

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001－228150
(P2001－228150A)

(43)公開日 平成13年8月24日(2001.8.24)

(51)Int.Cl⁷
G 0 1 N 33/532

識別記号

庁内整理番号

F I
G 0 1 N 33/532

技術表示箇所
Z

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L（全 5 数）

(21)出願番号	特願2000－37100(P2000－37100)	(71)出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
(22)出願日	平成12年2月15日(2000.2.15)	(72)発明者	川口 守 兵庫県神戸市西区高塚台4丁目3－2 国際試薬株式会社西神工場内
		(72)発明者	白波瀬 泰史 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1－2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(74)代理人	100088904 弁理士 庄司 隆 （外1名）
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 均一免疫分析法

(57)【要約】

【課題】高分子の被分析物質の免疫学的分析方法において、未反応物の分離洗浄（B／F分離）が不要な、蛋白質・ペプチドの免疫学的分析方法を提供すること。

【解決手段】高分子の被分析物質を分解・断片化して生じる分解断片をマーカーにすることにより、B／F分離の不要な蛋白質・ペプチドの免疫学的分析方法を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】被分析物質の特異的分解断片をマーカーにすることを特徴とする蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項2】被分析物質を分解する工程を経て生じる特異的分解断片、この分解断片と同一物質の又はこの分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片の標識化物質、並びにこの分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質を利用し、分解断片とペプチド断片の標識化物質に対して反応性物質を競合的に反応させる工程と標識化物質を測定する工程を含む蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項3】前記分解断片のアミノ酸数が3以上である請求項1又は2に記載の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項4】前記分解断片のアミノ酸数が3～50である請求項1又は2に記載の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項5】前記分解断片が、被分析物質のN末端又はC末端を含む物質から選択される請求項1～4のいずれか1項に記載の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項6】前記標識化が酵素標識である請求項1～5のいずれか1項に記載の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項7】前記分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質が、抗体である請求項1～6のいずれか1項に記載の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法。

【請求項8】請求項1～7のいずれか1項に記載の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法に使用されうる蛋白質・ペプチドの免疫分析測定キットであって、被分析物質を分解する試薬、この試薬により分解されて生じる分解断片と同一物質の又はこの分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片の標識化物質、分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質、標識化物質を測定する試薬、及びこれらの反応用媒体を含む蛋白質・ペプチドの免疫分析測定キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、蛋白質・ペプチドの免疫分析方法及びそれに用いる免疫分析測定キットに関する。本発明は、臨床、薬物化学、生化学、食品の分野、特に、臨床検査に用いられる生体試料中の物質の測定法に用いられる。

【0002】

【従来の技術】標識化物質を利用した免疫分析方法、特に酵素免疫測定法に代表される免疫測定法は、広く蛋白質・ペプチドの分析方法に用いられている。高分子抗原

として蛋白質・ペプチドを酵素免疫測定法で測定する場合には、固相化された抗体と被分析物質を含む試料を反応させて抗原抗体複合体を形成させた後、未反応成分を除去洗浄し、標識化抗体を反応させ、未反応の標識化抗体を洗浄除去後、固相に残存する標識物質の量を測定することにより、被分析物質の量や濃度を測定していた。

【0003】被分析物質が低分子物質の場合には、上記のような洗浄工程のない、均一な測定系で測定できる方法も考案されている。被分析物質のハプテンを酵素で標識しておき、被分析物質と同時に抗体と反応させると、試料中の被分析物質の濃度に応じて、標識化物質との間で競合反応が起こり、抗体と反応する標識化物質の酵素量は被分析物質の濃度に反比例するようになる。そして抗体と反応することにより酵素標識化物質の酵素活性が阻害されることを利用して被分析物質を測定する方法が知られている（特公昭63-1544）。この方法は、洗浄や未反応物質の分離（B/F分離）の必要ない均一測定系であることが特徴である。

【0004】しかし、この方法は低分子物質については有効な測定方法であったが、ペプチドや蛋白質等には不適な方法であった。そのため、被分析物質がタンパク質のような高分子の場合でも、正確かつ未反応物の分離、洗浄工程の必要のない均一測定法の開発が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決する課題は、蛋白質・ペプチドのような被分析物質を免疫学的に測定する方法において、未反応物の分離洗浄（B/F分離）を必要とせず、高感度な測定が可能な均一免疫分析法及び該分析法に用いる測定キットを提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、蛋白質・ペプチドのような高分子の被分析物質を断片化し、その分解断片をマーカーとすることで、蛋白質・ペプチドのような高分子の被分析物質を、高感度にかつ均一的に分析・測定する方法を発明した。

【0007】本発明は、被分析物質を分解する工程を経て生じる特異的分解断片、この分解断片と同一物質の又はこの分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片の標識化物質、並びにこの分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質を利用し、分解断片とペプチド断片の標識化物質に対して反応性物質を競合的に反応させる工程と標識化物質を測定する工程を含む蛋白質・ペプチドの免疫分析方法を提供する。

【0008】本発明の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法において、マーカーとする分解断片は反応性物質と免疫学的に反応性を有すればよく、そのアミノ酸数は3以上、好ましくは3～50であることができる。又、該分

解断片は、被分析物質のN末端又はC末端を含む物質であってもよい。

【0009】又、本発明の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法において、標識化が酵素標識であることができる。

【0010】更に、本発明の蛋白質・ペプチドの免疫分析方法において、分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質として、抗体を用いることができる。

【0011】さらにまた、本発明は、蛋白質・ペプチドの免疫分析方法に使用されうる蛋白質・ペプチドの免疫分析測定キットであって、被分析物質を分解する試薬、この試薬により分解されて生じる分解断片と同一物質の又はこの分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片の標識化物質、分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質、標識化物質を測定する試薬、及びこれらの反応媒体を含む蛋白質・ペプチドの免疫分析測定キットを提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳述する。本発明の免疫分析方法の概要は以下である。例えば被分析物質を酵素で分解し、分解断片を生じさせる。その分解断片と同一物質を又は免疫学的に分解断片と同様の免疫学的反応性を示す類似物質を酵素で標識化した酵素標識化物質をあらかじめ調製準備する。酵素標識化物質と被分析物質より生じた分解断片の混合試料中に、両者に反応性を有する抗体を加えて反応させる。分解断片と酵素標識化物質との間に抗体との競合反応が起こり、被分析物質中の被分析物質が多くなれば、酵素標識化物質と抗体との免疫複合体は少なくなる。逆に、被分析物質が無いもしくは少ない場合には酵素標識化物質と抗体との免疫複合体が多くなる。この時、免疫複合体を形成していない遊離の酵素標識化物質は酵素活性を示し、免疫複合体を形成した酵素標識化物質は酵素活性を示さない性質を利用する。またこの逆に、免疫複合体を形成していない遊離の酵素標識化物質は酵素活性を示さず、免疫複合体を生じた場合には酵素活性を示す性質を利用することも可能である。なおこの時、標識化物質は例えば酵素とペプチド断片を結合させたものであるが、被分析物質が高分子であれば、抗体は被分析物質より標識化物質と反応してしまい正確な測定をすることができない。

【0013】本発明において、被分析物質の特異的分解断片は、そのアミノ酸数が、免疫学的反応の可能な単位であり、好ましくは、3以上、より好ましくは3～50である。又、分解断片は被分析物質のN末端又はC末端を含む物質から選択されるものであってもよい。より好ましくは、その分解断片は、自然変異や多様性のないアミノ酸配列のものが選択される。本発明の分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片とは、分解断片と同一又は免疫学的に分解断片と同様の反応性を示す

物質であれば特に限定されないが、分解断片と類似物質が好ましい。また、適宜改変を加え、阻害物質との結合性を調整することも可能である。

【0014】本発明の具体例では、分解断片として、人ヘモグロビンのβ鎖N末端の7個のアミノ酸配列を例示したが、本発明は、これに限られるものではない。

【0015】分解断片と同一物質の又はこの分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片の標識化は、既知の免疫学的測定方法の標識化手段が利用できる。例えば、放射性同位体、酵素、又は蛍光等を用いて標識化し、それぞれラジオイムノアッセイ、酵素免疫分析法、蛍光免疫分析法等により測定を行う。以下、本発明では、最良の実施態様として酵素免疫分析法を例に挙げて説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0016】標識物質として用いる酵素としては、加水分解酵素、酸化還元酵素を用いることができるが、好ましくは、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)や、リンゴ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、アルカリ性ホスファターゼ、アミラーゼ等の酵素を例示することができる。

【0017】標識化の手段としては、たとえば酵素を分解断片又はペプチド断片に結合させる方法として、N-ヒドロキシスクシンイミド、マレイミド基など二価性試薬例えば、ヘミサクシネート、N-サクシンイミディル-3-(2-ピリジルジチオプロピオネート)、N-[2-(1-ピペラジル)エチル]マレイミドを用いた方法などが好適に利用される。しかし、標識物質と分解断片又はペプチド断片とを効率的に結合できる方法である限りこれらに限定はされない。

【0018】かくして本発明の標識化物質をえる。

【0019】本発明において、分解断片及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質とは、被分析物質由来の分解断片と標識化物質との間で免疫学的に競合反応する物質であり、免疫学的反応が起こり免疫複合体が形成されたとき、標識化物質の標識例えば酵素の酵素活性を減少または上昇させる物質であれば特に限定されない。具体的には、抗体またはそのFab断片など例示することができる。当該抗体は、分解断片又はペプチド断片を用いて既知のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製する技術により調製してもよい。また、被分析物質が糖タンパク質である場合には、ホウ酸誘導体などを例示することができる。

【0020】本発明の免疫分析方法及び免疫分析測定キットを使用する被分析物質としては、血液、体液、尿等に含有される蛋白質、糖蛋白質、ポリペプチド等が例示される。例えばヘモグロビン、アルブミン、また、糖化ヘモグロビンの一つHbA1c、フルクトサミン、ホルモン、免疫グロブリンなどタンパク質性の高分子が例示

される。

【0021】被分析物質の分解・断片化の手段としては、トリプシン、ペプシンといったタンパク質分解酵素を用いた方法、臭化シアン、N-ブロモスクシンイミド、 NH_2OH 、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩等の化学物質を用いた方法を行うことができる。また、これらの方法に、グアニジン誘導体、チオシアン酸等の変性剤、過塩素酸等のカオトロピック剤等を併用することも可能である。また、これらを適宜組み合わせてもよい。10
その他にpHをアルカリ性または酸性にし、被分析物質を変性及び／又は酵素を作用しやすくすることにより、被分析物質を分解しても良い。

【0022】処理条件は、自体公知の各被分析物質の目標とする断片化の条件により、簡単な実験を繰り返すことにより適宜決定される。

【0023】かくして、本発明は、上記説明した被分析物質を分解する試薬、この試薬により分解されて生じる分解断片と同一物質の又はこの分解断片と同等の免疫学的反応性を有するペプチド断片の標識化物質、分解断片20
及びペプチド断片の標識化物質の両方に対して免疫学的反応性を有する反応性物質に加えて、標識化物質を測定する試薬、及びこれらの反应用媒体を構成させることによって、本発明の蛋白質・ペプチドの免疫分析測定キットを提供する。

【0024】以下、具体的にヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンを測定する方法を例として説明する。

【0025】先ず血液を溶血させて、ヘモグロビンを遊離させた試料に、トリプシンやペプシンのようなタンパク質分解酵素を加えて、ヘモグロビンを分解する。予め30
準備しておいた糖化ヘモグロビンのベータ鎖N末端側ペプチド（以下、糖化N末ペプチド）をG6PDHで標識したG6PDH標識糖化N末ペプチドの一定量を加える。そして、糖化N末ペプチドと特異的に反応する抗体（抗HbA1c抗体）を加えて反応させる。その後、G6PDHの基質である、グルコース-6-リン酸と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）を加えて酵素反応させ、波長340nmの吸光度変化量を測定することにより酵素活性を測定する。あるいはニトロブルーテトラゾリウム塩とダイアフォラーゼの存在40
下、ホルマザンの生成量を可視部で測定することにより酵素活性を測定することも可能である。この場合、試料中の糖化ヘモグロビンの量が多くなるに従って、タンパク質分解酵素により遊離された遊離糖化N末ペプチド濃度が高くなるため、G6PDHで標識された糖化N末ペプチドに抗HbA1c抗体の結合する割合が減少し、測定される酵素活性は高くなる。このようにして、糖化ヘモグロビン量と酵素活性の関係を求め検量線を作成することができる。上記の例では、高分子抗原の分解にタンパク質分解酵素を使用した。これに限らず、糖類や脂*50

*質等の加水分解酵素等も抗原に応じて選択され使用される。

【0026】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】（1）G6PDH標識フルクトシルペプチドの調製

ヒトヘモグロビンのβ鎖N末端のアミノ酸配列Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Lysをペプチド合成により合成し、その6mmolとD-グルコース111mmolをピリジン／酢酸（1：1）溶液160mlに加え、室温で7日間反応させる。その後、濃縮し、Dowex50カラムに通し、水洗後、5Mの NH_4OH にて溶出させる。溶出画分を濃縮し、ODS-120Tカラムで分画分取することによりN末端にグルコースが付加したフルクトシルペプチドを合成した。フルクトシルペプチドにヘミサクシネートを反応させ、pH9.5の条件下でグルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PDH）を混合し、G6PDH標識フルクトシルペプチドを調製した。

【0028】（2）糖化ヘモグロビンの測定

市販のグリコヘモグロビンコントロールを生理食塩水で5/5、4/5、3/5、2/5、1/5と段階希釈し試料を調製した。その試料10μlを500μlの100mM酢酸緩衝液（pH4.5）と50μlのペプシン溶液（500単位/ml）の混液に加え、37℃で10分間反応させた。その反応液の20μlを採り、100mMリン酸緩衝液（pH7.5）100μlに加え、ペプシンの反応を止めると共に、測定試料とした。次いで（1）で合成した0.1U/mlのG6PDH標識グルコシドペプチド溶液100μlと抗HbA1c抗体溶液100μlを加え、37℃で5分間反応させた後、10mMのグルコース-6-リン酸と8mMのNADを含む溶液100μlを加えて、37℃で5分間反応させ、波長340nmでの吸光度の1分間当たりの変化速度を測定した。

【0029】糖化ヘモグロビンの濃度と測定した吸光度変化速度との関係を図1に示した。その結果、測定された吸光度変化速度は糖化ヘモグロビンの濃度に依存して変化することが判り、本発明の方法で糖化ヘモグロビンが測定できることが明らかとなった。

【0030】

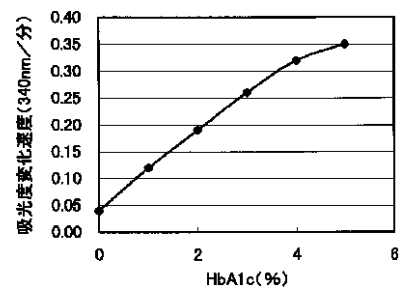
【発明の効果】本発明は、従前では不可能と考えられていた蛋白質・ペプチドのような高分子物質の免疫学的分析方法において、B/F分離を必要としない、均一系免疫分析法を提供し、正確でより簡便な蛋白質・ペプチドの免疫分析方法を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【図1】糖化ヘモグロビンの濃度と測定した吸光度変化

速度との関係を示す図である。

【図1】



专利名称(译)	均一免疫分析法		
公开(公告)号	JP2001228150A	公开(公告)日	2001-08-24
申请号	JP2000037100	申请日	2000-02-15
申请(专利权)人(译)	国际试剂有限公司		
[标]发明人	川口守 白波瀬泰史 日裏久英		
发明人	川口 守 白波瀬 泰史 日裏 久英		
IPC分类号	G01N33/532		
FI分类号	G01N33/532.Z		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种蛋白质和肽的免疫学分析方法，其不需要在聚合物分析物的免疫学分析方法中分离洗涤（B / F分离）未反应的物质。
 解决方案：通过使用通过分解/破碎聚合物分析物作为标记产生的降解片段，提供了不需要B / F分离的蛋白质和肽的免疫学分析方法。

【图 1】

