

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5124467号  
(P5124467)

(45) 発行日 平成25年1月23日(2013.1.23)

(24) 登録日 平成24年11月2日(2012.11.2)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 A
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S

請求項の数 36 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2008-535782 (P2008-535782)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成18年10月13日(2006.10.13)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2009-511919 (P2009-511919A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成21年3月19日(2009.3.19)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/040484		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02007/044978		O
(87) 国際公開日	平成19年4月19日(2007.4.19)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成21年10月9日(2009.10.9)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	11/249,188	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成17年10月13日(2005.10.13)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋
		(74) 代理人	100119253
			弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】水系界面活性剤を用いるタクロリムスの抽出および定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液検体を溶血剤および水溶性抽出剤と接触させる段階を有する、非変性性水系環境における血液検体からのタクロリムスの抽出方法であって、該抽出剤がシクロペンタノペルヒドロフェナントレン(コレステロール)部分を含む方法。

【請求項2】

血液検体が、沈殿がない水系環境で提供される請求項1の方法。

【請求項3】

溶血剤が、塩を含まない水、低張溶液および界面活性剤からなる群から選択される請求項1の方法。

【請求項4】

溶血剤がノニオン系界面活性剤である請求項3の方法。

【請求項5】

ノニオン系界面活性剤がサポニンである請求項4の方法。

【請求項6】

溶血剤がオクチルフェノキシポリエトキシエタノールである請求項1の方法。

【請求項7】

抽出剤が水溶性界面活性剤である請求項4の方法。

【請求項8】

抽出剤が、アニオン系胆汁酸塩界面活性剤および両性イオン胆汁酸塩界面活性剤からな

る群から選択される請求項 1 の方法。

【請求項 9】

抽出剤が、抱合および非抱合胆汁酸塩からなる群から選択されるアニオン系胆汁酸塩界面活性剤である請求項 8 の方法。

【請求項 10】

アニオン系胆汁酸塩界面活性剤が抱合胆汁酸塩である請求項 9 の方法。

【請求項 11】

抱合胆汁酸塩が、グリココール酸塩およびタウロデオキシコール酸塩を含む群から選択される請求項 10 の方法。

【請求項 12】

前記胆汁酸塩が非抱合胆汁酸塩である請求項 9 の方法。

【請求項 13】

前記非抱合胆汁酸塩が、コール酸塩、デオキシコール酸塩およびケノデオキシコール酸塩を含む群から選択される請求項 12 の方法。

【請求項 14】

前記胆汁酸塩がデオキシコール酸塩である請求項 13 の方法。

【請求項 15】

抽出剤が両性イオン胆汁酸塩界面活性剤である請求項 8 の方法。

【請求項 16】

両性イオン胆汁酸塩界面活性剤が 3 - [ ( 3 - コラミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] - 1 - プロパンスルホネート水和物である請求項 15 の方法。

【請求項 17】

非変性性水系環境で試験血液検体中のタクロリムス濃度を測定する方法であって、

( a ) 試験血液検体を溶血剤および水溶性抽出剤と混合する工程であって、該血液検体が非変性性水系環境で提供される 工程であって、該抽出剤がシクロペントノペルヒドロフェナントレン ( コレステロール ) 部分を含む工程、

( b ) 前記溶血剤によって前記血液検体を溶解させる工程、

( c ) 前記水溶性抽出剤によってタクロリムスを抽出する段階、および

( d ) 自動化システムで前記血液検体中のタクロリムス濃度を測定する工程

を有し、

抽出されたタクロリムスの測定濃度が前記血液検体中に存在するタクロリムスの濃度に相当する方法。

【請求項 18】

血液検体が、沈殿がない水系環境で提供される請求項 17 の方法。

【請求項 19】

溶血剤がオクチルフェノキシポリエトキシエタノールであり、水溶性抽出剤がデオキシコール酸塩である請求項 17 の方法。

【請求項 20】

検体中のタクロリムス濃度の測定方法がイムノアッセイによるものである請求項 17 の方法。

【請求項 21】

検体中のタクロリムス濃度の測定方法がイムノフィリン受容体結合アッセイによるものである請求項 17 の方法。

【請求項 22】

イムノアッセイ方法が、ラジオイムノアッセイ ( R I A ) 、酵素免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) 、微粒子酵素免疫吸着アッセイ ( M E I A ) 、イオン捕捉アッセイおよび化学発光に基づくアッセイを含む群から選択される請求項 20 の方法。

【請求項 23】

自動化システムを用いてヒト全血検体中のタクロリムスのレベルを検出する ためのアッセイキット であって、溶血剤および非変性性水溶性抽出剤を含み、該抽出剤がシクロペン

10

20

30

40

50

タノベルヒドロフェナントレン（コレステロール）部分を含む、キット。

【請求項 2 4】

溶血剤がオクチルフェノキシポリエトキシエタノールおよびサポニンからなる群から選択される請求項 2 3 のアッセイキット。

【請求項 2 5】

前記溶血剤がオクチルフェノキシポリエトキシエタノールである請求項 2 4 のアッセイキット。

【請求項 2 6】

非変性性水溶性抽出剤がアニオン系胆汁酸塩界面活性剤および両性イオン系胆汁酸塩界面活性剤からなる群から選択される請求項 2 3 のアッセイキット。

【請求項 2 7】

アニオン系胆汁酸塩界面活性剤が抱合（グリコシル化）および非抱合の胆汁酸塩から選択される請求項 2 6 のアッセイキット。

【請求項 2 8】

胆汁酸塩界面活性剤が抱合胆汁酸塩である請求項 2 7 のアッセイキット。

【請求項 2 9】

抱合胆汁酸塩がグリココール酸塩およびタウロデオキシコール酸塩を含む群から選択される請求項 2 8 のアッセイキット。

【請求項 3 0】

胆汁酸塩が非抱合胆汁酸塩である請求項 2 7 のアッセイキット。

【請求項 3 1】

非抱合胆汁酸塩がコール酸塩、デオキシコール酸塩およびケノデオキシコール酸塩を含む群から選択される請求項 3 0 のアッセイキット。

【請求項 3 2】

前記胆汁酸塩がデオキシコール酸塩である請求項 3 1 のアッセイキット。

【請求項 3 3】

非変性性水溶性抽出剤が両性イオン胆汁酸塩界面活性剤である請求項 2 6 のアッセイキット。

【請求項 3 4】

両性イオン胆汁酸塩界面活性剤が 3 - [ ( 3 - コラミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] - 1 - プロパンスルホネート水和物である請求項 3 3 のアッセイキット。

【請求項 3 5】

半自動化アッセイの枠組みで用いることができる請求項 2 3 のアッセイキット。

【請求項 3 6】

自動化アッセイの枠組みで用いることができる請求項 2 3 のアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全自動タクロリムス定量アッセイで使用するために試験サンプルからタクロリムスを抽出する簡単な方法に関する。その方法は、水溶性界面活性剤の使用に基づくものである。

【背景技術】

【0002】

タクロリムス（プログラフ（ProGraf；登録商標）および F K 5 0 6 とも称される）は、土壤真菌ストレプトミセス・ツクバエンシス（*Streptomyces tsukubaensis*）から単離される強力な免疫抑制性を有するマクロリドラクトン系抗生物質である。タクロリムスは、タクロリムス、F K 結合タンパク質（F K B P）、カルモジュリンならびにカルシニューリン A および B の間の 5 量体複合体の形成を介してカルシニューリン経路を阻害する（最終的に T 細胞増殖を阻害する）ことで、その免疫抑制効果を示す（McKeon et al., *Cell* Vol. 66, pages 823-6 (1991)）。タクロリムスは、F K B P に強固に結合し（K d

10

20

30

40

50

約 0.4 nM)、シクロフィリン (Handschemacher et al., Science Vol. 226, pages 544-547 (1984))、アルブミン類および - 1 - 酸糖タンパク質 (Wong, Clinica Chimica Acta Vol. 313, pages 241-253 (2001)) に結合することも知られている。他の免疫抑制剤と併用したタクロリムスで、臓器移植後の組織拒絶の治療に関して許容度が広がった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

薬剤用量と薬剤血中レベルとの間については患者間の変動が極めて大きいことから、その薬剤が毒性を生じる可能性があるため、タクロリムス免疫抑制療法を受けている患者ではタクロリムスレベルの治療的モニタリングが標準的な実務となっている。

10

【0004】

タクロリムスは、赤血球 (赤血球または RBC) でかなりの量が補捉され、FK 結合タンパク質 (FKBP) に結合している。従って、生検検体、骨髄および他の体液から抽出できたとしても、タクロリムスの治療的血液モニタリングに好ましい基質は全血検体である。タクロリムスは、イムノフィリン類、アルブミンおよびリポタンパク質類などの他の血漿成分とも複合体を形成する。ヒト血液検体中のタクロリムスの存在およびその濃度を測定するには、検体中に存在する RBC を溶解させて、タクロリムス/タンパク質複合体を放出させなければならない。次に、タクロリムス/タンパク質複合体を解離させて、タクロリムスを放出させる必要がある。

20

【0005】

タクロリムスの水溶液での溶解度は限られたものである。その結果、いずれの利用可能なタクロリムスアッセイでも、アッセイ用に薬剤を抽出するのに有機溶媒を使用する。有機溶媒 (例: 酢酸エチル、メタノール、塩化メチレン) は、定量のための準備において、赤血球を溶解させ、タンパク質を変性させ、タクロリムスを抽出するのに用いられてきた。

【0006】

有機溶媒に基づく手順を用いることには、いくつかの大きな欠点がある。例えば、有機溶媒は揮発性が非常に高く、引火性が高く、環境ガイドラインに従って適切に廃棄しなければならない有害物が関与する。

30

【0007】

有機溶媒の揮発性は、揮発性溶媒の累積的蒸発のために、タクロリムスの正確な定量を行う上での障害ともなり得る。抽出の各段階および検体アッセイインキュベーション時における過度の蒸発があると、タクロリムスのレベルが人工的に高く検出される可能性がある。

【0008】

タクロリムス抽出の現行の手順ではいずれの場合も、複雑な手動による検体調製が必要である。現行の手順では、検体の変性/抽出段階、遠心段階および上清傾斜除去段階が必要である。現在用いられている手動でのタクロリムス抽出手順は、遅くて労働集約的なプロセスである。その手順では代表的には、4つの成分、すなわち検体、変性剤、抽出剤および抽出された検体の正確なピペット採取を行う。手動での正確なピペット採取は時間を要するものであり、信頼性が低くなる可能性がある。その結果、これらの手順は、人員配置関連のコストに関して経費を要するものである。それらの手順にはさらに、分析スループットおよびタクロリムス定量の正確さに関して技術的に限界がある。

40

【0009】

現行の検体前処理手順で必要とされる変性、遠心および傾斜法分離の段階とともに有機溶媒を用いると、タクロリムス定量アッセイの完全自動化は実行できない。定量の完全自動化を可能とするには、試薬および検体を全て水系形態のままにする必要がある。血液検体の変性 (溶解) および遠心は必要なくなると考えられる。水溶液を用いることで、過剰な蒸発効果、ならびに電気機器での揮発性、引火性、場合によっては爆発性の条件の使用

50

に関連する危険性も排除されるものと考えられる。

【0010】

従って、入念で面倒な検体前処理の必要がない完全自動のタクロリムス定量方法を作ることが、当業界において必要とされており、関心を持たれている。そのような方法によれば、試験当たりのコストに関して当業界で公知の現行の方法と比較してかなりの改善があるものと考えられる。使用者の検体との手動での相互作用がないことで、薬剤抽出（従って、後の結果）に影響を与え得る人為的ミスを排除することにより、方法の再現性も高まるものと考えられる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、有機溶媒および遠心の使用を排除するだけでなく、タクロリムス定量アッセイの完全自動化のための必要条件をも満たす、沈澱や変性がない水系環境でタクロリムスを抽出する方法を提供する。

【0012】

（発明の詳細）

本発明は、手動での前処理を行う必要がなく、試験血液検体での完全自動化されたタクロリムス定量方法を可能とする、沈澱や変性がない水系でのタクロリムスの抽出方法を提供する。

【0013】

タクロリムスはRBCにかなりの量で結合していることから、好ましい試験血液検体は全血であるが、それは洗浄済みRBCを含む検体であっても良い。

【0014】

本発明の方法は、試験血液検体を少なくとも一つの溶血剤および少なくとも一つのタクロリムス抽出剤と混合する段階を有する。その2つの薬剤は、1段階でまたは別個の段階で加えることができる。

【0015】

溶血剤は赤血球を溶解させて、タクロリムス/タンパク質複合体を放出させる。本発明に関して、「溶血性」、「赤血球性」または「赤血球溶解性」という用語は同じ意味を有しており、赤血球を崩壊させて細胞内の内容物を放出させることである。

【0016】

抽出剤は、後段階の定量アッセイ方法と適合する水溶液中に、タクロリムスと血液タンパク質成分との複合体からタクロリムスを解離または放出させるものである。

【0017】

最終的に、前記定量方法中に、抽出されたタクロリムスの濃度を測定する。そのような定量法では、抽出タクロリムスの測定濃度は、血液検体中に最初に存在するタクロリムスの濃度に相当する。

【0018】

タクロリムス抽出および定量の完全自動化を行うには、アッセイ前に検体/溶解/抽出混合物からの成分が失われないようにする必要があることから、溶血剤は、強力な赤血球溶解活性を示すが、定量アッセイで必要な抗体その他の受容体分子を変性させないものでなければならない。同様に、溶血剤の濃度は、ほぼ即時に検体中のあらゆる細胞膜を溶解させるだけのものが必要であり、同時にタクロリムス定量法を妨害しないものでなければならない。本発明の方法で用いることができる溶血剤には、ノニオン系界面活性剤、または低イオン強度（またはイオンを含まない）の水溶液、例えば水などがあり得る。これらの薬剤は、浸透圧衝撃によって強力な赤血球性特性を有することが知られている（低張崩壊）。

【0019】

上述のように、界面活性剤を溶血剤として用いる場合、それは、アッセイにおいて継続的に存在することがアッセイ自体を妨害しないものでなければならない。従って、ドデシル硫酸ナトリウムなどの強変性性のイオン系界面活性剤は回避しなければならない。好ま

10

20

30

40

50

しい界面活性剤には、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（トリトン（Triton）X - 100（商標名））またはサポニンなどのノニオン系界面活性剤などがあり、好ましくはトリトンX - 100（商標名）である。さらに、完全自動化を行うには、界面活性剤がアッセイの結合インキュベーション期間を通じて反応混合物の溶解度を維持することが必須である。

#### 【0020】

部分的には、タクロリムスは疎水性であることから、血液中に存在する既知の高アフィニティおよび特異的結合性のタンパク質に結合する。免疫グロブリン類が、生理的重要性を有する高アフィニティおよび特異的結合性のタンパク質の1例である。イムノフィリン累は、いくつかの化合物に結合する細胞内結合性タンパク質のファミリーであり、2つの異なるイムノフィリン類のファミリーが現在知られており、それはシクロフィリン類およびマクロフィリン類であって、後者が特異的にタクロリムスに結合する。イムノフィリン類に強固に結合するタクロリムスの抽出は、水溶液を用いては容易には行えない。タクロリムスについてはこれまでに、10年間かけて免疫抑制療法において、かなりの研究および使用が行われてきたにも拘わらず、水系の非変性性試薬の使用に基づくタクロリムスの抽出については既存の方法はない。当業界で知られているいずれの方法でも、イムノフィリン類の変性およびさらなる定量的濃度速度のためのタクロリムス抽出には有機溶媒が用いられる。シクロペンタノペルヒドロフェナントレン（コレステロール）骨格を有する水溶性界面活性剤が、タクロリムスの強力な非変性性抽出を示すことが思いがけず発見された。タクロリムス抽出活性に有用なコレステロール骨格を有する界面活性剤には、アニオン系胆汁酸塩、そしてCHAPS（商標名）などの両性イオン界面活性剤などがあるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0021】

本明細書で使用される場合の「胆汁酸塩」とは、界面活性剤特性を示す、肝臓または腸内細菌が産生するステロイド分子の種類からの化合物またはその誘導体を意味する。試験血液検体中に存在する結合性タンパク質からのタクロリムス抽出のための条件を与える胆汁酸塩は、未接合（例：コール酸塩）であるか別の部分、例えば置換もしくは未置換のアルキル、アルケニルもしくはアルキニル部分、またはより好ましくは未置換のC<sub>1</sub>~C<sub>30</sub>アルキル、アルケニルもしくはアルキニル部分であり、例えばタウリン（例：タウロコール酸）もしくはグリシン（例：グリココール酸）または水溶性芳香族部分などに接合されていても良い。本発明の文脈で有用な胆汁酸塩には、コール酸塩、デオキシコール酸塩、ケノデオキシコール酸塩、コリルグリシン、ケノデオキシコール酸グリシン、コリルタウリン、ケノデオキシコール酸タウリン、ケノデオキシコール酸、リトコール酸、スルホコール酸、スルホリトコール酸、デオキシコリルグリシン、スルホリトコリルグリシンおよびウルソデオキシコール酸などがあるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0022】

後述の実施例に示したように、これらの水溶性胆汁酸塩は、強い非変性性タクロリムス抽出活性を示す種類の分子を代表するものである。本発明を示す上では、胆汁酸塩デオキシコール酸塩が好ましかった。しかしながら、他の胆汁酸塩の抽出活性も示されている。胆汁酸塩のこの抽出活性については、先行技術においてこれまで報告も示唆もされておらず、そのような抽出活性を当業者が経験的に知ることはないものと考えられる。この胆汁酸塩の特性を利用することで、(a)上記の理由で厄介なものであると考えられ、電気機器で使用するには危険となり得る有害な有機化学物質の使用を回避し、(b)試験血液検体中に存在する競合イムノフィリン類存在下に良好な抽出および溶解をもたらすことで、タクロリムス定量アッセイの完全自動化に必要な条件が提供される。

#### 【0023】

CHAPS（3 - [（3 - コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホネート水和物）およびCHAPSOなどの両性イオン系界面活性剤は、非特異的タンパク質相互作用を断ち、低タンパク質凝集を生じさせることができる非変性性界面活性剤である。CHAPSの非変性性タクロリムス抽出活性は、本願の実施例4（図5）に示さ

10

20

30

40

50

れている。

【0024】

抽出剤には、リン脂質または非界面活性剤系のスルホベタインなどの第2の抽出剤を補っても良い。好適なリン脂質には、天然リン脂質などがあるが、それに限定されるものではなく、特にレシチン（ホスファチジルコリン）などがある。

【0025】

自動化には、溶血剤および抽出剤の両方の存在下にタクロリムスを定量することが必要であることから、これら薬剤の性質および濃度を選択して、定量法の重大な妨害が回避されるようにすることが好ましい。例えば、これらの薬剤は好ましくは定量法中にアナライト結合性分子およびシグナル発生分子と不適合でなく、より好ましくはそれらを妨害しない。本発明において、「アナライト」という用語は、対象の化合物である（例：タクロリムス）。アナライトは、複合体を形成する分子によって捕捉または結合され得る。このアナライト結合性分子には、タクロリムスに結合するタンパク質、例えば抗体またはイムノフィリンなどがあり得る。

10

【0026】

シグナル発生分子には、アルカリホスファターゼまたはアクリジニウムなどがあり得るが、これらに限定されるものではない。

【0027】

本発明の方法で使用されるステロイド骨格を有する水溶性界面活性剤の化学特性は、抽出に必要な濃度でアッセイ中に継続的に存在することで重大な妨害を引き起こさないものである。

20

【0028】

試験血液検体は、完全な細胞溶解に十分な時間および条件下で、より好ましくは細胞膜および成分の可溶化が起こる上で十分な時間および条件下で溶血剤とともにインキュベートしなければならない。好適な時間は、薬剤に応じて数秒から数時間であることができる。

【0029】

同様に、検体は、イムノフィリン類その他の結合性タンパク質からタクロリムスを抽出できるだけの時間および条件下で抽出剤とともにインキュベートしなければならない。これらの条件は、界面活性剤の選択される濃度および検体の相対的容量に応じて変動する。概して、界面活性剤の濃度は、RBC溶解段階中は約0.1～約3.0重量/体積%、好ましくは約0.3～約1.0%の範囲とすべきであり、抽出剤（デオキシコール酸塩その他の水系界面活性剤）の濃度は、抽出段階中は約0.3%～約1%、好ましくは約0.4%～約0.6%の範囲とすべきである。

30

【0030】

試験血液検体は、別個の段階で（溶血剤を最初に、次に胆汁酸塩）または同一段階で溶血剤および抽出剤と接触させることができる。その2つの薬剤は通常は適合性であることから、試験血液検体は好ましくは、両方の薬剤を含む溶液と混合する。抽出のインキュベーション時間は、アッセイの種類に応じて広い範囲のものであり、それはわずから数秒（例えば、多くの急速非平衡イムノアッセイの場合など）から数時間（例えば、一部の平衡マイクロタイタープレートアッセイの場合など）であることができる。自動化および工程時間短縮に関しては、溶血剤もしくは抽出剤または両方とのインキュベーション時間は短い方が好ましい。従って、各個々の段階または合わせた段階のインキュベーション時間は、好ましくは10～20分である。

40

【0031】

溶血および抽出工程後に、当業者に公知の多くの方法のいずれかによって、検体中のタクロリムスの濃度を測定することができる。イムノアッセイまたは受容体結合アッセイ（例：イムノフィリン受容体アッセイ）を用いることができる。好ましくは、イムノアッセイを用いる。半自動化または完全自動化には、多くの市販の自動化イムノアッセイ分析装置のいずれかを用いることができる。イムノアッセイ方法は好ましくは、固相上でのタク

50

ロリムスの捕捉（FKBPなどのタクロリムスに結合することが知られている抗体またはタンパク質受容体を介して）と、それに続く結合したタクロリムスからの血液試験検体中の妨害成分となり得る成分（ヘモグロビンなど）の分離を可能とする不均一型のものであるものと考えられる。これには、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素免疫吸着アッセイ（ELISA）、微粒子酵素免疫吸着アッセイ（MELIA）、イオン捕捉アッセイ、化学発光に基づくアッセイその他のアナライト捕捉、シグナル発生および検出のための公知かつ市販のアッセイ構成などがある。

#### 【0032】

本発明を示す上で好ましい装置には、アボット（Abbott）のIMx（商標名）イムノアッセイ分析装置およびアボットのアーキテクト（商標名）イムノアッセイ分析装置がある。イムノアッセイで用いられる抗体、好ましくはモノクローナル抗体は、当業者に公知の方法に従って得ることができる。抗体は、アステラス（Astellas, Osaka, Japan）などの市販の入手源から得ることもできる。

10

#### 【0033】

至適な検体の大きさは、タクロリムスアッセイの特定の方法に好ましい量によって決まる。例を挙げると、医学的診断に十分な感度を有するイムノアッセイには50～200 $\mu$ Lの範囲の最低検体容量が必要であることが多いが、それに限定されるものではない。アボットのIMx（商標名）およびアボットのアーキテクト（商標名）イムノアッセイ分析装置では、至適な感度を達成するには最低検体容量150 $\mu$ Lが必要である。これによって、検体の前混合に十分な容量、そして試験を実施する上で十分な容量が提供される。アッセイ用の吸引容量がアッセイ感度に影響し得ることは、当業者には明らかであろう。タクロリムス用のアッセイの開発には、吸引検体容量の至適化が伴うものと考えられる。

20

#### 【0034】

本発明は、血液試験検体中のタクロリムスの自動化または半自動化定量測定のための、本発明の方法に基づく診断試験キットをも包含する。本発明のキットは、好ましい溶血剤としてのトリトン-X-100（商標名）および好ましい胆汁酸塩抽出剤としてのデオキシコール酸塩を含む。

#### 【0035】

要約すると本発明によって、有機溶媒を用いる面倒な手動抽出手順を必要とする現行の方法に匹敵する感度および正確さで、血液試験検体中のタクロリムス濃度の完全自動化測定が可能となる。下記の実施例によって、本発明についての理解がさらに深まるが、それら実施例は本発明の説明のみを目的としたものであり、本発明の範囲を制限するものではない。

30

#### 【実施例】

#### 【0036】

##### （実施例1）

半自動方式でのアボット・アーキテクト（登録商標）イムノアッセイ分析装置による定量のために前溶解ヒト血液からタクロリムスを抽出する上での胆汁酸塩の使用

前溶解および濾過を行ったヒト全血に、タクロリムス（藤沢薬品工業、大阪）を重量測定法で加えて、分析用に一連のタクロリムス検体6個を得た（検体は、2.5～30ng/mLの濃度およびブランクを含むものであった）。各検体110 $\mu$ Lを、アーキテクト（登録商標）検体カップ中で、0.8%デオキシコール酸塩溶液（Sigma, St. Louis, M）110 $\mu$ Lと前混合した。混合物を30秒間渦攪拌して、十分に混合した。タクロリムスを認識する抗体でコーティングした磁気微粒子（Polymer Laboratories, Shropshire, England）を含む試薬瓶および光信号発生用のタクロリムスおよびアクリジニウムのトレーサー結合体の溶液（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）を、アーキテクト（登録商標）装置上に乗せた。試験開始後、アーキテクト（登録商標）ピペッターが、各前抽出検体40 $\mu$ Lをアーキテクト（登録商標）反応容器（RV）に移し入れた。その後、抗タクロリムス抗体をコーティングした微粒子50 $\mu$ Lを加えた。反応混合物を18分間インキュベートした。磁気微粒子を磁石によって捕捉し、RV中でリン酸緩衝液に再懸濁させ

40

50

る洗浄段階後、タクロリムス - アクリジニウムトレーサー 50  $\mu$ L を各RVに加え、4分間インキュベートした。2回目の洗浄後、結合したトレーサーを放出させ、過酸化物質溶液で誘発を行い、アーキテクト（登録商標）装置システムにおける標準的な手順で化学発光を測定した。この実施例は競争的イムノアッセイであることから、光信号は検体中のタクロリムス濃度に反比例する。図1には、光信号とタクロリムス濃度との間の関係を示している。タクロリムス濃度による信号の変化から、タクロリムスが全血基質から抽出され、抗タクロリムス微粒子によって捕捉され、タクロリムス - アクリジニウム結合体によって検出されたことがわかる。本実施例は、抽出剤としてデオキシコール酸塩を用いる非変性性の水系環境でヒト全血の基質中に存在する内因性結合タンパク質からのタクロリムスの抽出、ならびに自動化イムノアッセイ分析装置による提供を示している。

10

【0037】

(実施例2)

抽出用胆汁酸塩およびアボットIMx（登録商標）イムノアッセイ分析装置を用いる全血患者検体からのタクロリムス定量の完全自動化

タクロリムス患者検体からの全血（150  $\mu$ Lずつ）を、個別のIMx反応セル（各セルは一つの患者検体に相当）の検体ウェルにピペットで入れた。ピペットで取った容量の正確さは結果に対して重要ではなかったが、IMx（登録商標）装置がその試料についてのピペット採取操作を行うのに十分な試料があった（最低容量150  $\mu$ Lが装置操作マニュアルで推奨されている）。タクロリムス検体を入れたIMx反応セルを搭載したIMx（登録商標）カルーセルをIMx装置に設置した。1.0体積%トリトン-X-100および0.5%（体積/重量）デオキシコール酸塩を含んだ溶血/抽出試薬を含む4試薬の診断キットを装置に乗せ、完全自動化IMx操作を開始した。IMx（登録商標）プローブ - 電極アセンブリが最初に、全血検体90  $\mu$ Lを2回吸引および分散させて、沈んだRBCを再懸濁させた。溶血/抽出試薬80  $\mu$ Lずつの小分け試料を、IMx（登録商標）プローブ/電極アセンブリによりIMx（登録商標）反応セルの前希釈ウェル中の各検体からの全血80  $\mu$ Lと混合した。溶解および抽出した検体50  $\mu$ Lを、試薬キットの第2の瓶からの抗タクロリムスコーティング微粒子50  $\mu$ Lおよび追加の溶血/抽出試薬50  $\mu$ Lとともに各IMx（登録商標）反応セルのインキュベーションウェルに移し入れた。反応混合物を37で30分間インキュベートした。インキュベーション後、各検体からの反応混合物の小分け試料175  $\mu$ Lずつを、IMx（登録商標）プローブ - 電極アセンブリによりIMx反応セルのガラス繊維マトリクスに移した。反応セルマトリクスを溶血/抽出試薬各100  $\mu$ Lずつで2回洗浄して、ガラス繊維マトリクスから検体ヘモグロビンおよび他の妨害する可能性のある物質を除去した。次に、試薬キットの第3の瓶からのアルカリホスファターゼおよびタクロリムスの結合体70  $\mu$ Lずつを、IMx（登録商標）プローブ/電極アセンブリによって反応セルマトリクスに加え、28分間インキュベートした。マトリクスをIMx（登録商標）装置ライン緩衝液で洗浄し（0.3M NaCl/Tris緩衝液、100  $\mu$ Lで2回）。IMx（登録商標）プローブ/電極アセンブリが、試薬キットの第4の瓶からのレポーター基質であるリン酸4 - メチルウンベリフェリル（MUP）（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）70  $\mu$ Lを、IMx（登録商標）反応セルの各マトリクスに移した。MUP添加の直後に、IMx（登録商標）光学アセンブリが、各検体について蛍光産物を測定した（カウント/秒/秒、c/s/s）。蛍光シグナルは、検体中のタクロリムス濃度に反比例していた。そのシグナルを、装置メモリーに予め記憶させてあった校正曲線を用いて、自動的にタクロリムス濃度単位に変換した。校正曲線は図2に示してある。キャリブレーションは、既知量のタクロリムスをヒト全血に重量測定法的に加えることで調製した。40個のタクロリムス患者検体についてのタクロリムス濃度の結果を図3に示してあり、アッセイに先だって有機溶媒での検体の手動による抽出を必要とするタクロリムスについての市販のアッセイからの結果と比較している。図3は、胆汁酸塩抽出を用いる完全自動化アッセイによって、アッセイに先だって検体の手動での抽出および遠心を必要とする市販のアッセイと同等またはそれより優れた結果が得られたことを示している。

20

30

40

50

## 【 0 0 3 8 】

( 実施例 3 )

タクロリムスについてのデオキシコール酸塩以外の胆汁酸塩の抽出活性

タクロリムスを正常な全血に重量測定法的に加えて、分析用に一連の全血タクロリムス検体 9 個 ( 3 ~ 4 8 0 n g / m L およびブランク ) を得た。5 種類の別個の溶血 / 抽出試薬を、5 種類の異なる胆汁酸塩を用いて濃度 0 . 5 % で調製した。デオキシコール酸塩、コール酸塩、ケノデオキシコール酸塩、タウロデオキシコール酸塩およびグリココール酸塩 ( Sigma, St. Louis, MS ) それぞれ 0 . 5 % に加えて、各溶血 / 抽出試薬には、溶血剤として 1 . 0 % トリトン X - 1 0 0 を含めた。各溶血 / 抽出試薬の瓶を、実施例 2 に記載の診断キット ( 抗タクロリムスをコーティングした微粒子、アルカリホスファターゼ ( Roche, Basel ) とタクロリムスの結合体、ならびに M U P ) に加えた。調製した全血タクロリムス検体 9 個 1 組を、実施例 2 に記載の完全自動化アッセイを用いて各試薬キットで分析した。図 4 には、5 種類の胆汁酸塩例のそれぞれから得られた逆用量 - 応答曲線を示してある。タクロリムス濃度による蛍光シグナルの変化によって示されるように、調べたいずれの胆汁酸塩も、タクロリムスに関してかなりの抽出活性を示した。

10

## 【 0 0 3 9 】

( 実施例 4 )

タクロリムスについての C H A P S の抽出活性

タクロリムスを正常な全血に重量測定法的に加えて、分析用に一連の全血タクロリムス検体 ( 3 ~ 4 8 0 n g / m L およびブランク ) を得た。抽出剤としての 1 % C H A P S ( 商標名 ) および溶血剤としての 0 . 5 % トリトン X - 1 0 0 を用いて、トリス緩衝液中にて、前記実施例の方法に従って、実験を行った。図 5 に示したように、2 つの非変性性界面活性剤であるデオキシコール酸塩および C H A P S ( 商標名 ) の間には、同等の抽出活性がある。

20

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 4 0 】

【 図 1 】タクロリムス抽出剤として胆汁酸塩を用いてアーキテクト ( ARCHITECT ; 商標名 ) 分析装置 ( Abbott Laboratories, Abbott Park, IL ) で行った半自動タクロリムスアッセイからの用量 - 応答曲線を表すグラフである。

【 図 2 】タクロリムス抽出剤として胆汁酸塩を用いて I M x ( 商標名 ) 分析装置 ( Abbott Laboratories, Abbott Park, IL ) で行った完全自動化タクロリムスアッセイからの用量 - 応答曲線である。

30

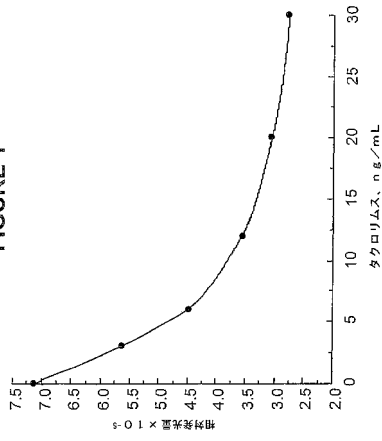
【 図 3 】胆汁酸塩抽出を用いる完全自動化アッセイからのタクロリムス患者検体の結果を、手動の有機溶媒抽出を用いる市販のアッセイからの結果とを比較するグラフである。

【 図 4 】抽出に 5 種類の異なる胆汁酸塩を用いて I M x ( 商標名 ) 分析装置で行った完全自動化タクロリムスアッセイの用量 - 応答である。

【 図 5 】 I M x ( 商標名 ) 分析装置でのデオキシコール酸塩および C H A P S を用いた完全自動化タクロリムス抽出の 2 つの用量 - 応答を比較するグラフである。

【 図 1 】

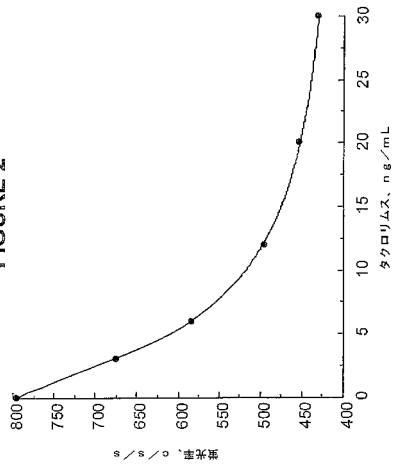
FIGURE 1



測定結果を用いてアボットのアーキテクト分析装置で行った半自動タクロリムスアッセイの測定結果

【 図 2 】

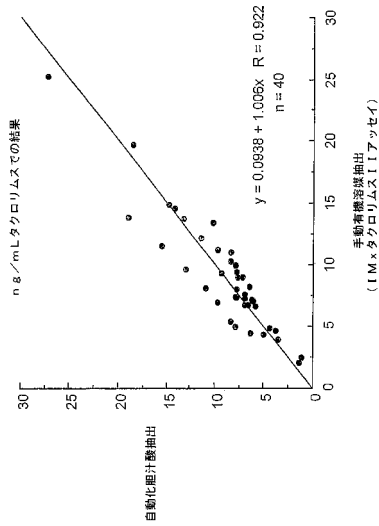
FIGURE 2



測定結果を用いてアボットのIMx分析装置で行った完全自動化タクロリムスアッセイの測定結果

【 図 3 】

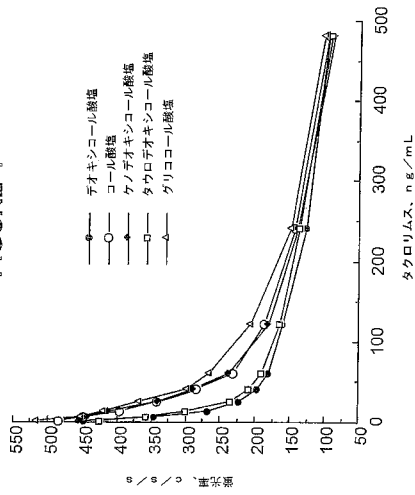
FIGURE 3



測定結果を用いた完全自動化タクロリムスアッセイから得られたタクロリムス濃度の結果と、手動有機溶抽出を用いた従来のアッセイからの結果との比較

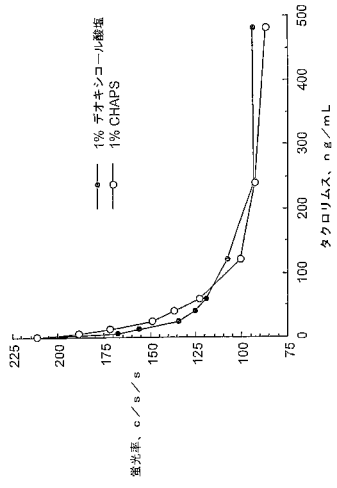
【 図 4 】

FIGURE 4



【 図 5 】

FIGURE 5



---

フロントページの続き

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 コンラス, ジョン・ジー

アメリカ合衆国、イリノイ・60046、レイク・ビラ、シーダー・バリー・ドライブ・3881  
3

(72)発明者 ウイルソン, デイビッド・エイチ

アメリカ合衆国、イリノイ・60099、ザイオン、サーテーター・ストリート・1629

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平04-233459(JP, A)

特表2008-538001(JP, A)

特表2001-514737(JP, A)

THOMAS M. ANNESLEY, CLINICAL CHEMISTRY, 2004年, V51 N10, P1845-1848

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

专利名称(译)	使用含水表面活性剂提取和定量他克莫司的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5124467B2</a>	公开(公告)日	2013-01-23
申请号	JP2008535782	申请日	2006-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	コンラスジョンジー ウイルソンデイビッドエイチ		
发明人	コンラス, ジョン・ジー ウイルソン, デイビッド・エイチ		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/9446 Y10T436/141111		
FI分类号	G01N33/48.A G01N33/531.B G01N33/53.S		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	11/249188 2005-10-13 US		
其他公开文献	JP2009511919A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种在测试血液样品中提取他克莫司以用于他克莫司定量测定的方法。本发明的方法在非沉淀的非变性水性环境中提取他克莫司，避免繁琐的手工预处理程序或使用有机溶剂。本发明的方法允许他克莫司定量测定的完全自动化。

