

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-157119

(P2004-157119A)

(43) 公開日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2003-358321 (P2003-358321)	(71) 出願人	390037006 株式会社エスアールエル
(22) 出願日	平成15年10月17日 (2003.10.17)		東京都立川市曙町二丁目41番19号
(31) 優先権主張番号	特願2002-304566 (P2002-304566)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(32) 優先日	平成14年10月18日 (2002.10.18)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	北野 壮一 東京都八王子市小宮町51 株式会社エ スアールエル八王子ラボラトリー内
		(72) 発明者	川野 克己 東京都八王子市小宮町51 株式会社エ スアールエル八王子ラボラトリー内
		(72) 発明者	日比 望 東京都八王子市小宮町51 株式会社エ スアールエル八王子ラボラトリー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 8-イソプロスタンの免疫測定の前処理方法

(57) 【要約】

【課題】 免疫測定により8-イソプロスタンを測定するための前処理方法であって、公知の方法よりも正確に8-イソプロスタンを免疫測定することを可能にする方法を提供すること。

【解決手段】 (1) 除タンパク及び脱脂した検体を、NH₂カラムにかける工程、

(2) 5~20 v/v%の2-プロパノール溶液でカラムを洗浄する工程、

(3) 20~30 v/v%の2-プロパノール溶液でカラムを洗浄する工程、

(4) 25~70 v/v%の2-プロパノール溶液で溶出する工程、

(ただし、(2)~(4)の溶液中の2-プロパノール濃度は、(2)<(3)<(4))をこの順序で行う。(4)の溶出工程で溶出された液を免疫測定に付し、8-イソプロスタン濃度を測定する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の工程を下記の順序で含む、8 - イソプロスタンの免疫測定の前処理方法。

- (1) 除タンパク及び脱脂した検体を、NH₂カラムにかける工程、
 - (2) 5 ~ 20 v/v% の 2 - プロパノール溶液でカラムを洗浄する工程、
 - (3) 20 ~ 30 v/v% の 2 - プロパノール溶液でカラムを洗浄する工程、
 - (4) 25 ~ 70 v/v% の 2 - プロパノール溶液で溶出する工程、
- (ただし、(2) ~ (4) の溶液中の 2 - プロパノール濃度は、(2) < (3) < (4))。

【請求項 2】

上記工程 (2) ~ (4) に用いられる 2 - プロパノール溶液の溶媒が n-ヘキサンである請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 3】

上記工程 (2) ~ (4) に用いられる 2 - プロパノール溶液が、0.1 ~ 2 v/v% の酢酸を含む請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

検体の除タンパクは、検体と ODS ゲルとを混合し、エタノール溶液で洗浄することにより行われる請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 ODS ゲルは、塩酸で処理されたものであり、上記エタノール溶液は塩酸を含む請求項 4 記載の方法。 20

【請求項 6】

検体の脱脂は、前記除タンパク工程後の ODS ゲルを、石油エーテルで処理することにより行われる請求項 4 又は 5 記載の方法。

【請求項 7】

脱脂工程後の ODS ゲルを、有機溶媒で抽出する工程をさらに含み、抽出液を乾固し、緩衝液に再溶解後、上記 NH₂ カラムにかける請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記有機溶媒が、8.0 ~ 11.0 の溶解度パラメーターを有する有機溶媒である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記有機溶媒が酢酸エチルである請求項 8 記載の方法。 30

【請求項 10】

除タンパク及び脱脂は、検体を、8.0 ~ 11.0 の溶解度パラメーターを有する有機溶媒で抽出することにより行なわれる請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記有機溶媒が酢酸エチルである請求項 10 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、8 - イソプロスタンの免疫測定の前処理方法に関する。 40

【背景技術】

【0002】

8 - イソプロスタンは、アラキドン酸の酸化生成物であり、細胞膜の脂質二重層のリン脂質上又は LDL 粒子のリン脂質でつくられ、フォスホオリパーゼ A2 によってエステル結合が加水分解されて遊離し、血中、次いで尿中に分泌されるものと考えられている。

【0003】

近年、8 - イソプロスタンは、酸化ストレスのマーカーとして、心血管疾患、呼吸器疾患、肝臓疾患、神経疾患等のリスク判定のために用いられている。すなわち、酸化ストレスによって、これらの疾患が起きやすくなることが知られており、これらの疾患の患者では、8 - イソプロスタン濃度が高まることが知られているので、尿中の 8 - イソプロスタ 50

ンを測定することにより、酸化ストレスの程度を測定し、ひいてはこれらの疾患のリスクを判定することが臨床的に行われている。

【0004】

体液中の成分の高感度な測定方法として、免疫測定が広範囲に行われている。しかしながら、生体内には、8-イソプロスタンと構造が類似した種々の物質（プロスタン類ないしはプロスタグランジン類）が含まれるので、抗体の交差反応のために、8-イソプロスタンのみを他の類似体と区別して測定することは困難である。このため、血中および尿中の8-イソプロスタンの測定は、従来より、ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)または液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)により行われている。

【0005】

GC/MSやLC/MSによれば、8-イソプロスタンのみを他の類似体と区別して正確に測定することができる。しかしながら、GC/MSやLC/MSを行うためには高価な装置が必要であり、操作も煩雑である。そこで、8-イソプロスタンを何とか免疫測定で測定しようという努力がなされており、検体を免疫測定に付す前に、8-イソプロスタンの類似体を除去する前処理方法が提案されている。例えば、Methods. Enzymol. 1999, 300, 13-17には、検体を0.1N塩酸で処理し、C18カラムにかけ、塩酸酸性のアセトニトリル水溶液で溶出し、溶出した液をNH2カラムにかけ、(1)n-ヘキサン：酢酸エチル=15:85、(2)アセトニトリル：水=90:10、(3)アセトニトリルの順に洗浄し、酢酸エチル：メタノール：酢酸=85:10:5で溶出し、溶出した液を免疫測定に付す方法が記載されている。また、Clinical Chemistry 2001, 47, 78, 1306-1308には、検体をギ酸緩衝液(pH3.0)で酸性化し、Oasis HLBカラムにかけ、アセトニトリル水溶液とギ酸緩衝液との混合物で洗浄し、n-ヘキサン：酢酸エチル：2-プロパノール=30:65:5で溶出し、溶出した液を免疫測定に付す方法が記載されている。そして、これらの前処理方法を行うことを前提として、酵素免疫測定により8-イソプロスタンを測定するためのキットも市販されている。

【0006】

【非特許文献1】Methods. Enzymol. 1999, 300, 13-17

【非特許文献2】Clinical Chemistry 2001, 47, 78, 1306-1308

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、これらの公知の前処理方法では、8-イソプロスタン類似体の除去が不十分であり、免疫測定により測定された8-イソプロスタンの濃度は、GC/MSで測定された8-イソプロスタン濃度よりもかなり高く、正確に8-イソプロスタンを測定することができない。

【0008】

したがって、本発明の目的は、免疫測定により8-イソプロスタンを測定するための前処理方法であって、公知の方法よりも正確に8-イソプロスタンを免疫測定することを可能にする方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、除タンパク及び脱脂した検体を、NH2カラムにかけ、所定の濃度制御をした2-プロパノール溶液で順次、洗浄、溶出を行うことにより、8-イソプロスタンを、公知の前処理方法よりも高度に精製することができ、その後の免疫測定による測定を、より正確に行うことができることを見出し、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は、下記の工程を下記の順序で含む、8-イソプロスタンの免疫測定の前処理方法を提供する。

- (1) 除タンパク及び脱脂した検体を、NH2カラムにかける工程、
- (2) 5～20v/v%の2-プロパノール溶液でカラムを洗浄する工程、
- (3) 20～30v/v%の2-プロパノール溶液でカラムを洗浄する工程、

10

20

30

40

50

(4) 25 ~ 70 v/v% の 2 - プロパノール溶液で溶出する工程、
(ただし、(2) ~ (4) の溶液中の 2 - プロパノール濃度は、(2) < (3) < (4))。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、免疫測定によっても、8 - イソプロスタン類似体との交差反応による測定誤差を低減し、より正確な 8 - イソプロスタンの定量を可能にする前処理方法が提供された。本発明の前処理方法を行うことにより、GC/MS や LC/MS のように高価な装置や煩雑な操作を要することなく、免疫測定により正確に 8 - イソプロスタンを定量することが可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の前処理方法に適用される検体は、除タンパク及び脱脂した検体である。検体としては、8 - イソプロスタンの濃度を測定しようとする体液であれば何ら限定されないが、通常、8 - イソプロスタンを含むことが知られている尿、血清、血漿、血液等である。

【0013】

体液の除タンパク及び脱脂方法自体は公知であり、公知の方法により行うことができる。除タンパク及び脱脂の特に好ましい方法として、本願発明者らが開発した、ODSゲルへの吸着を利用した次の方法を例示することができる。

【0014】

この方法では、体液を粒子状のODSゲルに吸着させ、所定の洗浄液で洗浄することにより除タンパクを行う。なお、ODSゲルは、シリカゲルの表面の水酸基にオクタデシルシリル基を結合したものであり、液体クロマトグラフィーの充填材として最も汎用されているものであり、多数の製品が市販されている。この方法では、このような市販品を好ましく用いることができる。ODSゲルは、エタノール溶液（好ましくは、濃度80 ~ 100%、溶媒が水）で浸潤後、酸性溶液にするのが好ましく、特に、エタノールに浸漬後のゲルに塩酸及び精製水を加えることによって、塩酸および精製水との混合液にすることが好ましい。この混合液中のエタノールの濃度は、特に限定されないが、25 ~ 35%程度が好ましく、また、混合液中の塩酸濃度は特に限定されないが、0.02 ~ 0.05N程度が好ましい。塩酸で処理されたものが好ましく、特に、濃度0.05N ~ 0.2N、さらに好ましくは0.07N ~ 0.15N程度の塩酸を含む、酸性溶液が好ましい。用いる塩酸の量は、特に限定されないが、ODSゲル 1 g 当たり通常、0.05 ~ 0.2 ml 程度が適当である。吸着時の温度は、特に限定されず、4 ~ 40 程度の温度下で行うことが可能であるが、室温下で行うことが最も簡便で好都合である。なお、除タンパク及び脱脂工程を含め、その後の本発明の前処理方法の全ての工程において、温度については上記のとおりである。吸着工程は、特に限定されないが、通常、5 ~ 20分間程度行われる。

【0015】

吸着工程後、ODSゲル粒子を遠心で集め、洗浄液で洗浄する。洗浄液としては、エタノール溶液が好ましく、特に、エタノール、塩酸および精製水の混合液が好ましい。この混合液中のエタノールの濃度は、特に限定されないが、10 ~ 20%程度が好ましく、また、混合液中の塩酸濃度は特に限定されないが、0.02 ~ 0.05N程度が好ましい。洗浄液の量は、特に限定されないが、ODSゲル 1 g に対し、好ましくは、10 ml 以上であり、さらに好ましくは12.5 ml ~ 25 ml である。洗浄液と共に検体中のタンパク質が除去される。なお、この洗浄工程は、複数回繰り返してもよく、2 ~ 3回繰り返すことが好ましい。

【0016】

次に、ODSゲル粒子を遠心で集め、石油エーテルで処理することにより脱脂を行う。処理時間は、特に限定されないが、通常、3 ~ 10分間程度であり、また、用いる石油エーテルの量は、特に限定されないが、ODSゲル 1 ml に対し、好ましくは、10 ml 以上であり、さらに好ましくは12.5 ml ~ 25 ml である。石油エーテルと共に脂質が除去される。なお、この脱脂工程は、複数回繰り返してもよく、2 ~ 3回繰り返すことが好ましい。

【0017】

10

20

30

40

50

本願発明者らは、さらに、除タンパク及び脱脂をより簡便に行うことができる方法を開発した。この方法では、検体を溶解度パラメーターが8.0ないし11.0の有機溶媒で抽出する。なお、溶解度パラメーターは、液体クロマトグラフィーの分野において、溶媒の性質を規定する特性の1つとして広く利用されているものであり、種々の有機溶媒について溶解度パラメーターが測定され、種々の文献に記載されている。例えば、波多野 博行、花井 俊彦、「新版・実験高速液体クロマトグラフィー」(株)化学同人発行等の文献に各種有機溶媒の溶解度パラメーターが記載されているので、これらのうち、溶解度パラメーターが8.0ないし11.0の有機溶媒を用いることができる。この範囲の溶解度パラメーターを有する好ましい有機溶媒の例として、酢酸エチル、トルエン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ベンゼン、アセトン、プロパノール等を挙げることができる。これらのうち、酢酸エチルが特に好ましい。抽出時の温度は、特に限定されず、10～35程度の温度下で行うことが可能であるが、室温下で行うことが最も簡便で好都合である。用いる有機溶媒の量は、特に限定されないが、検体1mlに対し、好ましくは、3ml以上であり、さらに好ましくは5～10mlである。この抽出により、測定すべき8-イソプロスタンは、有機相に抽出される。抽出操作は、複数回繰り返してもよく、2～3回繰り返すことが好ましい。抽出した有機相は、乾固後、次工程において、そのままNH₂カラムにかけることができる。

10

【0018】

なお、体液の除タンパク及び脱脂方法は、上記の方法に限定されるものではなく、他の公知の方法によっても行うことができる。要は、体液からタンパク質及び脂肪分の大部分が除去される方法であればよい。なお、タンパク質及び脂肪分は、完全に除去される必要はなく、一部残留していても支障はない。

20

【0019】

除タンパク及び脱脂した検体を、次いで本発明の方法に付す。なお、ODSゲル粒子を用いた上記方法により除タンパク及び脱脂を行った場合には、上記脱脂工程後にODSゲルに吸着されている有機成分を、溶解度パラメーターが8.0ないし11.0の有機溶媒で抽出することにより回収する。溶解度パラメーターが8.0ないし11.0の有機溶媒及びその好ましい例は、検体の抽出に用いる上記有機溶媒の説明に記載したものと同様である。この場合、抽出時間は特に限定されないが、通常3～10分間程度であり、用いる有機溶媒の量は、特に限定されないが、通常、ODSゲル1mlに対し、10～20ml程度が好ましい。抽出後のODSゲルを遠心により除去し、上清を乾固し、緩衝液に再溶解して本発明の方法に付すことが好ましい。なお、この抽出工程は、複数回繰り返してもよく、2～3回繰り返すことが好ましい。

30

【0020】

本発明の方法では、除タンパク及び脱脂した検体をNH₂カラムにかける。NH₂カラムは、シリカゲルのような担体に、アミノプロピル基のようなアミノ基(-NH₂)を含有する基を結合したものであり、糖類の分析等に汎用される、順相液体クロマトグラフィーの充填材として広く用いられており、多数の製品が市販されている。本発明の方法では、これらの市販のNH₂カラムを好ましく用いることができる。

【0021】

除タンパク及び脱脂した検体は、一旦乾固し、例えば、n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸=90:10:0.5(好ましくはpH3.0～5.0)のような緩衝液に再溶解したものをNH₂カラムにかけることが好ましい。

40

【0022】

次いで、カラムを、5～20v/v%(以下、液体成分の濃度を%で表した場合には、特に断りがない限りv/v%(体積%)を意味する)、好ましくは7～15%の2-プロパノール溶液で洗浄する(以下、この工程を「第1の洗浄工程」と言うことがある)。2-プロパノール溶液の溶媒としては、n-ヘキサンが好ましい。また、洗浄液は、0.1～2%程度、好ましくは0.5～1.0%程度の酢酸を含むことが好ましい。用いる洗浄液の量は、特に限定されないが、カラムの充填材1g当たり、好ましくは、5ml以上であり、さらに好

50

ましくは10ml ~ 20ml である。

【0023】

次に、カラムを、20 ~ 30%、好ましくは22 ~ 28%の2-プロパノール溶液で洗浄する(以下、この工程を「第2の洗浄工程」と言うことがある)。2-プロパノール溶液の溶媒としては、n-ヘキサンが好ましい。また、洗浄液は、0.1 ~ 2%程度、好ましくは0.5 ~ 1.0%程度の酢酸を含むことが好ましい。用いる洗浄液の量は、特に限定されないが、カラムの充填材1ml当たり、好ましくは、5ml以上であり、さらに好ましくは10ml ~ 20ml である。

【0024】

次に、カラムを、25 ~ 70%、好ましくは、45 ~ 60%の2-プロパノール溶液で溶出する(以下、この工程を「溶出工程」と言うことがある)。2-プロパノール溶液の溶媒としては、n-ヘキサンが好ましい。また、溶出に用いる溶液は、0.1 ~ 2%程度、好ましくは0.5 ~ 1.0%程度の酢酸を含むことが好ましい。用いる溶液の量は、特に限定されないが、カラムの充填材1ml当たり、好ましくは、5ml以上であり、さらに好ましくは10ml ~ 20ml である。

【0025】

上記の通り、本発明の方法では、第1の洗浄工程、第2の洗浄工程及び溶出工程の全てにおいて、2-プロパノール溶液を用いるが、用いる溶液中の2-プロパノール濃度は、第1の洗浄工程が最も低く、次いで、第2の洗浄工程が低く、溶出工程が最も高くなるように設定する。また、各工程で用いる溶液の溶媒は、全て共通のものにすることが好ましい。なお、第1の洗浄工程、第2の洗浄工程及び溶出工程は、それぞれ1回行えばよいが、任意の工程を複数回繰り返してもよい。また、これらの各工程は、圧力をかけて行うこともできるが、常圧下でも迅速に行うことができるので、常圧下で行うのが簡便である。

【0026】

溶出工程において溶出された液は、そのまま免疫測定に付すことができる。免疫測定方法自体は、種々のものがこの分野において周知であり、周知の免疫測定のいずれをも採用することができる。本発明の前処理方法により、8-イソプロスタンがかなり高度に精製されているので、どのような免疫測定に付した場合でも、免疫測定の精度が向上することは言うまでもない。免疫測定としては、高価な装置が不要で、放射免疫測定のように操作者の健康に悪影響を及ぼす危険のある放射性物質を用いる必要がない、酵素免疫測定や蛍光免疫測定が好ましく、特に酵素免疫測定が好ましいが、免疫測定方法は、これらに限定されるものではない。

【実施例】

【0027】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0028】

実施例1

(1) 除タンパク及び脱脂

エタノール(濃度99.5%)250mlにODSゲル粒子(和光純薬工業株式会社製、商品名Silica Gel ODS-Q3)64gを浸漬した。その後、1N塩酸80mlおよび精製水470mlを加え良く混和した。3名のヒトから採取した血漿各0.5mlにODSゲル粒子/エタノール/塩酸/精製水混液を1ml加え、室温下、10分間、よく攪拌した。上記と同様に遠心を行い、沈渣(ODSゲル粒子)を回収した。回収したODSゲル粒子に、エタノール、1N塩酸および精製水=15:3:82混合液を1ml加え、室温下、5分間、よく攪拌した。上記と同様に遠心を行い、沈渣(ODSゲル粒子)を回収した。エタノール/塩酸/精製水混液による洗浄、遠心を再度繰り返した。回収したODSゲル粒子に、石油エーテル1mlを加え、室温下、5分間、よく攪拌した。上記と同様に遠心を行い、沈渣(ODSゲル粒子)を回収した。回収したODSゲル粒子に酢酸エチル1mlを加え、室温下、5分間、よく攪拌した。上記と同様に遠心を行い、沈渣(ODSゲル粒子)を回収した。酢酸エチルによる抽出、遠心を再度繰り返した。回収した

10

20

30

50

遠心上清を1つにまとめ、乾固させ、n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸 = 90:10:0.5 緩衝液 (pH 4) 1 ml に再溶解した。

【0029】

(2) 前処理

(1)で得られた溶液を、NH₂カラム (Waters社製、商品名 Sep-Pak Vac NH₂、カラムサイズ3cc/500mg) にかけた。NH₂カラムは、予めメタノールおよびn-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸=90:10:0.5(体積比、以下同じ)で平衡化しておいた。室温で5分間放置後、n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸=90:10:0.5、2×2ml (2mlを2回加えたという意味、以下同様)をカラムに加えて洗浄した。洗浄液が排出された後、n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸=75:25:0.5、2×2mlをカラムに加えて洗浄した。洗浄液が排出された後、n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸=45:55:0.5、2×2mlをカラムに加え、溶出した液を回収した。回収した溶出液を後述する酵素免疫測定に付した。

10

【0030】

比較例 1

実施例1と同じ検体について、Methods. Enzymol. 1999, 300, 13-17記載の方法により前処理した。すなわち、血漿 各0.5 mlに0.1M塩酸(pH2.0)1mlを加えた。この混合物をC18カラム (Waters社製、商品名Sep Pak Vac C18、カラムサイズ3cc/500mg) にかけた。なお、C18カラムは予めメタノールおよび0.1M塩酸(pH2.0)で平衡化しておいた。室温で5分間放置後、アセトニトリル：水=15:85 5mlと、0.1M塩酸5mlとを加えて洗浄した。洗浄液が排出された後、n-ヘキサン：酢酸エチル：2-プロパノール=85:10:5 2×2mlで溶出した。溶出された液を回収し、実施例1で用いたのと同じNH₂カラムにかけた。室温で5分間放置後、n-ヘキサン：酢酸エチル=15:85 2×2mlで洗浄した。洗浄液が排出された後、アセトニトリル：水=90:10 2×2mlで洗浄した。洗浄液が排出された後、アセトニトリル 2×2mlで洗浄した。洗浄液が排出された後、酢酸エチル：メタノール：酢酸=85:10:5 2×2mlをカラムに加え、溶出した液を回収した。回収した溶出液を後述する酵素免疫測定に付した。

20

【0031】

比較例 2

実施例1と同じ検体について、Clinical Chemistry 2001, 47, 78, 1306-1308記載の方法により前処理した。すなわち、尿各0.5 mlに10 mmol/L ギ酸緩衝液(pH3.0) 1mlを加えた。これをOasis HLBカラム (Waters社製、商品名Oasis HLB、カラムサイズ3cc/500mg) にかけた。Oasis HLBカラムは、予めメタノールおよび10 mmol/L ギ酸緩衝液(pH3.0)で平衡化しておいた。室温で5分間放置後、アセトニトリル：水=15:85 5mlとギ酸緩衝液(pH3.0)5mlとで洗浄した。洗浄液が排出された後、n-ヘキサン：酢酸エチル：2-プロパノール=30:65:5 2×2mlをカラムに加え、溶出した液を回収した。回収した溶出液を後述する酵素免疫測定に付した。

30

【0032】

試験例 酵素免疫測定

実施例1、比較例1及び比較例2の方法により前処理した検体を、市販の8-イソプロスタン測定用酵素免疫測定キット (Cayman社製、商品名8-Isoprostane EIA Kit) を用いて、酵素免疫測定を行った。この操作は具体的に次のように行った。前処理した検体を、キットに添付されている、EIA Buffer 0.5mlに溶解後、マウスモノクローナル抗体がコートされているプレートに0.05ml加え (キットに添付のスタンダード溶液も同様に測定)、そこに、8-isoprostane AchE Tracer 0.05 mlおよび8-isoprostane Antiserum 0.05mlを加え、室温で18時間インキュベーションした。その後、プレートを良く洗浄し、そこにEllman's Reagent 0.2mlを加え、室温で60~90分インキュベーション後、マイクロプレートリーダーで、その吸光度を測定した。同時に測定したスタンダード溶液の吸光度より検量線を求め、それにより検体中の8-isoprostane濃度を定量した。

40

【0033】

結果を下記表1に示す。なお、表1中、「測定値(pg/well)」は、上記酵素免疫測定に

50

より実際に測定されたウェル当たりの 8 - イソプロスタンの重量であり、「換算値 (pg/ml)」は、予め、種々の既知濃度の 8 - イソプロスタンを含む標準溶液について、上記各例の前処理を行い、上記酵素免疫測定により測定された測定値 (pg/well) と、検体中の既知の 8 - イソプロスタンの濃度 (pg/ml) の比率を、上記各例における検体について測定された測定値 (pg/well) に乗ずることにより、検体 (尿) 中の 8 - イソプロスタン濃度 (pg/ml) を算出した値である。

【0034】

表 1

試料 No.	測定値 (pg/well)			換算値 (pg/ml)		
	実施例 1	比較例 1	比較例 2	実施例 1	比較例 1	比較例 2
1	10.4	38.6	62.3	15.5	29.4	34.6
2	13.1	52.0	91.8	19.5	41.6	50.9
3	10.1	35.7	60.9	15.0	28.6	33.8

10

【0035】

公知の LC/MS による測定により、健常人の血漿中の 8 - イソプロスタンの濃度は、約 20 pg/ml であることが知られている。表 1 から明らかなように、比較例 1 及び比較例 2 の方法では、この値よりもかなり大きな値になっており、非特異的に 8 - イソプロスタン類似体をも含めて測定していると考えられる。これに対し、本発明の実施例 1 の方法によれば、公知の値に近い値が得られており、かつ、公知の値よりもやや低い値が得られていることから、測定値には 8 - イソプロスタン類似体が含まれておらず、従来法よりも正確な免疫測定が可能であることが明らかになった。

20

【0036】

実施例 2

6 名のヒトから採取した血漿を検体として、除タンパク及び脱脂工程を酢酸エチルによる抽出に変えたことを除き実施例 1 と同じ操作を行なった。すなわち、0.5 ml の各血漿に 3 ml の酢酸エチルを加え、室温下、10 分間よく攪拌した。酢酸エチルによる抽出後、遠心により酢酸エチルの有機層と水層に分離し、回収した遠心上清 (有機層) を、別のチューブに移し、乾固させ、n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸 = 90:10:0.5 緩衝液 (pH 4) 1 ml に再溶解した。NH₂カラム以降の工程は実施例 1 と全く同じであった。さらに、比較のため、6 種類の同じ検体中の 8 - イソプロスタンの濃度を実施例 1 の方法により測定した。結果を下記表 2 に示す。

30

【0037】

表 2

	8 - イソプロスタン濃度 (pg/ml)					
	試料名					
	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6
実施例 1 法	39.8	114.0	32.8	31.1	24.5	25.2
実施例 2 法	44.0	115.8	31.1	29.2	24.5	24.6
実施例 1 法 / 実施例 2 法 x 100	90.4	98.4	105.3	106.5	100.2	102.6

40

【0038】

表 2 に示すように、実施例 1 の方法による測定結果と、実施例 2 の方法による測定結果はよく一致しており (相関係数 0.9982)、酢酸エチルによる抽出という、簡便な除タンパク及び脱脂方法を採用した実施例 2 においても、実施例 1 と同程度に正確に 8 - イソプロスタン濃度を測定できることが明らかになった。

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA10 AA25 DA31 DA69 FB01 FB05 FB17 GC10 GC11 GC20
JA01

专利名称(译)	8-异前列腺免疫分析的预处理方法		
公开(公告)号	JP2004157119A	公开(公告)日	2004-06-03
申请号	JP2003358321	申请日	2003-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	SRL股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	株式会社工スアールエル		
[标]发明人	北野壮一 川野克己 日比望		
发明人	北野 壮一 川野 克己 日比 望		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/48.A G01N33/53.S G01N33/92.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA10 2G045/AA25 2G045/DA31 2G045/DA69 2G045/FB01 2G045/FB05 2G045/FB17 2G045/GC10 2G045/GC11 2G045/GC20 2G045/JA01		
代理人(译)	谷川荣次郎		
优先权	2002304566 2002-10-18 JP		
其他公开文献	JP4378147B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种通过免疫测定法测量8-异前列腺素的预处理方法，与已知方法相比，该方法能够更精确地进行8-异前列腺素的免疫测定。解决方案：(1)将脱蛋白和脱脂样品应用于NH2色谱柱的步骤，(2)用5至20 v/v%的2-丙醇溶液洗涤色谱柱的步骤，(3)用20至30 v/v%的2-丙醇溶液洗涤色谱柱的步骤，(4)用25-70 v/v% 2-丙醇溶液洗脱的步骤，(然而，(2)至(4)的溶液中2-丙醇的浓度为(2) < (3) < (4))。对在洗脱步骤(4)中洗脱的溶液进行免疫测定以测量8-异前列腺素的浓度。[选择图]无

表2

	8-イソプロスタン濃度(µg/ml)					
	試料名					
	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6
実施例1法	39.8	114.0	32.8	31.1	24.5	25.2
実施例2法	44.0	115.8	31.1	29.2	24.5	24.6
実施例1法/実施例2法x100	90.4	98.4	105.3	106.5	100.2	102.6