非常に不安定であることから、これらのヘモグロビンの安定化方法であっても、その変性あるいは分解を十分に防ぐには至っていないという問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開昭63-271160号公報

【特許文献2】特開平2-296149号公報

【特許文献3】特開平4-145366号公報

【特許文献4】特公平5-69466号公報

【特許文献5】特開2000-258420号公報

【特許文献6】特開2009-222710号公報

【特許文献7】特開2013-257216号公報

【特許文献8】特開平7-229902号公報

【特許文献9】特開平11-118806号公報

【特許文献10】特開平11-218533号公報

【特許文献11】特開2001-249132号公報

【特許文献12】特開2003-14768号公報

【特許文献13】特開2003-194825号公報

【特許文献14】特開2009-097956号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

このような問題を解決するため、本発明は、ヘモグロビンに代表されるヘムタンパク質

10

20

30

40

50

の変性あるいは分解に対して有効な、新たなヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法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】

【0011】

本発明のヘムタンパク質の保存液は、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を含むことを特徴とする。また、本発明のヘムタンパク質の安定化方法は、ヘムタンパク質を含む試料中に、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を共存させることを特徴とする。

【0012】

すなわち、本発明は、

- (1) ハロアルカンスルホン酸又はその塩を含むヘムタンパク質の保存液。 10
- (2) ハロアルカンスルホン酸の置換ハロゲン原子が塩素原子である(1)に記載のヘムタンパク質の保存液。
- (3) ハロアルカンスルホン酸が、ヒドロキシ基が置換している炭素数1乃至5のハロアルカンスルホン酸である(1)又は(2)に記載のヘムタンパク質の保存液。
- (4) ハロアルカンスルホン酸又はその塩が、クロロメタンズルホン酸、2-クロロエタンズルホン酸、3-クロロ-1-プロパンズルホン酸、2-クロロ-1-ヒドロキシエタンズルホン酸、3-クロロ-2-ヒドロキシ-1-プロパンズルホン酸、又はその塩からなる群より選択される少なくとも1種である(1)乃至(3)のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。
- (5) ハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度が0.001mol/L以上0.3mol/L以下である(1)乃至(4)のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。 20
- (6) N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-エタンズルホン酸をさらに含む(1)乃至(5)のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。
- (7) ヘムタンパク質を含む標準試料又はコントロール試料として用いられる(1)乃至(6)のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。
- (8) 免疫学的測定に用いられる(1)乃至(7)のいずれかに記載のヘムタンパク質の保存液。
- (9) ヘムタンパク質を含む試料中に、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を共存させるヘムタンパク質の安定化方法。
- (10) ハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度が0.001mol/L以上0.3mol/L以下である(9)に記載のヘムタンパク質の安定化方法。 30

【発明の効果】

【0013】

本発明のヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法によれば、ヘムタンパク質の変性あるいは分解を抑制し、ヘムタンパク質を安定的に保存することができる。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0015】

本発明のヘムタンパク質の保存液は、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を含む。また、本発明のヘムタンパク質の安定化方法は、ヘムタンパク質を含む試料中に、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を共存させる。 40

【0016】

本発明に用いられるハロアルカンスルホン酸又はその塩は、特に限定されるものではなく、公知のものから選択することができる。本発明に用いられるハロアルカンスルホン酸の炭素数は1乃至5、より好ましくは1乃至3である。置換したハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、及び臭素原子等が挙げられるが、特に、塩素原子であることが好ましい。置換したハロゲン原子の数は1個以上であり、より好ましくは1乃至3個、特に好ましくは1又は2個である。本発明に用いられるハロアルカンスルホン酸としては、例えば、クロロメタンズルホン酸、2-クロロエタンズルホン酸、3-クロロ-1-プロパ 50

ンスルホン酸等が挙げられる。

【0017】

さらに、本発明に用いられるハロアルカンスルホン酸又はその塩は、ヒドロキシ基が置換していてもよい。置換したヒドロキシ基の数は1個以上であり、より好ましくは1又は2個である。ヒドロキシ基が置換したハロアルカンスルホン酸又はその塩としては、例えば、2-クロロ-1-ヒドロキシエタンスルホン酸、3-クロロ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸等が挙げられる。また、本発明に用いられるハロアルカンスルホン酸又はその塩は、少なくとも1種であり、2種以上を混合した混合物であってもよい。

【0018】

本発明によれば、保存液又は試料中にヘムタンパク質とハロアルカンスルホン酸又はその塩とを含むことによって、ヘムタンパク質の変性あるいは分解を抑制することができる。特に、本発明によれば、ハロアルカンスルホン酸が3-クロロ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(以下、CHPSという)を含むことによって、ヘムタンパク質の安定性をより高めることができる。

【0019】

本発明に用いられるハロアルカンスルホン酸の塩は、特に限定されないが、ハロアルカンスルホン酸の1価、2価、又は3価の塩である。ハロアルカンスルホン酸の塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アンモニウム塩、アルカリ土類金属塩、鉄塩、又はアルミニウム塩等が挙げられる。アルカリ金属としては、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウムが挙げられる。アルカリ土類金属としては、例えばカルシウム、ストロンチウム、バリウム、ラジウムが挙げられる。

【0020】

本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料に含まれるハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度の上限は、0.3 mol/L以下、より好ましくは0.2 mol/L以下であり、さらに好ましくは0.15 mol/L以下であり、下限は0.001 mol/L以上、より好ましくは0.005 mol/L以上、さらに好ましくは0.01 mol/L以上、最も好ましくは0.02 mol/L以上である。ハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度が0.001 mol/L未満であると、ヘムタンパク質の安定化効果が不十分になる。一方、ハロアルカンスルホン酸又はその塩の濃度が0.3 mol/Lを超えると、免疫反応が阻害され、測定に影響を及ぼしやすくなる他、ハロアルカンスルホン酸又はその塩の溶解度が低下することにより、十分なヘムタンパク質の安定化効果が得られなくなる。

【0021】

本発明が対象とするヘムタンパク質及び本発明の試料に含まれるヘムタンパク質は、ヘムを構成成分とするタンパク質の中から適宜選択することができる。ヘムタンパク質としては、例えば、ヘモグロビン、ミオグロビン、ペルオキシターゼ又はカタラーゼ等が挙げられる。特に、本発明が対象とするヘムタンパク質及び本発明の試料に含まれるヘムタンパク質は、好ましくは免疫学的な分析対象となるヘムタンパク質であり、より好ましくはヒトヘモグロビンである。免疫学的測定法では、検出対象の抗原性を維持することが重要であるが、本発明によればヘムタンパク質の抗原性を維持することができるため、より正確なヘムタンパク質の測定が可能となる。特に、本発明が対象とするヘムタンパク質及び本発明の試料に含まれるヘムタンパク質を生体試料中のヘモグロビンとすることで、大腸がん等の疾病の診断における測定結果の誤りを防ぐことが期待できる。さらに、特に限定されるものではなく、ヘモグロビンは、便中に含まれるヘモグロビン、赤血球より調製したヘモグロビンを含む標準試料又はコントロールとして市販されているヘモグロビン、及び凍結乾燥ヘモグロビン等を含むことができる。

【0022】

また、本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料は、ヘムタンパク質を溶解できる溶液を含むことができる。溶液としては、ヘムタンパク質を溶解できる溶液であればよく、例えば、緩衝液を挙げることができ、緩衝液の調製に使用される緩衝

10

20

30

40

50

剤としては、緩衝能を有するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、グッド緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等が挙げられる。

【0023】

さらに、グッド緩衝剤としては、例えば、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝剤、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝剤、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝剤、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)緩衝剤、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)緩衝剤、N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)緩衝剤、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝剤、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(TES)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝剤、3-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)緩衝剤、2-ヒドロキシ-3-{[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}プロパンスルホン酸(TAPSO)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸)(POPPO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)ピペラジン(HEPPSO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(3-スルホプロピル)ピペラジン(EPPS)緩衝剤、トリシン[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン]緩衝剤、ピシン[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン]緩衝剤、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノプロパンスルホン酸(TAPS)緩衝剤、2-(N-シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸(ChES)緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(CAPSO)緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)プロパンスルホン酸(CAPS)緩衝剤等が挙げられる。特に、本発明では、グッド緩衝剤の中でもHEPESを用いることが好ましく、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を共存させることで、ヘムタンパク質の安定性を著しく高めることができる。

【0024】

緩衝剤の濃度は、測定に適した濃度であれば特に限定されないが、0.001乃至2.0 mol/L、好ましくは0.005乃至1.5 mol/L、さらに好ましくは0.01乃至1.0 mol/Lである。

【0025】

また、本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料のpHは、中性域が好ましく、5乃至10が好ましく、より好ましくは6乃至8の範囲である。pHが5より低い、あるいは10より高い場合は、ヘムタンパク質の安定性が損なわれ、ヘムタンパク質が変性あるいは分解しやすくなる。pHは、公知の方法で調整でき、NaOHや適当な緩衝剤を用いて調整してもよい。

【0026】

さらに、本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料は、水溶性遷移金属錯体、フェロシアン化合物、ヘモグロビンの酵素分解産物、遷移金属類、有機酸、イミノカルボン酸、アルブミンやゼラチンに代表される不活性タンパク質、及びアジ化ナトリウム等、公知のタンパク質保護剤を含むことができる。また、微生物の不必要な繁殖を防ぐための抗菌剤等を含んでもよい。さらに、本発明の効果を損なわない範囲において、必要に応じて、塩、凝集促進剤、その他の成分を含んでもよい。本発明によれば、従来のタンパク質保護剤や抗菌剤等の作用を阻害することなく、従来のタンパク質保護剤や抗菌剤等と共にヘムタンパク質の安定性を高めることができる。

【0027】

また、本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料がアルブミンを含む場合には、アルブミンとして、牛、馬、豚、羊、兔、ヒト、ラット等のアルブミンを

10

20

30

40

50

用いることができ、アルブミンを含有する血清を用いるようにしてもよい。本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料中のアルブミンの濃度は、0.0005乃至2.0 w/v%、より好ましくは0.01乃至0.5 w/v%である。

【0028】

ヘムタンパク質の測定方法は、特に限定されるものではないが、好ましくは抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた免疫学的測定法である。ヒトヘモグロビンの免疫学的測定法としては、例えば、寒天平板内で抗ヒトヘモグロビン抗体と被検試料中のヒトヘモグロビンの結合による免疫複合体による沈降線の発現を確認する一元放射状免疫拡散法、抗ヒトヘモグロビン抗体を感作したラテックス粒子を用いるラテックス免疫凝集法、酵素や放射性元素で標識した抗ヒトヘモグロビン抗体を用いる酵素免疫測定法や放射免疫測定法、抗ヒトヘモグロビン抗体を感作した金コロイド粒子を用いる金コロイド凝集比色法等が挙げられる。いずれの測定方法においても、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を含む本発明のヘムタンパク質の保存液又はヘムタンパク質を含む試料によれば、ヘムタンパク質の抗原活性を保護し、測定値の誤りを抑制することができる。

10

【0029】

本発明のヘムタンパク質の保存液は、ヘムタンパク質を保存するための溶液として様々な用途に用いることができ、例えば、糞便、尿、及び血液等、生体試料由来のヘムタンパク質の溶解用懸濁液、希釈液、及び抽出液等の溶液として用いることができる。特に、ヘムタンパク質の検出を行うための検査、例えば便潜血検査の便検体用希釈液として有用である。

20

【0030】

また、本発明のヘムタンパク質の保存液は、上述の本発明が対象とするヘムタンパク質を含んでいてもよく、ヘムタンパク質を含む様々な溶液として使用できる。同様に、本発明のヘムタンパク質の安定化方法は、ヘムタンパク質を含む様々な試料に適用できる。例えば、本発明のヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質を含む試料は、ヘムタンパク質を含む標準試料又はヘムタンパク質を含むコントロール試料等、特に自動分析装置のキャリブレーション又は精度管理に用いられるヘムタンパク質を含む標準試料又はヘムタンパク質を含むコントロール試料として使用できる。ヘムタンパク質を含む標準試料及びコントロール試料は、長期的に保存された場合においても、ヘムタンパク質の測定値が変動しないことが必要とされるが、本発明によれば、比較的高温で保存された場合においても標準試料及びコントロール試料中のヘムタンパク質の変性あるいは分解を抑制できるため、ヘムタンパク質の測定値の安定化に貢献することができる。従って、本発明のヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質を含む試料は、ヘムタンパク質を含む標準試料及びコントロール試料として好適である。

30

【0031】

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではない。

【実施例】

【0032】

実施例1

0.3 w/v%の牛血清アルブミン、NaOH、及び緩衝液として0.05 mol/Lのリン酸緩衝液を含み、残部を純水とするpH7.0の溶液を調製した。この溶液に添加物として3-クロロ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CHPS)を表1に示す各濃度(0.01乃至0.2 mol/L)となるように添加し、各濃度の溶液を調製した。この調整した各溶液10 mLに溶血ヘモグロビンを600 ng/mLとなるように添加し、試料とした。

40

【0033】

ヘモグロビンの添加直後に、各試料のヘモグロビン濃度を測定した(添加直後濃度)。次いで、各試料を37℃で保存した。ヘモグロビンの添加時点を保存0時間として、6時間保存後及び24時間保存後に各試料のヘモグロビン濃度を測定した(6時間保存後濃度

50

及び24時間保存後濃度)。

【0034】

ヘモグロビンの濃度測定は、OCセンサーDIANA分析機(栄研化学(株)製)を用いて、免疫学的測定法の一つであるラテックス凝集反応を測定原理とする専用試薬(OCヘモディアオートIII:栄研化学(株)製)を用いて行った。詳細には、試料から35 μ Lを採取して試験液とし、この試験液にラテックス乳液(20vol%の抗ヒトヘモグロビンウサギポリクローナル抗体感作ラテックス液)60 μ L及び希釈液(11.92mg/mLのHEPES)300 μ Lを加え、波長660nmで吸光度を測定した。予め作成した検量線に基づき、得られた測定値から試験液中のヘモグロビン濃度を決定した。各試料について、3重測定を行い、測定結果の平均値を各試料のヘモグロビン濃度とした。

10

【0035】

測定したヘモグロビン濃度から、以下の式に基づいてヘモグロビンの残存率を求めた。

【0036】

6時間保存後又は24時間保存後のヘモグロビンの残存率[%] = 100 × ヘモグロビンの6時間保存後濃度又は24時間保存後濃度[ng/mL] / 対照試料の添加直後濃度[ng/mL]

【0037】

すなわち、各試料のヘモグロビンの残存率は、対照試料におけるヘモグロビンの添加直後濃度を100%とする相対値である。本実施例における対照試料は、添加物を含まないリン酸緩衝液であり、対照試料の添加直後濃度は583ng/mLであった。結果を表1

20

【0038】

【表1】

緩衝液	添加物	添加物濃度[mM]	残存率[%]	
			6時間保存後	24時間保存後
リン酸(対照)	なし	0	49.4	7.1
リン酸	CHPS	10	57.6	10.1
リン酸	CHPS	20	61.0	12.2
リン酸	CHPS	40	61.4	14.5
リン酸	CHPS	60	61.0	15.1
リン酸	CHPS	100	59.6	16.2
リン酸	CHPS	150	57.7	18.8
リン酸	CHPS	200	48.3	15.4

30

40

(注)残存率は対照試料の添加直後濃度(583ng/mL)を100%とする相対値

【0039】

表1に示す通り、ハロアルカンスルホン酸であるCHPSを含む試料は、対照試料と比較して6時間保存後及び24時間保存後の残存率が高く、CHPSがヘモグロビンの安定化効果を有することが分かる。さらに、CHPSの濃度の増加に伴い、24時間保存後の残存率は高くなり、ヘモグロビンの安定化効果を高めていることが分かる。

【0040】

実施例2

50

リン酸緩衝液の代わりに、 0.05 mol/L のN-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-エタンスルホン酸(以下、HEPESという)を用いた点、表2に示す各濃度(0.005 乃至 0.2 mol/L)となるようにCHPSを添加した点以外は、実施例1と同様にして試料を調製し、ヘモグロビン濃度を測定した。結果を表2に示す。なお、各試料の残存率は、対照試料(添加物を含まないHEPES緩衝液)における添加直後濃度(576 ng/mL)を 100% とする相対値で示した。

【0041】

【表2】

緩衝液	添加物	添加物濃度[mM]	残存率[%]	
			6時間保存後	24時間保存後
HEPES(対照)	なし	0	61.8	11.9
HEPES	CHPS	5	63.3	14.4
HEPES	CHPS	10	66.3	16.2
HEPES	CHPS	20	68.4	21.4
HEPES	CHPS	40	70.7	27.5
HEPES	CHPS	60	72.9	32.2
HEPES	CHPS	100	70.8	32.5
HEPES	CHPS	150	68.0	30.8
HEPES	CHPS	200	61.8	25.8

(注)残存率は対照試料の添加直後濃度(576 ng/mL)を 100% とする相対値

【0042】

表2に示す通り、ハロアルカンスルホン酸であるCHPSを含む試料は、対照試料と比較して6時間保存後及び24時間保存後の残存率が高く、CHPSがヘモグロビンの安定化効果を有することが分かる。特に、HEPESとCHPSとを含むことにより、CHPSの添加濃度が 5 mM という低濃度である試料においても6時間保存後及び24時間保存後の残存率が高いことが分かる。さらに、CHPSの添加濃度の増加に伴い、残存率が高くなり、ヘモグロビンの安定化効果を高めていることが分かる。

【0043】

実施例3

リン酸緩衝液の代わりに、 0.05 mol/L のピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(以下、PIPESという)、 0.05 mol/L のHEPES、又は 0.05 mol/L の2-モルホリノエタンスルホン酸(以下、MESという)を用いた点、CHPSを表3に示す濃度となるように添加した点以外は、実施例1と同様にして試料を調製し、ヘモグロビン濃度を測定した。結果を表3に示す。なお、各試料の残存率は、対照試料(添加物を含まないリン酸緩衝液)における添加直後濃度(583 ng/mL)を 100% とする相対値で示した。

【0044】

【表 3】

緩衝液	添加物	添加物 濃度[mM]	残存率[%]	
			6時間 保存後	24時間 保存後
リン酸(対照)	なし	0	49.4	7.1
リン酸	CHPS	20	61.0	12.2
PIPES	なし	0	50.4	9.2
PIPES	CHPS	20	57.5	13.5
HEPES	なし	0	61.0	11.7
HEPES	CHPS	20	67.5	21.1
MES	なし	0	54.6	11.7
MES	CHPS	20	60.6	17.9

(注) 残存率は対照試料の添加直後濃度(583ng/mL)を100%とする相対値

【0045】

表3に示す通り、緩衝液が異なる試料においても、CHPSによるヘモグロビンの安定化効果がみられた。特に、HEPESと、CHPSとを含む試料は、HEPESを緩衝液としてCHPSを含まない試料と比較して、24時間保存後の残存率が著しく高く、ヘモグロビンの変性あるいは分解の抑制効果が極めて高いことが分かる。また、HEPESと、CHPSとを含む試料は、リン酸緩衝液やグッド緩衝剤であるPIPES又はMESと、CHPSとを含む試料と比較して24時間保存後の残存率が高く、ヘモグロビンの変性あるいは分解の抑制効果をより高めていることから、相乗的なヘモグロビン安定化効果を有することが分かる。

【0046】

実施例4

CHPSの代わりに、添加物として、2-クロロ-1-ヒドロキシエタンスルホン酸(以下、CHESという)を表4に示す濃度となるように添加した点、及びリン酸緩衝液の代わりに、0.05mol/LのHEPESを用いた点以外は、実施例1と同様にして試料を調製し、ヘモグロビン濃度を測定した。結果を表4に示す。なお、各試料の残存率は、対照試料(添加物を含まないリン酸緩衝液)における添加直後濃度(548ng/mL)を100%とする相対値で示した。

【0047】

【表4】

緩衝液	添加物	添加物濃度[mM]	残存率[%]	
			6時間保存後	24時間保存後
リン酸(対照)	なし	0	49.8	6.2
リン酸	CHES	50	50.5	18.6
リン酸	CHES	150	39.6	12.6
HEPES	なし	0	64.9	12.5
HEPES	CHES	150	46.1	14.5

(注)残存率は対照試料の添加直後濃度(548ng/mL)を100%とする相対値

【0048】

表4に示す通り、ハロアルカンスルホン酸であるCHESはヘモグロビンの安定化効果を有することが分かる。

【0049】

比較例1

CHPSの代わりに、添加物として8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸(以下、ANSという)又は2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム(以下、MESSという)を0.01mol/Lとなるように添加した点以外は、実施例1と同様にして試料を調製し、ヘモグロビン濃度を測定した。結果を表5に示す。各試料の残存率は、対照試料(添加物を含まないリン酸緩衝液)における添加直後濃度(583ng/mL)を100%とする相対値で示した。

【0050】

【表5】

緩衝液	添加物	添加物濃度[mM]	残存率[%]	
			6時間保存後	24時間保存後
リン酸(対照)	なし	0	49.4	7.1
リン酸	CHPS	10	57.6	10.1
リン酸	ANS	10	2.6	2.5
リン酸	MESS	10	33.4	3.3

(注)残存率は対照試料の添加直後濃度(583ng/mL)を100%とする相対値

【0051】

表5に示す通り、ハロアルカンスルホン酸ではないスルホン酸を含む試料では、ヘモグロビンの変性あるいは分解が進んでいる可能性があることが分かる。

【0052】

従って、CHES及びCHPS等のハロアルカンスルホン酸を含む保存液及び試料は、37 という高温下で保存された場合においても、24時間保存後のヘモグロビンの残存

10

20

30

40

50

率を高く保つことが可能であった。この結果から、本発明のハロアルカンスルホン酸を含む保存液及び試料は、温度上昇及び時間経過を伴う場合においてもヘモグロビンの変性あるいは分解を抑制し、ヘモグロビンの安定化効果を有することが分かる。

【0053】

また、実施例1乃至4及び比較例1の各試料に便検体を添加し、実施例1と同様の測定を行ったところ、実施例1乃至4及び比較例1の測定結果と同様の傾向がみられた。

【0054】

以上より、ハロアルカンスルホン酸又はその塩を含む本発明のヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法によれば、ヘムタンパク質の変性あるいは分解を抑制し、ヘムタンパク質を安定化できることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0055】

本発明のヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法によれば、ヘムタンパク質の変性あるいは分解を抑制し、ヘムタンパク質を安定的に保存することができ、便潜血検査の便検体用希釈液、ヘムタンパク質を含む標準試料、及びヘムタンパク質を含むコントロール試料等のヘムタンパク質を安定的に保存することができる。

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2009-097956(JP,A)
特開2013-257216(JP,A)
特開平05-262716(JP,A)
特開平03-255360(JP,A)
MAZUMDER, U.K. et al., Antineoplastic and Antibacterial Activity of some Mononuclear Ru(II) Complexes, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2004年 4月, Vol. 19, No. 2, pp. 185-192
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	血红蛋白的保存液和稳定血红蛋白的方法		
公开(公告)号	JP6434843B2	公开(公告)日	2018-12-05
申请号	JP2015070762	申请日	2015-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
[标]发明人	坂田 梢 諏合 伸 安居 良太		
发明人	坂田 梢 諏合 伸 安居 良太		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/50 G01N33/48 G01N33/72		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/50.F G01N33/48.A G01N33/72.A C07K14/795 G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA22 2G045/BA11 2G045/BB54 2G045/CB04 2G045/DA36 2G045/DA51 2G045/FB03 2G045/GC10 4H045/AA50 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50		
其他公开文献	JP2016191580A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新的血红蛋白保护液和一种有效降解或降解血红蛋白的血红蛋白稳定方法。溶液：一种稳定血红蛋白的方法，其中卤代链烷磺酸或其盐在含有卤代链烷磺酸或其盐的血红蛋白和含有血红蛋白的样品的保存液中共存。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6434843号 (P6434843)
(45) 発行日 平成30年12月5日 (2018.12.5)	(24) 登録日 平成30年11月16日 (2018.11.16)	
(51) Int. Cl. G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/72 (2006.01)	F I G O I N 33/531 B G O I N 33/50 F G O I N 33/48 A G O I N 33/72 A	請求項の数 10 (全 13 頁)
(21) 出願番号 特願2015-70762 (P2015-70762)	(73) 特許権者 000120456 荣研化学株式会社	
(22) 出願日 平成27年3月31日 (2015.3.31)	東京都台東区台東 4丁目19番9号	
(65) 公開番号 特開2016-191580 (P2016-191580A)	(72) 発明者 坂田 梢 栃木県下部賀郡野木町野木 1 4 3 荣研化学株式会社 野木事業所内	
(43) 公開日 平成28年11月10日 (2016.11.10)	(72) 発明者 諏合 伸 栃木県下部賀郡野木町野木 1 4 3 荣研化学株式会社 野木事業所内	
審査請求日 平成30年2月26日 (2018.2.26)	(72) 発明者 安居 良太 栃木県下部賀郡野木町野木 1 4 3 荣研化学株式会社 野木事業所内	
	審査官 磯田 真美	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヘムタンパク質の保存液及びヘムタンパク質の安定化方法