

(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2004-251851
(P2004-251851A)

(43) 公開日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	G
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/573	GO 1 N 33/573	A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2003-44907 (P2003-44907)	(71) 出願人	592037055 株式会社日本医学臨床検査研究所 京都府久世郡久御山町大字大橋辺小字大橋 辺16番地10
(22) 出願日	平成15年2月21日 (2003.2.21)	(72) 発明者	松本 恭一 京都府久世郡久御山町大橋辺16-10 株式会社日本医学臨床検査研究所内
		(72) 発明者	木村 恵美 京都府久世郡久御山町大橋辺16-10 株式会社日本医学臨床検査研究所内
		(72) 発明者	日裏 久英 京都府久世郡久御山町大橋辺16-10 株式会社日本医学臨床検査研究所内

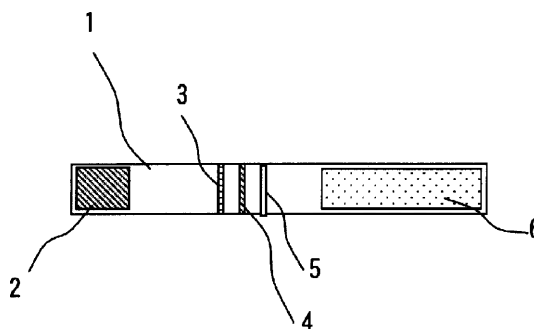
(54) 【発明の名称】 糞便成分の検査方法

(57) 【要約】

【課題】 便中のカルプロテクチン及び/又はエラスターゼの測定とヘモグロビン及び/又はトランスフェリンとを予め水性溶媒に溶解又は分散させた共通の検査試料を用いて同時又は同一の装置内で測定する糞便成分の検査方法を提供する。

【解決手段】 糞便中のヘモグロビンとトランスフェリンが大腸癌の検診に用いられていること及び糞便中のカルプロテクチンが炎症性腸炎の診断マーカーになり得ること、さらにエラスターゼ-1が膵臓の機能を診る上で有用であることに着目し、糞便を予め溶解或いは懸濁させた同一の試料でこれらの項目を同時又は同一装置内で免疫測定法により測定することにより、同時に異なる疾患の検査診断が可能であることを見出した。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糞便を予め水性溶媒中に溶解又は分散させた検査試料中のカルプロテクチン及びノ又はエラスターゼ - 1 を、該検査試料中に含まれる他の成分とともに少なくとも2種類の項目の組合せ測定を同一の該検査試料を用いて行うことを特徴とする糞便成分の検査方法。

【請求項 2】

糞便を予め水性溶媒中に溶解又は分散させた検査試料中のカルプロテクチンとエラスターゼ - 1 とを同一の該検査試料を用いて、それぞれを測定することを特徴とする糞便成分の検査方法。

【請求項 3】

免疫測定法により、同時、又は同一装置内で当該検査対象項目を測定する請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 に記載の方法を実施するための試薬キット。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 に記載の方法を実施するための検査装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糞便中の潜血成分を測定することによる大腸疾患の検査方法に用いられる。

【0002】

【従来の技術】

大腸疾患、とりわけ大腸癌の検診に糞便中のヘモグロビンを測定する診断方法が広く行われている。またヘモグロビンに加えてトランスフェリンを合わせて測定する方法も取り入れられている。これはヘモグロビンが、不安定であるため、ヘモグロビン単独では信頼性の高い検査ができない恐れがあるため、安定性のよいトランスフェリンを合わせて測定しようとするものである。一方、カルプロテクチンはファゲルホルらによって見出された分子量 36500 の蛋白質である（特許文献 1 参照）。糞便中のカルプロテクチンを測定することにより、炎症性腸炎の診断に有用であることから既に糞便中のカルプロテクチン測定キットが海外で製造発売されている（Calprest Eurospital 社製）。

また、糞便中のカルプロテクチンとヘモグロビンをそれぞれ測定して、大腸癌の診断マーカーとしての有用性を比較した報告もある（Scand. J. Gastroenterol (1996), 31, 1001-1005）。この報告では、ヘモグロビンとカルプロテクチンとの間には相関性がなく、カルプロテクチンは大腸癌の診断マーカーとして不向きであると述べられている。そして、この報告では、一つの糞便試料をヘモグロビン測定用及びカルプロテクチン測定用に分けて、それぞれ測定している。

【0003】

エラスターゼ - 1 はすい臓の機能を知るマーカーとして有用であり、特に糞便中のエラスターゼ - 1 を測定することにより、糖尿病の診断が可能になることも既に報告されている（Scand. J. Gastroenterol. 2001 Oct; 36(10): 1056-1061）。しかしながら、カルプロテクチンをヘモグロビン、トランスフェリン及びノ又はエラスターゼ - 1 の測定を同一の試料で測定した例は全くない。

【0004】

【特許文献 1】

特公平 7 - 8447

【特許文献 2】

US 5455160

【特許文献 3】

特開平 06 - 186227

【特許文献 4】

10

20

30

40

50

特開平 11 - 064331

【非特許文献 1】

Scand. J. Gastroenterol (1996)、31、1001 - 1005

【非特許文献 2】

Scand J Gastroenterol. 2001 Oct; 36(10): 1056 - 1061

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、糞便中の成分を測定することにより疾病の診断を行うにあたり、異なる疾患のマーカーとなりうる成分を同時又は同一の装置内で効率よく測定する方法を提供することである。具体的には糞便中のカルプロテクチン及びノ又はエラスターゼ - 1 の測定を予め水性溶媒に溶解又は分散させた共通の検査試料中に含まれる他の成分と組み合わせ、同一検査試料を用いることにより同時又は同一の装置内で測定する糞便成分の検査方法を提供するものである。

10

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、糞便中のヘモグロビンとトランスフェリンが大腸癌の検診に用いられていること及び糞便中のカルプロテクチンが炎症性腸炎の診断マーカーになり得ること、さらにエラスターゼ - 1 が膵臓の機能を診る上で有用であることに着目し、糞便を予め溶解或いは懸濁させた同一の試料でこれらの項目を同時又は同一装置内で免疫測定法により測定

20

【0007】

本発明は以下の構成からなる。

1、糞便を予め水性溶媒中に溶解又は分散させた検査試料中のカルプロテクチン及びノ又はエラスターゼ - 1 を、該検査試料中に含まれる他の成分とともに少なくとも2種類の項目の組合せ測定を同一の該検査試料を用いて行うことを特徴とする糞便成分の検査方法を提供するものである。

2、糞便を予め水性溶媒中に溶解又は分散させた検査試料中のカルプロテクチンとエラスターゼ - 1 とを同一の該検査試料を用いて、それぞれを測定することを特徴とする糞便成分の検査方法を提供するものである。

30

3、免疫測定法により、同時、又は同一装置内で当該検査対象項目を測定する上記1または2に記載の方法。

4、上記1～3に記載の方法を実施するための試薬キット。

5、上記1～3に記載の方法実施するための検査装置。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は糞便中のカルプロテクチン及びノ又はエラスターゼ - 1 を測定するにあたり、該検査試料中に含まれる他の成分とともに少なくとも2種類の項目の組合せ測定を同一の該検査試料を用いて行うことによる検査方法に関するものであり、さらに、カルプロテクチンとエラスターゼ - 1 とを同一の該検査試料を用いて、それぞれを測定することを特徴とする糞便成分の検査方法を提供するものである。

40

【0009】(糞便試料の調製方法)

糞便試料は市販の便潜血検査用の最便容器、例えば特開平06 - 186227、特開平11 - 064331等が開示されている用具を用いて糞便試料の採取、緩衝液への懸濁等の操作を行うことができる。このような容器は通常、糞便中のヘモグロビン及び又はトランスフェリンを測定(本発明においては、成分を測定すること又は検出することを同義に扱っている。)するために簡単にしかも比較的精度良く採便できるように工夫されているため本発明を実施するためには好適である。

【0010】(測定装置)

50

カルプロテクチン及びノ又はエラストラーゼ - 1 を検査試料中に含まれる他の成分と同時、又は同一の装置内で測定するための、好適な実施態様としては、免疫クロマト法が挙げられる。カルプロテクチンやエラストラーゼ - 1 に対する抗体、ポリクローナル或いはモノクローナル抗体、を金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子等に吸着保持させた粒子標識抗体を調製する。一方カルプロテクチン及びノ又はエラストラーゼ - 1 以外の糞便中の測定する他の成分は特に限定されないが、代表的な例としてヘモグロビンやトランスフェリンが挙げられる。これらに特異的な抗体をカルプロテクチン及びノ又はエラストラーゼの場合と同じ種類の粒子或いは異なる種類の粒子に吸着保持させた標識粒子を調製する。この標識粒子を粒子保持体に保持させてイムノクロマトに供する。イムノクロマトの展開メンブランの標識粒子捕獲部位にカルプロテクチン及びノ又はエラストラーゼ - 1 とヘモグロビン及びノ又はトランスフェリンに対する抗体を試料液の展開方向と垂直になるように保持しておく。これらの概念図を図 1 に示した。

10

糞便試料懸濁液をイムノクロマト装置の試料添加部位に添加し、展開させることによって、分析対象成分が一定濃度以上存在している場合には、検出部位において反応ラインが出現する。そのラインの有無を観察することにより、分析対象成分の有無を判定する。

【0011】(他の免疫測定装置)

上記例はイムノクロマト法による本発明の実施態様例を示したが、イムノクロマト法に限定されることなく、例えばカルプロテクチンに対する抗体と、ヘモグロビン等に対する抗体をそれぞれ異なる種類の標識物質で標識した標識抗体を用いて、同一の反応容器内に捕獲されたそれぞれの抗原を測定することも可能である。この実施態様を可能にする標識物質の組合せとしては、例えばペルオキダ - ゼとアルカリフォスファターゼの異なる酵素の組合せ、ユーロピウムキレートとルテニウムキレートの組合せ、アクリジニウムエステルとエクオリンによる発光測定の組合せ等、公知の標識物質が使用できる。用いる固相は、例えばチューブや、マイクロプレートのように容器に直接抗体を固定化するものでは、それぞれの抗体の混合物を固定化することにより、固相を調製することが可能である。磁性微粒子の様に粒子状固相を用いる場合には、各抗体を別々に吸着固定化した固相を混合して用いるか、或いは抗体の混合物を一種類の粒子に固定化して用いることも可能である。

20

このようにして調製した、固相に検査試料を反応させ、分析対象成分を固相に捕獲した後、標識抗体を反応させ、固相に捕獲された標識抗体量を測定することにより、分析対象成分の量を測定することが可能である。

30

【0012】

さらに、本発明は同一の免疫測定装置を用いる方法に限定されることなく、同一の糞便溶解試料を用いて、カルプロテクチン及びノ又はエラストラーゼ - 1 を糞便中に含まれる他の成分を、それぞれ別々に測定する方法にも及ぶ。このような例として、通常の E I A 法やラテックス凝集法等公知の免疫測定法が適用される。

さらには、ビリルビン等の場合には分光学的又は酵素反応を利用して測定する場合もある。

【0013】

ラテックス凝集反応を用いてその凝集反応を比濁法により、本発明を実施する場合には、カルプロテクチン及びノ又はエラストラーゼ - 1 に対する抗体をラテックス粒子に吸着させ、それぞれのラテックス試薬を調製する。さらに、例えばヘモグロビンに対する抗体もラテックス粒子に吸着させ、ラテックス試薬を調製し、同一被検試料を検体としてそれぞれの試薬で測定する。測定は、汎用の分光光度計や自動分析器を用いて測定することが可能である。また、便潜血専用の測定装置を用いることも可能である。

40

【0014】

【実施例】

以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。

【実施例 1】(イムノクロマト装置の調製)

抗カルプロテクチン抗体(マウスモノクローナル抗体クローン No. 108、日本医学臨

50

床検査研究所製)を金コロイド粒子に吸着させ金コロイド標識抗カルプロテクチン抗体を調製した。さらに抗エラスターゼ-1抗体(マウスモノクローナル抗体、クローンNo. EL-123、日本医学臨床検査研究所製)を金コロイド粒子に吸着させ金コロイド標識抗カルプロテクチン抗体を調製した。次いで、抗ヒトヘモグロビン抗体(マウスモノクローナル抗体クローンNo. B11.WG ケミコン社製)を同様に金コロイド粒子に吸着させて金コロイド標識抗ヒトヘモグロビン抗体を調製した。調製した2種類の金コロイド標識抗体を等量混合して、それをイムノクロマト用コンジュゲートパッドに浸漬保持させた。吸着パッドを乾燥させコンジュゲートパッドとしてイムノクロマト装置に組み込んだ。市販のラテラルフロー用メンブラン(孔径1.2 μ m)上に抗カルプロテクチン抗体(マウスモノクローナル抗体クローンNo. CL-19日本医学臨床研究所製)と抗ヒトヘモグロビン抗体(ウサギ)をそれぞれ検出部に保持させた。メンブランはBSAでブロッッキング後乾燥させて用いた。

10

図1に示したような構成でイムノクロマト装置を調製した。

【0015】

【実施例2】(測定)

実施例1で調製したイムノクロマト装置を用いて、試料の測定を行った。1%(W/V)のBSAを含むPBS緩衝液にカルプロテクチン200ng/mLを含む標準液、ヒトヘモグロビン300ng/mLを含む標準液をそれぞれ調製して、標準試料とした。

糞便10mgを2mLの緩衝液に懸濁させる市販の採便容器(栄研化学社製)に採取された糞便試料を用いて測定した。その結果を表1に示した。

20

【0016】

【表1】

表1 測定結果

試料	カルプロテクチン	エラスターゼ-1	ヒトヘモグロビン
カルプロテクチン標準液	陽性	陰性	陰性
エラスターゼ-1標準液	陰性	陽性	陰性
ヒトヘモグロビン標準液	陰性	陰性	陽性
等量混合標準液	陽性	陽性	陽性
便検体1(正常)	陰性	陽性	陰性
便検体2(大腸がん)	陰性	陽性	陽性
便検体3(炎症性腸炎)	陽性	陽性	陰性
便検体4(炎症性腸炎)	陽性	陰性	陰性
便検体5(出血性腸炎)	陽性	陽性	陽性
便検体6(糖尿病)	陰性	陰性	陰性
便検体7(正常)	陰性	陽性	陰性

30

【0017】

以上の結果、本発明により、カルプロテクチン、エラスターゼ-1及びヘモグロビンを同時に測定でき、種々の糞便試料で共に陰性、すべてが陽性、どれか一方が陽性示す試料が存在することを同時に判定することが可能となり、その結果から大腸がんと炎症性腸炎の鑑別診断、さらには糖尿病の診断も同時にできることが判った。

40

【0018】

【発明の効果】

本発明により、糞便中のカルプロテクチン及び/又はエラスターゼ-1と糞便中の他の成分、例えばヘモグロビン、トランスフェリン等を、糞便を予め水性溶媒に溶解又は懸濁させた共通の試料を用いて測定し、その結果を臨床診断に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のイムノクロマト法の概念図である。

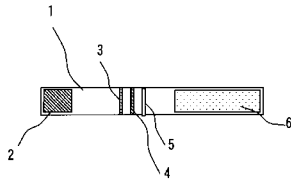
【符号の説明】

1、測定装置本体

50

- 2、コンジュゲートパッド
- 3、抗カルプロテクチン抗体
- 4、抗エラスターゼー1抗体
- 5、抗ヒトヘモグロビン抗体
- 6、吸収パッド

【図1】



专利名称(译)	测试粪便成分的方法		
公开(公告)号	JP2004251851A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2003044907	申请日	2003-02-21
申请(专利权)人(译)	日本医科大学临床检验实验室		
[标]发明人	松本恭一 木村惠美 日裏久英		
发明人	松本 恭一 木村 惠美 日裏 久英		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/573		
FI分类号	G01N33/48.G G01N33/53.D G01N33/573.A		
F-TERM分类号	2G045/AA22 2G045/BA13 2G045/BB01 2G045/CB04 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB03		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供粪便成分的检查方法，用于测量粪便中的钙卫蛋白和/或弹性蛋白酶，并通过使用通过预先将粪便溶解或分散在水性溶剂中获得的相同检查样品来测量血红蛋白和/或转铁蛋白。ZSOLUTION：通过考虑粪便中血红蛋白和转铁蛋白作为结肠癌检查标志物的事实，粪便中的钙卫蛋白可用作诊断肠道炎症性炎症的标志物，弹性蛋白酶1可用于诊断胰腺的功能，使用预先溶解或悬浮粪便的相同样品，通过免疫测定同时或在同一装置中测量这些物品，以便能够同时检查和诊断不同的疾病。Z

