

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4574066号
(P4574066)

(45) 発行日 平成22年11月4日(2010.11.4)

(24) 登録日 平成22年8月27日(2010.8.27)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48		B
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		S
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577		B

請求項の数 4 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2001-170803 (P2001-170803)	(73) 特許権者	390037327
(22) 出願日	平成13年6月6日(2001.6.6)		積水メディカル株式会社
(65) 公開番号	特開2002-365279 (P2002-365279A)		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(43) 公開日	平成14年12月18日(2002.12.18)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成20年5月29日(2008.5.29)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100089048
			弁理士 浅野 康隆
		(74) 代理人	100101317
			弁理士 的場 ひろみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Pre β 1-HDL測定用血液検体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サッカロース、マルトース、ラクトースから選択される2糖類；又はグリセロールを25～80重量%含有するPre 1-HDL測定用血液検体。

【請求項2】

サッカロース又はグリセロールを25～80重量%含有する請求項1記載の血液検体。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の血液検体に抗Pre 1-HDL抗体を反応させることを特徴とするPre 1-HDLの免疫学的測定法。

【請求項4】

抗Pre 1-HDL抗体が、抗Pre 1-HDLモノクローナル抗体である請求項3記載の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、保存安定性の高いPre 1-HDL測定用血液検体及び当該検体を使用したPre 1-HDLの免疫学的測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

アポA-IはHDLを構成する主なアポ蛋白質であり、HDLの末梢細胞から肝臓へのコ

レステロールを逆転送する機能において中心的な役割を果たしているものである。(Philips M. C. et al. Biochem. Biophys. Acta, 906 : p. 223(1987))。このことから、動脈硬化症の診断にアポA - Iを測定することが行われている。

【0003】

近年、アポリポ蛋白質A - II(以下、「アポA - II」という)を持たないアポA - I含有HDL(石塚ら:医学と薬学、39巻5号、1041頁、1988)が、アポA - I及びアポA - II含有HDLより細胞からのコレステロール引き抜き作用が強いことや、脂質とは結合せずに存在するアポA - Iや小粒子で脂質含量の少ないPre 1 - HDL(T. Miida. et al. Biochemistry, 29 : p. 10469(1990))に存在するアポA - Iが細胞からのコレステロールの逆転送系において重要な役割を演じていることが判明したことから、これら特定の
10
アポA - Iを測定することが重要となってきた。アポA - IIを持たないアポA - I含有HDLのうち、Pre 1 - HDLは、細胞表面との特異的な相互作用を介して末梢細胞からコレステロールを引き抜き(Fielding, C. et al, Lipid Res., 36 : p211-228(1995))、その作用はHDLよりも効率的であることから、特に注目されている。そしてPre 1 - HDLに対する抗体を用いるPre 1 - HDLの免疫学的測定法も開発されている(特開2000-239300)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、採血後の血液中におけるPre 1 - HDLは非常に不安定で、血液検体を通常の冷所保存条件である4℃や、室温で保存すると、Pre 1 - HDL濃度は、採
20
血直後の測定値に比べて1日後で30%程度、4日後で50%程度高値となってしまうという問題があることが判明した。また、このような保存安定性を防止する手段として検体の凍結保存がある。しかし、凍結保存後に融解して測定すると、この測定値もまた採血時の値に比べて高値となることが判明した。

従って、本発明の目的はPre 1 - HDL測定用の血液検体の安定化手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者は、採血後の血液、血漿又は血清検体中のPre 1 - HDLの安定化を図るべく、種々検討した結果、血液検体に25~80重量%となるように単糖類、2糖
30
類又はグリセロールを添加すれば、4℃で5日間経過後も検体中のPre 1 - HDL濃度はほとんど変化せず、また凍結融解後の検体中のPre 1 - HDL濃度もほとんど変化せず、安定性の高いPre 1 - HDL測定用血液検体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち、本発明は、単糖類、2糖類又はグリセロールを25~80重量%含有するPre 1 - HDL測定用血液検体を提供するものである。

また本発明は、当該Pre 1 - HDL測定用血液検体に抗Pre 1 - HDL抗体を反応させることを特徴とするPre 1 - HDLの免疫学的測定法を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明において単糖類、2糖類及びグリセロールは、血液検体中のPre 1 - HDLの安定化剤として作用するものであり、単糖類としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース等が挙げられる。2糖類としては、サッカロース、マルトース、ラクトース等が挙げられる。これらのうちサッカロース及びグリセロールがより好ましく、サッカロースが特に好ましい。

【0008】

これら安定化剤の検体中の濃度は、安定化作用の点から25~80重量%である必要があるが、30~80重量%、特に30~70重量%が好ましい。25重量%未満では安定化作用がない。

10

20

30

40

50

【0009】

検体としては、全血、血漿、血清のいずれも挙げられるが、血漿が好ましい。
また、検体には、血液凝固防止の目的で、クエン酸（好ましくは0.1～1.0%）、EDTA（好ましくは0.05～10mM）等が含まれていてもよい。

【0010】

本発明の血液検体は、例えば血漿の場合には、患者又は被検者からEDTA採血管等を用いて採血し、冷却後遠心分離して血漿を得た後、これに、濃度が25～80重量%になるように単糖類、2糖類若しくはグリセロール又はこれらの水溶液を添加することにより調製できる。

【0011】

かくして得られた本発明の血液検体はPre 1-HDLが安定化されているので、5日間程度まで冷所保存（通常2～10℃）した後に抗Pre 1-HDL抗体を用いて免疫測定しても安定したPre 1-HDL濃度の測定が可能である。

【0012】

本発明血液検体に抗Pre 1-HDL抗体を反応させてPre 1-HDLを測定するには、通常免疫学的測定法、通常競合法、サンドイッチ法によるRIA又はEIA等が挙げられる。これらの方法の実施にあたっては、抗Pre 1-HDL抗体の標識体を用いることもできる。ここで標識物質としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、 α -ガラクトオキシダーゼ等の酵素； ^{125}I 、 ^{131}I 、トリチウム等の放射性物質が挙げられる。

また、抗体を固相化するための単体としては、各種プラスチックウェル、各種プラスチックビーズ等が挙げられる。

【0013】

抗Pre 1-HDL抗体としてはポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体を用いるのが好ましく、当該モノクローナル抗体としては特開2000-239300記載のモノクローナル抗体55201が特に好ましい。

【0014】

例えば、ELISA法で測定する場合には、精製したアポA-Iを標準品として次のような方法で定量することができる。すなわち、抗Pre 1-HDLモノクローナル抗体を固相化したELISAプレートに、希釈した試料を添加し反応させた後、酵素標識した抗アポA-Iポリクローナル抗体を反応させ、発色後吸光度の変化から試料中に存在するPre 1-HDLを定量する方法が挙げられる。

【0015】

なお、これらの測定は、通常免疫学的測定法と同様に0～40℃のいずれの温度で行うこともできる。

【0016】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0017】

実施例1

(1) EDTA（4mM）採血管を用いて採血した血液を氷冷した後、3000rpm、15分遠心分離して血漿を得た。氷冷下血漿0.1mLに表1の濃度になるようにサッカロース水溶液2mLを加え、Pre 1-HDL測定用血漿検体を得た。

【0018】

(2) 得られた検体を用いて、採血当日、4℃に1日保存後、及び4℃に5日間保存後のPre 1-HDL濃度を測定した。また、サッカロースを添加しない血漿についても同様にPre 1-HDL濃度を測定した。

すなわち、特開2000-239300の実施例1で得たモノクローナル抗体55201を20mMリン酸緩衝生理食塩水（PBS；pH7.2）で3 μg /mLの濃度に調整後、96穴EL

10

20

30

40

50

ISAプレート(ヌンク社製)に50 μ L/ウェル加え、4 で一夜インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄後、ブロッキング液(1%BSA-PBS)を100 μ L/ウェル加え、1時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、ブロッキング液にて希釈した前記検体又は精製アポA-Iを50 μ L/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。ブロッキング液で3回洗浄した後、アポA-Iを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-I抗体を過ヨウ素酸法にてペルオキシダーゼ標識したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗アポA-I抗体を50 μ L/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。同様にブロッキング液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液を50 μ L/ウェル加えた。10分後、1.5N硫酸を50 μ L/ウェル加え、492nmにおける吸光度を測定し、精製アポA-Iを標準品として、各検体中のPre- β 1-HDL量を算出した。

10

【0019】

その結果、表1に示すように、サッカロースを添加しない血漿、4.8重量%及び9.5重量%のサッカロースを含む血漿はいずれも採血当日のPre- β 1-HDL濃度に比べて1日後及び5日後では高くなってしまった。これに対し28.6~66.7重量%のサッカロースを含む血漿は、5日後までPre- β 1-HDL濃度の変化がなかった。

【0020】

【表1】

サッカロース濃度 (重量%)	Pre- β 1-HDL (μ g/mL)		
	採血当日	1日後	5日後
4.8	22.1	26.4	29.1
9.5	24.8	27.1	28.4
28.6	22.5	23.7	22.4
47.6	22.4	23.8	24.6
66.7	21.5	21.1	23.9
血漿原液保存	19.2	23.2	32.2

20

30

【0021】

実施例2

実施例1と同様にして、検体として、血漿、1%BSA-PBS含有血漿、47.6重量%サッカロース含有血漿、及び47.6重量%グリセロール含有血漿を用いてPre- β 1-HDL濃度を測定した。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、血漿及びBSA-PBS含有血漿は1日後(4)からPre- β 1-HDL濃度が高くなっていったが、47.6重量%グリセロール又は47.6重量%サッカロース含有血漿は4日後(4)までPre- β 1-HDL濃度が変化しなかった。

40

【0022】

実施例3

高脂血症患者の血漿及びこれに47.6重量%となるようにサッカロースを添加した血漿を用いて、実施例1と同様にしてPre- β 1-HDL濃度を測定した。その結果、図2に示すように、サッカロース47.6重量%含有血漿は4 で5日間保存してもPre- β 1-HDL濃度が変化しなかった。

【0023】

実施例4

検体を4 で保存して後に測定するかわりに、-80 に凍結して保存した後融解して測定した。その結果を図3に示す。図3から明らかなように、血漿をそのまま凍結融解した

50

検体はPre 1-HDL濃度が高くなった。これに対し、47.6重量%サッカロースを含有する血漿は凍結融解して測定してもPre 1-HDL濃度に変化がみられなかった。

【0024】

【発明の効果】

本発明の血液検体を用いれば、冷所保存後又は凍結保存後に測定してもPre 1-HDL濃度が測定できる。従来法では、正確に採血後直ちにPre 1-HDLを測定しなければならず、実際に病院で採血した検体を検査センター等で測定することはできなかった。本発明の血液検体を用いれば冷所で5日間保存してもPre 1-HDLが安定に保持されるので、病院で採血した血液を用いた検査センターでの測定が可能となった。

10

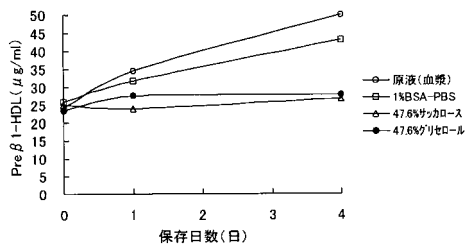
【図面の簡単な説明】

【図1】血液検体の4での保存日数とPre 1-HDL濃度との関係を示す図である。

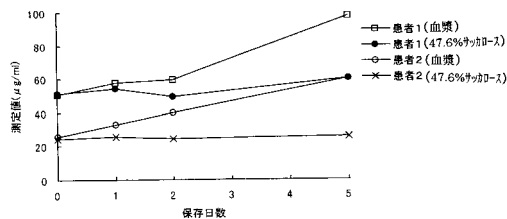
【図2】高脂血症患者の血液検体の4での保存日数とPre 1-HDL濃度との関係を示す図である。

【図3】凍結前、凍結血漿及び47.6重量%サッカロース含有凍結血漿のPre 1-HDL濃度を示す図である。

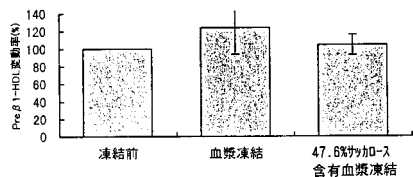
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (72)発明者 宮崎 修
茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内
- (72)発明者 中村 靖
茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内
- (72)発明者 深町 勇
茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開昭 6 1 - 1 4 2 4 6 7 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 2 3 9 3 0 0 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 0 6 6 3 1 4 (J P , A)
特開平 0 9 - 1 6 9 7 9 9 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 0 0 9 7 3 0 (J P , A)

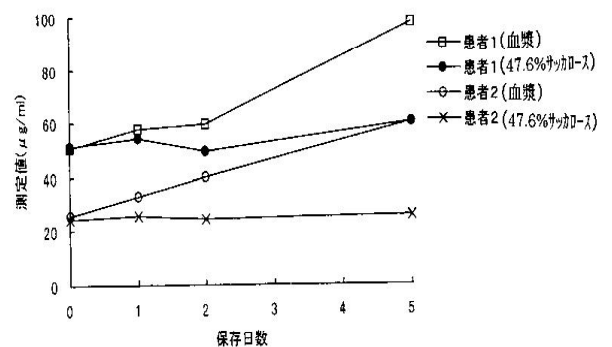
- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/48 - G01N 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	Pre β 1-HDL测定用血液検体		
公开(公告)号	JP4574066B2	公开(公告)日	2010-11-04
申请号	JP2001170803	申请日	2001-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学薬品株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	宫崎修 中村靖 深町勇		
发明人	宫崎 修 中村 靖 深町 勇		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/48.B G01N33/53.S G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/BA13 2G045/BA20 2G045/BB32 2G045/BB46 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA63 2G045/FB03		
代理人(译)	村田正树		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2002365279A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

溶液：用于测量Pre β 1-HDL的血液样品，其含有25至80重量%的单糖，二糖或甘油。[效果]如果使用本发明的血液样品，即使在冷藏后或冷冻保存后测量，也可以测量Pre β 1-HDL浓度。

【图2】



【图3】