

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-518369

(P2010-518369A)

(43) 公表日 平成22年5月27日 (2010.5.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 H	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 H	
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 5 1 H	
	GO 1 N 33/531 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-547690 (P2009-547690)
 (86) (22) 出願日 平成20年1月30日 (2008.1.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年7月29日 (2009.7.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/051162
 (87) 国際公開番号 W02008/092917
 (87) 国際公開日 平成20年8月7日 (2008.8.7)
 (31) 優先権主張番号 102007005099.4
 (32) 優先日 平成19年2月1日 (2007.2.1)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 509041991
 イムンディアグノスティック アクチエン
 ゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国 64625 ベンスハ
 イム スツベンワルド アレー 8 a
 (74) 代理人 100094053
 弁理士 佐藤 隆久
 (72) 発明者 アルムブルスター, フランツ ポール
 ドイツ連邦共和国, 64625 ベンス
 ハイム, スツベンワルド アレー 8 a
 , イムンディアグノスティック アクチ
 エンゲゼルシャフト内

最終頁に続く

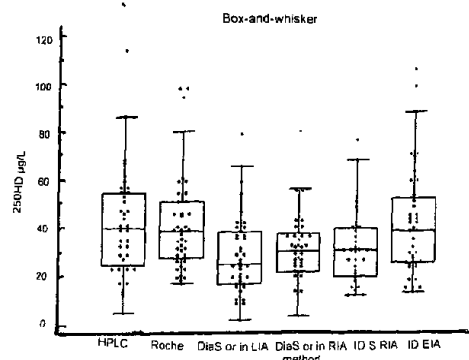
(54) 【発明の名称】 血清あるいは血漿中のビタミンDの直接決定

(57) 【要約】

プロテイナーゼKのようなセリンプロテアーゼによる血清タンパク質の消化、および競合的結合分析中でのプロテイナーゼK活性を阻害する順序立ったステップを含む、ビタミンD代謝物の事前の精製を必要としない、血漿または血清中で直接ビタミンD代謝物を定量する方法。この方法の利点は、生理的に適切な値の全範囲で高精度であること、ならびに血清および血漿試料の全自動分析に容易に適合させることができることにある。

【選択図】 図8

FIG. 8



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビタミンD代謝物の事前の精製を必要としない、血漿または血清中で直接ビタミンD代謝物を定量する方法であって、下記の諸工程、すなわち、

(a) 細胞内、外タンパク質分解活性 (endo- and exoproteolytic activity) を持つセリンプロテアーゼの、血漿または血清を含む試料への適量添加、および、ビタミンD結合タンパク質がもはやいかなるビタミンD代謝物とも結合できなくなるまで行う、血漿または血清中のビタミンD結合タンパク質の消化を実行する工程；

(b) 前記セリンプロテアーゼが実質的に不活性である、希釈緩衝剤を使用した、セリンプロテアーゼ、ビタミンD代謝物、および消化された血漿または血清タンパク質を含んでいる前記試料を希釈する工程；

(c) 固相に結合されているビタミンDトレーサー組成物を提供する工程；

(d) 関連するビタミンD代謝物に抗するモノクローナル抗体を提供する工程；

(e) 前記ビタミンD代謝物を含む前記試料、前記ビタミンDトレーサー組成物を固定した前記固相、および前記モノクローナル抗体の混合、ならびに前記セリンプロテアーゼが実質的に不活性である結合緩衝剤中で、ビタミンD代謝物、固相に結合したビタミンDトレーサー、およびモノクローナル抗体の間で、事前に決められた期間の競合的結合を実施する工程；

(f) 前記結合緩衝剤から、ビタミンDトレーサー化合物を固定した前記固相、および結合したモノクローナル抗体を分離し、選択的に前記固相を洗浄する工程；ならびに、

(g) 前記固相上のモノクローナル抗体量を決定し (determining)、標準試料との相関による血漿または血清中のビタミンD代謝物を定量する工程、を具備する、血漿または血清中で直接ビタミンD代謝物を定量する方法。

【請求項 2】

前記セリンプロテアーゼはプロテイナーゼKである、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体は、25-ヒドロキシビタミンD₃、25-ヒドロキシビタミンD₂、1 α 、25-ジヒドロキシビタミンD₂ および 1 α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃ の一つまたはそれ以上と結合する、

請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

直接測定されるビタミンD代謝物は、25-ヒドロキシビタミンD₂、25-ヒドロキシビタミンD₃、1 α 、25-ジヒドロキシビタミンD₂ および 1 α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃ からなる群から選択される、

請求項 1 ～ 3 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

タンパク質結合分析は、エライザ (ELISA) (enzyme-linked immunosorbent assay；酵素免疫測定法)、RIA (radioimmunoassay；放射免疫測定法)、FIA (fluorescence immunoassay；蛍光免疫測定法)、LIA (luminescence immunoassay；発光免疫測定法)、またはILMAのいずれか一つである、

請求項 1 ～ 4 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (a) のタンパク質の消化は、0.1 ～ 10 mg/mL のタンパク質変性剤の一つまたはそれ以上、およびサリチル酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、アニリノナフタレンスルホン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、ワルファリンから選択されるビタミンD解放剤 (releasing agents) の存在下、pH 6.0 ～ 10.0 の範囲内で行われる、請求項 1 ～ 5 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

血漿または血清中で直接ビタミンD代謝物を定量する試験キットであって、少なくとも

(i) 一つまたはそれ以上のビタミンD代謝物特異抗体、

(ii) 固相に結合されたビタミンDトレーサー、

(iii) 原液としてのプロテイナーゼK、

(iv) タンパク質変性剤の一つまたはそれ以上、およびサリチル酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、アニリノナフタレンスルホン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、ワルファリンから選択されるビタミンD解放剤を有する、プロテイナーゼKと使用するための緩衝剤；

(v) プロテイナーゼKの阻害剤をさらに有する、競合的結合分析で使用する緩衝剤、を具備する、

血漿または血清中で直接ビタミンD代謝物を定量する試験キット。

【請求項 8】

緩衝剤(v)は、0.1～50mMのEGTA、および0.5～10%(w/w)のサリチル酸およびその誘導体を有する、

請求項7に記載の試験キット。

【請求項 9】

緩衝剤(iv)は、0.1～10mg/mLの最終濃度が得られる量で変性剤およびビタミンD解放剤を有する、

請求項7に記載の試験キット。

【請求項 10】

請求項1～6のいずれか一つの方法、または請求項7～9のいずれか一つの試験キットが、血清および血漿試料の完全自動分析に用いられる、血漿または血清中で直接ビタミンD代謝物を定量する装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は血清または血漿中のビタミンDの定量方法に関する。

【背景技術】

【0002】

人間は日光の助けにより、皮膚中でビタミンD₃（コレカルシフェロール）を形成することができる。ビタミンD₂（エルゴカルシフェロール）は食物から取り込まれる。ビタミンD₂とD₃は、その側鎖においてわずかに異なるけれども、それらは同一の生物活性を持っている。それらはビタミンD結合タンパク質（VDBP）によって、循環系に結び付けられ、さらに、肝臓に25-ヒドロキシビタミンDとして代謝される。25-ヒドロキシビタミンDは体内への貯蔵形態であり、血清または血漿中で最も高い濃度を持つビタミンD代謝物である。必要とされるとき、それは生物学的に活性な形態である1α、25-ジヒドロキシビタミンD（いわゆるD-ホルモン）に、腎臓でヒドロキシル化される。そして、1α、25-ジヒドロキシビタミンDは、腸でのカルシウムの吸収、骨のミネラル添加、骨芽細胞（osteoplasts）の分化、骨基質の合成、および、とりわけ神経筋機能もまた規制する。血清1mL当たり25-ヒドロキシビタミンDが15ng（37.5nmol/L 25-OH-Vit. D/L）未満という、ごく少量の欠乏でさえ、カルシウム吸収の減少のために、副甲状腺ホルモン（parathormon）レベルの上昇を引き起こし、さらに骨吸収を増やした（Chapuy MCら、J Clin Endocrinol Metab 1996；81：1129-33）。ビタミンD欠乏は老人性骨粗しょう症に対する重要なリスク要因である。早期検診とビタミンD₂の補給が効果的な骨折の防止となる。血清1mL当たり25-ヒドロキシビタミンDが5ng（12.5nmol/L）未満である、重いビタミンD欠乏症は、子供たちにはくる病を、成人には骨軟化症をもたらす（Scharlaら、Exp Clin Endoc

10

20

30

40

50

rinol. Diabetes, 1996, 104: 289-292)。過剰摂取によるビタミンDの過剰は高カルシウム血症を引き起こす。冬の間ドイツにおいては、年齢50歳以上の人口のおよそ3分の1が、暗闇のためにビタミンD欠乏症に苦しんでいる (Scharlaら、Osteoporose Int. 1998; 8 (Supplement 2): S7-S12)。より若い人々は、胃腸病、肝臓機能障害、吸収不適合症 (マラドソープション (malabsorption))、または、例えば抗てんかん症 (antiepileptica) によって起こされる薬剤誘発性の高代謝作用のために、同じくビタミンD欠乏症で苦しむことがある。

【0003】

血清および血漿中の25-ヒドロキシビタミンD決定 (determination) のための、従来の実験室レベルの技法は非常に手間がかかる (Tannerら (1988)、J. Assoc. of Analyt. Chem., 17, 607-710)。さらに、米国特許5981779号 (Hollickら)、WO89/01631およびEP0583945 (DeLucaら) は、VDBPに結合することに基づいたビタミンD試験を教示する。それを達成するため、最初に、ビタミンD代謝物が有機溶媒を使用して血漿または血清から抽出され、それからクロマトグラフ法によって精製されなければならない。WO99/67211 (Armbrusterら) は、エタノールによる血漿および血清タンパク質の沈殿を含む試料調製を教える。タンパク質沈殿物が、それから遠心分離によって取り除かれ、さらに可溶のビタミンD代謝物を含むエタノール上澄み液が結合分析に使用される。EP0753743 (Hollis) が過ヨウ素酸塩沈殿を使う血漿または血清試料の調製を教示する。そこで、ビタミンD化合物の定量化がタンパク質除去上澄み液で行なわれる。DE10144905 (Armbrusterら) は、VDBPから25-ヒドロキシビタミンDを解放するために可溶性サリチル酸化合物が血清または血漿に加えられる、血漿または血清中の直接的なビタミンD決定方法を記述している。そこで、血漿または血清中の25-ヒドロキシビタミンDの量が、抗体を使用して直接決定される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上に述べた試料調製方法は手間がかかるか、もしくは誤りを起こし易いか、またはその両者である。本発明の目的は、血清または血漿中の25-ヒドロキシビタミンDを直接定量して決定するための、簡単で信頼性の高い方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

この課題は請求項1に基づく方法によって解決される。その方法の好ましい実施形態が従属請求項に開示されている。

【0006】

本発明によれば、血漿または血清からのビタミンD代謝物の精製を必要としない、競合的結合分析による血漿または血清中のビタミンD代謝物の直接的定量方法は、次のステップを含んでいる： (a) プロテイナーゼKのような、細胞内、外タンパク質分解活性 (endo- and exoproteolytic activity) を持つセリン・プロテアーゼの、血漿または血清を含む試料への適量添加、および、ビタミンD結合タンパク質がもうそれ以上のいかなるビタミンD代謝物とも結合できなくなるまで行う、血漿または血清中のビタミンD結合タンパク質の消化； (b) その中ではセリンプロテアーゼが実質的に不活性である、希釈緩衝液を使用した、セリンプロテアーゼ、ビタミンD代謝物、および消化された血漿または血清タンパク質を含んでいる試料の希釈； (c) 固相に結合されているビタミンDトレーサー組成物の提供； (d) 抗体、好ましくは関連するビタミンD代謝物に抗するモノクローナル抗体の提供。前記抗体は、使用されるセリンプロテアーゼの、細胞内タンパク質分解活性 (endoproteolytic activity) に対して十分に耐性を有する。さらに、 (e) ビタミンD代謝物 (検体) を含む

試料、ビタミンDトレーサー化合物を固定した固相、およびモノクローナル抗体の、事前に決められた期間の混合、ならびにその期間中の、結合緩衝剤中のモノクローナル抗体に対する、ビタミンD代謝物とビタミンDトレーサーの競合的結合反応の実施。ここにおいて、セリンプロテアーゼは本質的に不活性であり、ビタミンDと残っている血清タンパク質との非特異的結合は起きない。さらに、(f) 結合緩衝剤からの、ビタミンDトレーサー化合物を固定した固相、および選択的に結合したモノクローナル抗体の分離、さらに選択的なその固相の洗浄；さらに、(g) 固相上のモノクローナル抗体量の決定、さらに、(h) 比較データを使用した血漿または血清中のビタミンD代謝物量の決定。

【0007】

前記方法の好ましい一つの実施形態において、0.1～5.0% (w/v) のゼラチン、1～10 mmol/L のEDTAまたはEGTA、および任意にセリンプロテアーゼ阻害剤、ならびに0.005～0.050% (w/v) のβ-メルカプトエタノールの存在下に、pHの値が3から10の間で、結合分析が行われる。ステップ(d) および(f) で使用される抗体は、また、モノクローナル抗体の混合物であってもよく、それらは、各々25-ヒドロキシビタミンD₃ および25-ヒドロキシビタミンD₂ に特異的に結合する。本発明の一つの実施形態において、モノクローナル抗体は25-ヒドロキシビタミンD₃ もしくは25-ヒドロキシビタミンD₂ またはその両者と結合することができる。本発明の前記方法の別の実施形態において、モノクローナル抗体は1α、25-ジヒドロキシビタミンD₂ もしくは1α、25-ジヒドロキシビタミンD₃、またはその両ジヒドロキシビタミンD代謝物と結合することができる。

【0008】

本発明に従う方法によって決定されるビタミンD代謝物は、25-ヒドロキシビタミンD₂、25-ヒドロキシビタミンD₃、1α、25-ジヒドロキシビタミンD₂、1α、25-ジヒドロキシビタミンD₃ から選択される。タンパク質結合分析、およびその後の定量は、好ましくは、エライザ(ELISA) (enzyme-linked immunosorbent assay；酵素免疫測定法)、RIA (radio-immunoassay；放射免疫測定法)、FIA (fluorescence immunoassay；蛍光免疫測定法)、LIA (luminescence immunoassay；発光免疫測定法)、ILMA (immunoluminometric assay)、またはECLA (electrochemical luminescence assay；電気化学的発光分析) により行われる。結合モノクローナル抗体の量は、好ましくは二次抗体を使用して決定される。また、その二次抗体は通常異なった種の一つである。結合分析のためのモノクローナル抗体は、また、定量化可能な色、酵素、蛍光、発光、化学発光(chemoluminescence) (例えばアクリジン) または電界発光(electroluminescence) (例えばルテニウム錯体) 標識に結合され得る。

【0009】

本発明のさらなる態様は、ビタミンD代謝物に特異的な一つまたはそれ以上の抗体、固相に固定したビタミンDトレーサー、プロテイナーゼKおよび適当な緩衝液を含む、上記の方法を実行するための検査キットに関係する。本発明の検査キットの好ましい緩衝液は、薬剤変性した消化緩衝剤(digestion buffer)、後からプロテイナーゼKのようなセリンプロテアーゼによって消化され、破壊される、折り重ならない(unfolding) ビタミンD結合タンパク質、分析緩衝剤、を有し、好ましくは、プロテイナーゼK阻害物質およびサリチル酸解放薬剤(salicylic releasing agent)、好ましくは、ビタミンDが部分消化された血清タンパク質へ非特異的に背後結合(back-binding) するのを避けるため、0.1～1.0 mol/L のサリチル酸を含んでいる。

【0010】

上記の通り、本発明の方法において、血漿または血清試料は、分析の前に、ビタミンD代謝物に結合し得るすべての血漿または血清タンパク質が、もはやどのようにしても25

10

20

30

40

50

ーヒドロキシビタミンDまたは他のどんなビタミンD代謝物とも結合しないように消化され、および分解されるようにプロテイナーゼKで処理される。これは、好ましくはプロテイナーゼKによって消化されて達成される。もっとも好ましくは、タンパク質D結合タンパク質が折り重ならず、タンパク質分解酵素によって消化されるように、タンパク質変性剤およびビタミンD解放剤 (releasing agents) の存在下に消化されるのが好ましい。その後、血清または血漿を処理したプロテイナーゼKの分割量が、プロテイナーゼKの活性を阻害して止め、また、残存する血清タンパク質にビタミンD代謝物が非特異的または特異的に結合するのを防止する、緩衝液で薄められる。さらに、試料中のビタミンD代謝物の必要量は抗体、好ましくはプロテイナーゼKに対して十分に耐性があるモノクローナル抗体の競合的結合分析を用いてすばやく決定される。上記の通り、セリンプロテアーゼでの消化の前に変性剤 (denaturing agents) を添加することによって、ビタミンD結合タンパク質の完全な消化が確実になされ得る。有用なタンパク質変性剤は、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) (0.1%)、洗浄剤、ならびに次のようなビタミンD解放薬剤、すなわち、サリチル酸、ワルファリン、スルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、アニリノナフタレンスルホン酸 (ANS)、特に1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸 (1, 8-ANS) および8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸 (8-ANS)、サリチル酸類およびそれらの誘導体のような酸性変性剤である。そして、これら薬剤の濃度は、血清1 mL当たりの濃度で、好ましくは、0.01~20 mg/mL、より好ましくは、0.1~10 mg/mL、もっとも好ましくは、0.5 mg/mL以上の、有効濃度である。変性剤の量と型は、それぞれの血清タンパク質分解酵素に対して個々に選択され、選定されなければならない。

【0011】

従来の方法と比較して本発明による方法は、ビタミンD結合タンパク質がそれらの消化の後に測定を妨害することができないという利点を持っている。VDBPを別として、多くの他のタンパク質、例えばアルブミン、フェトプロテインなどがビタミンDと結合でき、そしてこれらのタンパク質が血清中に豊富であることは指摘されるべきである。これらのタンパク質は、周知の方法に従ってエタノールまたは過ヨウ素酸塩を使用して従来の沈殿により、主にビタミンD代謝物から分離されるけれども、緩衝剤が交換される競合的結合分析の間に、いくらかの残存量が試料中に留まり復元されることもあり、その後、結合分析を妨害し得る。残存タンパク質の量はまた、容器壁または固相に、さらに、使用される型によっては、ビタミンDトレーサーにさえ結合することができ、このため、このことが測定を著しく改ざんする。解放および結合緩衝剤中での、サリチル酸化合物またはワルファリンのようなビタミンD置換剤 (displacement agents) の使用は、この根本的な問題を解決しない。

【0012】

この問題は、血清または血漿をプロテイナーゼKと処理することによって、根本的に変えられる。第一に、このような血漿および血清タンパク質の酵素的処理は、制御が容易な確立された方法であり、予期しない沈殿の危険が無い。第二に、変性沈殿とは対照的に、消化の後、さらに、培地または緩衝剤の変更後においてさえ、タンパク質は復元されない。第三に、変性剤とビタミンD解放剤の添加によって、測定結果が安定させられるか、または強くされ、補完されるまで、消化は随意に延ばされ得る。第四に、タンパク質沈殿とは対照的に、プロテイナーゼKを使用する消化は容易に自動化され得る。したがって、残っている問題は、プロテイナーゼKの存在によって競合的結合分析が妨害されないことを確保することのみである。本発明によれば、この問題はpH条件を変化させ、ゼラチン含有緩衝剤中のプロテイナーゼKの希釈によって、より一般的には、これらがプロテイナーゼKの活性を阻害するように条件を変えることによって、解決される。プロテイナーゼKの活性はEGTAの添加によって、さらに阻害され得る。

【0013】

EGTAは化学物質エチレンジグリコール四酢酸、すなわち、より良く知られているEDTAと同類のキレート剤であるが、マグネシウムイオンに対するよりカルシウムイオン

10

20

30

40

50

に対して、ずっと高い親和力を有する。それは生きている細胞の中の環境、すなわち、通常カルシウムイオンがマグネシウムより少なくとも1000倍以下の濃度である環境に似ている、緩衝液を作ること役立つ。四塩基性EGTAによるカルシウムイオン結合のためのpKaは11.00であり、EGTAはさらにプロテイナーゼKの阻害物質である。さらに、本発明による競合的結合分析は、十分にプロテイナーゼKに対して抵抗する結合パートナーの使用によって特徴付けられる。この本発明による競合的結合分析は、プロテイナーゼKのような非結合タンパク質をすばやく希釈し、分析系内から系外に洗い出す、さらに多数の洗浄を含む。容器壁または固相内に残存しているプロテイナーゼKの量は無効にされて、結合分析または結合抗体量の決定の妨害をしない。

【0014】

本発明のさらなる利点、特徴および実施形態が、発明の詳細な説明、実施例および図に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、本発明の実施例1に従ってELISA（37℃で1時間プロテイナーゼKを消化）により決定される血清25-ヒドロキシビタミンDの直接測定値と、従来のサリチル酸解離試薬を利用したELISAによる値との相関をグラフ表示で示す。

【図2】図2は、本発明の実施例1に従ってELISA（37℃で1時間プロテイナーゼKを消化）により決定される血清25-ヒドロキシビタミンDの直接測定値と、IDS社に所有権のあるワルファリン含有の解放および解離緩衝剤を利用する、イムノディアグノスティックシステムズ リミティッド（Immunodiagnostic Systems Limited；IDS）社（Limited）、UKの25-ヒドロキシビタミンD ELISAによって決定される血清25-ヒドロキシビタミンD値との相関をグラフ表示で示す。

【図3】図3は、ビタミンDを測定するために別個に確立された二つの分析標準法、すなわち、LC-MS（液体クロマトグラフィー質量分析）/MS（質量分析）測定法、およびHPLC（高速液体クロマトグラフィー）測定法の相関図を示す。

【図4】図4は、実施例5に従った、IDS法と標準LC-MS/MS法とによって得られる、直接の血清値の相対的な差を表すブランドアンドアルトマンプロット（Bland & Altman Plot）を示す。

【図5】図5は、実施例5に従った、本発明による方法によって得られた測定結果と標準HPLCの測定結果の箱髭図（box and whisker plot）を示す。

【図6】図6は、実施例5に従った、本発明による方法によって得られた測定結果と標準HPLCの測定結果の相関プロットを示す。

【図7】図7は、本発明の方法によって得られた測定結果と、実施例5に従って得られた平均量を比較しての百分率の差を表すブランドアンドアルトマンプロット（Bland & Altman Plot）を示す。

【図8】図8は、本発明による直接タンパク質分解法（ID 酵素免疫測定法（EIA））、直接解離法（IDS 放射免疫測定法（RIA））、および三つの間接的な商業的方法（Roche、DiaSorin RIAおよびDiaSorin LIA）によって得られるビタミンD血清値、ならびに標準HPLCによって得られる血清値とを比較する、箱髭図（box and whisker plot）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

プロテイナーゼKは、質量28.904Da（ドルトン）の、菌トリチラチウムアルブム（fungus Tritirachium album）からの高活性なサブチリシン型（subtilisin-type）セリンプロテアーゼである。その酵素は、天然タンパク質および変性タンパク質に対して広い特異性を持ち、一般的にDNAおよびRNAの精製に使用される。ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）または尿素のような変性剤、および50～60℃への加温もまた、その活性を増進する。その推奨される濃度は、タン

10

20

30

40

50

パク質除去および酵素活性化のためには、 $50 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、組織処理のためには $2 \text{mg}/\text{mL}$ までである。血漿および血清タンパク質の除去において、好ましくは、プロテイナーゼKは $37 \sim 50^\circ\text{C}$ で、 $100 \sim 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ （血清 1mL 当たり）の最終濃度で使用された。プロテイナーゼKは、通常、リポフィライズド粉（lyophilised powder）から $20 \text{mg}/\text{mL}$ の原液として調製され、さらに、使用するまで -20°C で保存される。その酵素は、 $\text{pH} 7.5 \sim 12$ の範囲で活性である。それは $50 \sim 60^\circ\text{C}$ でその最大の触媒活性に到達する。プロテイナーゼKは、安定性のためにはカルシウムイオンの存在を必要とするが、タンパク質分解活性のためにはカルシウムイオンの存在を必要としない。本発明によれば、通常、血漿または血清中でのタンパク質の消化は、 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプロテイナーゼK（ 50mM のトリス塩酸、 $\text{pH} 8.0$ ； 10mM の CaCl_2 中、 20mg のプロテイナーゼK/ mL を含む原液からの）によって、 $25 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、最も好ましくは 37°C において、 60 分間にわたって起き、任意に（optionally）、 0.1% SDS、または、ワルファリン、 8-ANS 、 $1, 8\text{-ANS}$ 、トルエンスルホン酸等のようなビタミンD解放剤の存在下に、最も好ましくは $0.1 \sim 10 \text{mg}/\text{mL}$ 、最も好ましくは $0.5 \sim 2 \text{mg}/\text{mL}$ の 8-ANS の存在下に起きる。

【0017】

X線回折結晶学的研究は、プロテイナーゼKが2つのカルシウム結合部を持っていることを示した（Bajorathら、1989、Nature 337、481-484）。 Ca^{2+} は直接触媒機構に関与してはいないけれども、それを除去するとプロテイナーゼKの活性を、元の値の約20%に減少させる。これは、合成スクシニル-Ala-Ala-p-ニトロアニリド標準基質を使用して測定された。本発明によれば、 Ca^{2+} の除去は、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）またはエチレングリコール四酢酸（EGTA）のような金属イオン封鎖剤またはキレート剤の、例えば $2 \sim 10 \text{mmol}/\text{mL}$ 濃度での添加によって達成される。プロテイナーゼKはさらに、フッ化フェニルメチルスルフォニル（phenylmethylsulfonyl fluoride；PMSF）、ジイソプロピルフルオロホスホン酸塩（diisopropyl fluorophosphate；DFP）または4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルフォニルフルオリド [4-（2-Aminoethyl）benzenesulfonyl fluoride；AEBSF] のようなセリンプロテアーゼ阻害剤によって非活性化される。AEBSFはPMSFより類似の抗菌力スペクトラムを持つが、しかし、特に低い pH 環境で、かなりいっそう安定している。一般的には、 $0.1 \sim 1 \text{mM}$ 濃度の溶液が使用される。パラクロロマーキュリーベンゾエート（para-chloromercuribenzoate；PCMB）、L-1-トシルアミド-2-フェニルエチクロロメチルケトン（L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone；TPCK）、N-アルファ-p-トシル-L-リシルクロロメチルケトン（N-alpha-p-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone）、N-エチルマレイミド（NEM）、ヨードアセトアミド（iodoacetamide）、およびo-フェナントロリン（o-phenanthroline）のようなスルフヒドリル試薬が、プロテイナーゼKの活性に限定された影響のみを与える。

【0018】

試料の pH は、抗体上のタンパク質結合分析のために、 $3.0 \sim 10.0$ へ、好ましくは $7.0 \sim 8.0$ へ設定される。特に望ましい実施形態では、抗体上のタンパク質結合分析は $6.0 \sim 8.0$ の pH において実行される。さらに、緩衝剤は遊離 Ca^{2+} を結合するために、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）またはエチレングリコール四酢酸（EGTA）のような金属イオン封鎖剤またはキレート剤を過剰に、例えば $2 \sim 10 \text{mmol}/\text{mL}$ 含んでいる。タンパク質分解酵素のどんな残存活性をも相殺するために、血清中の通常のカルシウム濃度が十分であるので、プロテイナーゼKの消化のために Ca^{2+} イオンを添加する必要はない。最終的に、タンパク質結合分析のための希釈緩衝剤は、 $0.5 \sim 10$ 重量%のゼラチン、好ましくは $0.5 \sim 2$ 重量%のゼラチンを、 $1 \text{mmol}/\text{L}$ の β -

メルカプトエタノールとともに含む。それゆえ、結合緩衝剤は、pH 6.0～10.0（好ましくはpH 8.0）の、50 mmol/Lのリン酸二水素ナトリウム（ NaH_2PO_4 ）／リン酸水素ナトリウム（ Na_2HPO_4 ）、1～2%（好ましくは0.05～0.5%）のゼラチン、2～5 mmol/LのEGTA、0.005～2 mM（好ましくは0.005重量%）のβ-メルカプトエタノール、および任意にプロテイナーゼK阻害剤、を有する緩衝剤を含むことが好ましい。

【0019】

結合分析において、遊離脂肪酸、コレステロールおよび他の脂質の妨害を防ぐために、任意に、0.1～5重量%、好ましくは1～3重量%の天然および／または化学修飾されたシクロデキストリンを添加することができる。それゆえ、一つの好ましい実施形態において、脂肪酸、コレステロール等の妨害分子を封鎖および遮蔽（masking）するために、洗浄および希釈緩衝剤はシクロデキストリンを含む。シクロデキストリンは、試料中の最終濃度を基にして、好ましくは0.1～10重量%、好ましくは0.2～7.5重量%、最も好ましくは1～5重量%添加される。シクロデキストリンはまた、例えば、メチル、エチル、プロピル、ヒドロキシエチル、2-ヒドロキシプロピル、グリコシル、マルトシル（maltosyl）、カルボキシメチルの各基によって化学修飾される。天然シクロデキストリンおよび2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが特に好ましい。

【0020】

本発明による方法は、25-ヒドロキシビタミンD₂、25-ヒドロキシビタミンD₃の定量に適しており、および、他の実施形態においては、1α、25-ジヒドロキシビタミンD₂および1α、25-ジヒドロキシビタミンD₃の定量に適している。もし、D-ホルモンの濃度がビタミンD貯蔵型とは別に決定されるならば、試料の精製が必要とされる。D-ホルモンは、ジヒドロキシ種に対して特異的である抗体に結合することによって識別される。D-ホルモンに対して特異的であるが、25-ヒドロキシビタミンDには特異的でないモノクローナル抗体がよく知られている。

【0021】

本発明によるタンパク質結合分析は、エライザ（ELISA）（酵素免疫測定法）またはRIA（放射免疫測定法）として実行され得る。特に好ましいのは、蛍光またはケモルミネッセント（chemoluminescent）標識（FIAまたはLIA）に基づいた非放射方式（システム）である。もしビタミンDトレーサーが酵素、例えばアルカリホスファターゼまたは蛍光性もしくはケモルミネッセント（chemoluminescent）標識に結合されるならば、固相または反応容器壁が、通常、決定されるはずであるビタミンD化合物に抗する抗体で覆われる。

【0022】

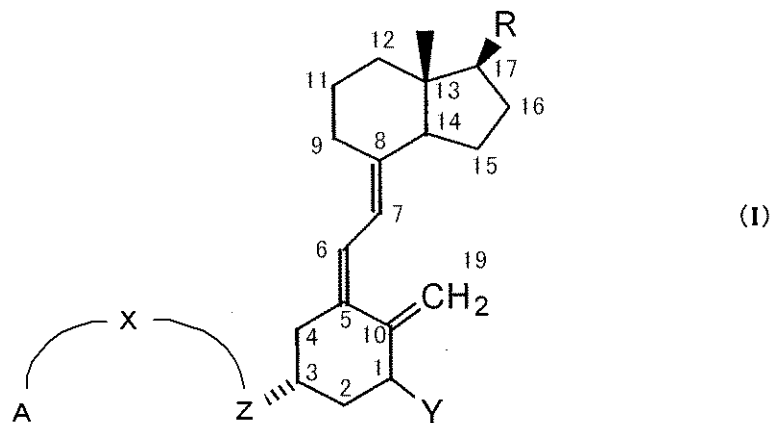
本発明の方法において、ビタミンD代謝物の定量が血漿の血清のような液体試料で直接行なわれ得ることは有利である。試料は、問題のあるタンパク質沈殿、有機物の抽出および／またはカラムクロマトグラフィーのような準備を必要としない。その代わりに、決定されるはずであるビタミンD代謝物は、ビタミンD結合タンパク質（VDBP、アルブミンおよびその他多くのもの）のタンパク質分解酵素Kの消化によって、その結合部から切り離される。もちろん、サリチル酸化合物は、インビトロでタンパク質からビタミンD代謝物を切り離すことができるが、再活性化形態に変性されたタンパク質（diverted proteins）の結合分析において、関与を避けることができない。我々の分析は、ビタミンD結合タンパク質／サリチル酸錯体がまた、その壁に吸収され、さらに後に、またビタミンDトレーサーに結合することを示唆する。前述した通り、ビタミンD結合タンパク質は高特異的VDBP（Gc-グロブリンまたは群特異的成分）だけでなく、アルブミン、α-フェトプロテインおよびその他多くのもののような多くのタンパク質を含んでいる。これらのタンパク質はまた、25-ヒドロキシビタミンDおよび1α、25-ジヒドロキシビタミンDと、大体高い特異性及び親和性を持って結合し得る。もしビタミンD試料の精製が、エタノールによる、または変性によるタンパク質沈殿の場合のように

、比較的不完全であれば、そのときは、試料溶液中のタンパク質は、競合的結合分析の間、ビタミンDトレーサーと結合し得る。さらに、ビタミンDの定量は、タンパク質沈殿の完全性または試料中のコレステロールの量といった偶然の一致に依存する。有機物の抽出および／またはビタミンD化合物のクロマトグラフィーによる精製は、これらのステップがまた、試料の性質に依存して、中でも、ビタミンD結合タンパク質が試料中にどれだけ多く存在しているか、そして、それがリパエミック (l i p a e m i c) 等であるかに依存して、トレースが可能なビタミンDの量に影響を与え、さらに変化させるので、その定量を改善しない。一方、本発明による方法は、誤りを起し易いビタミンD代謝物の精製は必要ではなく、さらにタンパク質結合分析は血漿または血清中で直接行われるという利点を有する。

10

【0023】

本発明はまた式 I のビタミンD誘導体の使用を含む：



20

30

40

ここで、Zはエーテル基の酸素もしくは硫黄原子または炭素である；Xは、0.8～4.2 nmの長さの置換または非置換炭化水素部分である；Yは水素または水酸基である；Aは、機能性ビタミンD誘導体を固相に結合させるために、高親和性を持つプロテイナーゼKに耐久性のあるタンパク質、例えば、モノクローナル抗体またはストレプトアビジンによって結合され得る、固相（容器壁、ビーズ、標識固体粒子または磁粉）、または官能基である。RはビタミンD代謝物の側鎖、好ましくはビタミンD₂またはビタミンD₃の25-ヒドロキシ化側鎖である。

【0024】

リンカーXは、S、O、NもしくはPのような一般的なヘテロ原子、ペプチド、ケトン

50

、または置換もしくは非置換アミノポリエーテル部分を含む、 $0.8-4.2$ nm、好ましくは約 $0.9-1.5$ nmの長さの、 C_8-C_{12} 基であり、最も好ましくは、アミノウンデカン酸、またはヘキサミド (hexamido)、オクタミド (octamido) もしくはデカミド (decamido) -アミドプロピルリンカー基である。側鎖Rおよび基Yを有する、基AおよびビタミンD抗原決定因子の間の間隙は、モノクローナル抗体が固相からの妨害無しに結合できることを許す。好ましいのは、ストレプトアビジンを介して固相に結合される、 25 -ヒドロキシビタミンD- $3\beta-3-[6-N-($ ビオチニル)ヘキサミド]アミドプロピルエーテル、および対応する 1α 、 25 -ジヒドロキシビタミンDビオチン化合物である。

【0025】

本発明による方法は、それゆえに、血清または血漿中の 25 -ヒドロキシビタミンDおよび 1α 、 25 -ジヒドロキシビタミンDの非放射性定量を、複雑な試料調製を要求すること無く可能にする。したがって、本方法は特に、骨粗しょう症の予防のための逐次試験に適している。

【0026】

本発明のさらなる態様は、 25 -ヒドロキシビタミンDおよび 1α 、 25 -ジヒドロキシビタミンDのようなビタミンD代謝物の決定のための、特に、機能性ビタミンDおよび適切なプロテイナーゼK水溶液を含む試薬キットに関する。任意に、そのキットは、 25 -ヒドロキシビタミンD $_2/3$ 、または 1α 、 25 -ジヒドロキシビタミンD $_2/3$ 、または異なるビタミンD代謝物に抗する抗体を意味する抗ビタミンD抗体、コーティングされた (coated) マイクロタイタープレート、および/または磁性もしくは他の微小粒子、および試薬を含む。

【0027】

原則として、血漿または血清試料の代わりに、牛乳 (ミルク) またはチーズ等のような食料が、それらのビタミンD含有量を直接分析され得る。ある場合には、基質 (matrix) の性状によって、妨害物質を抽出または沈殿によって試料から取り除くことは明白であり得る。精製後に残っているビタミンD結合タンパク質の妨害は、その後、プロテイナーゼKと共に消化によって取り除かれ得る。

【0028】

<実施例1> 血清または血漿中の 25 -ヒドロキシビタミンDの決定

(i) ビタミンDトレーサーの固相への結合

25 -ヒドロキシビタミンD- $3\beta-3-[6-N-($ ビオチニル)ヘキサミド]アミドプロピルエーテルが、ストレプトアビジンを介して固相に結合された。このために、ストレプトアビジンの 100 ngの部分が、 $pH 9.6$ で、 60 mMの重炭酸ナトリウム $200\mu L$ に溶解されて、最初に、マイクロタイタープレートの空洞に導入され、さらに、当該プレートは $4^\circ C$ で一晩インキュベートされた。ストレプトアビジン溶液はその後除去され、当該空洞は $200\mu L$ の洗浄緩衝液 (50 mmol/Lのリン酸緩衝液、 $pH 6.0$ 、 0.05% のツイーン (Tween) - 20 (登録商標)) で 5 回洗浄された。次に、 $250\mu L$ のブロック (block) 緩衝剤 (リン酸緩衝液、 $pH 6.0$ 、 0.5% のカゼイン、 1% のゼラチン、 1% のチメロサル) が各々の空洞に満たされ、 1 時間インキュベートした後除去され、その後、各空洞は再度 $200\mu L$ の洗浄緩衝液で 5 回洗浄された。その後、 $200\mu L$ の洗浄緩衝液中 10 ngの 25 ビオチン-ヒドロキシビタミンDが、各空洞に導入されて、 $2-8^\circ C$ 下、振とうしながら暗所で一晩インキュベートされ、ビオチン-ビタミンD溶液が取り除かれ、さらに該空洞が再度 $200\mu L$ の洗浄緩衝液で 5 回洗浄された。つづいて、液体の標準物質または試料から 25 -ヒドロキシビタミンDの存在下、ビタミンDとモノクローナルマウス抗体 (ID2) の結合が行われた。

【0029】

(ii) 試料処理と調製

血清および血漿試料は、単に室温で短期間貯蔵された。もし分析が試料採取後 24 時間以内に実行されるならば、該試料は $4-8^\circ C$ で貯蔵される。そうでなければ、試料は分析

10

20

30

40

50

まで -20°C で貯蔵される。試料を何度も冷凍および解凍することは避けられた。溶血は結果を妨害しない。全血液は試料物質として使用されないかもしれない。リパエミック (Lipae mic) 試料は、約30,000×Gで10分間遠心分離され、その後、水相がピペットを使用して上澄みの脂肪層を通して取り除かれた。強いリパエミック (lipae mic) の試料の場合には、脱脂キットが使用された。

【0030】

80 μL の血漿または血清が、800 μL のプロテイナーゼ K 溶液 (50 mM のトリス塩酸中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプロテイナーゼ K L、pH 8.0; 10 mM の CaCl_2 、10% SDS または 1 mg/mL の 8-ANS) に添加され、よく混合され、水浴中 37°C で1時間インキュベートされた。この間に、プロテイナーゼ K は、VDBP (Gc-Globulin) およびアルブミンのような他のビタミン D 結合血清タンパク質を、それらがもはや 25-ヒドロキシビタミン D_2/D_3 またはジヒドロキシビタミン D_2/D_3 と結合できなくなる大きさまで分解する。

【0031】

(iii) 競合的結合

洗浄緩衝液 (50 mM リン酸緩衝液、pH 8.0、2.0 mM EGTA、0.005% の β -メルカプトエタノール、0.1% (w/v) のゼラチン、任意に、0.5~10% のサリチル酸) 中の 200 μL モノクローナルマウス抗 25-OH-ビタミン D 抗体 (1:125, 000) と、20 μL の標準、対照 (コントロール) または試料が各々の空洞に導入された。マイクロタイタープレートが、 $8\sim 10^{\circ}\text{C}$ 下、暗所で一晩振とうされた。その後、試料中の 25-ヒドロキシビタミン D は、モノクローナル抗ビタミン D 抗体上の結合部 (サイト) に対して、内壁上のビタミン D トレーサーと競合した。その後、溶液が空洞から取り除かれ、該空洞は 250 μL 洗浄緩衝液で各々 5 回洗浄された。

【0032】

pH、緩衝剤中のゼラチンおよび EGTA による遊離 Ca^{2+} の除去は、競合結合分析の間、プロテイナーゼ K がどんな残存量であっても、モノクローナル抗体は切断されないということをもたらした。しかしながら、血清アルブミン (serum albumin) のような、試料中に存在しているビタミン D 結合タンパク質は、最新技術において、しばしば誤って高いビタミン D 含有量を導きだす、ビタミン D トレーサーへのより長い結合はすることができなかった。

【0033】

(iv) 競合的結合の決定

200 μL の複合体 (マークされた、やぎ-抗-マウス-MAB 抗体ペルオキシダーゼ) が、洗浄緩衝液中に 1:2, 500 で溶解され、空洞に導入されて、振とうしながら室温で1時間インキュベートされた。その後、溶液が取り除かれ、該空洞は 250 μL 洗浄緩衝液で各々 5 回洗浄された。呈色反応のために、200 μL のテトラメチルベンジジン (TMB) -基質溶液 (BioFX ラボラトリーズ社の) が、該空洞に導入された。20 分後に、空洞当たり 50 μL の 2 M 硫酸の添加によって、色の発生が止められた。光学的濃度 (optical density) 測定が、450 nm と 620 nm の参照波長 (または 690 nm) で、光度計により実行された。

【0034】

<実施例 2>: 本発明によるタンパク質分解試験システムの分析感度

本発明による試験システムの検出限界の決定のために、競合的結合および測定が、ビタミン D 代謝物を含まないか、または標準的な規定量を含む以外は、本質的に実施例 1 と同じように行われた。結果は下記の表 1 に示される。

【0035】

【表 1】

タンパク質分解性システムでの 25-ヒドロキシビタミンDの検出限界

試料、0 nmol Vit.D/L 40x		標準校正曲線の光学密度 (Optical Density)		
		OD1	OD2	標準 (nmol/L)
1.388	1.424	1.442	1.374	0
1.438	1.376	1.172	1.196	6.4
1.46	1.376	0.988	0.871	16
1.369	1.409	0.63	0.554	40
1.504	1.463	0.373	0.312	100
1.418	1.339	0.269	0.25	250
1.396	1.34			
1.476	1.401			
1.37	1.318			
1.424	1.449			
1.554	1.36			
1.354	1.373			
1.404	1.392			
1.386	1.413			
1.421	1.398			
1.48	1.439			
1.382	1.43			
1.366	1.411			
1.328	1.469			
1.415	1.476			

10

20

【0036】

ブランク試料の平均ODは1.41、標準偏差は0.05ODであった。25-ヒドロキシビタミンDの検出限界は、わずか2 nmol/Lであり、これは約0.8 ng/L (

30

【0037】

<実施例3>：タンパク質分解システムの再現性

タンパク質分解システム1のための独立した測定値間の対応が決定された。正確さは、分散値と平均値との間の標準偏差および相対的な標準偏差(変動係数)に起因する。標準的な血清試料が肯定的な(ポジティブ)比較試料として使用された。平均濃度は41.4 nmolの25-OH-Vit. D/Lであった。残存値(remaining values)に対して、決定された検出限界が使用された。血清試料に対する結果は表2に示される。

40

【0038】

【表 2】

タンパク質分解法のIntra-assayの分散(variance)

	校正曲線		
1試料、20操作(runs):	OD1	OD2	標準 (nmol/L)
	1.442	1.374	0
平均光学的濃度(Optical Density): 0.622	1.196	1.172	6.4
	0.988	0.871	16
平均濃度: 41.4 nmol/L	0.63	0.554	40
	0.373	0.312	100
Intra-assayの分散(variance) : 10%	0.269	0.25	250

10

【0039】

個別分析系間の（分析法間の）正確さは、一つまたはそれ以上の周知および未知の要因の変化を示す。これを達成するために、上記試料は、異なる日に10回、準備され、分析された。結果は表3に示される。

【0040】

【表 3】

タンパク質分解法のInter-assayの分散

異なる日での1試料の10回の INTER-ASSAYによる分析	測定 (in nmol/L)
	40.0
	33.6
	38.6
	36.5
	43.6
平均値: 38.7 nmol/L	38.1
	44.8
	38.0
安定値(Stability value)/平均値*100=CV	38.0
	35.8
CV in %	8.31

20

30

したがって、inter-assayの分散(variance)は8.31%である。

【0041】

<実施例4>：方法比較および相関分析

測定値の精度は、同一被検体の検出のための異なった試験システムからの定量結果の相関によって決定された。相関分析の目的は、一方では、本発明によるタンパク質分解システムであり、他方では、DE10144905およびEP1097132によるELISAであった。それらの方法は主に試料調製において異なった。実施例1で記載されたように、タンパク質分解法は実行された。図1と表4が測定値の相関を示す。

40

【0042】

【表 4】

従来のE L I S Aとタンパク質分解法を使用した結果の相関

試料	従来法の結果	タンパク質分解法の結果
	nmol/L	nmol/L
血漿1	5	4.2
2	20	22.9
3	40	32.2
4	5	9.6
CS	30	13.6
血清1	50	63.9
2	10	10.6
3	20	27.1
4	30	23.2
DS1	12	2.9
DS2	11	2.3
高(High)1	150	81.4
2	90	50.6
3	101	96.7

10

20

D S＝不十分な血清、

高(High)＝周知の高い25-OH-Vit. Dレベルの血清；

C S＝自身の血漿

【0043】

その相関分析は、本発明のタンパク質分解プロトコル（p r o t o l）および血清中の直接測定の詳細な利点を示す。特に、不十分な血清、おそらく、固相にビタミンDトレーサーを結合するV D B P（G c－g l o b u l i n）のような、ビタミンD結合血清タンパク質およびビタミンD結合血漿タンパク質の、解離後の高すぎる値、のような場合。それゆえ、血清または血漿中のG c－グロブリン（g l o b u l i n）レベルはビタミンDの決定を妨害する。相関分析は低ビタミンD値で逸脱する後退を示す。

30

【0044】

さらに、本発明による方法は、I D S社、U Kの商業的ビタミンD酵素免疫測定法と比較された。I D S社の25－ヒドロキシビタミンDキットは、血清または血漿中の25－ヒドロキシビタミンDおよび他のヒドロキシル化された代謝物の定量のための酵素免疫測定法である。この標準法において、コントロールと試料が、I D Sに独占所有権のある（p r o p r i e t o r y）解離緩衝剤（おそらくビタミンD置換剤としてワルファリンを含んでいる）で処理され、その後、25－ヒドロキシビタミンDの既知量が結合競合物質として添加され、希釈試料が、特定の25－ヒドロキシビタミンD抗体でコーティングされたマイクロタイタープレートの空洞内で2時間インキュベートされ、その後吸引され、最終的に当該空洞は洗浄される。ビオチン標識された25－ヒドロキシビタミンDの結合が、ビオチンに選択的に結合する西洋わさびペルオキシダーゼ標識アビジンで検出された。さらなる洗浄ステップの後、発色基質（T M B）中で、実施例1のように、発色（c o l o u r d e v e l o p m e n t）が実行された。中断された反応混合物の吸収が、マイクロタイタープレート光度計で測定された。測定色強度は、25－ヒドロキシビタミンD濃度に反比例していた。I D S試験キットは、血清または血漿中の結合タンパク質から25－ヒドロキシビタミンDおよびその代謝物を解離するための、会社所有の未開示試薬を使用する。

40

【0045】

50

図2は、25-ヒドロキシビタミンDおよびそのヒドロキシル化された代謝物の検出のための、二つの方法／試験の量的な単一結果（84血清）を示す。結果は直線に沿って、その周囲に存在している。相関係数Rは0.969である。しかしながら、回帰（regression）は平行オフセット（parallel offset）である。したがって、解離法でのIDS-ELISAは常に高い値を産出する。

【0046】

<実施例5>：LC-MS/MSおよび高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用して測定された値の比較

図3は、高速液体クロマトグラフィーおよびLC-MS/MSによる測定結果である、二つの別個に確立された分析標準法の相関図である。その図は、これらの二つの方法が、それらが、間接的および直接的ビタミンDイムノアッセイ（免疫学的測定）によって得られる値の正確さのために、基準として使用され得るようによく一致することを示す。

10

【0047】

291の試料の一群が商業的IDS分析を使用して分析され（実施例4参照）、結果がLC-MS/MS分析を使用して得られた結果と比較された。試料調製とELISAは、試験キットに付いている取扱説明書に正確に従って実行された。図4は、その二つの方法によって得られた測定値間の相対的な差を表しているブランドアンドアルトマンプロットである（Bland JM, Altman DG (1986) 臨床的測定の二つの方法間の一致を評価する統計的方法。The Lancet, i, 307-319; Bland JM, Altman DG (1999) 方法比較研究における測定一致。Statistical Methods in Medical Research, 8, 135-160）。

20

【0048】

測定値の分布は、より低い（臨床的に関連する）濃度において、IDS法は過大評価されたビタミンD含有量を導き、一方、より高い濃度においては、IDS法はビタミンD含有量を過小評価する。

【0049】

さらに40試料の一群が、本発明による方法、および高速液体クロマトグラフィー測定を使用して分析された。結果を表5に示す。

【0050】

30

【表 5】

タンパク質分解法と高速液体クロマトグラフィーによる結果の相関

試料	タンパク質分解法の値	HPLC法の値
No.	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$
1	31.8	43.7
2	18.3	14.5
3	69.1	67.9
4	42.5	47.4
5	15.2	13.4
6	13.1	
7	59.9	54.8
8	18.5	12.5
9	53.3	51.1
10	105.5	113.6
11	23.7	35.0
12	35.0	33.0
13	29.7	34.7
14	43.4	32.3
15	87.6	86.2
16	70.3	59.2
17	63.2	56.7
18	38.8	39.5
19	26.0	28.8
20	26.3	27.4
21	29.2	38.7
22	23.8	23.6
23	48.7	47.0
24	59.1	54.8
25	27.0	4.5
26	24.7	23.2
27	70.9	57.0
28	41.9	41.3
29	50.9	46.0
30	38.3	61.3
31	25.7	29.2
32	45.3	39.7
33	39.7	40.6
34	28.1	23.1
35	44.0	40.5
36	15.4	17.3
37	98.3	66.9
38	15.8	16.8
39	46.0	52.7
40	25.5	23.1

【0051】

試料 6 には H P L C 測定値が無いので、この試料は無視される。表 6 に示されるように、上記二組の測定値は、対になっている (p a i r e d) 標本 (s a m p l e s) t - 検定を使用して比較される。

【0052】

10

20

30

40

【表 6】

対になっている標本 t-検定

	タンパク質分解法	HPLC法
試料サイズ	39	39
算術平均値	41.0000	42.4718
平均値の95%CI	34.0639-47.9361	35.1970-49.7465
分散(Variance)	457.8284	503.6294
標準偏差	21.3969	22.4417
標準誤差	3.4263	3.5935
平均差(Mean difference)	1.4718	
標準偏差	9.1468	
95%CI	-1.4932-4.4368	
検定統計量 t	1.005	
自由度	38	
両側確率(Two-tailed probability)	P=0.3213	

10

【0053】

対になっている標本 t-検定は、本発明による方法によって得られる測定値と、比較される高速液体クロマトグラフィー基準測定値との間で、有意差が無いことを示す。図 5 は二つの方法によって得られる測定値の箱髭図 (box and whisker plot) であり、本発明の方法および基準法を使用する測定値によって得られる類似の分布パターンを示す。図 6 は二つの方法の相関図であり、それらの方法によって得られる値の良好な一致を視覚化している。図 7 は、本発明の方法を用いた結果と、比較される高速液体クロマトグラフィー基準測定値との間の百分率の差を表す。それは、基準と比較してタンパク質分解法の非常に低い過大評価 (< 2 %) を示し、および測定値の一致を示す。

20

【0054】

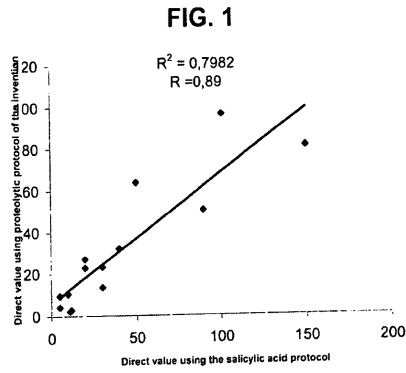
試料はさらに異なった商業的方法を使用して分析された。結果の分布は図 8 に箱髭図で示される。この図は、DiaSorin (LIAおよびRIA) ビタミン D 分析および IDS 分析は、高速液体クロマトグラフィー基準測定値と比較して常に低すぎる結果を与え、一方、本発明の方法および Elecsys ビタミン D 分析 (ロシュ (Roche) 診断法) 試験は、基準値に相当していること、を示している。しかしながら、ロシュ試験は間接的方法であり、本発明の方法と比較して不利な試料調製を必要とする。

30

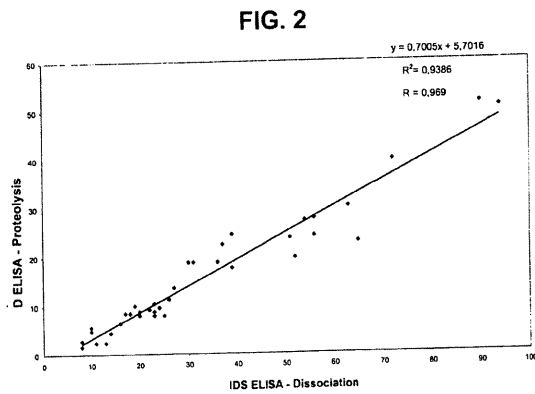
【0055】

これらの結果は明らかに、本発明による直接測定方法は、従来技術と比較して、確立された基準法と、より良い相関を与えることを示す。

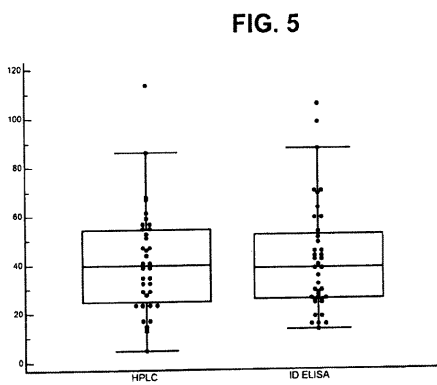
【 図 1 】



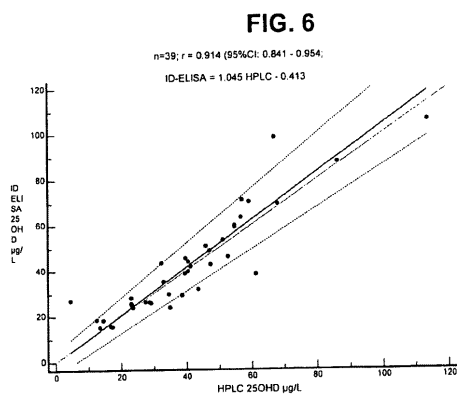
【 図 2 】



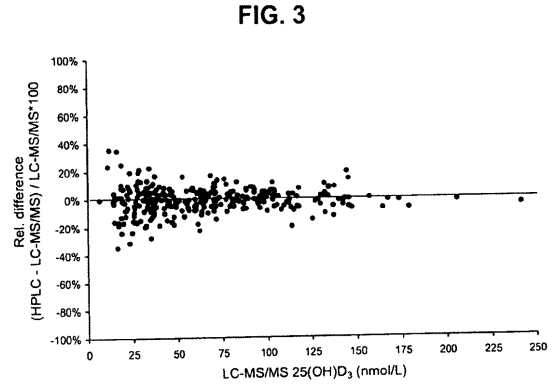
【 図 5 】



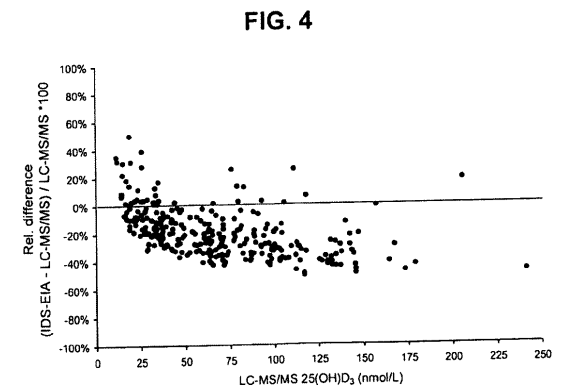
【 図 6 】



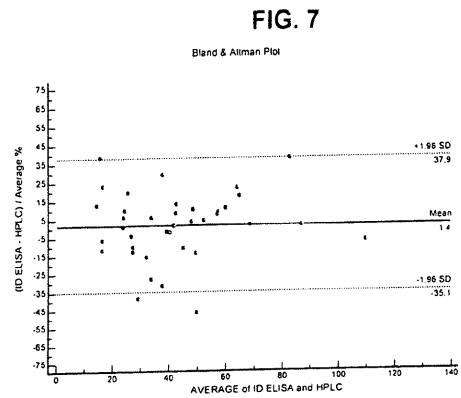
【 図 3 】



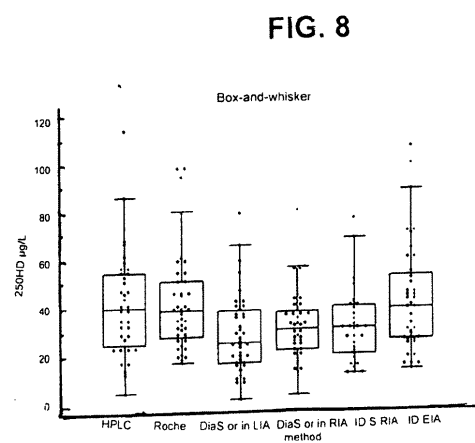
【 図 4 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/051162

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/023391 A (IMMUNDIAGNOSTIK AG [DE]; ARMBRUSTER, FRANZ PAUL [DE]; FRIEDL SABINE [DE]) 20 March 2003 (2003-03-20) cited in the application the whole document	1-9
A	WO 2004/063704 A (DIASORIN INC [US]) 29 July 2004 (2004-07-29) claims 1,10-13	1-9
A	WO 02/46746 A (IMMUNODIAGNOSTIC SYSTEMS LTD [GB]; LAURIE DAVID [GB]; BARNES ALEXANDER) 13 June 2002 (2002-06-13) claims 1-7	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

B document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2008

Date of mailing of the international search report

23/04/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, Paolo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/051162

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2008 /051162

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 10

Claim 10 does not contain any technical features at all of the claimed apparatus (Art.6 PCT), thus no meaningful search was possible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2008/051162

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03023391 A	20-03-2003	DE 10144905 A1	10-04-2003
WO 2004063704 A	29-07-2004	EP 1588165 A2	26-10-2005
		US 2004132104 A1	08-07-2004
WO 0246746 A	13-06-2002	AT 329260 T	15-06-2006
		AU 2090002 A	18-06-2002
		DE 60120487 T2	14-12-2006
		DK 1352238 T3	02-10-2006
		EP 1352238 A2	15-10-2003
		ES 2263691 T3	16-12-2006
		JP 3787121 B2	21-06-2006
		JP 2004515763 T	27-05-2004
		US 2004096900 A1	20-05-2004

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ロート, ハイッツ - ユエルゲン
ドイツ連邦共和国, 69126 ハイデルベルク, イム ブライトシュピール 15, ラボ
ール リンバッハ内

(72)発明者 フリードル, ザビーネ
ドイツ連邦共和国, 64625 ベンスハイム, エフエル エーベルト シュトラッセ 6

(72)発明者 シューマン, クラウディア
ドイツ連邦共和国, 69469 ヴァインハイム, キエフェルンヴェーク 17

专利名称(译)	直接测定血清或血浆中的维生素D.		
公开(公告)号	JP2010518369A	公开(公告)日	2010-05-27
申请号	JP2009547690	申请日	2008-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	曼迪利股份公司无关		
申请(专利权)人(译)	曼迪利股份公司无关		
[标]发明人	アルムブルスターフランツポール ロートハインツユエルゲン フリードルザビーネ シューマンクラウディア		
发明人	アルムブルスター, フランツ ポール ロート, ハインツ-ユエルゲン フリードル, ザビーネ シューマン, クラウディア		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/82		
FI分类号	G01N33/53.H G01N33/543.511.H G01N33/577.B G01N33/543.551.H G01N33/531.B		
代理人(译)	佐藤隆久		
优先权	102007005099 2007-02-01 DE		
其他公开文献	JP5185291B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种直接在血浆或血清中定量维生素D代谢物的方法，无需事先纯化维生素D代谢物，包括用丝氨酸蛋白酶如蛋白酶K消化血清蛋白和抑制蛋白酶K的步骤顺序竞争性结合分析中的活动。该方法的优点是在整个生理学相关值范围内具有高精度，并且它可以很容易地适用于血清和血浆样品的全自动分析。

FIG. 8

