

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5663494号
(P5663494)

(45) 発行日 平成27年2月4日(2015.2.4)

(24) 登録日 平成26年12月12日(2014.12.12)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	A
GO 1 N 33/493	(2006.01)	GO 1 N 33/493	A
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2011-547638 (P2011-547638)	(73) 特許権者	000162478
(86) (22) 出願日	平成22年12月24日(2010.12.24)		協和メデックス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/073285		東京都中央区晴海一丁目8番10号
(87) 国際公開番号	W02011/078307	(72) 発明者	佐々木 一彦
(87) 国際公開日	平成23年6月30日(2011.6.30)		静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600
審査請求日	平成25年10月4日(2013.10.4)		番1 協和メデックス株式会社 協和メデ
(31) 優先権主張番号	特願2009-295509 (P2009-295509)	(72) 発明者	青山 典仁
(32) 優先日	平成21年12月25日(2009.12.25)		静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		番1 協和メデックス株式会社 協和メデ
		(72) 発明者	草田 修
			静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600
			番1 協和メデックス株式会社 協和メデ
			ックス富士工場内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 尿検体中のサブスタンスPの測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

尿検体を加熱処理し、加熱処理後の尿検体中のサブスタンスPを測定することを特徴とする、尿検体中のサブスタンスPの測定方法。

【請求項2】

加熱処理が、尿検体を30～55で加熱する処理である、請求項1記載の測定方法。

【請求項3】

加熱処理が、尿検体を35～50で、15分間～4時間加熱する処理である、請求項1または2記載の測定方法。

【請求項4】

サブスタンスPの測定が、免疫学的測定法により行われる、請求項1～3のいずれかに記載の測定方法。

【請求項5】

尿検体が、原尿である、請求項1～4のいずれかに記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炎症、アレルギー疾患等のマーカーとして有用なサブスタンスPの測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床診断において、尿を検体として用いる尿中の測定対象成分の測定と、その測定に基づく疾患の診断がしばしば行われている。例えば、尿試験紙を用いた尿蛋白、尿潜血、尿中ヘモグロビン、尿糖等の検査は日常的に行われている。また、尿中の蛋白質及びペプチドは、腎臓、泌尿器系、循環器系等の疾患及び状態のマーカーとして有用であり、例えばC-ペプチド、L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)等が尿を検体として用いて測定されている。

【0003】

尿は、全血、血清や血漿とは異なり、被検者へ負担を掛けることなく採取することができる、という利点を有する一方、細菌が繁殖し易く、また、蛋白質分解酵素の影響を受け易い、という欠点を有する。従って、24時間蓄尿を検体として用いる場合や、長期間保存する場合には、保存剤を共存させて、尿中の測定対象成分を安定化させることがしばしば行われる。保存剤として、プロテアーゼ阻害剤、塩酸、トルエン、キシレン、アジ化ナトリウム、キレート剤、アルブミン、イソチアゾロン系化合物、緩衝剤、界面活性剤の他、これらの要素の組み合わせ等が知られている(例えば、特許文献1~4参照)。しかしながら、保存剤が測定対象成分の測定に影響することもあり、尿を検体として用いる場合には十分な管理が必要であり、尿は検体として使い辛い面を有している。

10

【0004】

また、従来、尿中の測定対象成分を測定するに際しては、尿中に存在する生体由来の妨害物質や上記の保存剤の影響を回避するために、採取した尿そのもの(原尿)を緩衝液等の水性媒体で高度に希釈し、高度に希釈された尿を測定に供することもしばしば行われる。しかしながら、原尿を希釈して、測定対象成分を測定する方法は、測定対象成分濃度が尿検体毎に異なり、尿検体毎に適切な希釈率を設定する必要があり、操作が煩雑になると共に、尿を高度に希釈することにより、測定対象成分の濃度が著しく低下し、測定の正確性と信頼性が著しい低下する、という欠点を有している。

20

【0005】

サブスタンスPは、11個のアミノ酸配列からなるペプチドである。サブスタンスPは、第一次知覚神経の化学伝達物質であり、この物質が体内に高濃度で存在することは、痛みや炎症の神経伝達亢進が疑われる。サブスタンスPは、炎症、アレルギー疾患の有用なマーカーとして注目を集めている。

30

【0006】

検体中のサブスタンスP測定方法としては、これまで、血清を酸処理した後、アセトンおよびエーテルで抽出し、さらに逆相カラムによるHPLCで精製したサブスタンスPを酵素免疫測定法で測定する方法が知られている(非特許文献1参照)。しかしながら、本方法は操作が非常に煩雑で、かつ、化学的処理条件が過酷なため、正確な測定値を与えるものではなかった。

【0007】

また、採血後の血液中サブスタンスPは非常に不安定であるため、正確な測定値を得ることは困難であったが、採血後の血液に糖類を添加することにより、採血後の血液中のサブスタンスPが安定化され、本安定化方法を利用した血液中のサブスタンスPの正確な測定方法が報告されている(特許文献5参照)。

40

【0008】

しかしながら、この方法も検体として血液を用いることから、被検者に採血という負担を強いることになる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特表平10-507269号公報

【特許文献2】特開平10-282095号公報

50

【特許文献3】特開2000-352565号公報

【特許文献4】国際公開第2009/041577号パンフレット

【特許文献5】国際公開第2007/010995号パンフレット

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】クリニカル・アンド・ディアグノスティック・ラボラトリー・イムノロジー (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology), (米国), 1998年, 第5巻, 第3号, p.303-307

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

本発明の目的は、尿検体中のサブスタンスPを簡便、かつ、正確に測定するための方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ペプチドは通常、加熱処理によって変性を受けるため、検体中のペプチドの測定に際して、検体を加熱することは行わないが、尿検体中のサブスタンスPについては、尿検体を加熱処理することによって、正確に測定できる、という知見を見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の(1)~(5)に関する。

20

【0013】

(1) 尿検体を加熱処理し、加熱処理後の尿検体中のサブスタンスPを測定することを特徴とする、尿検体中のサブスタンスPの測定方法。

(2) 加熱処理が、尿検体を30~55で加熱する処理である、(1)記載の測定方法。

(3) 加熱処理が、尿検体を35~50で、15分間~4時間加熱する処理である、(1)または(2)記載の測定方法。

(4) サブスタンスPの測定が、免疫学的測定法により行われる、(1)~(3)のいずれかに記載の測定方法。

(5) 尿検体が、原尿である、(1)~(4)のいずれかに記載の測定方法。

30

【発明の効果】

【0014】

本発明により、尿検体中のサブスタンスPを簡便、かつ、正確に測定するための方法が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明における尿検体は、サブスタンスPを含む尿検体であれば特に制限はなく、例えば動物より採取された尿等が挙げられる。動物としては、例えばヒト、猿、類人猿(ゴリラ、オランウータン、チンパンジー、テナガザル)、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ等が挙げられる。本発明においては、原尿のみならず、原尿に保存剤等の添加物が添加された尿等も用いることができるが、原尿を用いることが好ましい。保存剤としては、例えばプロテアーゼインヒビター、塩酸、トルエン、アジ化ナトリウム等の公知の保存剤等が挙げられる。

40

【0016】

本発明における尿検体の加熱処理は、尿検体中のサブスタンスPの測定を可能とする範囲であれば特に制限はなく、例えば尿を30~55で加熱する処理が挙げられ、35~50で加熱する処理が好ましい。加熱処理における尿検体の加熱時間は、尿検体中のサブスタンスPの測定を可能とする範囲であれば特に制限はなく、例えば10分間~6時間である。特に、加熱温度が35~50であれば、15分間~4時間が好ましく、1時間~3時間が特に好ましい。

50

【 0 0 1 7 】

本発明においては、尿検体を少なくとも1回加熱処理すれば、加熱処理の前後に冷蔵処理、冷凍処理または保存処理等の処理を行ってもよい。また、加熱処理は複数回行ってもよい。冷蔵処理としては、例えば尿検体を - 20 ~ 0 で冷蔵する処理等が挙げられる。冷凍処理としては、例えば尿検体を - 80 ~ - 20 で冷凍する処理等が挙げられる。保存処理としては、例えば尿検体を 4 ~ 25 で、2時間以上放置する処理等が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

本発明の尿検体中のサブスタンスPの測定方法は、加熱処理された尿検体を用いる方法であり、具体的には以下の工程により行うことができる。

[1] 尿検体を加熱処理する工程；

[2] [1] で加熱処理された尿検体を用いて、尿検体中のサブスタンスPを測定する工程；及び、

[3] 予め、既知濃度のサブスタンスPを用いて作成された、サブスタンスPの濃度と情報量との関係を表す検量線に、[2]での測定で得られた測定値を照らし合わせて、尿検体中のサブスタンスPの濃度を決定する工程。

【 0 0 1 9 】

尿検体中のサブスタンスPの測定は、サブスタンスPの測定を可能とする方法であればいかなる方法によっても行うことができ、例えば免疫学的測定法等の公知の方法により行うことができる。尿検体中のサブスタンスPの測定は、市販のキットを用いて行うこともできる。免疫学的測定法は、測定対象成分と、測定対象成分と結合する抗体またはそのフラグメントとの反応（抗原抗体反応）を用いる方法であり、サンドイッチ法、競合法、酵素免疫測定法、化学発光酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、ラジオイムノアッセイ等が挙げられる。市販のキットとしては、「Substance P EIA Kit」（Cayman Chemical社製）、「Substance P EIA Kit」（Assay Designs社製）、「DRG Human Substance P ELISA (EIA-3120)」（DRGインターナショナル社製）等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、本実施例においては、下記メーカーの試薬を使用した。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 1 】

(1) コントロール実験

健常人 A , B , C より採取したそれぞれの新鮮尿（原尿）を、サブスタンスP測定用キット「Substance P EIA Kit」（Cayman Chemical社製）中の検体希釈液(EIA Buffer)で希釈することにより、2倍希釈尿、4倍希釈尿、8倍希釈尿を調製した。これらの各尿検体（原尿、2倍希釈尿、4倍希釈尿、8倍希釈尿）中のサブスタンスP濃度を、「Substance P EIA Kit」（Cayman Chemical社製）を用いて、当該キットの添付文書に記載された方法に従って決定した。「Substance P EIA Kit」（Cayman Chemical社製）の添付文書には、当該キットを用いる測定の測定範囲として、8.2 ~ 500 pg/mLの範囲が記載されている。別途、原尿を 40 で 60 分間加熱処理して得られた尿検体を用いて、同様に、尿検体中のサブスタンスP濃度を決定した。測定結果を第1表に示す。第1表中、補正值とは、実際の測定値に希釈倍率を乗じて算出した値である。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

【表 1】

第1表

健常人	尿検体	加熱処理なし		加熱処理あり
		測定値(pg/mL)	補正值(pg/mL)	
A	原尿	38.8	38.8	43.8
	2倍希釈尿	21.7	43.5	
	4倍希釈尿	12.2	49.0	
	8倍希釈尿	—	—	
B	原尿	145.0	145.0	163.3
	2倍希釈尿	78.0	156.0	
	4倍希釈尿	39.9	159.6	
	8倍希釈尿	20.3	162.2	
C	原尿	67.0	67.0	104.9
	2倍希釈尿	44.5	89.0	
	4倍希釈尿	24.1	96.6	
	8倍希釈尿	13.5	107.9	

10

20

【0023】

第1表に示される様に、どの健常人においても、加熱処理を行わない原尿を用いた測定における測定値は、希釈された尿を用いた測定における補正值に比較して、低い値を示した。健常人Aにおいては、2倍希釈での補正值が、加熱処理した原尿を用いた測定の測定値とほぼ一致した。尚、健常人Aにおいては、8倍希釈した尿では、希釈された尿中のサブスタンスPの濃度が非常に低くなり、用いたキットの測定範囲外となったため、正確な測定ができなかった。健常人Bにおいては、8倍希釈での補正值が、加熱処理した原尿を用いた測定の測定値とほぼ一致した。健常人Cにおいては、8倍希釈での補正值が、加熱処理した原尿を用いた測定の測定値とほぼ一致した。この様に、加熱処理を行わない場合には、正確な測定を行うためには、用いる尿検体によって、希釈倍率を変える必要があるが、本発明の加熱処理を行う方法では、用いる尿検体によらず、単に尿検体を加熱処理するだけでよいことが判明した。従って、本発明の方法により、煩雑な操作を伴うことなく、簡便、かつ、正確に尿検体中のサブスタンスPを測定できる。

30

【0024】

(2) 添加回収実験

加熱処理後の尿検体を用いた測定が、尿検体中のサブスタンスPの正確な測定であることを、サブスタンスPの標準品を用いた添加回収実験で検証した。

【0025】

< 添加回収実験 >

1) 手順

健常人より採取した尿、及び、サブスタンスP測定用キット「Substance P EIA Kit」(Cayman Chemical社製)中の標準品(1,000 pg/mL)を用いて、以下の様に、添加回収試験用試料(1)~(3)を調製した。試料希釈液は、サブスタンスP測定用キット中の希釈液(EIA Buffer)を用いた。

- | | | | | |
|----------|----|---|-------|----|
| (1)尿 | 9容 | + | 試料希釈液 | 1容 |
| (2)尿 | 9容 | + | 標準品 | 1容 |
| (3)試料希釈液 | 9容 | + | 標準品 | 1容 |

【0026】

50

調製した添加回収試験用試料(1)～(3)それぞれを40℃で20～120分間、加熱処理し、加熱処理した後の各試料中のサブスタンスPを、サブスタンスP測定用キット「Substance P EIA Kit」(Cayman Chemical社製)を用いて、当該キットの添付文書に記載された方法に従って測定した。

【0027】

2) データ解析

添加回収率を下記の式(Ⅰ)により算出した。

【0028】

【数1】

$$\text{添加回収率(\%)} = \frac{[(2)\text{の測定値}] - [(1)\text{の測定値}]}{[(3)\text{の測定値}]} \times 100 \quad (\text{Ⅰ})$$

10

【0029】

添加回収率の結果を第2表に示す。

【0030】

【表2】

20

第2表

	20分間	40分間	60分間	80分間	100分間	120分間
40℃	113.3	105.8	101.5	98.9	102.1	100.2

【0031】

添加回収率が100%に近い程、正確な測定であることを意味する。第2表に示される様に、40℃で60分間以上加熱処理された尿検体において、良好な添加回収率を確認した。従って、40℃で60分間以上加熱処理された尿検体を用いた測定が、尿検体中のサブスタンスPの正確な測定であることが判明した。

30

【実施例2】

【0032】

・加熱処理条件の検討

健常人より採取した尿検体(原尿)を、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃及び55℃の各温度で加熱した後、当該加熱処理された尿検体を用いて、尿検体中のサブスタンスPを、サブスタンスP測定用キット「Substance P EIA Kit」(Cayman Chemical社製)を用いて、当該キットの添付文書に記載された方法に従って測定した。測定結果を第3表に示す。

【0033】

40

【表 3】

第3表

	30℃	35℃	40℃	45℃	50℃	55℃
20 分間	82.1	81.7	86.6	97.5	102.7	100.1
40 分間	85.3	86.9	97.3	102.8	98.2	102.3
60 分間	83.5	98.8	100.0	101.4	100.8	93.5
80 分間	88.7	99.1	99.0	100.8	99.1	91.9
100 分間	93.8	102.1	101.9	97.8	97.2	90.8
120 分間	101.8	98.3	99.8	99.9	94.3	92.7
140 分間	99.1	100.0	95.9	94.1	95.7	88.5
160 分間	102.0	95.0	97.6	95.4	93.3	90.1
180 分間	99.1	101.5	96.3	93.0	88.8	87.7
200 分間	94.2	96.0	95.5	89.7	92.4	90.0

10

20

【0034】

ここで、第3表中の数値は、40 で60分間加熱処理された尿検体を用いた測定での測定値を100とした時の相対値(%)を表す。第3表から、尿検体の加熱温度により、正確な測定が可能となる加熱時間が異なり、加熱温度が高い程、加熱時間が短縮されると共に、長時間の加熱では却って、測定値が低下することが判明した。

30

【実施例3】

【0035】

・尿検体の加熱条件の検討

健常人より採取した尿検体(原尿)を、第4表に示す10の条件で処理し、当該処理された尿検体中のサブスタンスPを、サブスタンスP測定用キット「Substance P EIA Kit」(Cayman Chemical社製)を用いて、当該キットの添付文書に記載された方法に従って測定した。測定結果を第4表に示す。

【0036】

【表4】

第4表

尿処理条件		測定値(相対%)
条件1	採尿直後	78.9
条件2	採尿後、室温(25°C)60分間	81.1
条件3	採尿後、加温(40°C60分間)	100
条件4	採尿後、加温(40°C60分間)→冷蔵(4°C24時間)	99.6
条件5	採尿後、加温(40°C60分間)→室温(25°C24時間)	103.2
条件6	採尿後、加温(40°C60分間)→凍結(-80°C24時間)	98.7
条件7	採尿後、冷蔵(4°C24時間)	82.1
条件8	採尿後、凍結(-80°C24時間)	79.5
条件9	採尿後、冷蔵(4°C24時間)→加温(40°C60分間)	98.6
条件10	採尿後、凍結(-80°C24時間)→加温(40°C60分間)	101.8

10

【0037】

ここで、第4表中の測定値とは、40 で60分間加熱処理された尿検体を用いた測定(条件3)における測定値を100とした時の相対値(%)を意味する。第4表から、加熱処理された尿検体(条件3~6、9~10)を用いた場合には、尿検体中のサブスタンスPを正確に測定できるのに対して、加熱処理されていない尿検体(条件1~2、7~8)を用いた場合には、測定値が著しく低くなり、これらの尿検体では、尿検体中のサブスタンスPを正確に測定できないことが判明した。本結果から、尿検体を加熱処理することにより、尿検体中のサブスタンスPを正確に測定できることが判明した。

20

【産業上の利用可能性】

【0038】

本発明により、炎症やアレルギー疾患の診断に有用な、尿検体中のサブスタンスPの簡便、かつ、正確な測定方法が提供される。

30

フロントページの続き

審査官 伊藤 裕美

(56)参考文献 国際公開第2007/010995(WO,A1)
特開2008-175630(JP,A)
国際公開第2008/022177(WO,A2)
特表2006-508357(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/48-33/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	测量尿样中P物质的方法		
公开(公告)号	JP5663494B2	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	JP2011547638	申请日	2010-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
[标]发明人	佐々木一彦 青山典仁 草田修		
发明人	佐々木 一彦 青山 典仁 草田 修		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/48 G01N33/493 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/493 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/48.A G01N33/493.A G01N33/53.D		
审查员(译)	伊藤弘美		
优先权	2009295509 2009-12-25 JP		
其他公开文献	JPWO2011078307A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种方便且准确地测量尿样中的物质P的方法。一种测量尿样中物质P的方法，包括加热尿样并测量经过热处理的尿样中的物质P。这里，热处理是在30至55°C下加热尿样品的处理，优选在35至50°C下加热尿样品15分钟至4小时的处理。根据本发明，可以方便且准确地测量尿液样本中的物质P。

第1表

健常人	尿検体	加熱処理なし		加熱処理あり
		測定値(pg/mL)	補正值(pg/mL)	
A	原尿	38.8	38.8	43.8
	2倍希釈尿	21.7	43.5	
	4倍希釈尿	12.2	49.0	
	8倍希釈尿	—	—	
B	原尿	145.0	145.0	163.3
	2倍希釈尿	78.0	156.0	
	4倍希釈尿	39.9	159.6	
	8倍希釈尿	20.3	162.2	
C	原尿	67.0	67.0	104.9
	2倍希釈尿	44.5	89.0	
	4倍希釈尿	24.1	96.6	
	8倍希釈尿	13.5	107.9	