

(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2014-126453

(P2014-126453A)

(43) 公開日 平成26年7月7日(2014.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	H

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2012-283327 (P2012-283327)	(71) 出願人	000003300
(22) 出願日	平成24年12月26日 (2012.12.26)		東ソー株式会社
			山口県周南市開成町4560番地
		(72) 発明者	堀田 秀樹
			神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社東京研究センター内

(54) 【発明の名称】 安定化したビタミンD類標準液

(57) 【要約】

【課題】 ヒト由来成分を含まない条件でビタミンD類の安定性を確保可能な標準液を提供すること。

【解決手段】 ヒト以外に由来したタンパク質をさらに含み、かつそのpHを7.5以上とすることで、前記課題を解決する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

一定濃度のビタミン D 類を含むビタミン D 類標準液であって、ヒト以外に由来したタンパク質をさらに含み、かつその pH が 7.5 以上である、前記標準液。

【請求項 2】

ビタミン D 類が 25 - ヒドロキシビタミン D 2 または 25 - ヒドロキシビタミン D 3 である、請求項 1 に記載の標準液。

【請求項 3】

ヒト以外に由来したタンパク質がウシ血清アルブミンである、請求項 1 または 2 に記載の標準液。

10

【請求項 4】

請求項 1 から 3 に記載の標準液を凍結乾燥して得られる、凍結乾燥体。

【請求項 5】

請求項 1 から 3 に記載の標準液を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫測定によりビタミン D 類を測定する方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、試料中のビタミン D 類を測定する際使用する、ビタミン D 類標準液に関する。

20

【背景技術】**【0002】**

ビタミン D は脂溶性ビタミンの 1 つであり、さらにコレカルシフェロール（ビタミン D 3）とエルゴカルシフェロール（ビタミン D 2）にわかれる。ビタミン D は食事やサプリメント等による直接摂取や、日光による皮膚中での合成により、ヒト体内に吸収される。

【0003】

ヒト体内に吸収されたビタミン D は、肝臓に存在する酵素によりその 25 位が水酸化されて 25 - ヒドロキシビタミン D となり、さらに腎臓に存在する酵素により 1 位が水酸化されることで、生物学的活性を有する 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D となる。1, 25 - ジヒドロキシビタミン D は、体内のカルシウムやリンの血中濃度をコントロールする役割を有している。一方 25 - ヒドロキシビタミン D は、ビタミン D 欠乏の最もよい指標として近年、臨床検査の分野で注目されている。ビタミン D の欠乏は骨粗鬆症、癌や心疾患と関連があるとされ、欧米を中心に検査数が年々増加している。

30

【0004】

臨床検査で 25 - ヒドロキシビタミン D 等のビタミン D 類を測定する際、検量線の作成や精度管理のためにビタミン D 類の標準品（標準液）が必要である。当該標準品は、測定の信頼性に影響を与えないよう、測定時や保存時における一定条件下での安定性を保証する必要がある。

【0005】

ビタミン D 類の保存安定性に関しては、非特許文献 1 において、ヒト血清中の 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の保存安定性について報告されており、室温条件下で約 24 時間の安定性を有していることが報告されている。しかしながら、非特許文献 1 において 25 - ヒドロキシビタミン D 3 に添加するヒト血清は、供給安定性やヒトへの感染性の点で問題を有していた。

40

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0006】**

【非特許文献 1】 *Clinical Chemistry*, 55(8), 1584 - 1595 (2009)

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0007】**

臨床検査でビタミンD類を測定する際使用するビタミンD類標準品（標準液）は、測定時や保存時における一定条件下での安定性を保証する必要がある一方、ビタミンD類を安定化させるために当該標準品に添加する添加剤として、ヒト血清等のヒト由来成分を用いるのは、供給安定性やヒトへの感染性から問題があった。

【0008】

そこで本発明の目的は、ヒト由来成分を含まない条件でビタミンD類の安定性を確保可能な標準液を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

10

【0009】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を行なった結果、ヒト以外に由来したタンパク質を添加し、かつpHを7.5以上とすることで、測定時におけるビタミンD類の安定性が向上することを見出し、本発明の完成に至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下の(1)から(5)に記載の態様を包含する。

【0011】

(1)一定濃度のビタミンD類を含むビタミンD類標準液であって、ヒト以外に由来したタンパク質をさらに含み、かつそのpHが7.5以上である、前記標準液。

20

【0012】

(2)ビタミンD類が25-ヒドロキシビタミンD₂または25-ヒドロキシビタミンD₃である、(1)に記載の標準液。

【0013】

(3)ヒト以外に由来したタンパク質がウシ血清アルブミンである、(1)または(2)に記載の標準液。

【0014】

(4)(1)から(3)に記載の標準液を凍結乾燥して得られる、凍結乾燥体。

【0015】

(5)(1)から(3)に記載の標準液を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫測定によりビタミンD類を測定する方法。

30

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

本発明において、ビタミンD類とは、ビタミンDそのもの、またはその代謝産物のことをいい、具体的には、ビタミンD₃（コレカルシフェロール）、ビタミンD₂（エルゴカルシフェロール）、25-ヒドロキシビタミンD₃、25-ヒドロキシビタミンD₂、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃、1,25-ジヒドロキシビタミンD₂、24,25-ジヒドロキシビタミンD₃、24,25-ジヒドロキシビタミンD₂が例示できる。中でも、臨床検査の測定項目として注目されている、25-ヒドロキシビタミンD₃および25-ヒドロキシビタミンD₂に対して、本発明を適用すると好ましい。

40

【0018】

本発明の標準液で添加する、ヒト以外に由来したタンパク質としては、抗原抗体反応を利用した免疫測定の分野で試薬等に通常添加するタンパク質が例示でき、具体的には、ウシ血清アルブミン、ヒト以外に由来したコラーゲンペプチド、カゼイン等があげられる。中でも、ウシ血清アルブミンが、本発明の標準液で添加するタンパク質として、好ましい。ヒト以外に由来したタンパク質の添加量は、免疫測定の分野で試薬等に通常添加する量の範囲で適宜決定すればよく、ヒト以外に由来したタンパク質としてウシ血清アルブミンを用いる場合は、1%（w/v）から10%（w/v）、好ましくは4%（w/v）から6%（w/v）添加すればよい。

【0019】

50

本発明において、標準液のpHは7.5以上にする必要がある。そのため、標準液を調製する際は、pH7.5以上の緩衝液に対してビタミンD類およびヒト以外に由来したタンパク質を添加するとよい。緩衝液の種類については、pH7.5以上の領域で緩衝能を有するものであれば特に限定はなく、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、TES緩衝液、HEPES緩衝液、Tricine緩衝液、Bicine緩衝液が例示できる。なお、標準液のpHを8.0以上とすると好ましく、pHを8.5以上とすると、より好ましい。

【0020】

本発明の標準液は、少なくともビタミンD類とヒト以外に由来したタンパク質とを含んでいればよいが、測定用途に応じてさらに他の成分を含んでもよい。他の成分の例としては、抗酸化剤（アスコルビン酸、ビタミンE等）、結合剤（カルボキシメチルセルロース等）、湿潤剤（セルロース、ポリエチレングリコール等）、着色剤（合成食用色素等）、懸濁化剤（ポリビニルピロリドン等）、乳化剤（アルキルスルホン酸等）、溶解補助剤（グリセリン等）、等張化剤（D-ソルビトール、塩化ナトリウム等）、界面活性剤（Triton X-100（商品名）、Tween20（商品名）等）があげられる。

【0021】

本発明の標準液は、使用時は液状にする必要があるが、保存時においては必ずしも液状にする必要はなく、液状の標準液を凍結乾燥して得られる、凍結乾燥体の形で保存してもよい。本発明の標準液の凍結乾燥体を製造する際は、凍結乾燥-再溶解操作によるpHの変動を防ぐため、あらかじめ緩衝液を構成する成分を、ビタミンD類とヒト以外に由来したタンパク質とを含んだ溶液に添加するとよい。

【発明の効果】

【0022】

本発明は、一定濃度のビタミンD類を含むビタミンD類標準液であって、ヒト以外に由来したタンパク質をさらに含み、かつそのpHが7.5以上であることを特徴としている。本発明により、供給安定性やヒトへの感染性の問題を有したヒト由来成分を使用しなくとも、ビタミンD類を安定に保存することができ、例えば抗原抗体反応を利用したビタミンD類の免疫測定時において、試料中に含まれるビタミンD類を精度高く定量することができる。

【実施例】

【0023】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は本実施例により限定されるものではない。

【0024】

実施例1

(1) 以下に示す各溶液に、25-ヒドロキシビタミンD₃を終濃度20ng/mLまたは80ng/mLとなるよう添加することで、ビタミンD類標準液を調製した。

【0025】

試薬A：5%ウシ血清アルブミンを含む50mMリン酸緩衝液（pH6.5）

試薬B：5%ウシ血清アルブミンを含む50mMリン酸緩衝液（pH7.0）

試薬C：5%ウシ血清アルブミンを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）

試薬D：5%ウシ血清アルブミンを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）

試薬E：5%ウシ血清アルブミンを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8.5）

(2) (1)で調製したビタミンD類標準品各1mLをガラス製容器に分注し、凍結乾燥した。

(3) 各凍結乾燥体に蒸留水1mLを加えて再溶解し、4（保存時を想定）または35（測定時を想定）で16時間保存した後、全自動エンザイムイムノアッセイ装置（AIA-2000、東ソー社製）と当該装置用25-ヒドロキシビタミンD免疫測定試薬とを用いて各標準品を測定し、当該試薬に含まれる基質（4-メチルウンベリフェロン）からの蛍光強度増加速度[nM/s]を求めた。

【0026】

結果を表 1 に示す。なお表 1 に示す蛍光強度増加速度 [n M / s] は、各標準品に対し、2 回ずつ測定した値の平均値である。また測定値百分率は、以下の式に基づき算出している。

【 0 0 2 7 】

測定値百分率 [%] =

(3 5 で保存した標準液の蛍光強度増加速度) ÷ (4 で保存した標準液の蛍光強度増加速度) × 1 0 0

【 0 0 2 8 】

【表 1】

	添加量 : 20ng/mL			添加量 : 80ng/mL		
	蛍光強度増加速度[nM/s]		測定値 百分率[%]	蛍光強度増加速度[nM/s]		測定値 百分率[%]
	4℃	35℃		4℃	35℃	
溶液 A	39.44	28.75	72.9	15.64	11.16	71.3
溶液 B	40.03	31.92	79.7	15.12	12.67	83.8
溶液 C	40.26	34.75	86.3	15.17	13.46	88.7
溶液 D	39.61	37.44	94.6	15.26	14.89	97.9
溶液 E	35.88	35.06	97.7	12.66	13.27	104.8

標準液の pH が 7 . 0 以下の場合、特にビタミン D 類の添加量が低い (2 0 n g / m L) 標準液において、4 で保存した標準液と比較し、2 0 % 以上測定値が減少していた。一方、標準液の pH を 7 . 5 以上とすると、4 で保存した標準液に対する測定値の減少を 1 5 % 以下に抑えることができ、標準液の pH が 8 . 0 以上とすると、測定値の減少が約 5 % 以下まで抑えることができた。つまり、ビタミン D 類標準液を作成する際、ウシ血清アルブミンのようなヒト以外に由来したタンパク質を添加し、かつその pH をアルカリ側 (具体的には pH 7 . 5 以上、好ましくは pH 8 . 0 以上、より好ましくは pH 8 . 5 以上) とすることで、測定時 (例えば、3 5 で 1 6 時間) においても、ビタミン D 類を安定に保存することができ、例えば抗原抗体反応を利用した免疫測定において、試料中に含まれるビタミン D 類を精度高く測定することができる。

专利名称(译)	稳定的维生素D标准溶液		
公开(公告)号	JP2014126453A	公开(公告)日	2014-07-07
申请号	JP2012283327	申请日	2012-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	堀田秀樹		
发明人	堀田 秀樹		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/53.H		
其他公开文献	JP6171333B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种标准溶液，该溶液可以在不含人源成分的条件下确保维生素D的稳定性。解决方案：标准溶液还包含非人类物种的蛋白质，其pH值在7.5或更高。

	添加量：20ng/mL			添加量：80ng/mL		
	荧光强度增加速度[nM/s]		测定值	荧光强度增加速度[nM/s]		测定值
	4℃	35℃	百分率[%]	4℃	35℃	百分率[%]
溶液A	39.44	28.75	72.9	15.64	11.16	71.3
溶液B	40.03	31.92	79.7	15.12	12.67	83.8
溶液C	40.26	34.75	86.3	15.17	13.46	88.7
溶液D	39.61	37.44	94.6	15.26	14.89	97.9
溶液E	35.88	35.06	97.7	12.66	13.27	104.8