

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4568334号
(P4568334)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月13日(2010.8.13)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/531 (2006.01)

GO 1 N 33/531

B

請求項の数 2 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2008-17428 (P2008-17428) (22) 出願日 平成20年1月29日 (2008.1.29) (65) 公開番号 特開2009-180527 (P2009-180527A) (43) 公開日 平成21年8月13日 (2009.8.13) 審査請求日 平成20年4月18日 (2008.4.18)</p>	<p>(73) 特許権者 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1番地の1 (72) 発明者 譽田 大仁 京都府京都市東山区一橋野本町1番地の1 三洋化成工業株式会社内 審査官 浅野 美奈</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原含有水溶液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体と、カゼイン及び/又はホエイ蛋白と、アミド基、スルホ基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも1種の官能基を含有する緩衝剤とを含有してなり、pHが5.5~7.0であることを特徴とする免疫測定法によるN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の含有量測定に用いる標準液用の抗原含有水溶液。

【請求項2】

カゼイン及び/又はホエイ蛋白濃度が、抗原含有水溶液の重量を基準として、0.01~3%である請求項1に記載の抗原含有水溶液。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原を含有した溶液中での抗原の失活を防止し、安定して保存することができる抗原含有水溶液に関するものである。

【背景技術】

【0002】

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

20

般的である。通常、この標準液中に含まれる抗原は希薄であるため、抗原種によっては溶液中で著しく失活する場合がある。特に、ホルモンや酵素などの抗原溶液は失活が激しく、水溶液状のキャリブレーターとして用いるのには困難な場合が多い。このような場合には、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個体を溶解する方法や、牛血清アルブミンや動物血清などのタンパク質を添加して水溶液中での安定性を確保する方策がとられてきた（非特許文献1、2）。

【非特許文献1】佐々木 實，免疫化学的同定法（第3版），東京化学同人，1993

【非特許文献2】石川榮治，超高感度酵素免疫測定法，学会出版センター，1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0003】

しかしながら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、特にN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体水溶液を標準液とする場合には、牛血清アルブミンや動物血清などのタンパク質を添加しても、溶液中でのN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の安定性が悪く、長期間の保存安定性を確保することが困難である。すなわち本発明の目的は、N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を水溶液中で安定に保存することができる組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

20

本発明の抗原含有水溶液の特徴は、N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体と、カゼイン及び/又はホエイ蛋白と、アミド基、スルホ基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも1種の官能基を含有する緩衝剤とを含有してなり、pHが5.5～7.0であることを要旨とする。

【発明の効果】

【0005】

本発明の抗原含有水溶液は以下の効果を奏する。

(1) 失活し易いN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を、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がなくなり、測定精度と再現性が良い免疫測定ができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

ヒト由来のN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体は、心筋細胞で合成されるナトリウム利尿ペプチド前駆体（proBNP）の分解物であり、76個のアミノ酸から構成される。

本発明に使用するN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体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。これらの抗原は、HyTest社やImmundiagnostikAG社等より市販されている。

40

【0007】

N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の含有量は、抗原含有水溶液の重量を基準として10mg/g以下であれば、任意の濃度で使用することが出来るが、血液中のN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を定量する際に必要な濃度域の観点から、抗原含有水溶液の重量を基準として、10pg/g～1μg/gが好ましく、さらに好ましくは100pg/g～100ng/g、次にさらに好ましくは1ng/g～10ng/gである。

【0008】

カゼインとしては、牛乳中のカゼインが含まれ、例えば、「第五版食品添加物公定書解説書（廣川書店発行）」記載のカゼインを用いることができる。具体的には、 - カゼイ

50

ン、 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼインをあげることができる。

【 0 0 0 9 】

カゼインの濃度は、抗原含有水溶液中の N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の保存安定性の観点から、抗原含有水溶液の重量を基準として、0 . 0 1 % ~ 3 % が好ましく、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 2 . 5 %、次にさらに好ましくは 0 . 5 ~ 2 % である。

【 0 0 1 0 】

ホエイ蛋白としては、牛乳中のホエイ蛋白が含まれ、例えば、「食品衛生法 乳及び乳製品の成分規格に関する省令」に記載されている濃縮ホエイやホエイパウダーを用いることができる。

【 0 0 1 1 】

ホエイ蛋白の濃度は、抗原含有水溶液中の N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の保存安定性の観点から、抗原含有水溶液の重量を基準として、0 . 0 1 % ~ 3 % が好ましく、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 2 . 5 %、次にさらに好ましくは 0 . 5 ~ 2 % である。

【 0 0 1 2 】

本発明の抗原含有水溶液は、カゼイン及びホエイ蛋白をそれぞれ単独で使うことができるが、カゼイン及びホエイ蛋白を併せて使うことも出来る。併せて使う場合のカゼイン及びホエイ蛋白の合計濃度は、抗原含有水溶液中の N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の保存安定性の観点から、抗原含有水溶液の重量を基準として、0 . 0 1 % ~ 3 % が好ましく、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 2 . 5 %、次にさらに好ましくは 0 . 5 ~ 2 % である。

【 0 0 1 3 】

カゼインとホエイ蛋白を共存させることにより、N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を含有する水溶液の保存安定性を更に向上させることができる。この時の濃度は、カゼイン 0 . 5 % ~ 1 . 2 5 %、ホエイ蛋白 0 . 5 % ~ 1 . 2 5 % が好ましく、特に好ましくは、カゼイン 0 . 2 5 % ~ 0 . 6 3 %、ホエイ蛋白 0 . 2 5 % ~ 0 . 6 3 % である。

【 0 0 1 4 】

本発明の抗原含有水溶液の pH は、5 . 5 ~ 7 . 0 であり、抗原含有水溶液中の N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の保存安定性の観点から、5 . 8 ~ 6 . 9 が好ましく、さらに好ましくは 6 . 1 ~ 6 . 8 である。

pH が 5 . 5 未満では、カゼイン及び / 又はホエイ蛋白の安定性が悪くなり、pH が 7 . 0 を越えると N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の保存安定性が悪くなる。

なお、pH は、J I S K 0 4 0 0 - 1 2 - 1 0 : 2 0 0 0 で測定できる (測定温度 2 5) 。

【 0 0 1 5 】

上記の範囲に抗原含有水溶液の pH を調整するには、後述する緩衝剤を用いて pH を調整することで行える。

pH の調整は、一般的な緩衝液の作製方法と同様に、緩衝剤の水溶液に無機アルカリの水酸化物を用いて行われる。無機アルカリの水酸化物としては、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム、水酸化リチウム等が挙げられる。

【 0 0 1 6 】

本発明の抗原含有水溶液に含まれる緩衝剤としては、G o o d 緩衝液として知られる緩衝剤を使用することが好ましい。G o o d 緩衝剤の中でも、pH 5 . 5 ~ 7 . 0 の間に緩衝能をもつ緩衝剤が保存安定性の観点から好ましい。

【 0 0 1 7 】

水溶液中の抗原安定の観点から、緩衝剤はアミド基、スルホ基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の官能基を含有する緩衝剤を含有する。

緩衝剤は 2 種以上を併用してもよいが、水溶液中の抗原安定の観点から、1 種を使用することが好ましい。

【 0 0 1 8 】

アミド基を含有する緩衝剤としては、N - (2 - アセトアミド) イミノジ酢酸 (以下、

10

20

30

40

50

A D A と略す。後述の化合物名の括弧内の表記は同様に略号を示す。)、N - (2 - アセトアミド) - 2 - アミノエタンスルホン酸 (A C E S) 等が含まれる。

【 0 0 1 9 】

スルホ基を含有する緩衝剤としては、2 - モルホリノエタンスルホン酸一水和物 (M E S)、ピペラジン - 1 , 4 - ビス (2 - エタンスルホン酸) (P I P E S)、N - (2 - アセトアミド) - 2 - アミノエタンスルホン酸 (A C E S)、2 - ヒドロキシ - 3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (M O P S O)、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 (B E S)、3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (M O P S) 等が含まれる。

【 0 0 2 0 】

カルボキシル基を含む緩衝剤としては、N - (2 - アセトアミド) イミノジ酢酸 (A D A) が等含まれる。

【 0 0 2 1 】

これらのうち、水溶液中の抗原安定の観点から、A D A、P I P E S、A C E S が好ましく、さらに好ましくは A D A、A C E S、次にさらに好ましくは A D A である。

【 0 0 2 2 】

本発明の抗原含有水溶液は、N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体、カゼイン及びホエイ蛋白、並びに緩衝剤を混合することで得られる。

混合方法としては、従来の抗原含有水溶液を製造する際と同様の方法でよい。

本発明の抗原含有水溶液は、製造のし易さや、製造時におけるN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の失活防止の観点から、緩衝液を作製した後でカゼイン及び/又はホエイ蛋白を添加混合して溶解させ、次いでN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を添加混合する方法が好ましい。

【 0 0 2 3 】

本発明の抗原含有水溶液は、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ら、標準液として好適に使用できる。

【 実施例 】

【 0 0 2 4 】

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 >

a) 抗原含有水溶液の作製

常法により 1 0 0 m M の A D A 緩衝液 (p H 6 . 6) を作製した。次いで、抗原含有水溶液の重量に対してそれぞれの濃度がカゼイン (牛乳製) 0 . 5 重量 %、ホエイ蛋白 (牛乳製) 0 . 5 重量 % となるように加えて加熱溶解させた。

均一溶解を確認後に、N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を 5 0 0 0 p g / g となるように添加し、抗原含有水溶液 1 を作製した。

b) 保存安定性の評価

作製した抗原含有水溶液 1 を 4 と 2 5 で保存し、作製時、3 カ月目、6 カ月目、1 2 カ月目の N 末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体濃度を、N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体測定試薬 { 三洋化成工業 (株) 製 } で測定し、濃度の変化を調べた。結果を表 2 に示す。

【 0 0 2 5 】

< 実施例 2 ~ 9 及び比較例 1 ~ 3 >

実施例 1 において、緩衝液の種類、p H、カゼイン、ホエイ蛋白及びN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の濃度を表 1 に示す値にした以外は実施例と同様にして、抗原含有水溶液 2 ~ 9 及び比較抗原含有水溶液 1 ~ 3 を得た。これらについて、実施例 1 と同様に評価し、その結果を表 2 に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

【 表 1 】

＜組成＞		緩衝液	緩衝液中の緩衝剤が含有する官能基	緩衝剤が	pH	カゼイン濃度 (重量%)	ホエイ蛋白濃度 (重量%)	抗原濃度 (pg/g)
実施例	1	ADA	カルボキシル基	アミド基	6.6	0.5	0.5	5000
	2	MES	スルホ基		5.5	0.5	0.5	5000
	3	MOPSO	スルホ基		7.0	0.5	0.5	5000
	4	ADA	カルボキシル基	アミド基	6.6	1.0	0	5000
	5	ADA	カルボキシル基	アミド基	6.6	0	1.0	5000
	6	ADA	カルボキシル基	アミド基	6.6	0.63	0.63	5000
	7	ADA	カルボキシル基	アミド基	6.6	0.25	0.25	5000
	8	PIPES	スルホ基		6.6	0.5	0.5	5000
	9	ACES	スルホ基	アミド基	6.6	0.5	0.5	5000
比較例	1	酢酸Buffer	カルボキシル基		5.0	0.5	0.5	5000
	2	リン酸Buffer	リン酸基		7.2	0.5	0.5	5000
	3	リン酸Buffer	リン酸基		6.7	0.5	0.5	5000

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

【 表 2 】

		保存温度	抗原測定値 (pg/g)			
			作製時	3ヶ月	6ヶ月	12ヶ月
実施例	1	4°C	5000	5009	5018	4976
		25°C	5000	4984	4994	4926
	2	4°C	5000	4962	4934	4905
		25°C	5000	4930	4917	4899
	3	4°C	5000	4966	4943	4901
		25°C	5000	4948	4922	4895
	4	4°C	5000	5011	5014	4971
		25°C	5000	5006	4972	4942
	5	4°C	5000	4992	5009	5060
		25°C	5000	4993	5014	4968
	6	4°C	5000	4994	4984	4956
		25°C	5000	5012	4967	4907
	7	4°C	5000	4994	4979	4964
		25°C	5000	4984	4974	4958
	8	4°C	5000	4964	4939	4903
		25°C	5000	4939	4919	4897
	9	4°C	5000	4955	4928	4900
		25°C	5000	4934	4918	4898
比較例	1	4°C	5000	4890	4760	4615
		25°C	5000	4750	4520	4340
	2	4°C	5000	4810	4590	4370
		25°C	5000	4710	4430	4025
	3	4°C	5000	4880	4687	4302
		25°C	5000	4699	4527	4144

【 0 0 2 8 】

本発明の抗原含有水溶液は、比較用の抗原含有水溶液に比べて、N末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体の濃度変化が少なかった。特に、実施例1、実施例4、実施例5、実施例6及び実施例7においては、12ヶ月後でも非常に安定であった。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 2 9 】

本発明の抗原含有水溶液は以下の効果を奏する。

(1) 失活し易いN末端脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体を、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がなくなり、測定精度と再現性が良い免疫測定ができる。

よって、本発明の抗原含有水溶液は、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ら、標準

10

20

30

40

50

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08 - 005634 (JP, A)
特開平09 - 080051 (JP, A)
特開2003 - 270250 (JP, A)
特開2008 - 534440 (JP, A)

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

专利名称(译)	抗原含有水溶液		
公开(公告)号	JP4568334B2	公开(公告)日	2010-10-27
申请号	JP2008017428	申请日	2008-01-29
[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	譽田大仁		
发明人	譽田 大仁		
IPC分类号	G01N33/531		
FI分类号	G01N33/531.B		
其他公开文献	JP2009180527A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了解决这样的问题，其中，在传统的冷冻干燥方法中，当使用时需要添加水从而使操作复杂化，尽管具有优异的保存稳定性，并且因此标准溶液中的抗原浓度经常具有错误特别是当使用N-末端脑利钠肽前体水溶液作为标准溶液时，即使加入诸如牛血清白蛋白或动物血清的蛋白质，N-末端脑利钠肽前体在溶液中的稳定性也差。溶液：该含抗原的pH为5.5-7.0的水溶液包括N-末端脑利钠肽前体;酪蛋白和/或乳清蛋白;和含有至少一种选自酰胺基，磺基和羧基的官能团的缓冲剂。

缓冲液	缓冲液中的缓冲剂含有官能基	pH	抗原量 (重量)	牛血清白蛋白量 (重量)	抗原浓度 (mg/ml)
1)ADA	加有羧基	6.6	0.5	0.5	5000
2)MES	无	5.5	0.5	0.5	5000
3)MOPS	无	7.0	0.5	0.5	5000
4)ADA	加有羧基	6.6	1.0	0	5000
5)ADA	加有羧基	6.6	0	1.0	5000
6)ADA	加有羧基	6.6	0.63	0.63	5000
7)ADA	加有羧基	6.6	0.25	0.25	5000
8)PPES	无	6.6	0.5	0.5	5000
9)ACES	无	6.6	0.5	0.5	5000
1)蔗糖buffer	加有羧基	5.0	0.5	0.5	5000
2)磷酸buffer	无	7.2	0.5	0.5	5000
3)磷酸buffer	无	6.7	0.5	0.5	5000

〈组成〉

实施例

比较例