

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 277463

(P2002 - 277463A)

(43)公開日 平成14年9月25日(2002.9.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53 33/493		G 0 1 N 33/53 33/493	D 2 G 0 4 5 A

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 14数)

(21)出願番号 特願2001 - 73021(P2001 - 73021)

(22)出願日 平成13年3月14日(2001.3.14)

(71)出願人 000002288

三洋化成工業株式会社

京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1

(72)発明者 國近 誠

京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内

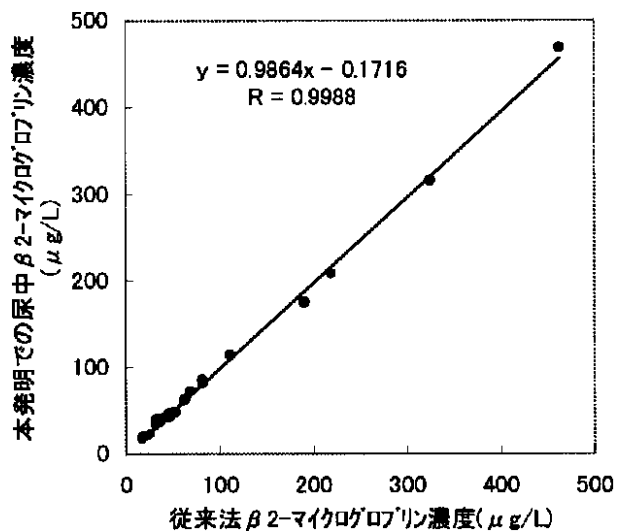
Fターム(参考) 2G045 AA16 CB03 DA36 DA37 DA38
FB03

(54)【発明の名称】 尿中の抗原定量方法

(57)【要約】

【課題】 臨床診断に使用される尿中の抗原を簡易に定量する方法を提供する。

【解決手段】 尿担持担体から尿成分を抽出し、該抽出尿成分から尿中の抗原を定量することを特徴とする尿中の抗原定量方法を用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】尿担持担体から尿成分を抽出し、該抽出尿成分から尿中の抗原を免疫測定により定量することを特徴とする尿中の抗原定量方法。

【請求項2】尿中の抗原が、アルブミン、2-マイクログロブリン、I V型コラーゲン及びC-ペプチドからなる群より選ばれる抗原である請求項1記載の尿中の抗原定量方法。

【請求項3】尿担持担体が、濾紙を使用してなる吸収体に尿を担持してなる請求項1又は2記載の尿中の抗原定量方法。

【請求項4】抽出液中の抗原濃度と、尿成分の抽出率とから、尿中の抗原濃度を決定する請求項1～3の何れかに記載の尿中の抗原定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、尿中の抗原定量方法に関する。さらに詳しくは、臨床診断に用いられる尿中の抗原定量方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、尿中の抗原の定量方法として、各種条件で採尿した尿（例えば、随時尿；随時放出した尿、早朝尿；起床後第1回目の尿、夜間尿；20時から翌日8時までの蓄尿、昼間尿；8時から20時までの蓄尿、24時間尿；通常8時から翌日8時までの蓄尿、時間尿；2時間又は食後4時間等一定時間内に排泄された尿）に適当な保存剤（例えば、トルオール、キシロール、クロロホルム、フェノール、ホルマリン、濃塩酸及びアジ化ナトリウム等）を添加して試験管等に保存後、これを測定検体として定量する方法等が知られている（例えば、臨床検査マニュアル、1988年、文光堂）。更に通常は測定を効率的に実施するため、測定検体を凍結又は冷蔵保存して一定量の測定検体をまとめて定量する方法等が知られている（例えば、イムノアッセイ、1984年、ジェイエムシー、173～174頁）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来の方法においては、健康診断等多数の被検者から採尿し尿中の抗原を測定する場合、多数の尿に保存剤を添加する操作が必要であり、尿を試験管で冷蔵又は冷凍で輸送・保存する必要がある等コストが高くなるという問題があった。すなわち、本発明の目的は、尿中の抗原を簡易に定量する方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、特定の方法を用いることにより、尿中の抗原を簡易に定量できることを見だし本発明に到達した。すなわち、本発明は、尿担持担体から尿成分を抽出し、該抽出尿成分から尿中の抗原を免疫

測定により定量することを特徴とする尿中の抗原定量方法である。

【0005】

【発明実施の形態】本発明における抗原は、従来の臨床診断に用いられる尿中の抗原が使用でき、例えば、蛋白質、ホルモン及びホルモン代謝物等が挙げられる。蛋白質としては、例えば、アルブミン（糖尿病性腎症等の糸球体障害を示す疾患の診断）、2-マイクログロブリン（間質性腎炎及び慢性腎不全等の尿細管障害又は糸球体障害を示す疾患の診断）、I V型コラーゲン（糖尿病性腎症等の糸球体障害を示す疾患の診断）、アミラーゼ（膵臓、唾液腺及び卵巣・卵管等のの疾患並びにアミラーゼ産生腫瘍の診断）、並びに抗ウイルス抗体及び抗細菌抗体（ウイルス及び細菌感染の診断）等が挙げられる。抗ウイルス抗体としては、例えば、H I V、H B V及びH C V等のウイルスに対する抗体等が挙げられる。抗細菌抗体としては、例えば、ヘリコバクター・ピロリに対する抗体等が挙げられる。

【0006】ホルモン及びホルモン代謝物としては、例えば、H C G（妊娠及び絨毛性腫瘍等の診断）、メタネフリン（褐色細胞腫及び交感神経芽腫等の診断）、ノルメタネフリン（褐色細胞腫及び交感神経芽腫等の診断）、アルドステロン（高血圧の病態等の診断）、コルチゾール（副腎皮質機能等の診断）、エストリオール（卵巣機能及び排卵等の診断）及びC-ペプチド（糖尿病等の診断）等が挙げられる。これらのうち、アルブミン、2-マイクログロブリン、I V型コラーゲン、アミラーゼ、H C G及びC-ペプチドが好ましく、さらに好ましくはアルブミン、2-マイクログロブリン、I V型コラーゲン、H C G及びC-ペプチドである。

【0007】尿担持担体中の尿は、その採取方法等に制限はなく、従来の採取方法（例えば、臨床検査マニュアル、1988年、文光堂）で得た尿の一部を本発明に用いることが可能であるが、定量する尿中の抗原に応じて適宜採取方法を設定することが望ましく、例えば、日内変動の大きい抗原（例えば、C-ペプチド等）であれば蓄尿又は時間尿、日内変動の小さい抗原（例えば、2-マイクログロブリン及びI V型コラーゲン等）であれば随時尿を採取することが好ましい。利便性の観点から随時尿を採取することがさらに好ましい。

【0008】尿担持担体中の担体としては、尿を保持することが可能である限り、担体の材質、形状等は特に制限されないが、吸着による尿の保持が容易であり、抽出により尿成分が溶出し易い材質・形状であることが好ましく、吸着による保持が容易という観点から、吸収体であることがさらに好ましい。担体の材質としては、公知の天然高分子及び合成高分子等が使用でき、例えば、綿、羊毛、セルロース、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリウレタン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリエステル、エポキシ樹脂、フェノール樹

脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン、エポナイト、ゴム、ガラス、石英及びセラミックス等が挙げられる。これらの中で、天然高分子が好ましく、さらに好ましくはセルロース及び綿であり、特に好ましくはセルロースである。

【0009】担体としては、公知のものが使用でき、例えば、上記の材質等からなる濾紙、不織布、織布又はシート状発泡体等からなる吸収体が挙げられる。吸収体の孔径は、自由に設定選択できるが、平均孔径の範囲が1~100 μm が好ましく、より好ましくは2~80 μm 10

であり、特に好ましくは5~50 μm の範囲である。
【0010】濾紙としては、例えば、JIS P3801(1995年)又はTAPPI(Technical Association of the Pulp and Paper Industry)T205に規定される濾紙等が挙げられる。不織布としては、例えば、ポリオレフィン不織布、ニトロセルロース不織布、セルソールアセテート不織布、ポリエステル不織布、エポキシ不織布、ガラス不織布及びセラミックス不織布等が挙げられる。織布としては、例えば、綿布、羊毛布、 20

セルロース布、ポリオレフィン布、ニトロセルロース布、セルソールアセテート布、エポキシ布、ガラス布及びセラミックス布等が挙げられる。
【0011】シート状発泡体としては、例えば、発泡ポリスチレン、発泡ポリオレフィン、発泡ポリウレタン、発泡ポリエステル、発泡エポキシ樹脂、発泡ガラス及び発泡セラミックス等が挙げられる。これらの中で、単位体積又は単位面積あたりに吸収する尿の量が一定になりやすいという(定量精度向上)観点から、濾紙、不織布及びシート状発泡体が好ましく、さらに好ましくは濾紙 30

及び不織布、特に好ましくは濾紙、ポリオレフィン不織布、ニトロセルロース不織布、セルソールアセテート不織布、ポリエステル不織布、エポキシ不織布、ガラス不織布及びセラミックス不織布であり、最も好ましくは濾紙である。
【0012】濾紙、不織布、織布又はシート状発泡体等の厚さは、適宜選択することができるが、0.1~3.0mmが好ましく、さらに好ましくは0.2~1.0mm、特に好ましくは0.3~0.6mmである。濾紙、不織布、織布又はシート状発泡体等の大きさ(面積) 40

は、採尿、保管及び輸送時などの操作性を考慮して自由に設定できるが、1~200 cm^2 が好ましく、さらに好ましくは10~150 cm^2 、特に好ましく25~100 cm^2 である。
【0013】尿の担体への担持は、尿が保持できれば特に制限されず、担体と尿とを接触させることにより担体に尿を担持させることができる。担体と尿とを接触させる方法としては、例えば、尿に担体を浸漬する方法、担体に尿を滴下する方法等が挙げられる。これらのうち、簡便性及び乾燥(後述)し易さの観点から、担体に尿を 50

滴下する方法が好ましい。

【0014】尿に担体を浸漬する場合、尿の使用量は担体が浸漬できる量であり、担体の大きさに決定されるが、0.05~2mLが好ましく、さらに好ましくは0.1~1mL、特に好ましくは0.15~0.5mLである。担体に尿を滴下する場合、尿の使用量は担体の大きさに決定されるが、0.02~0.5mLが好ましく、さらに好ましくは0.05~0.3mL、特に好ましくは0.1~0.2mLである。

【0015】尿担持担体の尿担持部分を一定の大きさに切り取る場合(後述)、切取られる担体が保持できる量以上の尿を滴下すればよく、滴下する尿量を正確に制御する必要はない。例えば、ろ紙がワットマン社製BFC180(厚さ0.49mm)の場合、滴下した尿量が50 μL であれば尿を保持した部分の大きさは直径約12mmである。1滴の液量は約40~60 μL であるので、尿担持部分を直径6mmの円形に打ちぬく場合、必要な尿の量は1~2滴となる。

【0016】さらに、尿の安定性及び定量の再現性の観点から、尿を担体に保持させた後、乾燥させることが好ましく、担体に保持された尿の重量が10重量%以下(好ましくは5重量%以下)になるまで乾燥することがさらに好ましい。乾燥方法としては、例えば、減圧乾燥、冷凍減圧乾燥、微加熱乾燥及び単純乾燥(風乾)等が適用でき、これらのうち、減圧乾燥、冷凍減圧乾燥及び単純乾燥が好ましく、さらに好ましくは減圧乾燥及び単純乾燥であり、特に好ましくは単純乾燥である。

【0017】乾燥は、尿中の抗原の抗原性が変化しない条件で行うことが好ましく、40以下の温度で行うのがさらに好ましく、特に好ましくは10~30で行う。減圧する場合は、0.02~10Paが好ましく、さらに好ましくは0.05~2Pa、特に好ましくは0.1~1Paである。単純乾燥する場合の湿度は、特に制限はないが、10~90%RHが好ましく、さらに好ましくは40~80%RHである。乾燥時間は、担体の形状、保持した尿量により適宜設定できるが、担体が濾紙の場合、20分~1時間程度である。

【0018】尿保持担体を保存する場合、湿度は、80%RH以下が好ましく、さらに好ましくは10~60%RH、特に好ましくは20~40%RHであり、温度は、0~40が好ましく、さらに好ましくは2~30、特に好ましくは2~10である。なお、湿度80%RH以下を保てる状態(密閉下、乾燥剤存在の密閉下等)であれば郵便又は宅配便等により輸送することができる。

【0019】尿成分の抽出の前に、尿担持担体の尿担持部分を一定の大きさに切り取ってから行うことが好ましい。例えば、均一な吸収体に尿を滴下し、過剰な尿は周囲に拡散吸収させて乾燥した後、中心部を一定の形状に切り取ったものを抽出に用いる方法が好ましい。切り取

る方法としては、一定直径のパンチで打ちぬく方法及び予め入れた切取線（ミシン目等）に沿って切り出す方法等が適用できる。

【0020】尿担持担体から尿成分の抽出は、尿中の抗原の抗原性が変化しない限り特に制限なく行うことができ、例えば、抽出用溶液に尿担持担体を浸漬し、その上清を抽出液として用いることができる。抽出用溶液として、pHが中性領域の緩衝液が使用でき、例えば、pH6～8のグッド緩衝液及びpH6～8のリン酸緩衝液等が好ましく使用される。

【0021】また、抽出用溶液に、塩、界面活性剤、蛋白質及び抗原安定化剤等を添加することもできる。塩としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキッド付加物（例えば、ツイーン20及びツイーン40（ICIアメリカ社））等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。蛋白質としては、例えば、牛血清アルブミン及びカゼイン等が挙げられる。抗原安定化剤としては、例えば、EDTA等のキレート剤及びプロテアーゼインヒビター等が挙げられる。

【0022】定量再現性の観点から、担体に対する抽出用溶液の使用量及び抽出時間等の抽出条件を一定にする必要がある。抽出用溶液の使用量としては、0.05～5mLが好ましく、さらに好ましくは0.1～1mL、特に好ましくは0.2～0.5mLである。抽出時間としては、0.5～480分が好ましく、さらに好ましくは1～180分、特に好ましくは5～60分である。攪拌は、ボルテックスミキサーのような装置を用いて、容器を震動して行うことが好ましく、震動回数は100～2000rpmが好ましい。

【0023】例えば、尿担持担体から切り取った直径6mm（厚さ0.49mm）の濾紙（ワットマン社製BFC180）の場合、以下の条件等で抽出できる。抽出用溶液組成：塩化ナトリウム含有0.05モル/Lリン酸緩衝液（pH7.2）（塩化ナトリウムの含有量：緩衝液100mL当たり0.85g、以下同じ。）

【0024】抽出用溶液の使用量：200～300μL
抽出温度：室温（15～25℃）

抽出時間：20分～1時間（攪拌後の放置時間）

抽出操作：担体に抽出用溶液を加えボルテックスミキサーで攪拌後（500rpm、1分）、上記温度で上記時間放置する。再度攪拌（ボルテックスミキサーで500rpm、5秒）し、1分間静置し分散したろ紙繊維を沈降させた後、上清液を採取し、抗原測定のための検体（抽出液）として用いる。

【0025】上記抽出液中の抗原の定量方法は免疫測定法であれば、特に制限されず、従来公知の方法が使用できるが、抽出液中の抗原濃度が尿中の濃度より低いためより定量感度の高い測定法が望ましく、例えば、放射免

疫測定（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定（FIA）及び化学発光免疫測定法（CLIA）が好ましい。

【0026】放射免疫測定（RIA）としては、固相抗体とI125標識抗体を用いた2部位サンドイッチ測定法等が挙げられ、多数の測定試薬キットが市販されている。酵素免疫測定法（EIA）としては、固相抗体と酵素標識抗体を用いた2部位サンドイッチ測定法等が挙げられ、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等を用いた種々の測定試薬キットが市販されている。

【0027】蛍光免疫測定（FIA）としては、固相抗体とユーロピウム標識抗体を用いた2部位サンドイッチ測定法等が挙げられる。化学発光免疫測定法（CLIA）としては、固相抗体とアクリジニウムエステル標識抗体を用いた2部位サンドイッチ測定法等が挙げられ、種々の測定試薬キットが市販されている。これらの免疫学的測定法の中で、好ましいのは酵素免疫測定法（EIA）であり、さらに好ましくは化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）である。

【0028】抽出液中の抗原濃度から、尿中の抗原濃度を求める方法は、種々の方法が適用でき、例えば、

（1）抗原濃度既知の尿を担持した尿担持担体を用いて作成した検量線を用いる方法、及び（2）抗原濃度既知の抽出液を用いて作成した検量線と抗原の抽出率とを用いる方法等が挙げられる。

【0029】（2）の方法において、抽出率は、既知濃度の抗原を含む尿を用いて尿担持担体を作成し、これから抽出された抽出液中の抗原の含有量を定量して抽出液の抗原の濃度を求め、次式から求められる。抽出率は、以上の操作を少なくとも2回（好ましくは少なくとも3回）行い、それらの平均値を用いることが好ましい。
抽出率 = (抽出液の抗原の濃度) / (尿の抗原の濃度)
検体の尿中の抗原濃度は、検体から調製される抽出液中の抗原濃度を抽出率で除すことで求めることが出来るが、その際、尿担持担体の作成及び抽出の条件は抽出率を求めた時と同じ条件である必要がある。

【0030】なお、本発明で定量される抗原は、尿中に極低濃度で存在しているため、濃度の変動による抽出率の変動は極わずかであり、例えば、2-マイクログロブリンの場合、2～5,000μg/Lの範囲で同一の抽出率が使用できる。5mg/Lを越える高濃度の検体の場合、求めた抽出率と実際の抽出率とが異なる可能性はあるが、臨床的な判断に影響することはない（すなわち、2-マイクログロブリンの場合、健常人の随時尿中の濃度は16～520μg/Lの範囲であり、5,000μg/Lを越えていれば腎機能の障害があると判断される）。2-マイクログロブリン以外の抗原についても同様である。

【0031】（1）及び（2）の方法の何れの場合も、

既知濃度の抗原を含む尿又は抽出液は、濃度の異なる2種以上を用いることが好ましい。既知濃度の抗原を含む尿又は抽出液の濃度は、測定する抗原の種類により自由に設定できるが、通常は健康人の範囲（正常域）と疾患を有する可能性が高い範囲との境界濃度（カットオフ）を明確に測定できる濃度で設定することが好ましく、例えば、2マイクログロブリンの場合、健康人の随時尿中の濃度は16～520μg/Lの範囲であるため、（1）の方法の場合、既知濃度の抗原を含む尿は、少なくとも16～520μg/Lの濃度を含む3濃度（例えば、10μg/L、200μg/mL及び600μg/L）設定することが好ましい。

【0032】また、（2）の方法の場合は、抽出液中の抗原の濃度であるので、16～520μg/Lを元に抽出率を考慮した2濃度（例えば、抽出率が0.02の場合、尿中濃度16～520μg/Lは抽出液中濃度0.32～10.4μg/Lに相当するので、0.2μg/L、4μg/L及び12μg/L）に設定することが好ましい。

【0033】（1）の方法では、検量線の作成に抽出操作から行う必要がある点及び検量線作成用の尿は長期間保存できないので測定の際に作成する煩わしさがあるが、抽出条件が変動しても正確な測定ができるという長所がある。一方、（2）の方法は、あらかじめ抽出率を求め、抽出操作等の条件を一定にすれば多量の検体を正確かつ簡便に測定することができる。（1）及び（2）の方法のうち、簡便さの観点から、（2）の方法が好ましい。

【0034】本発明の定量方法は、被検者自身で採尿、担体に保持・乾燥、輸送（例えば、持参、郵便及び宅配等）することができ、健康診断等のように多数の検体を広い地域から集めて定量する場合に最適である。又、健康診断のほか、遠隔地の患者に対する腎疾患等の治療の経過観察等においても、適用できる。

【0035】

【実施例】以下、実施例により本発明をさら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

本実施例は、尿担持担体を長期間保存しても正確に抗原（2-マイクログロブリン）を定量できることを示したものである。

1. 採尿及び尿担持担体（尿乾燥濾紙）の作成

ボランティア6名（被検者A～F）から随時尿を紙コップに採取し、ディスプレイ微量ピペット（相互理化学硝子製作所製、品番4858-08）を用いて尿200μLを10枚の採尿用濾紙（品番BFC180、ワットマン株式会社製）にそれぞれ滴下し吸収させた。（ここまでの操作はボランティア自身が実施した。）次いで、室内（25±1、65±5%RH）で風乾し（風乾時間5、20、40、60又は120分）、尿担持担*50

*体（尿乾燥濾紙）を得た。

【0036】風乾時間毎に尿担持担体（尿乾燥濾紙）の重量を計測し、初期尿重量（濾紙重量を除いた値）に対する比を乾燥度を求めた（尿担持担体2枚の平均値）。この乾燥度を表1中に示した。次いで、尿担持担体（尿乾燥濾紙）を表1記載の保存条件で保存した（保存日数0、3、5、10、15日）。

【0037】

【表1】

条件No.	乾燥時間 (分)	乾燥度 (%)	保存条件	
			温度 (°C)	湿度 (%RH)
1a	5	78	4±2	35±5
1b	5	78	25±2	55±5
2a	20	47	4±2	35±5
2b	20	47	25±2	55±5
3a	40	34	4±2	35±5
3b	40	34	25±2	55±5
4a	60	28	4±2	35±5
4b	60	28	25±2	55±5
5a	120	26	4±2	35±5
5b	120	26	25±2	55±5

【0038】2. 抽出操作

以下の操作は温度20～25の室内で実施した。表1の条件で保存した各尿担持担体（尿乾燥濾紙）の尿担持部分の中心部を、直径6mmの1穴パンチ（事務用として市販されている物）で打ち抜いて濾紙片を得た。試験管に打ち抜いた濾紙片及び塩化ナトリウム含有0.05モル/Lリン酸緩衝液（pH7.2）（抽出用溶液）250μLを加え、30秒間攪拌（ボルテックスミキサーで500rpm）した後、30分間放置した。その後、30秒間同様に攪拌した後1分間静置し、上清を分取して抽出液を調製し、これを抗原の定量に供した。

【0039】3. 抽出液中の抗原（2-マイクログロブリン）の定量

定量用試薬としては、臨床検査薬として和光純薬工業株式会社より発売されている「スフィアライト 2-マイクログロブリン」を用いた。抽出液中の抗原量を決定するための標準溶液は、和光純薬工業株式会社より発売されている「スフィアライト 2-マイクログロブリンコントロールセット」を用いた。定量装置としては、オリンパス光学工業株式会社製のSphereLight180を用いた。

【0040】本試薬と装置を用いることで化学発光酵素免疫測定法により、2-マイクログロブリンの定量ができる。使用する定量用試薬が血清、血漿及び尿中の抗原濃度を測定するための臨床検査薬であり、通常測定に使用する検体量は10μLに設定されおり、反応時間は

トータル約15分である。抽出液中の抗原の定量の場合、血清、血漿及び尿中より低濃度であるため、抽出液は50 μ L使用した。

【0041】4. 定量結果

定量結果及び次式で求めた安定度を表2～11に示した。

$$(\text{安定度}) = (\text{所定保存期間後の定量値}) \times 100 / (\text{初期定量値})$$

なお、初期定量値は、尿担持担体を作成後、直ちに抽出用溶液に尿担持担体を投入し、抽出操作を開始して定量*10

*したものであり、保存期間0日として示した。各条件で作成、保存した尿担持担体（尿乾燥濾紙）から得た抽出液中の抗原（抗原：2-マイクログロブリン）は、乾燥時間が5分の場合を除き、保存温度4では15日、25では5日間、安定度90%以上の値を示した。従って、乾燥時間が20分以上であれば、尿担持担体（尿乾燥濾紙）中の抗原（抗原：2-マイクログロブリン）は安定であることが判った。

【0042】

【表2】

条件No: 1a

被 検 者	β 2-マイクログロブリン濃度(μ g/L)					安 定 度 (%)			
	保 存 期 間 (日)					保 存 期 間 (日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.484	0.468	0.463	0.424	0.411	97	96	90	85
B	1.624	1.560	1.470	1.380	1.110	96	91	85	69
C	3.285	3.150	2.655	2.880	2.655	96	81	88	81
D	1.088	1.054	1.003	0.952	0.799	97	92	88	73
E	0.750	0.732	0.726	0.696	0.666	98	97	93	89
F	4.883	4.702	4.431	4.159	3.346	96	91	85	69
平 均						97	91	88	78

【0043】

* * 【表3】

条件No: 1b

被 検 者	β 2-マイクログロブリン濃度(μ g/L)					安 定 度 (%)			
	保 存 期 間 (日)					保 存 期 間 (日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.489	0.442	0.395	0.234	0.203	90	81	48	41
B	1.590	1.260	1.089	0.780	0.540	79	68	49	34
C	3.330	2.925	2.520	1.125	0.855	88	76	34	26
D	1.071	0.884	0.787	0.612	0.476	83	73	57	44
E	0.756	0.702	0.648	0.462	0.426	93	86	61	56
F	4.792	3.798	3.282	2.351	1.628	79	68	49	34
平 均						85	75	50	39

【0044】

【表4】

条件No: 2a

被 検 者	β 2-マイクログロブリン濃度(μ g/L)					安 定 度 (%)			
	保 存 期 間 (日)					保 存 期 間 (日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.478	0.484	0.468	0.460	0.463	101	98	99	97
B	1.620	1.590	1.560	1.500	1.470	98	96	93	91
C	3.240	3.285	3.150	3.195	3.105	101	97	99	96
D	1.088	1.071	1.054	1.020	1.003	98	97	94	92
E	0.744	0.750	0.732	0.738	0.726	101	98	99	98
F	4.883	4.702	4.521	4.431	0.067	98	96	93	91
平 均						100	97	96	94

【0045】

【表5】

条件No: 2b

被 検 者	β 2-マイクログロブリン濃度(μ g/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.484	0.463	0.437	0.406	0.374	96	90	84	77
B	1.590	1.500	1.440	1.290	1.170	94	91	81	74
C	3.285	3.105	2.955	2.805	2.340	95	88	79	71
D	1.071	1.020	0.986	0.901	0.833	95	92	84	78
E	0.750	0.726	0.696	0.660	0.624	97	93	88	83
F	4.792	4.521	4.340	3.888	3.526	94	91	81	74
	平均					95	91	83	76

【0046】

* * 【表6】

条件No: 3a

被 検 者	β 2-マイクログロブリン濃度(μ g/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.489	0.484	0.484	0.460	0.452	99	99	97	98
B	1.560	1.590	1.551	1.530	1.500	102	100	98	96
C	3.330	3.285	3.285	3.195	3.240	99	99	96	97
D	1.054	1.071	1.037	1.020	1.003	102	98	97	95
E	0.756	0.750	0.750	0.738	0.744	99	99	98	98
F	4.702	4.792	4.702	4.611	4.521	102	100	98	96
	平均					101	99	97	97

【0047】

【表7】

条件No: 3b

被 検 者	β 2-マイクログロブリン濃度(μ g/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.478	0.463	0.447	0.426	0.406	97	93	89	85
B	1.620	1.560	1.500	1.470	1.410	96	93	91	87
C	3.240	3.105	2.970	2.790	2.610	96	92	86	81
D	1.088	1.054	1.020	1.003	0.969	97	94	92	89
E	0.744	0.726	0.708	0.684	0.660	98	95	92	89
F	4.883	4.702	4.521	4.431	4.250	96	93	91	87
	平均					97	93	90	86

【0048】

【表8】

条件No: 4a

被 検 者	β2-マイクログロブリン濃度(μg/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.484	0.489	0.484	0.473	0.463	101	100	98	96
B	1.590	1.590	1.560	1.530	1.470	100	98	96	92
C	3.285	3.330	3.285	3.195	3.105	101	100	97	95
D	1.071	1.071	1.054	1.037	1.003	100	98	97	94
E	0.750	0.756	0.750	0.738	0.726	101	100	98	97
F	4.792	4.792	4.702	4.611	4.431	100	98	96	92
平均						101	99	97	94

【0049】

* * 【表9】

条件No: 4b

被 検 者	β2-マイクログロブリン濃度(μg/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.484	0.463	0.452	0.442	0.421	96	94	91	87
B	1.560	1.500	1.440	1.410	1.350	96	92	90	87
C	3.285	3.105	3.015	2.925	2.745	95	92	89	84
D	1.054	1.020	0.986	0.969	2.745	97	94	92	89
E	0.750	0.726	0.714	0.702	0.678	97	95	94	90
F	4.702	4.521	4.340	4.250	4.069	96	92	90	87
平均						96	93	91	87

【0050】

【表10】

条件No: 5a

被 検 者	β2-マイクログロブリン濃度(μg/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.478	0.484	0.478	0.484	0.468	101	100	101	98
B	1.590	1.590	1.560	1.500	1.530	100	98	94	96
C	3.240	3.285	3.240	3.285	3.150	101	100	101	97
D	1.071	1.071	1.054	1.020	1.037	100	98	95	97
E	0.744	0.750	0.744	0.750	0.732	101	100	101	98
F	4.792	4.792	4.702	4.521	4.611	100	98	94	96
平均						101	99	98	97

【0051】

【表11】

条件No: 5b

被 検 者	β2-マイグログロブリン濃度(μg/L)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.489	0.468	0.463	0.447	0.426	96	95	91	87
B	1.590	1.500	1.500	1.440	1.440	94	94	91	91
C	3.330	3.150	3.105	2.970	3.240	95	93	89	97
D	1.071	1.020	1.020	0.986	0.986	95	95	92	92
E	0.756	0.732	0.726	0.708	0.684	97	96	94	90
F	4.792	4.521	4.521	4.340	4.340	94	94	91	91
	平均					95	95	91	91

【0052】実施例2

本実施例は、尿担持担体を長期間保存しても正確に抗原(C-ペプチド)を定量できることを場合で示したものである。

1. 採尿及び尿担持担体(尿乾燥濾紙)の作成

実施例1と同様にして、ボランティア6名(被検者A~F)から尿担持担体(尿乾燥濾紙)を調製し、表1記載の保存条件で保存した(保存日数0, 3, 7, 14, 28日)。

2. 抽出操作

実施例1と同様にして、抽出液を調製し、これを抗原の定量に供した。

【0053】3. 抽出液中の抗原(C-ペプチド)の定量

測定試薬は臨床検査薬としては、和光純薬工業株式会社より発売されている「スフィアライト C-ペプチド」を用いた。抽出液中の抗原量を決定するための標準溶液は、和光純薬工業株式会社より発売されている「スフィアライト C-ペプチドコントロールセット」を用いた。定量装置としては、オリンパス光学工業株式会社製のSphereLight180を用いた。

【0054】本試薬と装置を用いることで化学発光酵素*

条件No: 1a

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.239	0.226	0.222	0.202	0.181	95	93	85	76
B	0.632	0.598	0.545	0.493	0.336	94	86	78	53
C	1.380	1.314	1.292	1.183	1.073	95	94	86	78
D	2.040	1.920	1.740	1.560	1.020	94	85	76	50
E	0.467	0.450	0.444	0.415	0.386	96	95	89	83
F	1.628	1.531	1.384	1.238	0.799	94	85	76	49
	平均					95	90	82	65

【0057】

【表13】

*免疫測定法により、C-ペプチドの定量ができる。使用する定量用試薬が血清、血漿及び尿中の抗原濃度を測定するための臨床検査薬であり、通常測定に使用する検体量は40μLに設定されており、反応時間はトータル約15分である。尿中の抗原の測定に際しては検体を10倍希釈して測定を実施する設定となっている。抽出液中の抗原の定量の場合、尿中より低濃度であるため、抽出液をそのまま測定した。

【0055】4. 定量結果

- 10 定量結果及び実施例1と同様にして求めた安定度を表12~21に示した。なお、初期定量値は、尿担持担体を作成後、直ちに抽出用溶液に尿担持担体を投入し、抽出操作を開始して定量したものであり、保存期間0日として示した。各条件で作成、保存した尿担持担体(尿乾燥濾紙)から得た抽出液中の抗原(抗原:C-ペプチド)は、乾燥時間が5分の場合を除き、保存温度4では15日、25では5日間、安定度90%以上の値を示した。従って、乾燥時間が20分以上であれば、尿担持担体(尿乾燥濾紙)中の抗原(抗原:C-ペプチド)は安定であることが判った。

【0056】

【表12】

条件No: 1b

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.239	0.202	0.169	0.083	0.058	85	71	35	24
B	0.615	0.423	0.319	0.145	0.179	69	52	24	29
C	1.380	1.183	1.007	0.548	0.416	86	73	40	30
D	1.980	1.320	0.960	0.360	0.480	67	48	18	24
E	0.467	0.450	0.444	0.415	0.386	89	79	53	46
F	1.579	1.043	0.750	0.263	0.360	66	48	17	23
平均						77	62	31	29

【0058】

* * 【表14】

条件No: 2a

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.235	0.239	0.226	0.230	0.222	102	96	98	95
B	0.632	0.615	0.598	0.580	0.580	97	94	92	92
C	1.358	1.380	1.314	1.336	1.292	102	97	98	95
D	2.040	1.980	1.920	1.860	1.860	97	94	91	91
E	0.461	0.467	0.450	0.455	0.444	101	97	99	96
F	1.628	1.579	1.531	1.482	1.482	97	94	91	91
平均						99	95	95	93

【0059】

【表15】

条件No: 2b

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.239	0.222	0.214	0.189	0.161	93	90	79	67
B	0.615	0.580	0.563	0.528	0.458	94	92	86	75
C	1.380	1.292	1.248	1.117	0.964	94	90	81	70
D	1.980	1.860	1.800	1.680	1.440	94	91	85	73
E	0.467	0.444	0.432	0.398	0.357	95	93	85	77
F	1.579	1.482	1.433	1.335	1.140	94	91	85	72
平均						94	91	84	72

【0060】

【表16】

条件No: 3a

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安 定 度 (%)			
	保 存 期 間 (日)					保 存 期 間 (日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.239	0.239	0.239	0.230	0.235	100	100	97	98
B	0.598	0.615	0.598	0.580	0.563	103	100	97	94
C	1.380	1.380	1.380	1.336	1.358	100	100	97	98
D	1.920	1.980	1.920	1.860	1.800	103	100	97	94
E	0.467	0.467	0.467	0.455	0.461	100	100	98	99
F	1.531	1.579	1.531	1.482	1.433	103	100	97	94
平 均						101	100	97	96

【0061】

* * 【表17】

条件No: 3b

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安 定 度 (%)			
	保 存 期 間 (日)					保 存 期 間 (日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.235	0.222	0.214	0.193	0.177	95	91	82	75
B	0.632	0.598	0.580	0.545	0.510	94	92	86	81
C	1.358	1.292	1.248	1.139	1.051	95	92	84	77
D	2.040	1.920	1.860	1.740	1.620	94	91	85	79
E	0.461	0.444	0.432	0.403	0.380	96	94	87	82
F	1.628	1.531	1.482	1.384	1.287	94	91	85	79
平 均						95	92	85	79

【0062】

【表18】

条件No: 4a

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安 定 度 (%)			
	保 存 期 間 (日)					保 存 期 間 (日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.239	0.243	0.239	0.230	0.222	102	100	97	93
B	0.615	0.615	0.598	0.580	0.560	100	97	94	91
C	1.380	1.402	1.380	1.336	1.292	102	100	97	94
D	1.980	1.980	1.920	1.860	1.740	100	97	94	88
E	0.467	0.473	0.467	0.455	0.444	101	100	98	95
F	1.579	1.579	1.531	1.482	1.414	100	97	94	90
平 均						101	99	96	92

【0063】

【表19】

条件No: 4b

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.239	0.222	0.214	0.206	0.189	93	90	86	79
B	0.598	0.563	0.545	0.510	0.476	94	91	85	80
C	1.380	1.292	1.248	1.205	1.117	94	90	87	81
D	1.920	1.800	1.740	1.620	1.500	94	91	84	78
E	0.467	0.444	0.432	0.421	0.398	95	93	90	85
F	1.531	1.433	1.384	1.287	1.189	94	90	84	78
平均						94	91	86	80

【0064】

* * 【表20】

条件No: 5a

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.235	0.239	0.235	0.239	0.226	102	100	102	96
B	0.615	0.615	0.598	0.563	0.580	100	97	92	94
C	1.358	1.380	1.358	1.380	1.314	102	100	102	97
D	1.980	1.980	1.920	1.800	1.860	100	97	91	94
E	0.461	0.467	0.461	0.467	0.450	101	100	101	97
F	1.579	1.579	1.531	1.433	1.482	100	97	91	94
平均						101	99	97	95

【0065】

【表21】

条件No: 5b

被 検 者	C-ペプチド濃度(ng/mL)					安定度(%)			
	保存期間(日)					保存期間(日)			
	0	3	5	10	15	3	5	10	15
A	0.243	0.226	0.222	0.210	0.193	93	92	86	80
B	0.615	0.580	0.563	0.545	0.528	94	92	89	86
C	1.402	1.314	1.292	1.226	1.139	94	92	88	81
D	1.980	1.860	1.800	1.740	1.680	94	91	88	85
E	0.473	0.450	0.444	0.427	0.403	95	94	90	85
F	1.579	1.482	1.433	1.384	1.335	94	91	88	85
平均						94	92	88	84

【0066】実施例3

本実施例は、本発明の方法によって求めた 2-マイクログロブリン濃度と従来の方法により求めた 2-マイクログロブリン濃度とが良好な相関関係にあることを示すものである。

【0067】1. 標準 2-マイクログロブリン添加尿担持担体の作成

ボランティア5名(被検者G~K)より尿1.8mLを採取し、0.9mL×2本に分割して、その一方に「スフィアライト 2-マイクログロブリンコントロールセット」の標準 2-マイクログロブリン溶液(5mg/L=5,000µg/L)を100µL加えて、標準

2-マイクログロブリン添加尿を調製した。濾紙(BFC180、ワットマン株式会社製)に標準 2-マイクログロブリン添加尿を100µL滴下し、室温(25±2)で1時間乾燥し、標準 2-マイクログロブリン添加尿担持担体を作成した。同様に、他一方の尿0.9mLに標準 2-マイクログロブリン溶液(0mg/L)を100µL加えて濾紙に滴下・乾燥し、尿担持担体を作成した。

【0068】2. 抽出及び測定

実施例1記載の抽出方法と同様に、標準 2-マイクログロブリン添加尿担持担体及び尿担持担体からそれぞれ抽出液を調製して、抽出液中の 2-マイクロ

グロブリン濃度を測定した。それらの結果を表22に示した。 【0069】

【表22】

被検者	抽出液中のβ2-マイクログロブリン濃度(μg/L)		B-A	抽出率 (B-A) 500
	尿担持担体① (A)	尿担持担体② (B)		
G	0.486	10.481	9.995	0.0200
H	7.543	17.457	9.914	0.0198
I	1.428	11.594	10.166	0.0203
J	3.034	12.901	9.867	0.0197
K	4.265	14.128	9.863	0.0197
平均	3.351	13.312	9.961	0.0199

【0070】3. 抽出率の設定

表22に示した測定値から次式から抽出率を算出した。それらの結果を表22に示した。5名の尿での抽出率の平均値を、本条件で作成及び抽出した場合の抽出率(0.0199)として設定した。

$$\text{抽出率} = (B - A) / C$$

A: 尿担持担体 から調製した抽出液中の 2-マイクログロブリン濃度

B: 標準 2-マイクログロブリン(5,000 μg/L) 添加尿担持担体から調製した抽出液中の 2-マイクログロブリン濃度

C: 500 μg/L (添加した 2-マイクログロブリン量)

【0071】4. 採尿

腎機能障害の患者を含め20名より採尿を実施した。採尿は実施例1記載方法(紙コップに随時尿を採取)で実施した。

5. 尿担持担体(尿乾燥濾紙)の作成

実施例1記載の方法と同様にして、尿担持担体(尿乾燥濾紙)を作成した。乾燥時間は、抽出率設定の場合と同じ1時間とした。

【0072】6. 抽出及び定量

尿担持担体について、抽出率設定の場合と同じ方法で抽

出及び 2-マイクログロブリン濃度測定を実施した。一方、採取した尿については、実施例1記載の「スフィアライト 2-マイクログロブリン」で、測定試薬に添付された説明書通りの条件で測定を実施した(検体量 10 μL)。

【0073】7. 尿中の 2-マイクログロブリン濃度の決定

尿担持担体から調製した抽出液中の 2-マイクログロブリン濃度を抽出率(0.0199)で除し、尿中の 2-マイクログロブリン濃度を求めた。従来の方で求めた尿中の 2-マイクログロブリン濃度と本発明の方法で求めた尿中の 2-マイクログロブリン濃度を表23に示した。また、これらの値を用いて本発明の方法による 2-マイクログロブリン濃度と従来法による 2-マイクログロブリン濃度との相関図を図1に示した。図1から判るように、従来法での血清中の 2-マイクログロブリン濃度と本発明の方法による尿中 2-マイクログロブリン濃度は、良好な相関性を示した。図1中、式は相関式(X:従来法での 2-マイクログロブリン濃度、Y:本発明の方法での 2-マイクログロブリン濃度)、Rは相関係数を示すものである。

【0074】

【表23】

単位： $\mu\text{g/L}$

被検者	従来法による $\beta 2$ -マイクロ グロブリン濃度	本発明の定量方法	
		抽出液中の $\beta 2$ -マイ クログロブリン濃度	尿中の $\beta 2$ -マイク ログロブリン濃度
1	33.3	0.781	39.25
2	25.8	0.433	21.76
3	325.7	6.271	315.13
4	190.7	3.473	174.52
5	463.0	9.310	467.84
6	34.8	0.723	36.33
7	52.3	0.946	47.54
8	45.7	0.913	45.89
9	17.4	0.346	17.39
10	81.5	1.702	85.53
11	37.4	0.741	37.25
12	62.5	1.230	61.81
13	46.8	0.849	42.67
14	18.4	0.387	19.45
15	219.6	4.132	207.64
16	111.2	2.271	114.14
17	69.4	1.428	71.76
18	82.5	1.610	80.90
19	41.2	0.820	41.23
20	32.4	0.658	33.07

【0075】

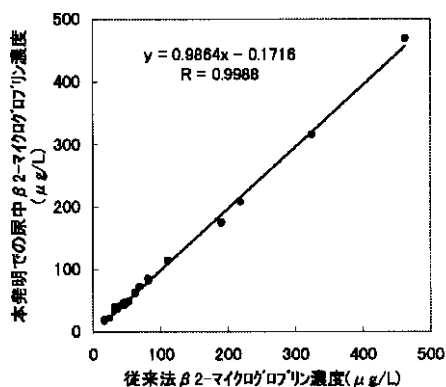
【発明の効果】本発明の尿中の抗原の定量方法によると、臨床診断に用いられる尿中の抗原を極めて簡易に定量することができる。さらに、被検者自身で採尿及び保存検体（尿乾燥濾紙）を調製することができるので採尿のための熟練者等が不要であり、被検者が採尿のため病院等に出向く必要もないという簡便性も併せもつものである。また、尿担持担体は、簡単に輸送することができるので、多数の検体を一ヶ所に集めて測定することがで

き輸送及び測定のコストを低減させることができる等の効果がある。従って、本発明の定量方法は、健康診断等の多数の検体を広い地域から集めて測定する場合に最適である。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来の方法による尿中の $\beta 2$ -マイクログロブリン濃度と本発明の方法による尿中の $\beta 2$ -マイクログロブリン濃度との相関を表すグラフである。

【図1】



专利名称(译)	用于定量尿液中抗原的方法		
公开(公告)号	JP2002277463A	公开(公告)日	2002-09-25
申请号	JP2001073021	申请日	2001-03-14
[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		
[标]发明人	國近誠		
发明人	國近 誠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/493		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/493.A		
F-TERM分类号	2G045/AA16 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA38 2G045/FB03		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种易于定量用于临床诊断的尿液中抗原的方法。
一种定量尿液中抗原的方法，包括从载尿载体中提取尿液成分，并从提取的尿液成分中定量尿液中的抗原。

