

(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2013-524208

(P2013-524208A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(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 M	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2013-502516 (P2013-502516)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月1日 (2011.4.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年11月29日 (2012.11.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2011/050219
 (87) 国際公開番号 W02011/122948
 (87) 国際公開日 平成23年10月6日 (2011.10.6)
 (31) 優先権主張番号 10159035.4
 (32) 優先日 平成22年4月1日 (2010.4.1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 512253981
 フューチャー・ダイアグノスティックス・
 ベーフェー
 オランダ・NL-6603・ペーター・ウ
 ェイヘン・ニューウェヴェーグ・172
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

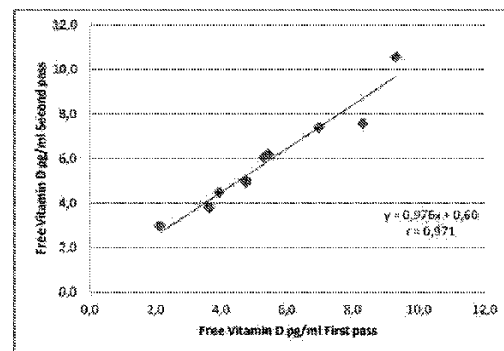
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遊離型ビタミンDのイムノアッセイ

(57) 【要約】

血液または血液成分、とりわけ血清または血漿に由来する遊離型25(OH)-ビタミンDの免疫吸着を行い、その後、吸収された材料を測定する、発明が開示される。フルオロアルキル界面活性剤は、ビタミンDの溶解性を促進し、遊離型ビタミンDの測定を可能にするために用いられる。よって、本発明は、結合タンパク質を使用して、遊離型25(OH)-ビタミンDを吸収する。その後、25-OHビタミンDを含む結合タンパク質を、標識化ビタミンD化合物、好ましくは放射性標識化、蛍光標識化、発光標識化、ビオチン標識化、金標識化または酵素標識化したビタミンD化合物との競合結合アッセイに供する。あるいは、免疫捕捉された25-OHビタミンDは、質量分析法によって定量することができる。

Fig. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

遊離型ビタミンD(25-ヒドロキシ-ビタミンDまたは1,25-ジヒドロキシ-ビタミンDなどのビタミンD代謝産物を含む)の存在について血液または血液成分のサンプルをアッセイする方法であって、

(a)25-OHビタミンD用の固定化結合タンパク質または抗体をサンプルに加えるステップ;

(b)前記サンプルを希釈液と混合するステップであって、前記希釈液はフルオロアルキル界面活性剤を含むステップ;

(c)所望の量のビタミンDを前記結合タンパク質に結合させるのに有効な時間量の間、前記サンプルをインキュベートするステップ;

(d)洗浄によって、結合していない血清および血清成分を除去するステップ;

(e)結合した捕捉ビタミンDを含む前記固定化結合タンパク質または抗体を、標識化ビタミンD化合物との競合的結合に供するステップ;

(f)前記結合タンパク質に結合した標識化ビタミンD化合物の濃度を測定するステップを含む方法。

10

【請求項 2】

前記フルオロアルキル界面活性剤がペルフルオロカルボン酸であり、好ましくは、ペルフルオロオクタン酸、ペルフルオロヘプタン酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記界面活性剤の濃度が、0.05~0.5重量%、好ましくは0.1~0.25重量%である、請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記希釈液が、6.0~8.0の範囲の緩衝pHを有する緩衝液である、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記結合タンパク質が抗体である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記結合タンパク質が、ビタミンD結合タンパク質である、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記サンプルが、ヒトの血清または血漿である、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記結合タンパク質が、磁性粒子上にコーティングされた形態で提供される、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記標識化ビタミンD化合物が、放射性標識、蛍光標識、発光標識、ビオチン標識、金標識、酵素標識からなる群より選択される標識を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記濃度が、遊離型25-OHビタミンDの標準物質濃度を基準にして測定される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第1のステップにおいて、ビタミンD用の固定化結合剤上にビタミンDを捕捉し、その後のステップにおいて、前記捕捉ビタミンDを標識化ビタミンD変異型に対する競合結合アッセイに供することを含む、遊離型ビタミンDの存在について血液または血液成分のサンプルをアッセイする方法であって、遊離型ビタミンDの捕捉が、反復試験を満たすように制限されたある量の結合ビタミンDを隔離することによって達成され、ビタミンDが捕捉された前記サンプルを、ビタミンDを捕捉し、前記捕捉ビタミンDを同じ競合結合アッセイに供

50

する同じステップに供し、両方の競合結合アッセイ後の遊離型ビタミンDの測定濃度が実質的に同じである、方法。

【請求項12】

請求項1から10のいずれか一項に記載の方法に従って行われる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

隔離されたビタミンDの割合が、前記サンプル中に存在する全ビタミンDの0.1～10重量%であり、好ましくは全ビタミンDの5重量%以下である、請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

請求項1に記載のステップ(a)、(b)、(c)、および(d)、ならびに、捕捉ビタミンDを質量分光アッセイによる定量分析に供するステップを含む、血清または血漿サンプルから遊離型ビタミンDを定量する方法。 10

【請求項15】

請求項1から14のいずれか一項に記載の方法を使用する、血液または血液成分中の遊離型ビタミンDを決定するためのイムノアッセイ。

【請求項16】

固相上に固定化されたビタミンDのための結合タンパク質、および標識化ビタミンD化合物を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法を使用してイムノアッセイを行うためのキット。

【発明の詳細な説明】 20

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液または血液成分のサンプルを遊離型ビタミンDについてアッセイするイムノアッセイ法に関する。本発明はまた、ポイント・オブ・ケア検査を含めたイムノアッセイ、および、このようなイムノアッセイを行うためのキットにも関する。

【背景技術】

【0002】

「ビタミンD」と称される物質は、一群の脂溶性プロホルモン、ならびにそれらの代謝産物および類似体を包含する。体内で生じるビタミンDの主要形態は、ビタミンD₂(エルゴカルシフェロール)およびビタミンD₃(コレカルシフェロール)である。後者は、日光の影響を受けてヒトが皮膚内で形成することができる、ビタミンDの内因性の形態である。前者は、食品とともに取り込まれる、ビタミンDの外因性の形態である。米国では、ビタミンD₂はビタミンDサプリメント製剤として使用される。特に指示のない限り、本開示において、ビタミンDという用語は、25-ヒドロキシ-ビタミンDまたは1,25-ジヒドロキシ-ビタミンDなどのビタミンD代謝産物を含めた、すべての形態のビタミンDを指す。 30

【0003】

ビタミンD₂とビタミンD₃は、側鎖の分子構造の点で異なるが、これらは、プロホルモンであるという同じ生物活性を共有し、2つのステップで代謝され、最終的には、カルシトリオールとも称される1,25-ジヒドロキシ-ビタミンD(1,25-(OH)₂-ビタミンD)、または1,25-ジヒドロキシ-コレカルシフェロールとなる。前の代謝産物である25-ヒドロキシ-ビタミンD(25-(OH)-ビタミンD)、すなわちカルシジオールは、肝臓での変換によって生じ、ビタミンDの体内における貯蔵形態であると考えられている。 40

【0004】

血中循環ビタミンDは、主として、25-(OH)-ビタミンD₃と25-(OH)-ビタミンD₂からなる。生物学的には、25-(OH)-ビタミンD₂は、25-(OH)-ビタミンD₃と同程度に有効である。25-(OH)-ビタミンD₂の循環血液中における半減期の方が短い。臨床の場では、25-(OH)-ビタミンD₃と25-(OH)-ビタミンD₂の両方を測定する25-(OH)-ビタミンDアッセイの使用が推奨されている(1)。

【0005】

ビタミンDは、長年にわたり、その活性型が骨の形成および維持、ならびにヒトまたは 50

動物の体内の他のプロセスにおける役割を担う重要な物質として認識されている。よって、ビタミンDは、腸における食物からのカルシウムおよびリンの吸収、および腎臓におけるカルシウムの再吸収を促進することによって、カルシウムの血流内への流れを増大するよう作用し、骨の正常な石灰化を可能にし、低カルシウム血症を予防する。ビタミンDはまた、骨芽細胞および破骨細胞による骨成長および骨再形成にとって必要である。

【0006】

ビタミンD欠乏症は、骨の石灰化を損ない、結果的に、骨軟化症、子供におけるくる病、および成人における骨軟化症に至り、骨粗鬆症の一因となる可能性がある。

【0007】

ビタミンDは、甲状腺からのカルシトニン放出の阻害など、ヒトの健康においていくつかの他の役割も果たしている。カルシトニンは、破骨細胞に直接的に作用し、その結果、骨吸収および軟骨分解を阻害する。ビタミンDはまた、副甲状腺からの副甲状腺ホルモンの分泌も阻害し、神経筋および免疫機能を調節し、炎症を低減することができる。よって、適正水準のビタミンDを有することは、ヒトまたは動物の健康に重要である。

【0008】

しかし、過剰のビタミンD(過剰摂取の結果として生じうる)は有毒である。ビタミンDの毒性のいくつかの症状は、腸のカルシウム吸収の増大によって生じる、高カルシウム血症(血中のカルシウム濃度の上昇)である。ビタミンDの毒性は、高血圧の原因であることが知られている。ビタミンDの毒性の胃腸症状としては、食欲不振、悪心、および嘔吐が挙げられる。これらの症状に続いて、多尿症(尿の過剰生成)、多渴症(のどの渇きの増大)、虚弱、神経質、掻痒(かゆみ)、最終的には腎不全を生じることもしばしばある。

【0009】

明らかに、ビタミンD欠乏症の可能性について対象を診断できることは重要である。潜在的な過剰のビタミンDについて対象を検査できることもまた、特に、ビタミンDを補給している対象にとって重要である。全25-(OH)-ビタミンDの血清濃度は、ビタミンDの状態の一次指標であると考えられるが(2)、この概念は論争となっている。

【0010】

血清中のほとんどの血中循環25-(OH)-ビタミンDは、ビタミンD結合タンパク質(88%)およびアルブミン(12%)と結合している。ビタミンD結合タンパク質(DBP)は、血清の主成分であり、250~400mg/血清1Lの濃度を有する。DBPのビタミンD結合部位のほんの一部にすぎない約2%が占有されている。25-(OH)-ビタミンDのほんのわずかな割合である0.04%が、遊離型の、タンパク質と結合していない形態で循環している。

【0011】

DBPの濃度は、すべての人々において一定というわけではなく、妊娠、経口避妊薬の使用、腎疾患および肝疾患を含めた、他の因子の影響を受けうる。DBPの濃度を知ることが、患者の真の25-(OH)-ビタミンDの状態を正確に評価するために不可欠である。例えば、経口避妊薬を服用している若い女性は、正常範囲にある全25-(OH)-ビタミンDレベルを有する可能性があった。しかし、DBPが高かったため、遊離型25-(OH)-ビタミンDの濃度が著しく低下し、臨床的な25-(OH)-ビタミンD不足のリスクの上昇およびその状態が引き起こすすべてのリスクにさらされる可能性があった。

【0012】

インビボにおける甲状腺ホルモンおよびステロイドホルモンの生理学的活性は、血漿中の全ホルモン濃度より、タンパク質と結合していない遊離型のものとより相関性があることが示されている。特に、結合タンパク質の濃度が上昇または低下した状況では、全血中循環ホルモンの測定は誤診につながりうる。このような状況では、遊離型の血中循環ホルモン濃度の測定は、より良い情報を提供する。この概念は「遊離型ホルモン仮説」として知られている。Mendel(3)は、遊離型ホルモン仮説が、すべての組織に関して、甲状腺ホルモン、コルチゾール、さらにはビタミンDのヒドロキシル化代謝産物に対して有効である可能性が高いことを示唆した。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

Bikleら(4)は、1,25-(OH)₂-ビタミンDについての遊離型ホルモン仮説の有効性を試験している。データは、肝疾患を有し、DBP濃度が低下した対象においてさえも、全1,25-(OH)₂-ビタミンDの顕著な減少にもかかわらず、遊離型1,25-(OH)₂-ビタミンD濃度は良好に維持されるように思われることを示唆した。

【 0 0 1 4 】

その後の25-(OH)-ビタミンDに関する研究において、同研究グループは、結合タンパク質の濃度が増えられている状態では、遊離型25-(OH)-ビタミンDを測定することを推奨した。この著者は、全ビタミンD代謝産物の測定が、肝疾患を有する患者のビタミンDの状態の評価に誤解を招く可能性があるとして結論付け、ビタミンD欠乏症の診断をする前に、遊離型25-(OH)-ビタミンD濃度も測定することを推奨している。Bikleらは、遊離型25-(OH)-ビタミンD濃度の測定に、限外濾過を用いた(5)。この方法は、高度に精製された放射性標識化ビタミンDを必要とし、遊離型ビタミンDの割合を過大評価する傾向がある。

10

【 0 0 1 5 】

Lauridsenら(6)は、異なるDBP表現型を有する女性が、異なる1,25(OH)₂ビタミンDおよび25(OH)-ビタミンD濃度を有することを示した。これらの著者は、Gc2-2を有する女性は、より低い血漿25(OH)-ビタミンD濃度において、ビタミンDが足りていることを示唆している。

【 0 0 1 6 】

遊離型の検体の測定に関しては、いくつかの背景技術を参照することができる。

20

【 0 0 1 7 】

米国特許第4,366,143号明細書には、体液中に結合型および遊離型の形態で存在する有機物質またはリガンドの遊離部分のアッセイに関連する発明が記載されている。この方法は、本質的には、一ステップで、サンプルに標識化リガンドと特異的結合剤を同時に加える競合的イムノアッセイである。リガンドの遊離部分と標識化リガンドは、特異的結合剤との反応について競合し、サンプル中に存在する遊離型リガンド部分の量に応じて決まる比率で、前記結合剤と結合する。この開示された方法の欠点は、特異的結合剤と標識化リガンドの両方が存在するため、結合型リガンドと遊離型リガンドとの平衡状態を乱す可能性のある複数の因子が存在し、このことにより、この方法が、ビタミンDの場合と同様に比較的少量で存在する遊離型リガンドとともに用いるのにあまり適さなくなってしまうことである。事実、遊離型ビタミンDの測定のためにこのアッセイを使用する方法は開示されていない。

30

【 0 0 1 8 】

米国特許第4,292,296号明細書は、遊離型検体と受容体に結合した検体を含むサンプル中の遊離型の検体を決定する方法を開示している。この方法は2つのステップを含み、第1のステップは、サンプルを検体の吸収剤と接触させて、溶液から検体を除去することである。第2のステップは、吸収剤に結合した検体を、標識化した検体類似体と接触させることを含む。その後すぐに、吸収剤から可溶性相を除去し、結合相および洗い流された相における標識の量を測定する。この方法は、遊離型甲状腺ホルモンの濃度の測定に関しても記載されている。

40

【 0 0 1 9 】

米国特許出願公開第2008/0182341号明細書は、流体中の遊離型検体または非結合検体の濃度の測定に有用な安定化剤に関する。安定化剤は、結合タンパク質のリガンドの解離を防ぐことが示唆されている。前記文献は、同時アッセイ手順を用い、さまざまな安定化剤について記載している。アルキルアミンフルオロ界面活性剤を含まない安定化剤が提供される。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 2 0 】

【 特許文献 1 】 米国特許第4,366,143号明細書

50

【特許文献2】米国特許第4,292,296号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第2008/0182341号明細書

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):507S-510S

【非特許文献2】Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Jun;39(2):381-400

【非特許文献3】Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* 1989 Aug;10(3):232-74

10

【非特許文献4】Bikle D, Gee E, Halloran B, Haddad J. Free 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Serum from Normal Subjects, Pregnant Subjects, and Subjects with Liver Disease. *J Clin Invest.* 1984; 74: 1966-1971

【非特許文献5】Bikle D, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad J. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986 Oct;63(4):954-9

【非特許文献6】Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, Nexø E. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2005 Jul;77(1):15-22

20

【非特許文献7】van Hoof HJ, Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D symmetric (rate) dialysis. *Anal Biochem* 1998 May 1;258(2):176-83

【非特許文献8】Hollis, *Clin.Chem* 31/11, 1815-1819 (1985)

【非特許文献9】Hollis, *Clin.Chem* 39/3, 529-533 (1993)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

30

先行技術文献はいずれも、遊離型ビタミンDの状態を反映したビタミンD測定用のアッセイを明確に提供していない。

【0023】

遊離型ビタミンD用のアッセイは、数十年間にわたり知られているが、それらアッセイは基礎としての平衡透析または速度透析(rate dialysis)のような方法を使用していることに留意されたい。このような方法は、高度な訓練を受けた技術スタッフを有する研究者には受け入れられるが、財政目標に到達するためには高スループットの自動化試験を必要とする日常的な研究室にとっては不相当である。よって、自動化することができ、かつ、ポイント・オブ・ケア検査における使用に適した、遊離型ビタミンDのアッセイを提供することが求められている。

40

【0024】

前述の番号を付した参考文献は、以下の通りである：

1. Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs.

Am J Clin Nutr. 2008 Aug;88(2):507S-510S.

2. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health.

Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Jun;39(2):381-400.

3 Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model.

Endocr Rev. 1989 Aug;10(3):232-74.

50

4. Bikle D, Gee E, Halloran B, Haddad J. Free 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Serum from Normal Subjects, Pregnant Subjects, and Subjects with Liver Disease. J Clin Invest. 1984; 74: 1966-1971.

5. Bikle D, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad J. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein.

J Clin Endocrinol Metab. 1986 Oct;63(4):954-9.

6. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, Nexø E.

Plasma concentrations of 25-hydroxy- vitamin D and 1,25-dihydroxy- vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women.

Calcif Tissue Int. 2005 Jul;77(1):15-22.

7. van Hoof HJ, Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ.

Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D symmetric (rate) dialysis.

Anal Biochem 1998 May 1;258(2):176-83.

【課題を解決するための手段】

【0025】

前述の要望の1つ以上に対してより良く対処するために、本発明は、1つの態様において、遊離型ビタミンD(25-ヒドロキシ-ビタミンDまたは1,25-ジヒドロキシ-ビタミンDなどのビタミンD代謝産物を含む)の存在について血液または血液成分のサンプルをアッセイする方法を提示し、この方法は、

(a)25-OHビタミンD用の固定化結合タンパク質または抗体をサンプルに加えるステップ;

(b)前記サンプルを希釈液と混合するステップであって、前記希釈液はフルオロアルキル界面活性剤を含むステップ;

(c)所望の量の25-OHビタミンDを前記結合タンパク質と結合可能にするのに有効な時間量の間、前記サンプルをインキュベートするステップ;

(d)洗浄によって、結合していない血清および血清成分を除去するステップ;

(e)結合した25-OHビタミンDを含む前記固定化結合タンパク質または抗体を、標識化ビタミンD化合物との競合的結合に供するステップ;

(f)前記結合タンパク質に結合した標識化ビタミンD化合物の濃度を測定するステップを含む。

【0026】

別の態様においては、本発明は、前述の方法を行うためのキットに属する。

【0027】

さらなる態様においては、本発明は、第1のステップにおいて、25-OHビタミンD用の固定化結合タンパク質または抗体などの固定化結合剤上にビタミンDを捕捉し、その後のステップにおいて、前記捕捉25-OHビタミンDを、標識化ビタミンD変異型に対する競合結合アッセイに供することを含む、遊離型ビタミンDの存在について血液または血液成分のサンプルをアッセイする方法であって、遊離型ビタミンDの捕捉は、反復試験を満たすように制限されたある量の結合ビタミンDを隔離することによって達成され、また、ビタミンDが捕捉された前記サンプルを、ビタミンDを捕捉し、前記捕捉ビタミンDを同じ競合結合アッセイに供するという同じステップに供し、両方の競合結合アッセイ後の遊離型ビタミンDの測定濃度は実質的に同じである方法に関する。

【0028】

さらなる態様では、本発明は、第1のステップにおいて、25-OHビタミンD用の固定化結合タンパク質または抗体などの固定化結合剤上にビタミンDを捕捉し、その後のステップにおいて、前記捕捉された25-OHビタミンDを標識化ビタミンD変異型に対する競合結合アッセイに供することを含む、遊離型ビタミンDの存在について血液または血液成分のサン

ブルをアッセイする方法であって、結合ビタミンDの0.5~5重量%が捕捉される方法に関する。

【0029】

さらに別の態様では、本方法は、ポイント・オブ・ケア検査に用いることができる。後者は、血液サンプルを採取し、それらを診断研究所に送るのではなく、患者の治療の場所またはその近くで検査することを指し、サンプルは、ステップの数を可能な限り制限し、かつ、手動操作を可能な限り制限したアッセイを行うことが可能な、携帯用デバイス、好ましくはハンドヘルドデバイスに迅速に取り込むことができる。

【0030】

別の態様では、本発明は、遊離型ビタミンDの測定のためのイムノアッセイにおけるビタミンDの溶解促進剤としての、フルオロアルキル界面活性剤、好ましくはペルフルオロカルボキシレート界面活性剤、さらに好ましくはペルフルオロオクタン酸(PFOA)の使用に関連する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本発明のアッセイの1回目と2回目における遊離型ビタミンDの濃度の相関関係を示している。その直線は、さまざまな濃度の遊離型ビタミンDを含む10個のサンプルを使用した、反復免疫抽出法の結果を示している。回帰直線の傾きは、1から有意に差はない。

【発明を実施するための形態】

【0032】

広い意味で、本発明は、血液または血液成分、とりわけ血清または血漿に由来する、タンパク質に結合していない25(OH)-ビタミンDを免疫吸着し、その後、吸収されたビタミンDを測定することを含む、遊離型ビタミンDの測定のための2段階アッセイに関係する。

【0033】

これらのサンプルは、血中の遊離型25-OH-ビタミンDの存在を検査することが所望される対象、特にヒトから、当技術分野で知られているいずれかの方法で採取することができる。

【0034】

遊離型ビタミンDとは、ビタミンDの血液循環する非結合画分のことを指す。これは、ビタミンD₂、ビタミンD₃、およびその代謝産物である25(OH)-ビタミンD₂、25-(OH)-ビタミンD₃、1,25(OH)₂-ビタミンD₂、および1,25(OH)₂-ビタミンD₃を含むビタミンDのいずれかの形態に関する。前記アッセイは、単独でまたは組み合わせて、これらの形態の遊離型ビタミンDのいずれかを測定するのに使用することができる。好ましくは、本発明のアッセイを、遊離型25(OH)-ビタミンDの測定に使用して、25(OH)-ビタミンD₂および25-(OH)-ビタミンD₃の測定をもたらす。「遊離型」および「非結合」という用語は、ビタミンD結合タンパク質(VDBPまたはDBP)を主として含むいずれのタンパク質にも結合していない画分のことを指す。

【0035】

サンプルは、好ましくは、結合タンパク質の添加前、添加の間、または添加後に希釈する。サンプル希釈液は、水性であってよく、好ましくは緩衝液であろう。好ましくは、緩衝pHは、6.0~8.0の範囲である。緩衝液には、フルオロアルキル界面活性剤が含まれる。緩衝液とサンプルとの混合は、希釈液をサンプルに加えることによって、サンプルを希釈液に加えることによって、または、緩衝液とサンプルを互いに同時に加えることによって実施できることが理解されよう。実用的な理由から、サンプルに希釈液を加えることが好ましい。

【0036】

理論に縛られることなく、本発明者らは、界面活性剤が、ビタミンDの限定された隔離をもたらすような方法で、ビタミンDの溶解性を高めると考えている。

【0037】

10

20

30

40

50

別の態様では、本発明は、遊離型ビタミンDをアッセイするための新しい概念に関連する。遊離型ビタミンDのアッセイに伴う問題は、遊離型ビタミンDの初期濃度が非常に低く、既存のイムノアッセイでは測定できないことである。この問題を解決するための既存の試みは、DBPからのビタミンDの解離を回避したいという欲求に基づいている(例えば、遊離型ビタミンDと結合ビタミンDとの間の平衡を「安定化」しようとする試みによって)が、遊離型のDBPはアッセイできないという事実に関するものであり、これらのアッセイは、DBPからのビタミンDの置換にのみ関与している。

【0038】

本発明では、ビタミンDの限定された隔離が予測され、隔離されたビタミンDの割合は、初期の遊離型ビタミンDの濃度を反映するのに十分に低い濃度であり、好ましくは前記サンプル中に存在する全ビタミンDの0.1~10%、好ましくは全ビタミンDの5%以下である。

10

【0039】

このことは、トリチウム化ビタミンDおよび希釈緩衝液を加えることによって、サンプルにおける過度の実験を行うことなく、確認することができる。ビタミンD結合タンパク質に結合したビタミンDは、5%を超える割合で低下しないはずである。あるいは、サンプルは、抗体をコーティングしたウェルの壁に吸収させてもよい。サンプルの除去後、ビオチン化ビタミンDを加え、抗体に吸収された遊離型ビタミンDを定量する。初期量のビタミンDを取り除いたサンプルを、第2のウェルに導入し再度、インキュベートし、定量する。遊離型ビタミンDの測定濃度は、第1のインキュベーションから得られた結果と同じはずである。

20

【0040】

ビタミンDの限定された隔離は、好ましくは、0.05~0.5重量%、好ましくは0.1~0.25%のフルオロアルキル界面活性剤を加えることによって達成する。好ましくは、フルオロアルキル界面活性剤は、ペルフルオロアルキル界面活性剤であり、さらに好ましくは、ペルフルオロカルボキシレート界面活性剤、最も好ましくはペルフルオロオクタン酸(PFOA)である。好ましくは0.1~0.2%、さらに好ましくは0.15%のPFOAを用いる。これらの条件下で、全ビタミンDの濃度は同じであるが、さまざまな濃度のDBPを含むサンプルの応答は、対称透析 (symmetric dialysis) によって測定される遊離型ビタミンDの濃度と相関していた。

【0041】

本発明では、PFOA自体またはその誘導体を用いることが可能であることが考えられる。これらの誘導体は、一般に、ペルフルオロオクタン酸部分を含む誘導体、特に、PFOAアンモニウム塩などのPFOA塩、および、対応するスルホン酸、すなわち、PFOS(ペルフルオロオクタンスルホネート、また、ペルフルオロオクタンスルホン酸としても知られる)と略されるPFOAスルホネートを指す。

30

【0042】

本発明の遊離型ビタミンD(ビタミンD代謝産物を含む)を測定する方法の利点は、本方法が、自動化することができるアッセイ形式を提供することである。これにより、本発明のアッセイは、遊離型ビタミンDの測定のための既存のアッセイから顕著に区別される。

【0043】

本発明のアッセイでは、25-OH-ビタミンD用の結合タンパク質を加える。ビタミンDのための結合タンパク質、例えば抗体は、当技術分野で知られており、ビタミンDの既存のイムノアッセイに幅広く用いられている。同じ抗体ならびに他の結合タンパク質も、同様に本発明に用いることができる。例えば、ビタミンDの抗体の代わりに、抗体フラグメント、例えばファージディスプレイ法を用いて生成したものなどを用いることができる。適切な抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体でありうる。それらは、既知の方法で入手することができ、例えばポリクローナルヤギ抗ビタミンD、ポリクローナルウサギ抗ビタミンD、またはビタミンDのイムノアッセイにおける用途として当技術分野で知られているビタミンDの任意の他の適切な抗体のいずれかである。適切な抗体は、例えば、次の参考文献から知られている:Hollis、Clin.Chem 31/11、1815-1819(1985); Hollis

40

50

、Clin.Chem 39/3、529-533(1993)。

【0044】

結合タンパク質は、好ましくは、固体担体を含む粒子形態で加えられる。典型的には、結合タンパク質は、例えばマイクロタイタープレートなどの固相上にコーティングされる。好ましい実施形態では、結合タンパク質は磁性粒子上にコーティングされ、磁場における分離を促進する。

【0045】

結合タンパク質、例えば抗体などの添加後、サンプルをインキュベートすることができる。必要な時間は、試薬の濃度、結合タンパク質の種類、および、例えば振とうおよび温度などのインキュベーション中の条件などの状況に応じて決まる。一般に、インキュベーション時間は、10秒間から数時間の範囲であり、好ましくは1分から2時間である。自動化プラットフォームでは、短いインキュベーション時間(10秒間~10分間、好ましくは30秒間~30分間)が好ましい。基本的に、所望される時間、その条件下で、どのくらいの量の遊離型ビタミンDが結合されるかを、校正システムで決定する限りにおいては、時間は特に重要ではない。適正な校正が行われれば、より短時間およびより長時間も明らかに用いることができる。よって、好ましくは、標準物質との比較は、同じ条件下、同じ時間であることを伴う。

【0046】

インキュベーション期間後、サンプルは、既知の方法で、標識化ビタミンD化合物を使用する競合結合アッセイに供することができる。ビタミンDの測定のためのイムノアッセイにおける競合的結合抗原として役立つ多くの標識化化合物が知られている。典型的な標識としては、放射性標識、蛍光標識、発光標識、ビオチン標識、金標識、酵素標識が挙げられる。競合結合アッセイは当業者に知られており、特に、本発明の方法のこの部分は、ビタミンDの測定に適していることが知られている任意の標識を使用して実施できることから、説明は必要ではない。使用できる標識としては、とりわけ、既存のビタミンDイムノアッセイについて前述した参考文献に開示されるものが挙げられる。

【0047】

濃度の測定を可能にする標識を用いて、結果として、サンプル中の遊離型ビタミンDの濃度を測定する。測定値の解釈は、校正測定、すなわち同じアッセイにおける標準物質の応答によって決定されることが理解されよう。

【0048】

あるいは、捕捉ビタミンDは、質量分光測定法を用いた定量分析に供することができる。

【0049】

本発明のアッセイの校正は、所定の濃度の遊離型25-OH-ビタミンDを含む標準物質を準備することによって行うことができる。これらの標準物質における遊離型ビタミンDの割合は、対称透析によって測定することができる。対称透析では、血清サンプルを、透析セルの一侧に負荷する。他のコンパートメントには、微量の放射性標識化ビタミンDを加えた同じサンプルを負荷する。1つの透析コンパートメントから他の透析コンパートメントへの放射性標識化ビタミンDの移動率は、ビタミンDの遊離型の割合に正比例する(7)。

【0050】

本発明の遊離型ビタミンDの測定は、上述のように、ビタミンDの限定された隔離に基づいて、遊離型ビタミンDの濃度に実質的に影響を及ぼすことなく、遊離型ビタミンDの濃度を評価することによる。

【0051】

本発明は、別の態様では、血液または血液成分中の25-OH-ビタミンDを測定するためのイムノアッセイの形態をした製品を提示し、ここで、前記イムノアッセイは、上記実施形態のいずれか1つに従う方法を使用する。さらに具体的には、このような製品は、イムノアッセイを行うためのキットの形態で提供されよう。このようなキットは、関係する個々の試薬、すなわち結合タンパク質および標識化ビタミンD化合物を含むことができる。こ

10

20

30

40

50

これらの試薬は、別々に提供して、本発明のイムノアッセイに使用する際に、キットを形成することができる。試薬は、一緒に提供することが好ましく、パーツで構成される1つのキットとして一緒にパッケージ化されることが好ましい。キットは、任意選択で、血液または血液成分のサンプル用の容器を含むが、慣用通り、別々に提供してもよい。典型的には、キットは、固相に固定化した結合剤、および分離された複合化ビタミンDを含む。標識が異なれば必要とされる試薬も異なりうることから、他のキット構成要素は、当技術分野の慣用通り、選択される標識に応じて決まる。

【0052】

遊離型ビタミンDの測定のためのイムノアッセイではビタミンDの溶解性が高まることから、本発明はまた、フルオロアルキル界面活性剤、好ましくはペルフルオロカルボキシレート界面活性剤、さらに好ましくはペルフルオロオクタン酸および/またはペルフルオロヘプタン酸の使用にも関連する。

10

【0053】

好ましい界面活性剤としては、ペルフルオロアルキル界面活性剤が挙げられ、さらに好ましくは、ペルフルオロヘプタン酸またはペルフルオロオクタン酸などのペルフルオロカルボン酸である。最も好ましくは、界面活性剤は、ペルフルオロオクタン酸(PFOA)、またはその誘導体である。これらの誘導体は、一般に、ペルフルオロオクタン部分を含む誘導体、特に、PFOAアンモニウム塩などのPFOA塩、および、対応するスルホン酸、すなわち、PFOS(ペルフルオロオクタンスルホネート、また、ペルフルオロオクタンスルホン酸としても知られる)と略されるPFOAスルホネートを指す。他のペルフルオロカルボキシレート界面活性剤の類似の誘導体も使用することができる。

20

【0054】

本発明は、先に記載された実施形態および式に限定されないことが理解されるべきである。特許請求の範囲において、「含む(comprising)」という用語は、他の構成要素またはステップを除外しないことも理解されるべきである。単数名詞を参照して、例えば「a」または「an」、「the」などの不定冠詞または定冠詞が用いられる場合、これは、他のことが具体的に示されない限り、その名詞の複数形を含む。

【0055】

本発明は、後述する非限定的な実施例および添付の非限定的な図に関して例証される。

【実施例】

30

【0056】

材料

コーティングしたマイクロタイタープレート

Nunc maxisorpマイクロタイタープレートを、200ng/ウェルの濃度の抗マウスIgG抗体でコーティングした。その後、モノクローナル抗25(OH)-ビタミンD抗体の層を、抗マウスIgG層上に2ng/ウェルの濃度で吸収させた。BSAおよびショ糖を含むホウ酸塩緩衝剤を用いて、プレートをブロッキングした。

【0057】

サンプル希釈液

サンプル希釈液は、保存料および0.15%のPFOAを含む、pH8.0の0.1M TRIS緩衝液からなる。

40

【0058】

複合体(すなわち、標識化ビタミンD化合物)は、ビオチン化ビタミンDである。この複合体は、0.1%のウシ血清アルブミンおよび保存料を含むpH7.5の0.1M Tris緩衝液中に25pg/mlの濃度で存在していた。

【0059】

ストレプトアビジン-HRPおよびTMBは、商業的な供給源に由来するものであった。

【0060】

手順

本アッセイは、次のように行う。マイクロタイタープレートのウェルに、90 μ lのサン

50

プル希釈液をピペットで分注する。次に、希釈液に10 μ lのサンプルを加える。この混合物を37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートする。その後、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄する。100 μ lの西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体(HRP複合体)をキュベットに加え、30分間インキュベートする。再度、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄する。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化ストレプトアビジンの添加によって比色シグナルを生成させる。37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベート後、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄する。その後、100 μ lのTMB溶液をウェルに加える。室温で20分間、暗所でインキュベートした後、100 μ lの停止溶液を加え、450nmでの吸光度を読み取る。

【0061】

ウェル内で生じたシグナルは、サンプルまたは標準物質中の遊離型25(OH)-ビタミンDの濃度に反比例する。最初のサンプル中の遊離型25(OH)-ビタミンDの濃度は、未知物質のシグナルを標準物質の応答と比較することによって計算できる。

【0062】

結果

標準参照サンプルに対して本発明のアッセイを使用して、遊離型25(OH)-ビタミンDの測定の典型的な較正曲線を作成し、下記Table(表1)に示す。

【0063】

【表1】

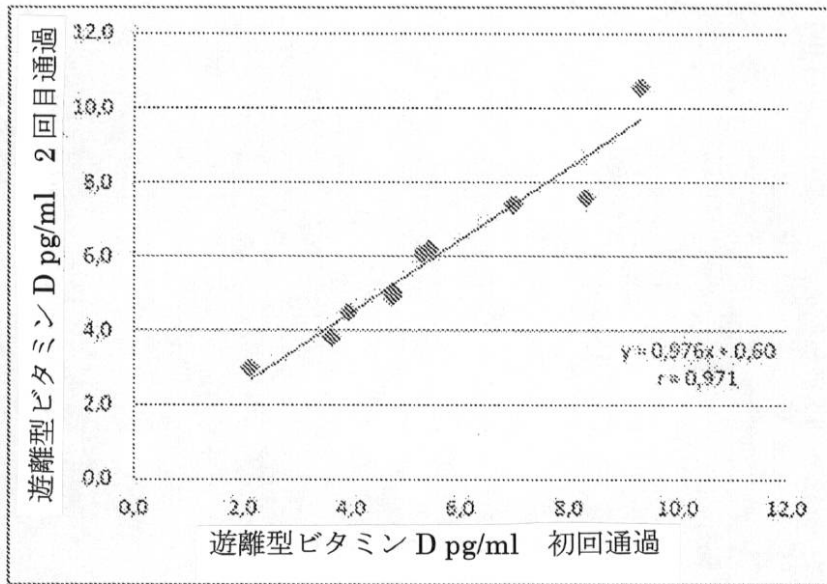
標準物質	標準物質A	標準物質B	標準物質C	標準物質D	標準物質E
遊離型25(OH)D ₃ [pg/ml]	1.1pg/ml	4.2pg/ml	8.6pg/ml	16.2pg/ml	41.6pg/ml
吸光度 450nm	2.304	1.856	1.177	0.514	0.132
吸光度 450nm	2.291	1.808	1.151	0.517	0.123
平均OD	2.298	1.832	1.164	0.516	0.128
CV%	0.40%	1.85%	1.58%	0.41%	4.99%
結合の割合%	100%	80%	51%	22%	6%

【0064】

ヒトまたは動物の対象(例えば患者など)の血液または血液成分のサンプルを、本発明のアッセイに供することができる。ビタミンDの測定量を較正曲線と相関させ、それによって解釈することができる。

【 図 1 】

Fig. 1



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/NL2011/050219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/82 ADD. 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) EP0-Internal, CHEM ABS Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 03/023391 A2 (IMMUNDIAGNOSTIK AG) 20 March 2003 (2003-03-20)	16		
Y	page 2, line 16 - line 19 page 3, lines 11-21 page 9, line 13 - line 19 claims 1,7-10,15,16	1-15		
Y	WO 2008/039266 A2 (BECKMAN COULTER INC [US]; LU WENYUAN [US]; LEITH KATHERINE M [US]; CHA) 3 April 2008 (2008-04-03) cited in the application paragraph [0003] - paragraph [0004] ----- -/--	1-15		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> *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 </td> <td style="vertical-align: top;"> *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. *&* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*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. *&* document member of the same patent family
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. *&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
7 July 2011		14/07/2011		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griffith, Gerard		

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/NL2011/050219

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2008/092917 A1 (IMMUNODIAGNOSTIC AG) 7 August 2008 (2008-08-07) cited in the application page 9, line 1 - line 11 page 10, line 38 - page 11, line 4 page 16, line 1 - line 16 -----</p>	1-16
A	<p>US 5 981 779 A (HOLICK MICHAEL F [US] ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) cited in the application column 6, line 51 - column 7, line 24 example 7 -----</p>	1-16
A	<p>HOLLIS B W ET AL: "DETERMINATION OF VITAMIN D STATUS BY RADIOIMMUNOASSAY WITH AN 125I-LABELED TRACER", CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, vol. 39, no. 3, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 529-533, XP002054204, ISSN: 0009-9147 cited in the application page 530, column 2, paragraph "Radioimmunoassay" -----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2011/050219

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03023391	A2	20-03-2003 DE 10144905 A1	10-04-2003
WO 2008039266	A2	03-04-2008 CA 2659387 A1 CN 101512342 A EP 2047270 A2 KR 20090035025 A US 2008182341 A1 US 2011091909 A1	03-04-2008 19-08-2009 15-04-2009 08-04-2009 31-07-2008 21-04-2011
WO 2008092917	A1	07-08-2008 AT 472734 T AU 2008209736 A1 DK 2126586 T3 EP 2126586 A1 ES 2348126 T3 HR 20100532 T1 JP 2010518369 A PT 2126586 E US 2010068725 A1	15-07-2010 07-08-2008 11-10-2010 02-12-2009 30-11-2010 30-11-2010 27-05-2010 17-09-2010 18-03-2010
US 5981779	A	09-11-1999 US 6291693 B1	18-09-2001

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ミハエル・フランシスクス・ウィルヘルムス・コルネリス・マルテンス
オランダ・5704・ハーザー・ヘルモント・スネーウハイデ・50

(72) 発明者 ジョージ・ヘンリー・パーソンズ
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02476・アーリントン・ブルースター・ロード・23

(72) 発明者 フランシスクス・マリア・アンナ・ロスマーレン
オランダ・6602・エーペー・ウェイヘン・エーフェラードゥスブライン・16

(72) 発明者 レオン・マリア・ヤコブス・ウィルヘルムス・スウィンケルス
オランダ・6881・デーアー・ベメル・パーペンストラート・29

专利名称(译)	免疫测定游离维生素D.		
公开(公告)号	JP2013524208A	公开(公告)日	2013-06-17
申请号	JP2013502516	申请日	2011-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	FUTURE诊断		
申请(专利权)人(译)	未来的诊断, BEFE		
[标]发明人	ミハエルフランシスクスウィルヘルムスコルネリスマルテンス ジョージヘンリーパーソンズ フランシスクスマリアアンナロスマーレン レオンマリアヤコブスウィルヘルムススウィンケルス		
发明人	ミハエル・フランシスクス・ウィルヘルムス・コルネリス・マルテンス ジョージ・ヘンリー・パーソンズ フランシスクス・マリア・アンナ・ロスマーレン レオン・マリア・ヤコブス・ウィルヘルムス・スウィンケルス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/82		
FI分类号	G01N33/53.H G01N33/543.511.M G01N33/543.541.B		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2010159035 2010-04-01 EP		
其他公开文献	JP5808390B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了一种发明，其中进行来自血液或血液成分，特别是血清或血浆的游离25(OH)-维生素D的免疫吸附，然后测量吸收的物质。氟代烷基表面活性剂用于促进维生素D的溶解度，并能够测量游离维生素D。因此，本发明使用结合蛋白吸收游离形式25(OH)-维生素D。此后，含有25-OH维生素D的结合蛋白与标记的维生素D化合物反应，优选维生素D化合物，其被放射性标记，荧光标记，发光标记，生物素标记，金标记或酶标记。进行竞争性结合试验。或者，可以通过质谱法定量免疫捕获的25-OH维生素D。

