

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4035062号
(P4035062)

(45) 発行日 平成20年1月16日(2008.1.16)

(24) 登録日 平成19年11月2日(2007.11.2)

(51) Int. Cl.		F I
C 1 2 N	9/96	(2006.01)
GO 1 N	33/535	(2006.01)
		C 1 2 N 9/96
		GO 1 N 33/535

請求項の数 3 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-16150 (P2003-16150)	(73) 特許権者	000006116
(22) 出願日	平成15年1月24日 (2003.1.24)		森永製菓株式会社
(65) 公開番号	特開2004-222634 (P2004-222634A)		東京都港区芝5丁目33番1号
(43) 公開日	平成16年8月12日 (2004.8.12)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成16年1月14日 (2004.1.14)		弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100105131
			弁理士 井上 満
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペルオキシダーゼ組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5 - アセトアミドアントラニル酸を含有するペルオキシダーゼ組成物。

【請求項 2】

ペルオキシダーゼが、抗体又は抗原とのコンジュゲートとして存在する請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の組成物を含む免疫測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、安定化されたペルオキシダーゼ組成物に関する。該組成物は、特に、免疫測定用キットに用いる試薬として有用である。

【0002】

【従来の技術】

免疫測定用の試薬として抗原又は抗体とコンジュゲートしたペルオキシダーゼ(以下、「POD」と略す。)が広く用いられている。PODは、競合法或いは非競合法に基づく免疫学的測定法において、形成された抗原-抗体複合体の鋭敏且つ簡便な検出方法として多用される。非競合法に基づくサンドウィッチ-ELISAを例に簡単に説明すると、まず、測定対象物質(抗原)と特異的に結合する一次抗体をマイクロプレートのウェル等の

固体表面に固相化し、当該固相化一次抗体と測定対象物を含む試料溶液を接触させて測定対象物を前記一次抗体上に捕捉する。次いで、洗浄により一次抗体を介して固相に維持された測定対象物のみを分離し、分離された測定対象物を該測定対象物に特異的なPOD標識二次抗体で検出する。すなわち、PODは特定の基質に作用してそれを発色させることができるので、固相化一次抗体 - 測定対象物（抗原） - POD標識二次抗体の生成量はその発色強度に比例することになり、それにより測定対象物の濃度が検出される。

【0003】

従って、PODの酵素活性は前記免疫測定の感度を左右する極めて重要な因子である。特に、そのような免疫測定用の試薬類はキットの形態で広く用いられており、その流通・保存の全段階において該PODの酵素活性を維持するような条件、例えば - 80 等の極低温を維持しなければならないとすると極めて不都合である。好ましくは、該キットは常温程度で流通させることができ、また、厳重な保存条件下に付すことなく長期間安定であるべきである。

10

【0004】

このような観点から、PODの安定性に関する多くの技術が提案されてきた。特許文献1には、安定化POD溶液のための血清タンパク質とパラヒドロキシフェニルカルボン酸の併用が開示されている。特許文献2には、安定化されたPOD組成物のためのアルコキシフェノール化合物の使用が開示されている。特許文献3には、安定なPOD組成物のための、特定の置換基を有するフェノール化合物の使用が開示されている。特許文献4には、安定化POD組成物のための特定のフェノール誘導体の使用が開示されている。特許文献5には、安定なPOD組成物のためのヒドロキシベンジルアルキルアルコール、ヒドロキシベンジルシラン類の使用が開示されている。特許文献6には、安定化されたPOD溶液におけるフェノール系化合物とアジ化ナトリウムの併用が開示されている。特許文献7には、安定なPOD組成物のためのヒドロキシフェニル - アルコキシシランの使用が開示されている。特許文献8には、安定化されたPOD活性を有する溶液のためのヒドロキシフェニル - アルキレン - カルボン酸の使用が開示されている。しかしながら、これらいずれの文献もヒドロキシル基を有さないベンゼン環化合物の使用を示唆しない。

20

【0005】

【特許文献1】

特開昭61 - 239890号公報

30

【特許文献2】

特開昭64 - 63380号公報

【特許文献3】

特開平2 - 42982号公報

【特許文献4】

特開平6 - 121683号公報

【特許文献5】

特開平7 - 75574号公報

【特許文献6】

特開平7 - 135975号公報

40

【特許文献7】

特開平7 - 140146号公報

【特許文献8】

特開平9 - 299085号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な安定化POD組成物を提供する。PODを常温においても長期間安定化させ、且つ廉価であるような化合物を含む組成物が特に望ましい。

【0007】

【課題を解決するための手段】

50

今や、フェノール（或いはヒドロキシフェニル／ヒドロキシベンジル）骨格を有さない特定の化合物が極めて有効にPODを安定化することが見出された。

【0008】

5 - アセトアミドアントラニル酸は、その入手の容易性等を考慮しても特に好ましい。従って、本発明の第1は、

(1) 5 - アセトアミドアントラニル酸を含有するペルオキシダーゼ組成物である。

【0009】

また、本発明のPOD組成物は、特に免疫測定用の試薬に好適に用いることができ、また、当該試薬を含むキットは、長期化安定に保存し得るので極めて有用である。従って、本発明の第2乃至第3は、

(2) ペルオキシダーゼが、抗体又は抗原とのコンジュゲートとして存在する上記(1)の組成物であり、

(3) 上記(2)の組成物を含む免疫測定用キットである。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明のPOD組成物は、少なくともPODと前記一般式(I)で表されるアントラニル酸誘導体を含む。

【0011】

POD(EC 1.11.1.7)は、一般に $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$ の反応を触媒する酵素であり、動物、植物或いは微生物界にも広く存在する酵素である。ELISAやウェスタンブロット等の実験技法において用いられる場合は、西洋ワサビペルオキシダーゼが特に有用である。これらの実験技法で用いられる場合、例えば3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を基質として用いることで、PODによる検出可能な発色が得られる。

【0012】

免疫学的測定方法においては、PODを特定の抗原又は抗体にコンジュゲートすることが好ましい。当該コンジュゲート及びその作製方法は当業者に公知である。各種の抗原又は抗体がPODとコンジュゲートされ得る。抗体では、抗AIDSウイルス抗体、抗肝炎ウイルス抗体、抗インシュリン抗体、抗食物アレルギー抗体、抗ステロイドホルモン抗体或いはこれらの抗体の抗原特異的結合性部位等が例示されるがこれに限定されない。同様に抗原も各種ウイルスの抗原タンパク質や糖鎖、食物アレルギータンパク質、各種ホルモン等がPODとコンジュゲートされてよい。勿論、他の実験技法等に用いる場合はPODが核酸、レセプター、糖鎖又はレクチン等とコンジュゲートしていてもよく、或いは全くコンジュゲートしていない単体のPODであってもよい。

【0013】

組成物中に含有されるPODの量には特に制限がなく、当該組成物の形態、用途や該組成物の他の成分等も勘案して適宜変更できるが、免疫測定用の試薬に用いる場合は、典型的に最終溶液の形態で $0.01 \mu g/ml \sim 10 mg/ml$ の範囲であってよい。

【0014】

本発明の組成物のもう一方の必須成分であるアントラニル酸誘導体は、その5位にアルキルアミド基を有する。該アルキルの例としては、メチル、エチル、プロピル、i-プロピル、ブチル、i-ブチル、t-ブチル等が上げられる。

【0015】

特に5位の置換基としてアセトアミド基を有する化合物、すなわち5 - アセトアミドアントラニル酸は市販されており、例えば東京化成工業株式会社から容易且つ廉価に入手することができる。

【0016】

該アントラニル酸誘導体の組成物への添加量も、当該組成物の形態、用途等を勘案して適宜変更できるが、典型的には最終溶液の形態で0.01乃至1w/v%、好ましくは0.05~0.5w/v%程度の範囲で添加されてよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本発明のPOD組成物には上記の2成分以外の付加的な成分を含み得る。例えば、組成物のpH調製のための緩衝剤や牛血清アルブミン等の血清タンパク質、各種無機塩類、界面活性剤等を更に含んでよく、また所望によりラクトースやデキストラン、アスパラギン酸マグネシウム等の追加的安定剤を含んでもよい。

【 0 0 1 8 】

組成物が溶液形態である場合、当該組成物のpHは4乃至9程度に維持されることが好ましい。また、組成物を凍結乾燥物形態として調製する場合も、当該凍結乾燥形態の組成物が水に再溶解された際のpHは、やはり4乃至9程度となるように上記各種成分を組成すべきである。

10

【 0 0 1 9 】

本発明のPOD組成物は免疫測定用キットの試薬として好適に利用できる。サンドウィッチ法に基づくELISA用キットの例では、キャプチャー用としての一次抗体からなる試薬と、本発明のPOD組成物、すなわち本発明のアントラニル酸誘導体を含むPOD標識抗体含有検出用試薬、及び適切な酵素基質が該キットに含まれ得る。洗浄用の緩衝液や、ウェルへの非特異的吸着を抑制するブロッキング用試薬等が更に含まれてもよい。そのようなキットの構成及びその製造方法は当業者にとって公知であろう。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明が当該実施例に限定されないことはいうまでもない。なお、以下において、特にことわりのない限り濃度(%)は、w/v%をさす。

20

【 0 0 2 0 】

【実施例】

以下の方法により本発明のPOD組成物の安定性を試験した。

【 0 0 2 1 】

すなわち、POD組成物としてPOD標識抗体溶液(POD標識抗グリアジン抗体、0.1%BSA、20mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM NaCl、0.05% Tween)を用い、これに0.1%の5-アセトアミドアントラニル酸を添加した溶液(実施例)及び無添加の溶液(比較例)を調製した。37℃で3、7、10及び14日間保存後のPODの活性を以下の測定プロトコールに従って評価した。

【 0 0 2 2 】

測定プロトコール

1. 抗グリアジン抗体(一次抗体)を固相化したマイクロプレートに100µlのサンプル溶液(それぞれ、グリアジン:0、1、32及び64ng/mlを含む)を分注する。
2. 室温で一時間静置して反応させる。
3. 300µlの洗浄液(20mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM NaCl、0.05% Tween)で6回洗浄する。
4. POD標識抗体溶液を100µlずつ分注する。
5. 室温で30分静置して反応させる。
6. 300µlの洗浄液(20mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM NaCl、0.05% Tween)で6回洗浄する。
7. 発色基質(TMB:3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を100µlずつ分注し、遮光下、室温で10分間反応させる。
8. 1N硫酸、100µlで反応を停止する。
9. 波長450nmの吸光度を測定する。

30

40

【 0 0 2 3 】

評価試験結果

上記試験の結果(2連)を表1に示した。

【 0 0 2 4 】

【表1】

表 1 : 37°CにおけるPOD組成物の安定性

	抗原 濃度 ng/ml	0日目	3日目	7日目	10日目	14日目
5-AA*添加	0	0 0	0.002 0.002	0.001 0	0.01 0.035	0.001 0.022
	1	0.111 0.099	0.116 0.119	0.106 0.113	0.124 0.146	0.109 0.120
	32	1.024 0.947	1.097 1.042	1.041 1.074	1.036 1.005	0.920 1.002
	64	1.199 1.154	1.244 1.206	1.215 1.199	1.185 1.195	1.151 1.180
5-AA*無添加	0	0.057 0.043	0.053 0.012	0 0	0 0	0.002 0
	1	0.133 0.129	0.045 0.025	0 0	0 0	0.003 0
	32	0.988 0.959	0.145 0.131	0.017 0.014	0 0.011	0.001 0
	64	1.138 1.185	0.173 0.175	0.021 0.035	0.004 0.011	0 0

5-AA : 5-アセトアミドアントラニル酸

【 0 0 2 5 】

また、上記の結果のうち、抗原（グリアジン）濃度が64 ng/mlのサンプルについての2連の平均値を、5-アセトアミドアントラニル酸添加（実施例）と無添加（比較例）の場合で、試験開始後0日目の測定値を100%として標準化し、作成したグラフを図1に示した。

【 0 0 2 6 】

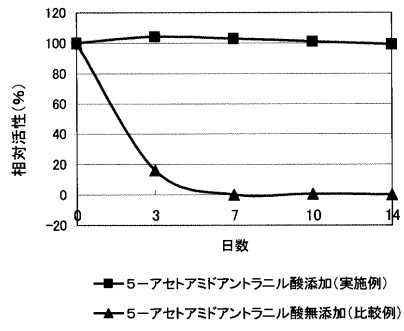
表1及び図1から明らかなように、本発明のアントラニル酸誘導体は組成物中のPOD活性を極めて有効に安定化した。

【 図面の簡単な説明 】

【 図1 】 5-アセトアミドアントラニル酸添加POD組成物（実施例）と無添加POD組成物（比較例）における37°CでのPOD酵素活性の経時的変化を示す。縦軸は0日目の酵素活性を100%とした時の相対活性（%）。横軸は日数。

【 図 1 】

図1: 37°CでのPOD酵素活性の経時の変化



フロントページの続き

- (72)発明者 村岡 嗣朗
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 松岡 由美子
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 境 雅寿
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 本庄 勉
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 特開平06 - 121683 (JP, A)
特開平07 - 140146 (JP, A)
特開平07 - 075574 (JP, A)
特開平09 - 299085 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12N 9/00-9/99
CAplus/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	过氧化物酶组成		
公开(公告)号	JP4035062B2	公开(公告)日	2008-01-16
申请号	JP2003016150	申请日	2003-01-24
申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
[标]发明人	村岡嗣朗 松岡由美子 境雅寿 本庄勉		
发明人	村岡 嗣朗 松岡 由美子 境 雅寿 本庄 勉		
IPC分类号	C12N9/96 G01N33/535		
FI分类号	C12N9/96 G01N33/535		
F-TERM分类号	4B050/CC05 4B050/CC07 4B050/CC10 4B050/HH02 4B050/KK11 4B050/LL03		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
审查员(译)	三原贤治		
其他公开文献	JP2004222634A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新的稳定过氧化物酶 (POD) 组合物，其含有廉价的化合物，在常温下稳定POD较长时间。解决方案：过氧化物酶组合物包含通式 (I) 表示的化合物[其中R是直链或支链1-4C烷基]。之

	抗原 濃度 ng/ml	0日目		3日目		7日目		10日目		14日目	
5-AA*添加	0	0	0	0.002	0.002	0.001	0	0.01	0.035	0.001	0.022
	1	0.111	0.099	0.116	0.119	0.106	0.113	0.124	0.146	0.109	0.120
	32	1.024	0.947	1.097	1.042	1.041	1.074	1.036	1.005	0.920	1.002
	64	1.199	1.154	1.244	1.206	1.215	1.199	1.185	1.195	1.151	1.180
5-AA*無添加	0	0.057	0.043	0.053	0.012	0	0	0	0	0.002	0
	1	0.133	0.129	0.045	0.025	0	0	0	0	0.003	0
	32	0.988	0.959	0.145	0.131	0.017	0.014	0	0.011	0.001	0
	64	1.138	1.185	0.173	0.175	0.021	0.035	0.004	0.011	0	0