

(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 - 365279

(P2002 - 365279A)

(43)公開日 平成14年12月18日(2002.12.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	B 2 G 0 4 5
33/53		33/53	S
33/577		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 数)

(21)出願番号 特願2001 - 170803(P2001 - 170803)

(22)出願日 平成13年6月6日(2001.6.6)

(71)出願人 390037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(72)発明者 宮崎 修

茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬

品株式会社診断薬研究所内

(72)発明者 中村 靖

茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬

品株式会社診断薬研究所内

(74)代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P r e 1 - H D L測定用血液検体

(57)【要約】

【解決手段】 単糖類、2糖類又はグリセロールを25～80重量%含有するP r e 1 - H D L測定用血液検体。

【効果】 本発明の血液検体を用いれば、冷所保存後又は凍結保存後に測定してもP r e 1 - H D L濃度が測定できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単糖類、2糖類又はグリセロールを25～80重量%含有するPre 1-HDL測定用血液検体。

【請求項2】 請求項1記載の血液検体に抗Pre 1-HDL抗体を反応させることを特徴とするPre 1-HDLの免疫学的測定法。

【請求項3】 抗Pre 1-HDL抗体が、抗Pre 1-HDLモノクローナル抗体である請求項2記載の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、保存安定性の高いPre 1-HDL測定用血液検体及び当該検体を使用したPre 1-HDLの免疫学的測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】アポA-IはHDLを構成する主なアポ蛋白質であり、HDLの末梢細胞から肝臓へのコレステロールを逆転送する機能において中心的な役割を果たしているものである。(Philips M. C. et al. Biochem. Biophys. Acta, 906:p. 223(1987))。このことから、動脈硬化症の診断にアポA-Iを測定することが行われている。

【0003】近年、アポリポ蛋白質A-II(以下、「アポA-II」という)を持たないアポA-I含有HDL(石塚ら:医学と薬学、39巻5号、1041頁、1988)が、アポA-I及びアポA-II含有HDLより細胞からのコレステロール引き抜き作用が強いことや、脂質とは結合せずに存在するアポA-Iや小粒子で脂質含量の少ないPre 1-HDL(T. Miida, et al. Biochemistry, 29:p. 10469(1990))に存在するアポA-Iが細胞からのコレステロールの逆転送系において重要な役割を演じていることが判明したことから、これら特定のアポA-Iを測定することが重要となってきた。アポA-IIを持たないアポA-I含有HDLのうち、Pre 1-HDLは、細胞表面との特異的な相互作用を介して末梢細胞からコレステロールを引き抜き(Fielding, C. et al, Lipid Res., 36:p211-228(1995))、その作用はHDLよりも効率的であることから、特に注目されている。そしてPre 1-HDLに対する抗体を用いるPre 1-HDLの免疫学的測定法も開発されている(特開2000-239300)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、採血後の血液中におけるPre 1-HDLは非常に不安定で、血液検体を通常の冷所保存条件である4℃や、室温で保存すると、Pre 1-HDL濃度は、採血直後の測定値に比べて1日後で30%程度、4日後で50%程度高値になってしまうという問題があることが判明した。また、このような保存安定性を防止する手段として

検体の凍結保存がある。しかし、凍結保存後に融解して測定すると、この測定値もまた採血時の値に比べて高値となることが判明した。従って、本発明の目的はPre 1-HDL測定用の血液検体の安定化手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者は、採血後の血液、血漿又は血清検体中のPre 1-HDLの安定化を図るべく、種々検討した結果、血液検体に25～80重量%となるように単糖類、2糖類又はグリセロールを添加すれば、4℃で5日間経過後も検体中のPre 1-HDL濃度はほとんど変化せず、また凍結融解後の検体中のPre 1-HDL濃度もほとんど変化せず、安定性の高いPre 1-HDL測定用血液検体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、単糖類、2糖類又はグリセロールを25～80重量%含有するPre 1-HDL測定用血液検体を提供するものである。また本発明は、当該Pre 1-HDL測定用血液検体に抗Pre 1-HDL抗体を反応させることを特徴とするPre 1-HDLの免疫学的測定法を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明において単糖類、2糖類及びグリセロールは、血液検体中のPre 1-HDLの安定化剤として作用するものであり、単糖類としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース等が挙げられる。2糖類としては、サッカロース、マルトース、ラクトース等が挙げられる。これらのうちサッカロース及びグリセロールがより好ましく、サッカロースが特に好ましい。

【0008】これら安定化剤の検体中の濃度は、安定化作用の点から25～80重量%である必要があるが、30～80重量%、特に30～70重量%が好ましい。25重量%未満では安定化作用がない。

【0009】検体としては、全血、血漿、血清のいずれも挙げられるが、血漿が好ましい。また、検体には、血液凝固防止の目的で、クエン酸(好ましくは0.1～1.0%)、EDTA(好ましくは0.05～1.0mM)等が含まれていてもよい。

【0010】本発明の血液検体は、例えば血漿の場合には、患者又は被検者からEDTA採血管等を用いて採血し、冷却後遠心分離して血漿を得た後、これに、濃度が25～80重量%になるように単糖類、2糖類若しくはグリセロール又はこれらの水溶液を添加することにより調製できる。

【0011】かくして得られた本発明の血液検体はPre 1-HDLが安定化されているので、5日間程度まで冷所保存(通常2～10℃)した後に抗Pre 1-HDL抗体を用いて免疫測定しても安定したPre 1-

- HDL濃度の測定が可能である。

【0012】本発明血液検体に抗Pre 1-HDL抗体を反応させてPre 1-HDLを測定するには、通常の免疫学的測定法、通常の競合法、サンドイッチ法によるRIA又はEIA等が挙げられる。これらの方法の実施にあたっては、抗Pre 1-HDL抗体の標識体を用いることもできる。ここで標識物質としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、 β -ガラクトオキシダーゼ等の酵素；¹²⁵I、¹³¹I、トリチウム等の放射性物質が挙げられる。また、抗体を固相化するための単体としては、各種プラスチックウェル、各種プラスチックビーズ等が挙げられる。

【0013】抗Pre 1-HDL抗体としてはポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体を用いるのが好ましく、当該モノクローナル抗体としては特開2000-239300記載のモノクローナル抗体55201が特に好ましい。

【0014】例えば、ELISA法で測定する場合には、精製したアポA-Iを標準品として次のような方法で定量することができる。すなわち、抗Pre 1-HDLモノクローナル抗体を固相化したELISAプレートに、希釈した試料を添加し反応させた後、酵素標識した抗アポA-Iポリクローナル抗体を反応させ、発色後吸光度の変化から試料中に存在するPre 1-HDLを定量する方法が挙げられる。

【0015】なお、これらの測定は、通常の免疫学的測定法と同様に0~40℃のいずれの温度で行うこともできる。

【0016】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0017】実施例1

(1) EDTA (4 mM) 採血管を用いて採血した血液を氷冷した後、3000 rpm、15分遠心分離して血漿を得た。氷冷下血漿0.1 mLに表1の濃度になるようにサッカロース水溶液2 mLを加え、Pre 1-HDL測定用血漿検体を得た。

【0018】(2) 得られた検体を用いて、採血当日、4℃に1日保存後、及び4℃に5日間保存後のPre 1-HDL濃度を測定した。また、サッカロースを添加しない血漿についても同様にしてPre 1-HDL濃度を測定した。すなわち、特開2000-239300の実施例1で得たモノクローナル抗体55201を20 mMリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.2) で3 µg/mLの濃度に調整後、96穴ELISAプレート(ヌンク社製)に50 µL/ウェル加え、4℃で一晩インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄後、ブロッキング液(1%BSA-PBS)を100 µL/ウェル加え、1時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、ブロッキ

ング液にて希釈した前記検体又は精製アポA-Iを50 µL/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。ブロッキング液で3回洗浄した後、アポA-Iを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-I抗体を過ヨウ素酸法にてペルオキシダーゼ標識したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗アポA-I抗体を50 µL/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。同様にブロッキング液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液を50 µL/ウェル加えた。10分後、1.5 N硫酸を50 µL/ウェル加え、492 nmにおける吸光度を測定し、精製アポA-Iを標準品として、各検体中のPre 1-HDL量を算出した。

【0019】その結果、表1に示すように、サッカロースを添加しない血漿、4.8重量%及び9.5重量%のサッカロースを含む血漿はいずれも採血当日のPre 1-HDL濃度に比べて1日後及び5日後では高くなってしまった。これに対し28.6~66.7重量%のサッカロースを含む血漿は、5日後までPre 1-HDL濃度の変化がなかった。

【0020】

【表1】

サッカロース濃度 (重量%)	Pre β1-HDL (µg/mL)		
	採血当日	1日後	5日後
4.8	22.1	26.4	29.1
9.5	24.8	27.1	28.4
28.6	22.5	23.7	22.4
47.6	22.4	23.8	24.6
66.7	21.5	21.1	23.9
血漿原液保存	19.2	23.2	32.2

【0021】実施例2

実施例1と同様にして、検体として、血漿、1%BSA-PBS含有血漿、47.6重量%サッカロース含有血漿、及び47.6重量%グリセロール含有血漿を用いてPre 1-HDL濃度を測定した。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、血漿及びBSA-PBS含有血漿は1日後(4℃)からPre 1-HDL濃度が高くなっていったが、47.6重量%グリセロール又は47.6重量%サッカロース含有血漿は4日後(4℃)までPre 1-HDL濃度が変化しなかった。

【0022】実施例3

高脂血症患者の血漿及びこれに47.6重量%となるようにサッカロースを添加した血漿を用いて、実施例1と同様にしてPre 1-HDL濃度を測定した。その結果、図2に示すように、サッカロース47.6重量%含有血漿は4℃で5日間保存してもPre 1-HDL濃度が変化しなかった。

【0023】実施例4

検体を4℃で保存して後に測定するかわりに、-80

に凍結して保存した後融解して測定した。その結果を図3に示す。図3から明らかなように、血漿をそのまま凍結融解した検体はPre 1-HDL濃度が高くなった。これに対し、47.6重量%サッカロースを含有する血漿は凍結融解して測定してもPre 1-HDL濃度に変化がみられなかった。

【0024】

【発明の効果】本発明の血液検体を用いれば、冷所保存後又は凍結保存後に測定してもPre 1-HDL濃度が測定できる。従来法では、正確に採血後直ちにPre 1-HDLを測定しなければならず、実際に病院で採血した検体を検査センター等で測定することはできな*

った。本発明の血液検体を用いれば冷所で5日間保存してもPre 1-HDLが安定に保持されるので、病院で採血した血液を用いた検査センターでの測定が可能となった。

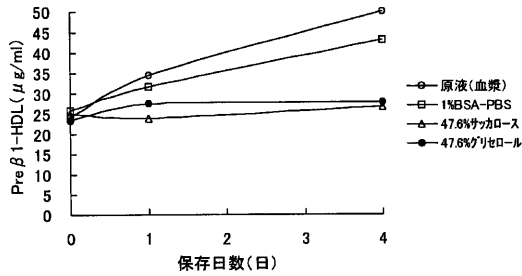
【図面の簡単な説明】

【図1】血液検体の4での保存日数とPre 1-HDL濃度との関係を示す図である。

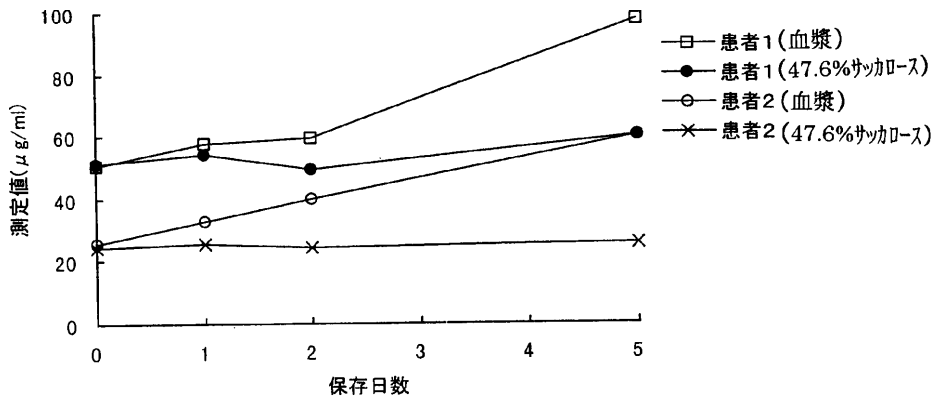
【図2】高脂血症患者の血液検体の4での保存日数とPre 1-HDL濃度との関係を示す図である。

【図3】凍結前、凍結血漿及び47.6重量%サッカロース含有凍結血漿のPre 1-HDL濃度を示す図である。

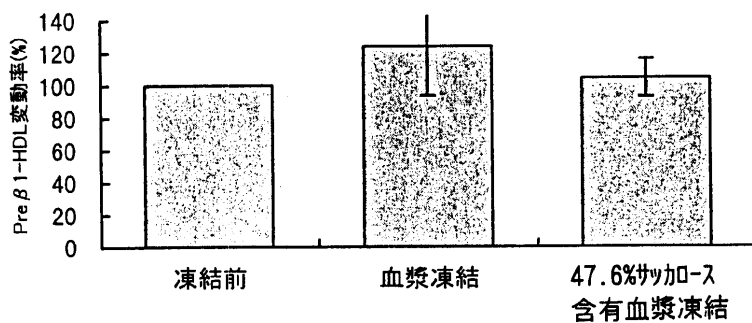
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 深町 勇
茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬
品株式会社診断薬研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA01 BA13 BA20 BB32 BB46
CA25 CA26 DA63 FB03

专利名称(译)	Pre β 1-HDL测定用血液検体		
公开(公告)号	JP2002365279A	公开(公告)日	2002-12-18
申请号	JP2001170803	申请日	2001-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学薬品株式会社		
[标]发明人	宫崎修 中村靖 深町勇		
发明人	宫崎 修 中村 靖 深町 勇		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/48.B G01N33/53.S G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/BA13 2G045/BA20 2G045/BB32 2G045/BB46 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA63 2G045/FB03		
其他公开文献	JP4574066B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于测量Pre β 1-HDL的血液样品，其包含按重量计25%至80%的单糖，二糖或甘油。[效果]使用本发明的血液样品，即使在阴凉处保存或冷冻后，也可以测定Pre β 1-HDL浓度。

【図1】

