

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6934587号
(P6934587)

(45) 発行日 令和3年9月15日 (2021.9.15)

(24) 登録日 令和3年8月26日 (2021.8.26)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 A
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 M
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B

請求項の数 14 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2017-16495 (P2017-16495)	(73) 特許権者	000162478
(22) 出願日	平成29年2月1日 (2017.2.1)		ミナリスメディカル株式会社
(65) 公開番号	特開2017-142241 (P2017-142241A)		東京都中央区晴海一丁目8番10号
(43) 公開日	平成29年8月17日 (2017.8.17)	(74) 代理人	100149076
審査請求日	令和1年11月14日 (2019.11.14)		弁理士 梅田 慎介
(31) 優先権主張番号	特願2016-20737 (P2016-20737)	(74) 代理人	100119183
(32) 優先日	平成28年2月5日 (2016.2.5)		弁理士 松任谷 優子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100173185
			弁理士 森田 裕
前置審査		(74) 代理人	100162503
			弁理士 今野 智介
		(74) 代理人	100144794
			弁理士 大木 信人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体中のステロイドホルモンの測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体と、抗アルドステロン抗体及び標識化競合物質とを、

3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (PIPES)、2 - [N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エタンスルホン酸 (BES)、及びビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン (Bis - Tris) からなる群から選ばれる緩衝剤と、

ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選ばれる非イオン性界面活性剤、

コール酸類から選ばれる陰イオン性界面活性剤、及び、

両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、

を含有する水性媒体中で反応させて、抗アルドステロン抗体と標識化競合物質との免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識を測定することを特徴とする、検体中のアルドステロンの測定方法。

【請求項 2】

検体と抗アルドステロン抗体とを反応させた後、当該反応の反応液に標識化競合物質を添加する、請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】

10

20

抗アルドステロン抗体が、不溶性担体に固定化されている、請求項 1 又は 2 記載の測定方法。

【請求項 4】

検体と、標識化抗アルドステロン抗体及び競合物質とを、

3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPSS)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (PIPES)、2 - [N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エタンスルホン酸 (BES)、及びビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン (Bis - Tris) からなる群から選ばれる緩衝剤と、

ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選ばれる非イオン性界面活性剤、

コール酸類から選ばれる陰イオン性界面活性剤、及び、

両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤と、

を含有する水性媒体中で反応させて、標識化抗アルドステロン抗体と競合物質との免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識を測定することを特徴とする、検体中のアルドステロンの測定方法。

【請求項 5】

検体と標識化抗アルドステロン抗体とを反応させた後、当該反応の反応液に競合物質を添加する、請求項 4 記載の測定方法。

【請求項 6】

競合物質が、不溶性担体に固定化されている、請求項 4 又は 5 記載の測定方法。

【請求項 7】

ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選ばれる非イオン性界面活性剤、

コール酸類から選ばれる陰イオン性界面活性剤、及び、

両性界面活性剤

からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤、

3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPSS)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (PIPES)、2 - [N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エタンスルホン酸 (BES)、及びビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン (Bis - Tris) からなる群から選ばれる緩衝剤、

標識化競合物質、並びに、

抗アルドステロン抗体を含む、

検体中のアルドステロンの測定用試薬。

【請求項 8】

抗アルドステロン抗体が、不溶性担体に固定化されている、請求項 7 記載の試薬。

【請求項 9】

ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選ばれる非イオン性界面活性剤、

コール酸類から選ばれる陰イオン性界面活性剤、及び、

両性界面活性剤

からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤、

3 - モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPSS)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (PIPES)、2 - [N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エタンスルホン酸 (BES)、及びビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)からなる群から選ばれる緩衝剤、
標識化抗アルドステロン抗体、並びに、
競合物質を含む、
検体中のアルドステロンの測定用試薬。

【請求項10】

競合物質が、不溶性担体に固定化されている、請求項9記載の試薬。

【請求項11】

抗アルドステロン抗体を含む第1試薬と、標識化競合物質を含む第2試薬とを含有し、
ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、
ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン
縮合物及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選ばれる非イオン性界面活
性剤、

コール酸類から選ばれる陰イオン性界面活性剤、及び、
両性界面活性剤

からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、

3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-
エタンスルホン酸)(PIPES)、2-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミ
ノ]エタンスルホン酸(BES)、及びビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒ
ドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)からなる群から選ばれる緩衝剤

のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれる、検体中のアルドステ
ロンの測定用キット。

【請求項12】

抗アルドステロン抗体が、不溶性担体に固定化されている、請求項11記載のキット。

【請求項13】

標識化抗アルドステロン抗体を含む第1試薬と、競合物質を含む第2試薬とを含有し、
ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、
ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン
縮合物及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選ばれる非イオン性界面活
性剤、

コール酸類から選ばれる陰イオン性界面活性剤、及び、
両性界面活性剤

からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、

3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-
エタンスルホン酸)(PIPES)、2-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミ
ノ]エタンスルホン酸(BES)、及びビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒ
ドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)からなる群から選ばれる緩衝剤

のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれる、検体中のアルドステ
ロンの測定用キット。

【請求項14】

競合物質が、不溶性担体に固定化されている、請求項13記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中のステロイドホルモンの測定方法、測定用試薬、及び、測定用キット
に関する。

【背景技術】

【0002】

ステロイドホルモンは、分子量が300~400の、ステロイド骨格を有するホルモン
で、その機能から、性ホルモン、糖質コルチコイド、鉱質コルチコイド等に分類される。
ステロイドホルモンの臨床的な研究のため、生体中のステロイドホルモン量を測定する方

10

20

30

40

50

法が研究され、ガスクロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (GC-MS) 法、液体クロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (LC-MS) 法、免疫学的測定法等が開発されてきた。GC-MS法やLC-MS法は高い分析能を有するが、これらの分析に用いる分析装置は高価であり、かつ、濃縮操作、抽出操作等の煩雑な操作が必要である等の問題がある。一方、免疫学的測定法は、簡便で短時間にステロイドホルモンを測定できることから、臨床研究においてよく用いられている。

【 0 0 0 3 】

免疫学的測定法としては、サンドイッチ法、競合法等が知られているが、通常、タンパク質等の高分子を測定対象とする場合にはサンドイッチ法が用いられ、ステロイドホルモンのような低分子化合物を測定対象とする場合には、競合法が用いられる。しかしながら、競合法によるステロイドホルモンの測定においては、用いる抗体が、測定対象物質と類似の構造を有する測定対象物質以外のステロイドホルモンにも反応してしまう「交差反応」により、感度及び特異性がしばしば問題となる。これまでに、感度向上のために、リンカーを介してキャリアータンパク質と結合した低分子量化合物で動物を免疫して得られる抗体と、前記キャリアータンパク質と結合した低分子量化合物におけるリンカー結合位置とは異なる位置でリンカーを介して標識物質と結合した低分子量化合物とを用いた、前記低分子量化合物の測定方法が報告されている（特許文献 1 参照）。

10

【 0 0 0 4 】

アルドステロンは、副腎皮質外層に属する球状層から分泌される、分子量約 3 6 0 の鉱質ステロイドホルモンであり、その分泌は、主にレニン - アンジオテンシン - アルドステロン系に依存している。アルドステロンは、電解質の恒常性、循環血液量、血圧の維持にきわめて重要なホルモンであり、腎臓遠位尿細管のミネラルコルチコイド受容体に作用して、ナトリウムの再吸収と共に水の再吸収を促進することで血圧を上昇させる機能を有している。

20

【 0 0 0 5 】

アルドステロンは、原発性アルドステロン症、バーター症候群、リドル症候群、副腎における 17α 水酸化酵素欠損症、 11β 水酸化酵素欠損症等の水酸化酵素欠損症、及び、選択的低アルドステロン症等の鑑別診断に利用されている。また、日本内分泌学会ガイドラインおよび日本高血圧学会ガイドラインにおいては、原発性アルドステロン症のスクリーニング方法として、アルドステロン濃度 (Plasma Aldosterone Concentration : PAC) の、レニン活性 (Plasma Renin Activity : PRA) 又はレニン濃度 (Active Renin Concentration : ARC) に対する比率であるアルドステロン / レニン比 (Aldosterone to Renin Ratio : ARR) の測定が推奨されている。

30

【 0 0 0 6 】

アルドステロンの測定方法としては、LC-MS法、免疫学的測定法等が知られており、免疫学的測定法として、ラジオイムノアッセイ法 (RIA法)、酵素免疫測定法 (EIA法) が知られている（特許文献 2 参照）。しかしながら、慢性腎不全患者の血漿中のアルドステロンをRIA法にて測定する際、試料中に、アルドステロンと構造が類似したステロイドホルモンが多量に存在しているため、当該ステロイドホルモンが抗アルドステロン抗体と反応する交差反応の影響により、正確な測定値が得られないことが報告されている（非特許文献 1 参照）。

40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 1 3 - 0 8 3 4 4 8 号公報

【 特許文献 2 】 特開平 2 - 0 5 7 9 7 6 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 J Lab. Clin. Med., Vol.114(3), pp.294-300 (1989).

【 発明の概要 】

50

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、測定対象としてのステロイドホルモンと構造が類似する交差反応性物質の影響を受けることなく、正確な検体中のステロイドホルモンの測定を可能とする方法、試薬、及び、キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

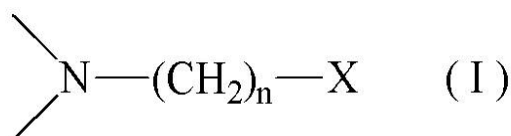
【 0 0 1 0 】

本発明者らは、本課題を解決すべく鋭意検討し、検体中のステロイドホルモンの競合法による測定において、抗原抗体反応を、特定の構造を有する緩衝剤と、特定の界面活性剤とを含有する水性媒体中で行うことにより、交差反応が抑制され、正確なステロイドホルモンの測定が可能となる、という知見を見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の〔 1 〕～〔 2 3 〕に関する。

【 0 0 1 1 】

〔 1 〕 検体と、抗ステロイドホルモン抗体及び標識化競合物質とを、一般式（ I ）

【化 1 】



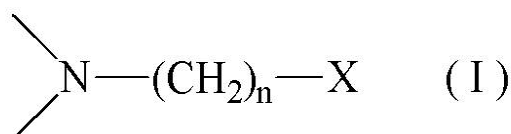
（式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2～5の整数を表す）で表される構造を有する緩衝剤と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させて、抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識を測定することを特徴とする、検体中のステロイドホルモンの測定方法。

〔 2 〕 検体と抗ステロイドホルモン抗体とを反応させた後、当該反応の反応液に標識化競合物質を添加する、〔 1 〕記載の測定方法。

〔 3 〕 抗ステロイドホルモン抗体が、不溶性担体に固定化されている、〔 1 〕又は〔 2 〕記載の測定方法。

〔 4 〕 検体と、標識化抗ステロイドホルモン抗体及び競合物質とを、一般式（ I ）

【化 2 】



（式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2～5の整数を表す）で表される構造を有する緩衝剤と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させて、標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識を測定することを特徴とする、検体中のステロイドホルモンの測定方法。

〔 5 〕 検体と標識化抗ステロイドホルモン抗体とを反応させた後、当該反応の反応液に競合物質を添加する、〔 4 〕記載の測定方法。

〔 6 〕 競合物質が、不溶性担体に固定化されている、〔 4 〕又は〔 5 〕記載の測定方法。

〔 7 〕 緩衝剤が、2 - モルホリノエタンスルホン酸（MES）、3 - モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン - N , N ' - ビス（2 - エタンスルホン酸）（PIPES）、2 - [N , N - ビス（2 - ヒドロキシエチル）アミノ] エタンスルホン酸（

BES)、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-スルホエチル)ピペラジン(HEPES)、及びビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)からなる群から選ばれる緩衝剤である、[1]~[6]のいずれかに記載の測定方法。

[8] ステロイドホルモンが、鉱質コルチコイドである、[1]~[7]のいずれかに記載の測定方法。

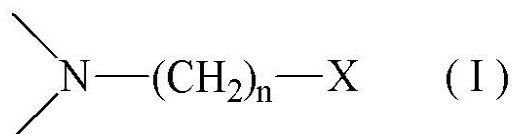
[9] 鉱質コルチコイドが、アルドステロンである、[8]記載の測定方法。

【0012】

[10] 非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤、一般式(I)

10

【化3】



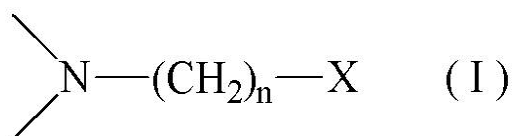
(式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2~5の整数を表す)で表される構造を有する緩衝剤、標識化競合物質、並びに、抗ステロイドホルモン抗体を含む、検体中のステロイドホルモンの測定用試薬。

[11] 抗ステロイドホルモン抗体が、不溶性担体に固定化されている、[10]記載の試薬。

20

[12] 非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤、一般式(I)

【化4】



(式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2~5の整数を表す)で表される構造を有する緩衝剤、標識化抗ステロイドホルモン抗体、並びに、競合物質を含む、検体中のステロイドホルモンの測定用試薬。

30

[13] 競合物質が、不溶性担体に固定化されている、[12]記載の試薬。

[14] 緩衝剤が、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、2-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エタンスルホン酸(BES)、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-スルホエチル)ピペラジン(HEPES)、及びビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)からなる群から選ばれる緩衝剤である、[10]~[13]のいずれかに記載の試薬。

40

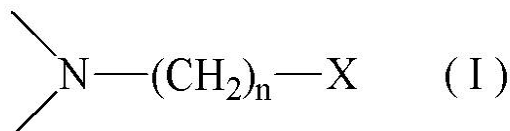
[15] ステロイドホルモンが、鉱質コルチコイドである、[10]~[14]のいずれかに記載の試薬。

[16] 鉱質コルチコイドが、アルドステロンである、[15]記載の試薬。

【0013】

[17] 抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、標識化競合物質を含む第2試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、一般式(I)

【化 5】

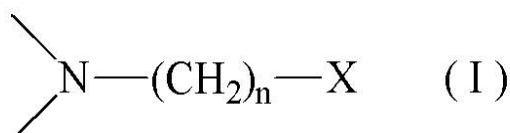


(式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2～5の整数を表す)で表される構造を有する緩衝剤のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれる、検体中のステロイドホルモンの測定用キット。

【18】 抗ステロイドホルモン抗体が、不溶性担体に固定化されている、【17】記載のキット。 10

【19】 標識化抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、競合物質を含む第2試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、一般式(I)

【化 6】



(式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2～5の整数を表す)で表される構造を有する緩衝剤のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれる、検体中のステロイドホルモンの測定用キット。

【20】 競合物質が、不溶性担体に固定化されている、【19】記載のキット。

【21】 緩衝剤が、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、2-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エタンスルホン酸(BES)、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-スルホエチル)ピペラジン(HEPES)、及びビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)からなる群から選ばれる緩衝剤である、【17】～【20】のいずれかに記載のキット。 30

【22】 ステロイドホルモンが、鉱質コルチコイドである、【17】～【21】のいずれかに記載のキット。

【23】 鉱質コルチコイドが、アルドステロンである、【22】記載のキット。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、交差反応性物質の影響を受けることなく、正確な検体中のステロイドホルモンの測定を可能とする方法、試薬、及び、キットが提供される。

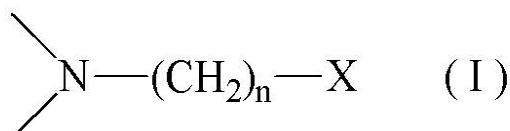
【発明を実施するための形態】

【0015】

(測定方法)

本発明の検体中のステロイドホルモンの測定方法は、検体と、抗ステロイドホルモン抗体及び標識化競合物質とを、一般式(I)

【化 7】



【0016】

10

20

30

40

50

(式中、Xは水酸基又はスルホ基を表し、nは2～5の整数を表す)で表される構造を有する緩衝剤〔以下、緩衝剤(I)と記す〕と非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させ、抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識を測定することを特徴とする方法である。

【0017】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の1つの態様(態様1)として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔1〕検体と、抗ステロイドホルモン抗体及び標識化競合物質とを、緩衝剤(I)と非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させて、抗ステロイドホル

10

モン抗体とステロイドホルモンとの免疫複合体、及び、抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体を生成させる工程；

〔2〕工程〔1〕で生成した抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔3〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔1〕及び工程〔2〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

20

【0018】

抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されている方が好ましい。

【0019】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様(態様2)として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔1〕検体と抗ステロイドホルモン抗体とを、緩衝剤(I)と非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させる工程；

〔2〕工程〔1〕の反応液に、標識化競合物質を添加する工程；

30

〔3〕工程〔2〕で生成した抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔4〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔1〕～工程〔3〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔5〕工程〔4〕で作成された検量線と、工程〔3〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【0020】

抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

40

【0021】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様(態様3)として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔1〕検体と抗ステロイドホルモン抗体とを、緩衝剤(I)を含有する水性媒体中で反応させる工程；

〔2〕工程〔1〕の反応液に、標識化競合物質と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを添加する工程；

〔3〕工程〔2〕で生成した抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

50

〔４〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔１〕～工程〔３〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔５〕工程〔４〕で作成された検量線と、工程〔３〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【００２２】

抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【００２３】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様（態様４）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔１〕検体と抗ステロイドホルモン抗体とを、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤を含有する水性媒体中で反応させる工程；

〔２〕工程〔１〕の反応液に、標識化競合物質と、緩衝剤（Ｉ）とを添加する工程；

〔３〕工程〔２〕で生成した抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔４〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔１〕～工程〔３〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔５〕工程〔４〕で作成された検量線と、工程〔３〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【００２４】

抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【００２５】

さらに、本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様（態様５）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔１〕検体と抗ステロイドホルモン抗体とを水性媒体中で反応させる工程；

〔２〕工程〔１〕の反応液に、標識化競合物質、緩衝剤（Ｉ）、並びに、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤を添加する工程；

〔３〕工程〔２〕で生成した抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔４〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔１〕～工程〔３〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔５〕工程〔４〕で作成された検量線と、工程〔３〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【００２６】

抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【００２７】

抗ステロイドホルモン抗体が不溶性担体に固定化されている場合、抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方（Ａ）が結合した抗ステロイドホルモン抗体と、一組の親和性物質のもう一方（ａ）が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。Ａ－ａの組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ ビオチンとアビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）との組み合わせ；
- ・ アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）とビオチンとの組み合わせ；
- ・ 抗ステロイドホルモン抗体のFc領域と、Fc領域と結合する抗体との組み合わせ。

【 0 0 2 8 】

態様 1 における工程 [1]、及び、態様 2 ～ 5 における工程 [1] 及び工程 [2] における検体と抗ステロイドホルモン抗体の反応、及び、標識化競合物質と抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応温度は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする温度であれば特に制限はなく、通常、0 ～ 50 であり、4 ～ 45 が好ましく、20 ～ 40 が特に好ましい。当該反応の反応時間は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1 分間 ～ 2 時間であり、2 分間 ～ 1 時間が好ましい。

10

【 0 0 2 9 】

態様 1 ～ 5 における工程 [1] において、検体を予め後述の水性媒体で前処理した後に反応に供することもできる。前処理としては、例えば希釈、可溶化、変性等が挙げられる。水性媒体には、後述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。検体を予め水性媒体で前処理する温度は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする温度であれば特に制限はなく、通常、0 ～ 50 であり、4 ～ 45 が好ましく、20 ～ 40 が特に好ましい。検体を予め水性媒体で前処理する時間は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1 分間 ～ 2 時間であり、2 分間 ～ 1 時間が好ましい。

20

【 0 0 3 0 】

態様 1 における工程 [2]、及び、態様 2 ～ 5 における工程 [3] における標識物質の測定方法としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする方法であれば特に制限はなく、例えば後述の方法等が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

本発明の検体中のステロイドホルモンの測定方法は、また、検体と、標識化抗ステロイドホルモン抗体及び競合物質とを、緩衝剤（Ⅰ）と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させ、標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体を生成させ、生成した当該免疫複合体中の標識物質を測定することを特徴とする方法である。

30

【 0 0 3 2 】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の 1 つの態様（態様 6）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

[1] 検体と、標識化抗ステロイドホルモン抗体及び競合物質とを、緩衝剤（Ⅰ）と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させて、標識化抗ステロイドホルモン抗体とステロイドホルモンとの免疫複合体、及び、標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体を生成させる工程；

40

[2] 工程 [1] で生成した標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

[3] 検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程 [1] 及び工程 [2] を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

[4] 工程 [3] で作成された検量線と、工程 [2] で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【 0 0 3 3 】

競合物質は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

50

【 0 0 3 4 】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様（態様 7）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔 1 〕検体と標識化抗ステロイドホルモン抗体とを、緩衝剤（ I ）と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤とを含有する水性媒体中で反応させる工程；

〔 2 〕工程〔 1 〕の反応液に、競合物質を添加する工程；

〔 3 〕工程〔 2 〕で生成した標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔 4 〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔 1 〕～工程〔 3 〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔 5 〕工程〔 4 〕で作成された検量線と、工程〔 3 〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【 0 0 3 5 】

競合物質は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【 0 0 3 6 】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様（態様 8）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔 1 〕検体と標識化抗ステロイドホルモン抗体とを、緩衝剤（ I ）を含有する水性媒体中で反応させる工程；

〔 2 〕工程〔 1 〕の反応液に、競合物質と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤とを添加する工程；

〔 3 〕工程〔 2 〕で生成した標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔 4 〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔 1 〕～工程〔 3 〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔 5 〕工程〔 4 〕で作成された検量線と、工程〔 3 〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【 0 0 3 7 】

競合物質は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【 0 0 3 8 】

本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様（態様 9）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

〔 1 〕検体と標識化抗ステロイドホルモン抗体とを、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤を含有する水性媒体中で反応させる工程；

〔 2 〕工程〔 1 〕の反応液に、競合物質と、緩衝剤（ I ）とを添加する工程；

〔 3 〕工程〔 2 〕で生成した標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

〔 4 〕検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程〔 1 〕～工程〔 3 〕を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

〔 5 〕工程〔 4 〕で作成された検量線と、工程〔 3 〕で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【 0 0 3 9 】

競合物質は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【 0 0 4 0 】

さらに、本発明のステロイドホルモンの測定方法の別の態様（態様 1 0 ）として、例えば以下の工程を含む方法が挙げられる。

[1] 検体と標識化抗ステロイドホルモン抗体とを水性媒体中で反応させる工程；

[2] 工程 [1] の反応液に、競合物質、緩衝剤（ I ）、並びに、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の界面活性剤を添加する工程；

[3] 工程 [2] で生成した標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体中の標識物質を測定する工程；

[4] 検体の代わりに既知濃度のステロイドホルモンを用いて前記工程 [1] ~ 工程 [3] を行い、ステロイドホルモン濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

[5] 工程 [4] で作成された検量線と、工程 [3] で測定された標識物質の測定値とから、検体中のステロイドホルモン濃度を決定する工程。

【 0 0 4 1 】

競合物質は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

【 0 0 4 2 】

競合物質が不溶性担体に固定化されている場合、競合物質が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方（ B ）が結合した競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（ b ）が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、競合物質が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。 B - b の組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

・ ビオチンとアビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）との組み合わせ；

・ アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）とビオチンとの組み合わせ。

【 0 0 4 3 】

態様 6 における工程 [1]、及び、態様 7 ~ 1 0 における工程 [1] 及び工程 [2] における検体と標識化抗ステロイドホルモン抗体との反応、及び、競合物質と標識化抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応温度は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする温度であれば特に制限はなく、通常、0 ~ 50 であり、4 ~ 45 が好ましく、20 ~ 40 が特に好ましい。当該反応の反応時間は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1 分間 ~ 2 時間であり、2 分間 ~ 1 時間が好ましい。

【 0 0 4 4 】

態様 6 ~ 1 0 における工程 [1] において、検体を予め後述の水性媒体で前処理した後に反応に供することもできる。前処理としては、例えば希釈、可溶化、変性等が挙げられる。水性媒体には、後述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。検体を予め水性媒体で前処理する温度は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする温度であれば特に制限はなく、通常、0 ~ 50 であり、4 ~ 45 が好ましく、20 ~ 40 が特に好ましい。検体を予め水性媒体で前処理する時間は、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1 分間 ~ 2 時間であり、2 分間 ~ 1 時間が好ましい。

【 0 0 4 5 】

態様 6 における工程 [2]、及び、態様 7 ~ 1 0 における工程 [3] における標識物質の測定方法としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする方法であれば特に制限はなく、例えば後述の方法等が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

本発明におけるステロイドホルモンとしては、本発明の測定を可能とするステロイドホルモンであれば特に制限はなく、例えば鉱質コルチコイド、糖質コルチコイド、性ホルモン等が挙げられ、鉱質コルチコイドが好ましい。鉱質コルチコイドとしては、例えばアルドステロン、フルドコルチゾン酢酸エステル等が挙げられる。糖質コルチコイドとしては、例えばコルチゾール、コルチコステロン、コルチゾン等が挙げられる。性ホルモンとしては、例えば男性ホルモン（アンドロゲン）、女性ホルモン等が挙げられる。男性ホルモンとしては、例えばテストステロン、デヒドロエピアンドロステロン等が挙げられる。女性ホルモンとしては、例えばエストラジオール、エストリオール、エストロン、プロゲステロン等が挙げられる。

10

【 0 0 4 7 】

本発明における検体としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする検体であれば特に制限はなく、例えば全血、血漿、血清、尿、髄液、唾液、羊水、汗、腓液等が挙げられ、全血、血漿、血清、尿等が好ましい。

【 0 0 4 8 】

本発明における緩衝剤（I）としては、例えば2 - モルホリノエタンスルホン酸（MES）、3 - モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン - N, N' - ビス（2 - エタンスルホン酸）（PIPES）、2 - [N, N - ビス（2 - ヒドロキシエチル）アミノ] エタンスルホン酸（BES）、N - （2 - ヒドロキシエチル） - N' - （2 - スルホエチル）ピペラジン（HEPES）、ビス（2 - ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（Bis - Tris）、N - （2 - アセトアミド） - 2 - アミノエタンスルホン酸（ACES）、N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸（TES）、3 - [4 - （2 - ヒドロキシエチル） - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸（EPPS）、N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、N - シクロヘキシル - 2 - アミノエタンスルホン酸（CHES）、N - シクロヘキシル - 3 - アミノプロパンスルホン酸（CAPS）等が挙げられ、2 - モルホリノエタンスルホン酸（MES）、3 - モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン - N, N' - ビス（2 - エタンスルホン酸）（PIPES）、2 - [N, N - ビス（2 - ヒドロキシエチル）アミノ] エタンスルホン酸（BES）、N - （2 - ヒドロキシエチル） - N' - （2 - スルホエチル）ピペラジン（HEPES）、ビス（2 - ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（Bis - Tris）が好ましい。

20

30

【 0 0 4 9 】

緩衝剤（I）の、検体又は標識化競合物質と抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中の濃度としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常、0.001 ~ 2.0 mol/Lであり、0.005 ~ 1.0 mol/Lが好ましい。

【 0 0 5 0 】

本発明における非イオン性界面活性剤としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする非イオン性界面活性剤であれば特に制限はなく、例えばポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤、非ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤等が挙げられ、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が好ましい。ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤としては、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルアミン、アルキレンジアミン - ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等が挙げられる。非ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤としては、例えばソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、脂肪酸アルカノールアミド、ショ糖脂肪酸エステル等が挙げられる。

40

【 0 0 5 1 】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしては、例えばポリオキシエチレンセチルエー

50

テル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンドデシルエーテル等が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとしては、例えばポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

ポリオキシエチレン多環フェニルエーテルとしては、例えばポリオキシエチレンジベンジルフェニルエーテル、ポリオキシエチレントリベンジルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（ジスチレン化）フェニルエーテル、ポリオキシエチレン（トリスチレン化）フェニルエーテル等が挙げられる。

10

【 0 0 5 4 】

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物としては、例えばポリオキシエチレンポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンランダム重合体等が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

ポリオキシエチレンアルキルアミンとしては、例えばポリオキシエチレンドデシルアミン、ポリオキシエチレンステアリルアミン等が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

アルキレンジアミン - ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物としては、例えばエチレンジアミンテトラポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン・ブロックポリマー等が挙げられる。

20

【 0 0 5 7 】

ポリオキシエチレン脂肪酸エステルとしては、例えばポリオキシエチレングリコールモノラウレート、ポリオキシエチレングリコールモノステアレート、ポリオキシエチレングリコールジステアレート、ポリオキシエチレングリコールモノオレエート等が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート等が挙げられる。

30

【 0 0 5 9 】

ソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えばソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンジステアレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタントリオレエート、ソルビタンセスキオレエート等が挙げられる。

【 0 0 6 0 】

グリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばステアリン酸モノグリセライド、オレイン酸モノグリセライド等が挙げられる。

40

【 0 0 6 1 】

脂肪酸アルカノールアミドとしては、例えばラウリン酸ジエタノールアミド等が挙げられる。ショ糖脂肪酸エステルとしては、例えばショ糖パルミチン酸エステル、ショ糖ステアリン酸エステル等が挙げられる。

【 0 0 6 2 】

陰イオン性界面活性剤としては、例えばカルボン酸塩、スルホン酸塩、硫酸エステル塩、リン酸エステル塩、コール酸類等が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

カルボン酸塩としては、例えばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン

50

酸、オレイン酸等の高級脂肪酸等と、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属等との塩等が挙げられ。具体的には、例えばオレイン酸カリウム、ラウロイルサルコシナトリウム、N-ミリストイル-N-メチル-β-アラニンナトリウム、ポリオキシエチレンドデシルエーテル酢酸ナトリウム等が挙げられる。

【0064】

スルホン酸塩としては、例えばドデシルベンゼンスルホン酸等のアルキルベンゼンスルホン酸、ジプロピルナフタレンスルホン酸、ジブチルナフタレンスルホン酸等のナフタレンスルホン酸、ジオクチルスルホコハク酸等のスルホコハク酸等と、ナトリウム等との塩等が挙げられる。具体的には、例えばドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ジプロピルナフタレンスルホン酸ナトリウム、ジブチルナフタレンスルホン酸ナトリウム、ジオク

10

【0065】

硫酸エステル塩としては、例えば高級アルコール硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル塩、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル塩等が挙げられる。塩としては、例えばナトリウム塩、アンモニウム塩等が挙げられる。高級アルコール硫酸エステル塩の具体例としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等が、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル塩の具体例としては、例えばポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム等が、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル塩の具体例としては、例えばポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸ナトリウム等が挙げられる。

20

【0066】

リン酸エステル塩としては、例えばモノアルキルリン酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル塩等が挙げられる。塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。モノアルキルリン酸エステル塩の具体例としては、例えばモノステアリルリン酸ナトリウム、モノドデシルリン酸ナトリウム等が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル塩の具体例としては、例えばポリオキシエチレンドデシルエーテルリン酸カリウム等が挙げられる。

【0067】

コール酸類としては、例えばコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、7-オキソリトコール酸、12-オキソリトコール酸、12-オキソケノデオキシコール酸、7-オキソデオキシコール酸、ヒオコール酸、ヒオデオキシコール酸、デヒドロコール酸等が挙げられる。これらのコール酸類は塩を形成してもよい。塩としては、例えばアンモニウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。

30

【0068】

両性界面活性剤としては、例えばベタイン類、グリシン類、アラニン類、2-アルキルイミダゾリン誘導体、アミノオキサイド類、アルキルアミノ塩類、胆汁酸類等が挙げられる。

【0069】

ベタイン類としては、例えばアルキルベタイン類、カルボキシベタイン類、スルホベタイン類等が挙げられる。アルキルベタイン類としては、例えばN-ドデシルベタイン等が挙げられる。カルボキシベタイン類としては、例えばラウリン酸アミドプロピルベタイン、ドデシルジメチルアミノ酢酸ベタイン、N-ラウロイル-N'-カルボキシメチル-N'-ヒドロキシエチルエチレンジアミンナトリウム等が挙げられる。スルホベタイン類としては、例えばラウリン酸アミドプロピルヒドロキシスルホベタイン等が挙げられる。

40

【0070】

グリシン類としては、例えばドデシルジアミノエチルグリシンナトリウム等が挙げられる。

【0071】

アラニン類としては、例えばN-オクトデシル-β-アラニンナトリウム、N-ミスチル-

50

β -アラニンナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸ナトリウム等が挙げられる。

2-アルキルイミダゾリン誘導体としては、例えば2-ラウロイル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等の2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等が挙げられる。

【0072】

アミノオキサイド類としては、例えばドデシルジメチルアミノオキサイド、ジヒドロキシエチルドデシルアミノオキサイド、ポリオキシエチレンヤシ油アルキルジメチルアミノオキサイド等が挙げられる。

【0073】

アルキルアミノ塩類としては、例えばドデシルアミノジ酢酸ナトリウム等が挙げられる。

10

【0074】

胆汁酸類としては、例えば3-[(3-コルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホネート(CHAPS)、3-[(3-コルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシプロパンスルホネート(CHAPSO)等が挙げられる。

【0075】

非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、又は、両性界面活性剤の、検体又は標識化競合物質と抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中の濃度としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常、0.005~3%であり、0.01~2%が好ましい。また、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、又は、両性界面活性剤の、検体又は競合物質と標識化抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中の濃度としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常、0.005~3%であり、0.01~2%が好ましい。

20

【0076】

本発明の測定方法においては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤は、1種類又は2種類以上を組み合わせ用いてもよい。

【0077】

本発明における不溶性担体としては、抗ステロイドホルモン抗体および競合物質を固定化し、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする不溶性担体であれば特に制限はなく、例えばマイクロタイタープレート等のポリスチレンプレート、ガラス製または合成樹脂製の粒状物(ビーズ)、ガラス製または合成樹脂製の球状物(ボール)、ラテックス、磁性粒子、ニトロセルロース膜等の各種メンブレン、合成樹脂製の試験管等が挙げられる。

30

【0078】

本発明において、抗ステロイドホルモン抗体と不溶性担体との間の結合としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする結合であれば特に制限はなく、物理吸着、化学結合等が挙げられる。物理吸着としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。

【0079】

抗ステロイドホルモン抗体は、前述の物理吸着及び/又は化学結合を利用して、直接、不溶性担体に固定化してもよいし、間接的に不溶性担体に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばビオチンとアビジン類(アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等)との特異的結合を介して、抗ステロイドホルモン抗体を不溶性担体に固定化する方法等が挙げられる。また、抗ステロイドホルモン抗体は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体に固定化してもよい。

40

【0080】

リンカーとしては、不溶性担体表面の官能基と抗ステロイドホルモン抗体が有する官能基の両者を共有結合できる分子等が挙げられ、抗ステロイドホルモン抗体が有する官能基と反応することができる第1の反応活性基と、不溶性担体表面の官能基と反応することができる第2の反応活性基とを同一分子内に有し、第1の反応活性基と第2の反応活性基が

50

異なる基である分子が好ましい。抗ステロイドホルモン抗体の官能基および不溶性担体はその表面に保持している官能基としては、例えばカルボキシル基、アミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、N-ヒドロキシサクシニル基（NHS基）、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける反応活性基としては、例えばアリルアジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル、ペンタフルオロフェニル(PFP)エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基が挙げられる。

【0081】

本発明において、競合物質と不溶性担体との間の結合としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする結合であれば特に制限はなく、物理吸着、化学結合等が挙げられる。物理吸着としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。

【0082】

競合物質は、前述の物理吸着及び/又は化学結合を利用して、直接、不溶性担体に固定化してもよいし、間接的に不溶性担体に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばビオチンとアビジン類（アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等）との特異的結合を介して、抗ステロイドホルモン抗体を不溶性担体に固定化する方法等が挙げられる。また、競合物質は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体に固定化してもよい。

【0083】

リンカーとしては、不溶性担体表面の官能基と競合物質が有する官能基の両者を共有結合できる分子等が挙げられ、競合物質が有する官能基と反応することができる第1の反応活性基と、不溶性担体表面の官能基と反応することができる第2の反応活性基とを同一分子内に有し、第1の反応活性基と第2の反応活性基が異なる基である分子が好ましい。競合物質の官能基および不溶性担体はその表面に保持している官能基としては、例えば前述の官能基等が挙げられる。リンカーにおける反応活性基としては、例えば前述の反応活性基等が挙げられる。

【0084】

本発明における抗ステロイドホルモン抗体は、ステロイドホルモンに結合し、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用可能である。また、本発明においては、全長の抗体のみならず、抗体フラグメントを用いることもできる。抗体フラグメントとしては、例えば、抗体をパパイン処理により得られるFab、ペプシン処理により得られるF(ab')₂、ペプシン処理・還元処理により得られるFab'等のFc部分が除去された抗体フラグメント等が挙げられる。不溶性担体として、アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）がその上に固定化された不溶性担体を用いる場合には、抗ステロイドホルモン抗体にビオチンが結合したビオチン結合抗ステロイドホルモン抗体を用いることができる。また、不溶性担体として、ビオチンがその上に固定化された不溶性担体を用いる場合には、抗ステロイドホルモン抗体にアビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）が結合したアビジン類結合抗ステロイドホルモン抗体を用いることができる。

【0085】

本発明における抗ステロイドホルモン抗体は、ステロイドホルモンそのもの、又は、ステロイドホルモン中のエピトープに相当する部分構造を有する化合物を抗原として用いる通常の抗体の製造方法により製造することができるが、市販品としても入手可能である。抗ステロイドホルモン抗体の市販品としては、例えば抗ステロイドホルモンポリクローナル抗体（アブカム社製）等が挙げられる。

【0086】

本発明における標識化抗ステロイドホルモン抗体は、前述の抗ステロイドホルモン抗体

10

20

30

40

50

と後述の標識物質とを用いて、後述の方法により作製される。

【0087】

本発明における競合物質は、抗ステロイドホルモン抗体に結合し、かつその結合が、測定対象物質であるステロイドホルモンと競合的であるような物質を意味し、測定対象物質であるステロイドホルモンそのものも含まれる。本発明における競合物質としては、抗ステロイドホルモン抗体が認識するエピトープの構造と同じ構造を有している物質が好ましく、さらに抗ステロイドホルモン抗体に対する結合の強さが、当該抗体に対する当該ステロイドホルモンの結合の強さと同程度であるものがより好ましく、具体的には、測定対象物質であるステロイドホルモンそのものが挙げられる。

【0088】

不溶性担体として、アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）がその上に固定化された不溶性担体を用いる場合には、競合物質にビオチンが結合したビオチン結合競合物質を用いることができる。また、不溶性担体として、ビオチンがその上に固定化された不溶性担体を用いる場合には、競合物質にアビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）が結合したアビジン類結合競合物質を用いることができる。

【0089】

本発明における競合物質は、公知の方法を用いて作製することができ、例えば特開昭60-260592号公報や特開昭63-060996号公報に記載された方法等により作製することができる。

【0090】

本発明における標識化競合物質は、前述の競合物質と後述の標識物質とを用いて、後述の方法により作製される。

【0091】

本発明における標識化抗ステロイドホルモン抗体及び標識化競合物質において使用される標識物質としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする標識物質であれば特に制限はなく、例えば酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、タグ配列を含むポリペプチド、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子等が挙げられる。

【0092】

酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

【0093】

蛍光物質としては、例えば、フルオレッセイン イソチオシアナート(FITC)、ローダミンB-イソチオシアナート(RITC)等が挙げられる。その他の蛍光物質としては、例えばquantum dot (Science, 281, 2016-2018, 1998)、フィコエリスリン等のフィコビリ蛋白質、GFP (Green fluorescent Protein)、RFP (Red fluorescent Protein)、YFP (Yellow fluorescent Protein)、BFP (Blue fluorescent Protein)等の蛍光を発する蛋白質が挙げられる。

【0094】

発光物質としては、例えば、アクリジニウムおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。ルテニウム錯体化合物としては、電子供与体と共に電気化学的に発光する、Clin. Chem. 37, 9, 1534-1539, 1991に示されたものが好ましい。

放射性同位元素としては、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等が挙げられる。

【0095】

タグ配列を含むポリペプチドとしては、FLAGペプチド（FLAGタグ、Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys）、ポリヒスチジン（Hisタグ、His His His His His His）、mycエピトープペプチド（mycタグ、Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu）、ヘマグルチニンエピトープペプチド（HAタグ、Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala）等が挙げられる。

【0096】

抗ステロイドホルモン抗体の標識物質による標識化、及び、競合物質の標識物質による標識化は、抗ステロイドホルモン抗体又は競合物質が有する官能基と、標識物質が有する官能基との間でリンカーを介してまたは介さず共有結合を生じる反応によって行うことができる。官能基としては、カルボキシ基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、ヒドロキシサクシニルエステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基等が挙げられる。

【0097】

競合物質の標識物質による標識化において、競合物質が標識物質と結合する競合物質中の位置は、競合物質の構造によって適宜選択することができる。例えば測定対象物であるステロイドホルモンがアルドステロンであり、競合物質として、アルドステロンそのものを用いる場合、標識物質は、アルドステロンの3位、4位、6位又は21位等の位置に結合させることができる。

10

【0098】

リンカーを介さない結合方法としては例えば、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)等のカルボジイミド化合物を用いる方法等が挙げられる。この場合、NHS又はその誘導体等の活性エステルを使用することも可能である。イソチオシアナート基とアミノ基の間の縮合反応は、他の試薬を必要とせず、中性～弱アルカリ性の条件で混合するだけで進行するため、好ましい。

【0099】

リンカーとしては、抗ステロイドホルモン抗体又は競合物質が有する官能基と、標識物質が有する官能基とを結合させ得る分子であればいかなるリンカーでもよい。好ましい態様としては、例えば、抗ステロイドホルモン抗体のアミノ酸残基と反応することができる第1の官能基と、標識物質の官能基と反応することができる第2の官能基とを同一分子内に有する分子、競合物質のカルボキシ基と反応することができる第1の官能基と、標識物質の官能基と反応することができる第2の官能基とを同一分子内に有する分子等が挙げられ、第1の官能基と第2の官能基とが異なっていることが好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基等が挙げられる。

20

【0100】

放射性同位元素を化学的に結合させる方法としては、例えば文献(Antibody Immunoconj. Radiopharm., 3, 60, 1990)記載の方法等が挙げられる。

30

【0101】

標識物質が酵素、アビジン、蛍光を発する蛋白質、フィコビリ蛋白質、タグ配列を含むポリペプチド等のポリペプチドである場合には、公知の遺伝子組換え技術(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)にしたがって、標識物質と抗ステロイドホルモン抗体との融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、発現ベクターを適当な宿主に導入して、宿主を培養することにより製造することができる。融合蛋白質をコードするDNAは、抗体および標識物質をそれぞれコードするDNAをPCR等でクローニングし、それぞれのDNAをリガーゼ反応で連結することにより得ることができる。

【0102】

40

本発明において、抗ステロイドホルモン抗体と標識化競合物質との免疫複合体中の標識物質の測定、及び、標識化抗ステロイドホルモン抗体と競合物質との免疫複合体中の標識物質の測定は、用いる標識物質により適宜、選択することができる。

【0103】

標識物質が発色物質、すなわち、ある波長の光を吸収する物質の場合には、分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等を用いて吸光度を測定することができる。

標識物質が蛍光物質の場合には、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等を用いて蛍光強度を測定することができる。

標識物質が発光物質の場合には、発光光度計や発光マルチウェルプレートリーダー等を用いて、発光強度を測定することができる。

50

標識物質が放射性同位元素である場合、放射活性をシンチレーションカウンター、 γ -ウェルカウンター等により、放射活性を測定することができる。

【0104】

標識物質が酵素である場合、標識量は、酵素活性を測定することにより定量することができる。例えば酵素の基質を当該酵素と反応させ、生成した物質を測定することにより、

標識量を測定することができる。

【0105】

酵素がペルオキシダーゼである場合には、例えば吸光度法、蛍光法等によりペルオキシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼと、その基質である過酸化水素および酸化発色型色原体の組み合わせとを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。

【0106】

ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジジン、*o*-フェニレンジアミン、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン ナトリウム塩(DA-64)、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン ナトリウム塩(DA-67)、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。

【0107】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カブラーとアニリン類(トリンダー試薬)との組み合わせ、カブラーとフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。

【0108】

カブラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等が挙げられる。

【0109】

アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N,N-ジメチル-3-メチルアニリン、N,N-ビス(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3,5-ジメトキシアニリン(F-DAOS)等が挙げられる。

【0110】

フェノール類としては、フェノール、4-4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等が挙げられる。

【0111】

蛍光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼと、その基質である過酸化水素および蛍光物質の組み合わせとを反応させ、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で生成した蛍光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該蛍光物質としては、例えば4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。

【0112】

発光法によるペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼと、その基質である過酸化水素および発光物質の組み合わせとを反応させ、発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で生成した発光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該発光物質としては、例えばルミノール化合物、ルシゲニン化合物等が挙げられる。

10

【0113】

酵素がアルカリホスファターゼである場合には、例えば発光法等によりアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。発光法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する方法としては、例えばアルカリホスファターゼとその基質とを反応させ、生成した発光の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。

【0114】

アルカリホスファターゼの基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム塩(AMPPD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.3.7]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CDP-StarTM)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.3.7]デカン]3.3.1.3.7イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CSPDTM)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩(LumigenTM APS-5)等が挙げられる。

20

【0115】

酵素がβ-D-ガラクトシダーゼである場合には、例えば吸光度法(比色法)、発光法又は蛍光法等によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法(比色法)によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばβ-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。β-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばo-ニトロフェル-β-D-ガラクトピラノシド等が挙げられる。発光法によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばβ-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。β-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン・プラス[Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社製]及びその類似化合物等が挙げられる。蛍光法によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばβ-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の蛍光度を蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。β-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド等が挙げられる。

30

40

【0116】

酵素がルシフェラーゼである場合には、例えば発光法等によりルシフェラーゼ活性を測定することができる。発光法によりルシフェラーゼ活性を測定する方法としては、例えばルシフェラーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。ルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等が挙げられる。

【0117】

50

標識物質が蛍光物質、発光物質、放射性同位元素および酵素以外の場合は、当該標識物質に特異的に結合する物質を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、酵素等で標識した標識体と、免疫複合体中の標識化抗ステロイドホルモン抗体または標識化競合物質を構成している当該標識物質とを結合させ、当該標識物質に特異的に結合する物質を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素又は酵素を、上述の方法により測定することにより、当該標識物質を測定することができる。標識物質に特異的に結合する物質としては、標識物質に特異的に結合する抗体の他、標識物質がビオチンの場合は、アビジン類等が挙げられる。また、標識物質に特異的に結合する物質（標識物質に特異的に結合する抗体、アビジン類等）を用いて、免疫複合体中の標識物質と結合させた後、標識物質に特異的に結合する物質に結合する抗体、例えば、標識物質に特異的に結合する抗体の定常領域に特異的に結合する抗体、又は、アビジン類に特異的に結合する抗体を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素で標識したものを結合させ、これらの抗体を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素を、上述の方法により測定することにより、当該標識物質を測定することができる。

10

【0118】

本発明における水性媒体としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする水性媒体であれば特に制限はなく、例えば脱イオン水、蒸留水等が挙げられる。

【0119】

本発明における金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。本発明における糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。本発明における防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質（ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、バイオエース、プロクリン300、プロキセル（Proxel）GXL等が挙げられる。本発明における蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ胎児血清(FBS)、カゼイン、ブロックエース（DSファーマバイオメディカル社製）等が挙げられる。

20

【0120】

（測定用試薬）

本発明の検体中のステロイドホルモンの測定用試薬は、本発明のステロイドホルモンの測定方法に用いられる試薬であり、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤、緩衝剤（I）、標識化競合物質、並びに、抗ステロイドホルモン抗体を含む試薬である。抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても固定化されていなくてもよいが、固定化されている方が好ましい。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

30

【0121】

また、本発明の検体中のステロイドホルモンの測定用試薬は、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤、緩衝剤（I）、標識化抗ステロイドホルモン抗体、並びに、競合物質を含む試薬である。競合物質は不溶性担体に固定化されていても固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

40

【0122】

本発明の測定用試薬は、凍結乾燥状態でも液状でもよい。凍結乾燥状態の測定用試薬を使用する場合には、測定前に水性媒体で溶解して液状にして測定に供する。液状の測定用試薬においては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤、緩衝剤（I）、標識化競合物質、標識化抗ステロイドホルモン抗体、競合物質、並びに、抗ステロイドホルモン抗体は水性媒体で溶解された状態となっている。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。液状の測定用試薬には、水性媒体が含まれる。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されて

50

もよい。

【0123】

本発明の測定用試薬におけるステロイドホルモンとしては、前述のステロイドホルモンが挙げられる。本発明の測定用試薬における緩衝剤（I）としては、例えば前述の緩衝剤（I）が挙げられる。本発明の測定用試薬における緩衝剤（I）の含量としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で通常、0.001～2.0 mol/Lとなる含量であり、0.005～1.0 mol/Lとなる含量が好ましい。

【0124】

本発明の測定用試薬における非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤としては、例えば前述の非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤がそれぞれ挙げられる。本発明の測定用試薬における非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤のそれぞれの界面活性剤の含量としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で0.005～3%となる含量であり、0.01～2%となる含量が好ましい。

【0125】

本発明の測定用試薬においては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤は、1種類又は2種類以上を組み合わせ用いてもよい。

【0126】

本発明の測定用試薬における標識化競合物質、抗ステロイドホルモン抗体、標識化抗ステロイドホルモン抗体、競合物質としては、例えば前述の標識化競合物質、抗ステロイドホルモン抗体、標識化抗ステロイドホルモン抗体、競合物質がそれぞれ挙げられる。

【0127】

本発明の測定用試薬において、抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方（A）が結合した抗ステロイドホルモン抗体と、一組の親和性物質のもう一方（a）が結合した不溶性担体との組み合わせを用いることもできる。この場合、抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体は、検体又は標識化競合物質と抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中で生成される。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Aとaの組み合わせとしては、例えば前述の組み合わせ等が

【0128】

また、本発明の測定用試薬において、競合物質が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体との組み合わせを用いることもできる。この場合、競合物質が固定化された不溶性担体は、検体又は競合物質と標識化抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中で生成される。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Bとbの組み合わせとしては、例えば前述の組み合わせ等が挙げられる。

【0129】

本発明の測定用試薬において、検体を前処理するための検体前処理試薬が含まれていてもよい。前処理としては、例えば希釈、可溶化、変性等が挙げられる。検体前処理試薬としては、例えば前述の水性媒体等が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。検体前処理試薬は液状でも凍結乾燥状態でもよい。凍結乾燥状態の検体前処理試薬を用いる場合には、予め水性媒体で溶解した後、検体の前処理に用いることができる。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体等が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。

【0130】

（測定用キット）

本発明の測定用試薬は、保存、運搬、流通等の観点からキットの形態を取ることでもできる。本発明の測定用キットは、本発明のステロイドホルモンの測定方法に用いられる。

【0131】

本発明の検体中のステロイドホルモンの測定用キットは、抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、標識化競合物質を含む第2試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、緩衝剤（I）のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれるキットである。

【0132】

本発明の測定用キットにおいて、抗ステロイドホルモン抗体は不溶性担体に固定化されていても固定化されていなくてもよいが、固定化されている方が好ましい。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

10

【0133】

また、本発明の検体中のステロイドホルモンの測定用キットは、標識化抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、競合物質を含む第2試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、緩衝剤（I）のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれるキットである。

【0134】

本発明の測定用キットにおいて、競合物質は不溶性担体に固定化されていても固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

20

【0135】

本発明の測定用キットは、凍結乾燥状態でも液状でもよい。凍結乾燥状態の測定用キットを使用する場合には、測定前に水性媒体で溶解して液状にして測定に供する。液状の測定用キットにおいては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤、緩衝剤（I）、標識化競合物質、標識化抗ステロイドホルモン抗体、競合物質、並びに、抗ステロイドホルモン抗体は水性媒体で溶解された状態となっている。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。液状の測定用キットには、水性媒体が含まれる。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。

30

【0136】

本発明の測定用キットにおけるステロイドホルモンとしては、前述のステロイドホルモンが挙げられる。本発明の測定用キットにおける緩衝剤（I）としては、例えば前述の緩衝剤（I）が挙げられる。本発明の測定用キットの抗ステロイドホルモン抗体を含有する第1試薬、及び、標識化競合物質を含有する第2試薬における緩衝剤（I）の含量としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、水性媒体で溶解された状態で0.001~2.0 mol/Lとなる含量であり、0.005~1.0 mol/Lとなる含量が好ましい。また、本発明の測定用キットの標識化抗ステロイドホルモン抗体を含有する第1試薬、及び、競合物質を含有する第2試薬における緩衝剤（I）の含量としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、水性媒体で溶解された状態で0.001~2.0 mol/Lとなる含量であり、0.005~1.0 mol/Lとなる含量が好ましい。

40

【0137】

本発明の測定用キットにおける非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤としては、例えば前述の非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤がそれぞれ挙げられる。本発明の測定用キットの抗ステロイドホルモン抗体を含有する第1試薬、及び、標識化競合物質を含有する第2試薬における非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤のそれぞれの界面活性剤の含量としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする含量であれば特に制限

50

はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、水性媒体で溶解された状態で0.02～10%となる含量であり、0.04～5%となる含量が好ましい。また、本発明の測定用キットの標識化抗ステロイドホルモン抗体を含有する第1試薬、及び、競合物質を含有する第2試薬における非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤のそれぞれの界面活性剤の含量としては、本発明のステロイドホルモンの測定を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、水性媒体で溶解された状態で0.02～10%となる含量であり、0.04～5%となる含量が好ましい。

【0138】

本発明の測定用キットにおいて、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤は、1種類又は2種類以上を組み合わせ用いてもよい。

10

【0139】

本発明の測定用キットにおける標識化競合物質、抗ステロイドホルモン抗体、標識化抗ステロイドホルモン抗体、競合物質としては、例えば前述の標識化競合物質、抗ステロイドホルモン抗体、標識化抗ステロイドホルモン抗体、競合物質がそれぞれ挙げられる。

【0140】

本発明の測定用キットにおいて、抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体との組み合わせを用いることもできる。この場合、抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体は、検体又は標識化競合物質と抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中で生成される。本発明の測定用キットにおいて、一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体との組み合わせを用いる場合、一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体とは同一の試薬に含まれても、別々の試薬に含まれてもよいが、別々の試薬に含まれることが好ましい。一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体とが、別々の試薬に含まれているキットの場合、一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、標識化競合物質を含む第2試薬と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体を含む第3試薬とを含むキットも本発明のキットに含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Aとaの組み合わせとしては、例えば前述の組み合わせ等が挙げられる。抗ステロイドホルモン抗体が固定化された不溶性担体が、抗原抗体反応の反応液中で生成される場合、本発明の測定用キットとしては、例えば以下のキットが挙げられる。

20

30

・キット1

一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、標識化競合物質、及び、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体を含む第2試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、緩衝剤(I)のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれるキット。

・キット2

40

一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、標識化競合物質を含む第2試薬と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体を含む第3試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、緩衝剤(I)のそれぞれが第1試薬、第2試薬、及び、第3試薬の少なくとも1つの試薬に含まれるキット。

【0141】

本発明の測定用キットにおいて、競合物質が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方(B)が結合した競合物質と、一組の親和性物質のもう一方(b)が結合した不溶性担体との組み合わせを用いることもできる。この場合、競合物質が固定化

50

された不溶性担体は、検体又は競合物質と標識化抗ステロイドホルモン抗体との反応の反応液中で生成される。本発明の測定用キットにおいて、一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体との組み合わせを用いる場合、一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体とは同一の試薬に含まれても、別々の試薬に含まれてもよいが、別々の試薬に含まれることが好ましい。一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体とが、別々の試薬に含まれているキットの場合、標識化抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質を含む第2試薬と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体を含む第3試薬とを含むキットも本発明のキットに含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Bとbの組み合わせとしては、例えば前述の組み合わせ等が挙げられる。競合物質が固定化された不溶性担体が、抗原抗体反応の反応液中で生成される場合、本発明の測定用キットとしては、例えば以下のキットが挙げられる。

10

・キット3

標識化抗ステロイドホルモン抗体、及び、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体を含む第1試薬と、一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質を含む第2試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、緩衝剤（I）のそれぞれが、第1試薬、第2試薬のいずれか又は両方に含まれるキット。

20

・キット4

標識化抗ステロイドホルモン抗体を含む第1試薬と、一組の親和性物質の片方（B）が結合した競合物質を含む第2試薬と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体を含む第3試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤と、緩衝剤（I）のそれぞれが、第1試薬、第2試薬、及び、第3試薬の少なくとも1つの試薬に含まれるキット。

【0142】

本発明の測定用キットにおいて、検体を前処理するための検体前処理試薬が含まれていてもよい。前処理としては、例えば希釈、可溶化、変性等が挙げられる。検体前処理試薬としては、例えば前述の水性媒体等が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。検体前処理試薬は液状でも凍結乾燥状態でもよい。凍結乾燥状態の検体前処理試薬を用いる場合には、予め水性媒体で溶解した後、検体の前処理に用いることができる。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体等が挙げられる。水性媒体には、前述の金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質等が含有されてもよい。

30

【0143】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0144】

[参考例] 抗アルドステロン抗体の作製

40

(1) 免疫原の作製

ALDOSTERONE 3-CMO（アルドステロン 3-カルボキシメチルオキシム；STERALOIDS社製）をジメチルスルホキシド（DMSO）（シグマアルドリッチ社製）で溶解して調製した、100 mg/mL ALDOSTERONE 3-CMOのDMSO溶液（25 μ L）に、10 mg/mL KLH（Keyhole limpet hemocyanin；サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）のPBS溶液（2 mL）、100 mg/mL EDC [1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩；サーモフィッシャーサイエンティフィック社製] のDMSO溶液（50 μ L）、及び、100 mg/mL NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド；サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）のDMSO溶液（10 μ L）を添加して混合し、4 で16時間反応させて、ALDOSTERONE 3-CMOとKLHとを結合させ、KLH結合ALDOSTERONE 3-CMO溶液を調製した。調製したKLH結合ALDOSTERONE 3-CMO溶液について、PBS

50

溶液で平衡化したPD-10カラム（GEヘルスケア・ジャパン社製）を用いて溶媒の置換を行い、KLH結合ALDOSTERONE 3-CMOのPBS溶液を調製した。得られたKLH結合ALDOSTERONE 3-CMOのPBS溶液を免疫原とした。

【0145】

（2）抗アルドステロンポリクローナル抗体の作製

上記（1）で調製したKLH結合ALDOSTERONE 3-CMOを0.5 mg含む免疫原をアジュバントと混合してエマルジョン化し、得られたKLH結合ALDOSTERONE 3-CMOのエマルジョンを計4回、ウサギ（NZW種）へ皮下注射した。1回目の免疫に際しては、アジュバントとしてFreund's Complete Adjuvant（シグマアルドリッチ社製）を使用し、2～4回目の免疫に際しては、アジュバントとしてFreund's Incomplete Adjuvant（シグマアルドリッチ社製）を使用し、2週間間隔で計4回免疫を行った後に採血し、血清中の抗体価をELISAにて評価した。血清中の抗体価が上昇していることを確認した後、更に、アジュバントとしてFreund's Incomplete Adjuvant（シグマアルドリッチ社製）を使用し、2週間間隔で2回免疫を行った。最終免疫の後に採血し、この抗血清を、プロテインAセファロース（GEヘルスケア・ジャパン社製）を用いて精製し、抗アルドステロンポリクローナル抗体を得た。

【実施例1】

【0146】

以下のストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液、及び、アルドステロン標準溶液からなるアルドステロン測定用キットA、B、C、D及びEを作製した。

【0147】

<ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液>

磁性粒子として、ストレプトアビジンが結合した市販の磁性粒子（Dynabeads M-280 Streptavidin：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、以下の組成からなる磁性粒子懸濁液を調製した。

【0148】

緩衝剤（I）	125 mmol/L（第1表、第2表参照）
ストレプトアビジン結合磁性粒子	0.7 mg/mL
B S A	0.1 %
ツィーン20	1.0 %

【0149】

<ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液>

参考例で得られた抗アルドステロンポリクローナル抗体を用いて、当該抗体とNHS-ビオチン（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）とを混合し、37℃で1時間反応させ、反応後の混合物をセファデックスG-50カラム（GEヘルスサイエンス・ジャパン社製）に供して未反応のNHS-ビオチンを除去し、ビオチン結合抗アルドステロンポリクローナル抗体を調製した。得られたビオチン結合抗アルドステロンポリクローナル抗体を用いて、以下の組成からなるビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液を調製した。

【0150】

緩衝剤（I）	125 mmol/L（第1表、第2表参照）
ビオチン結合抗アルドステロン抗体	22.5 ng/mL
B S A	1.0 %

【0151】

<アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液>

ALDOSTERONE 3-CMO（STERALOID社製）を、DMSO-水（3:1）の混合溶媒中で、Sulfo-NHS（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）及びEDC [1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩；サーモフィッシャーサイエンティフィック社製]と混合し、25℃で15分間、反応させた後、さらにアルカリホスファターゼ（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）と、4℃で16時間反応させた。反応混合物をセファデックスG-50カラム（GEヘルスケア・ジャパン社製）に供して未反応のALDOSTERONE 3-CMOを除去し

10

20

30

40

50

、アルカリホスファターゼ標識化競合物質を得た。得られたアルカリホスファターゼ標識競合物質を用いて、以下の組成からなるアルカリホスファターゼ標識競合物質溶液を調製した。

【 0 1 5 2 】

緩衝剤 (I)	20 mmol / L (第 1 表、第 2 表参照)
アルカリホスファターゼ標識競合物質	1.5 μ g / mL
B S A	0.1 %
ツィーン 2 0	1.0 %
塩化マグネシウム・6水和物	30 mmol / L

【 0 1 5 3 】

< アルドステロン標準溶液 >

アルドステロン (シグマアルドリッチ社製) を、脱脂処理された血漿 [Human Plasma, Defibrinated, Delipidized double charcoal stripped (Golden West Biologicals社製)] で希釈して調製した、アルドステロン濃度が 0, 16, 40, 80, 160, 400, 1600 pg / mL の各濃度のアルドステロン溶液を、検量線作成用のアルドステロン標準溶液とした。

【 0 1 5 4 】

なお、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液における緩衝剤は、全て同一種類を用いた。

【 0 1 5 5 】

[比較例 1]

実施例 1 の緩衝剤 (I) の代わりに、リン酸緩衝液、T r i s 緩衝液またはクエン酸緩衝液を用いる以外は同様の方法を用いて、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液を調製し、各ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液及び実施例 1 のアルドステロン標準溶液からなるキット a、b 及び c を作製した。

【 実施例 2 】

【 0 1 5 6 】

(1) 検量線の作成

反応容器に、実施例 1 の各アルドステロン標準溶液 (10 μ L)、及び、実施例 1 のビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液 (50 μ L) を添加して攪拌し、37 °C で 18 時間反応させた後、当該反応の反応液に、実施例 1 のストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液 (30 μ L) 及びアルカリホスファターゼ標識競合物質溶液 (30 μ L) を加えて攪拌し、37 °C で 8 時間反応させた。磁性粒子を磁力で集めて、磁性粒子以外の反応溶液を除去した後、反応容器に洗浄液 [0.1% ツィーン 20 を含有する 50 mmol / L MOPS 緩衝液 (pH 7.35)] を添加し、磁性粒子を洗浄した。磁性粒子を磁力で集めて、磁性粒子以外の溶液を除去した後、反応容器に洗浄液を添加し、磁性粒子を洗浄した。この集磁、磁性粒子以外の溶液の除去、洗浄液による磁性粒子の洗浄という一連の操作を 5 回行った後、9- (4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン) -10-メチルアクリダン・二ナトリウム塩を主成分とする発光基質液 (70 μ L) を加えて攪拌し、生じた発光量 (RLU) を測定し、アルドステロン濃度と発光量 (RLU) との関係を表す検量線 1 を作成した。

【 0 1 5 7 】

実施例 1 のキットの各アルドステロン標準溶液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液の代わりに、比較例 1 の各アルドステロン標準溶液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液を用いる以外は前述と同様の方法により、アルドステロン濃度と発光量 (RLU) との関係を表す検量線 2 を作成した。

【 0 1 5 8 】

(2) 検体中のアルドステロン濃度の決定～相関性試験

実施例1及び比較例1の各アルドステロン標準溶液の代わりに、原発性アルドステロン症患者、及び、健常人から採取された13の血清又は血漿検体を用いる以外は、(1)と同様の方法により、当該13の各検体に対する発光量(RLU)を測定した。各検体に対して得られた発光量(RLU)と、(1)で作成した検量線とから、各検体中のアルドステロン濃度を決定した。なお、実施例1のキットを用いてアルドステロンの濃度を決定する場合は、検量線として検量線1を用い、比較例1のキットを用いてアルドステロンの濃度を決定する場合は、検量線として検量線2を用いた。

【0159】

また、市販のアルドステロン測定用キット「スパック-S アルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いて、当該キットの添付文書に記載された測定手順に従って測定を行い、当該13の各検体中のアルドステロン濃度を決定した。

正確な測定ができていないか否かを判断する方法の1つとして、相関性試験がある。当該試験は、既存の体外診断用医薬品と、当該体外診断用医薬品と比較したい評価試薬とを用いて、複数の同一の検体を測定し、それぞれの試薬を用いた測定により得られた測定値から、統計学的に相関式($Y = aX + b$)及び相関係数(r)を算出し、その結果を評価する試験である。前記相関式における傾き「 a 」が1.0に近く、かつ、相関係数(r)が1.0に近い程、既存の体外診断用医薬品における測定値と、評価試薬における測定値とが同じであり、正確な測定ができていないことを示していることとなる。

【0160】

実施例1のキット又は比較例1のキットを用いるアルドステロンの測定と、「スパック-S アルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いるアルドステロンの測定との間の相関式の傾き、及び、相関係数を第1表に示す。

【0161】

【表1】

第1表	キット							
	A	B	C	D	E	a	b	c
緩衝剤	BES	HEPES	Bis-Tris	PIPES	MES	リン酸	Tris	クエン酸
	緩衝剤(I)	緩衝剤(I)	緩衝剤(I)	緩衝剤(I)	緩衝剤(I)			
pH	7.5	7.5	6.5	6.5	6.5	7.5	7.5	6.2
傾き	1.00	1.05	1.05	0.96	0.96	0.80	0.81	1.37
相関係数	0.98	0.99	0.99	0.97	0.99	0.82	0.95	0.90

【0162】

第1表から明らかな様に、キットa～cの各キットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、非イオン性界面活性剤のみを用い、緩衝剤(I)を用いないアルドステロンの測定は、「スパック-S アルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いるアルドステロンの測定との間の相関式の傾きが0.80、0.81、1.37であり、正確な測定ができないのに対して、キットA～Eの各キットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、緩衝剤(I)及び非イオン性界面活性剤を用いる本発明のアルドステロンの測定は、「スパック-S アルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いるアルドステロンの測定との間の相関式の傾きが0.96～1.05であり、ほぼ1.0に近く、また、相関係数も0.97～0.99であり、ほぼ1.0に近かった。従って、緩衝剤(I)及び非イオン性界面活性剤を用いる本発明のアルドステロンの測定方法は、正確にアルドステロンを測定できる方法であることが判明した。

【実施例3】

【0163】

実施例 1 のキット A ~ E、及び、比較例 1 のキット a ~ c の各キットを用いるアルドステロンの測定における、コルチコステロン、コルチゾール及びコルチゾンの各交差反応性物質に対する交差反応性を評価した。コルチコステロン、コルチゾール及びコルチゾンはいずれも、アルドステロンと構造が類似したステロイドホルモンである。

各交差反応性物質を、脱脂処理された血漿[Human Plasma, Defibrinated, Delipidized double charcoal stripped (Golden West Biologicals社製)]で希釈して調製した、 $10 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ ($=1 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^8 \text{pg/mL}$) の各交差反応性物質溶液を検体として用いて、実施例 2 の (2) の方法に従って測定を行い、以下の式により、各交差反応性物質に対する交差率を決定した。その結果を第 2 表に示す。

【 0 1 6 4 】

10

【 数 1 】

$$\text{交差率(\%)} = \frac{\text{検出された交差反応性物質の濃度 (pg/mL)}}{\text{添加した交差反応物質の濃度 (pg/mL)}} \times 100$$

【 0 1 6 5 】

交差率は、本来測定すべきではない交差反応性物質を測定してしまう割合を示す指標であるので、交差率が低いほど、アルドステロンを特異的に検出することができ、正確な測定ができていることを示している。

【 0 1 6 6 】

20

【表 2】

第2表	キット							
	A	B	C	D	E	a	b	c
緩衝剤	BES	HEPES	Bis-Tris	PIPES	MES	リン酸	Tris	クエン酸
	緩衝剤(Ⅰ)	緩衝剤(Ⅰ)	緩衝剤(Ⅰ)	緩衝剤(Ⅰ)	緩衝剤(Ⅰ)			
pH	7.5	7.5	6.5	6.5	6.5	7.5	7.5	6.2
コルチコステロン	0.00100%	0.00091%	0.00099%	0.00101%	0.00103%	0.00091%	0.00276%	0.00224%
コルチゾール	0.00002%	0.00002%	0.00002%	0.00002%	0.00002%	0.00002%	0.00011%	0.00009%
コルチゾン	0.00005%	0.00004%	0.00005%	0.00008%	0.00006%	0.00003%	0.00236%	0.00172%

【 0 1 6 7 】

第2表から明らかな通り、キットb～cの各キットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、非イオン性界面活性剤のみを用い、緩衝剤(Ⅰ)を用いないアルドステロンの測定に比較して、キットA～Eの各キットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、緩衝

10

20

30

40

50

剤（Ⅰ）及び非イオン性界面活性剤を用いるアルドステロンの測定においては、各交差反応性物質に対する交差反応性が抑制されていた。従って、緩衝剤（Ⅰ）及び非イオン性界面活性剤を用いる本発明のアルドステロンの測定方法は、正確にアルドステロンを測定できる方法であることが判明した。

【実施例 4】

【0168】

以下のストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液、及び、アルドステロン標準溶液からなるアルドステロン測定用キット F～Q を調製した。

【0169】

10

<ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液>

磁性粒子として、ストレプトアビジンが結合した市販の磁性粒子（Dynabeads M-280 Streptavidin：サーモフィッシュサイエンティフィック社製）を用いて、以下の組成からなるストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液（pH6.5）を調製した。

【0170】

BES	125 mmol/L
ストレプトアビジン結合磁性粒子	0.7 mg/mL
BSA	0.1%
界面活性剤（第3表参照）	

【0171】

20

<ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液>

参考例で得られた抗アルドステロンポリクローナル抗体を用いて、実施例1と同様の方法で得られたビオチン結合抗アルドステロン抗体を用いて、以下の組成からなるビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液（pH6.5）を調製した。

【0172】

BES	125 mmol/L
ビオチン結合抗アルドステロン抗体	22.5 ng/mL
BSA	0.1%

【0173】

<アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液>

30

実施例1と同様の方法で作製したアルカリホスファターゼ標識競合物質を用いて、以下の組成からなるアルカリホスファターゼ標識競合物質溶液（pH7.5）を調製した。

【0174】

TES	20 mmol/L
アルカリホスファターゼ標識競合物質	1.5 µg/mL
BSA	0.1%
界面活性剤（第3表参照）	
塩化マグネシウム・6水和物	30 mmol/L

【0175】

<アルドステロン標準溶液>

40

実施例1と同様の方法で、アルドステロン濃度が0, 16, 40, 80, 160, 400, 1600 pg/mLの各濃度のアルドステロン溶液を調製し、当該溶液を検量線作成用のアルドステロン標準溶液とした。

【0176】

なお、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液中の界面活性剤と、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液中の界面活性剤とは、種類も濃度も同じものを用いた。

【0177】

[比較例 2]

実施例4のキットの、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液の代わりに、界面活性剤を含まないストレプトアビジン結合磁

50

性粒子懸濁液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液を調製し、界面活性剤を含まないストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、界面活性剤を含まないアルカリホスファターゼ標識競合物質溶液及び実施例4のアルドステロン標準溶液からなるキットdを作製した。

【実施例5】

【0178】

(1) 検量線の作成

反応容器に、実施例4の各アルドステロン標準溶液(10 μ L)、及び、実施例4のビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液(50 μ L)を添加して攪拌し、37 $^{\circ}$ Cで18分間反応させた後、当該反応の反応液に、実施例4のストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液(30 μ L)及びアルカリホスファターゼ標識競合物質溶液(30 μ L)を加えて攪拌し、37 $^{\circ}$ Cで8分間反応させた。磁性粒子を磁力で集めて、磁性粒子以外の反応溶液を除去した後、反応容器に洗浄液[0.1%ツイーン20を含有する50 mmol/L MOPS緩衝液(pH7.35)]を添加し、磁性粒子を洗浄した。磁性粒子を磁力で集めて、磁性粒子以外の溶液を除去した後、反応容器に洗浄液を添加し、磁性粒子を洗浄した。この集磁、磁性粒子以外の溶液の除去、洗浄液による磁性粒子の洗浄という一連の操作を5回行った後、9-(4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン)-10-メチルアクリダン・ニナトリウム塩を主成分とする発光基質液(70 μ L)を加えて攪拌し、生じた発光量(RLU)を測定し、アルドステロン濃度と発光量(RLU)との関係を表す検量線3を作成した。

【0179】

実施例4のキットのアルドステロン標準溶液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液の各溶液又は懸濁液の代わりに、比較例2のアルドステロン標準溶液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、ストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液の各溶液又は懸濁液を用いる以外は前述と同様の方法により、アルドステロン濃度と発光量(RLU)との関係を表す検量線4を作成した。

【0180】

(2) 検体中のアルドステロン濃度の決定～相関性試験

実施例4及び比較例2の各アルドステロン標準溶液の代わりに、原発性アルドステロン症患者、及び、健常人から採取された13の血清又は血漿検体を用いる以外は、(1)と同様の方法により、当該13の各検体に対する発光量(RLU)を測定した。各検体に対して得られた発光量(RLU)と、(1)で作成した検量線とから、各検体中のアルドステロン濃度を決定した。なお、実施例4のキットを用いてアルドステロンの濃度を決定する場合は、検量線として検量線3を用い、比較例2のキットを用いてアルドステロンの濃度を決定する場合は、検量線として検量線4を用いた。

【0181】

また、市販のアルドステロン測定用キット「スパック-S アルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いて、当該キットの添付文書に記載された測定手順に従って測定を行い、当該13の各検体中のアルドステロン濃度を決定した。

実施例4及び比較例2で調製したストレプトアビジン結合磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗アルドステロン抗体溶液、及び、アルカリホスファターゼ標識競合物質溶液を用いるアルドステロンの測定と、「スパック-S アルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いるアルドステロンの測定との間の相関式の傾き、及び、相関係数を第3表に示す。

【0182】

【表 3】

第3表

キット	界面活性剤		濃度(%)	傾き	相関係数
d	—		0.00	1.30	0.97
F	Tween 20	ホ ^リ オキシエチレンソルビタンモノラウレート	1.84	1.08	1.00
G	ノニオン OT-221	ホ ^リ オキシエチレンソルビタンモノオレート	1.00	1.04	0.99
H	ノニデット P-40	ホ ^リ オキシエチレンノニルフェニルエーテル	1.00	0.97	0.99
I	Triton X-705	ホ ^リ オキシエチレンオクチルフェニルエーテル	1.40	0.86	1.00
J	ナイミーン S220	ホ ^リ オキシエチレンステアリルアミン	1.00	1.01	0.99
K	ノニオン E230	ホ ^リ オキシエチレンオレイルエーテル	2.00	1.07	0.99
L	ニューコール 740	ホ ^リ オキシエチレン多環フェニルエーテル	2.00	0.90	0.99
M	プロノン 208	ホ ^リ オキシエチレンホ ^リ オキシプロピレン縮合物	3.00	1.16	0.97
N	デオキシコール酸		0.05	1.12	0.98
O	パーソフト EP	ホ ^リ オキシエチレンラウリルエーテル硫酸エステルナトリウム塩	1.00	1.00	0.99
P	CHAPS	3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホネート	1.00	1.05	0.99
Q	GLM-R-LV	2-アルキル-N(カルボキシメチル)-N-(ヒドロキシエチル)イミダゾリウム ペプタイン	0.20	1.21	1.00

第3表から明らかな様に、キットdのキットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、緩衝剤(Ⅰ)のみを用い、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤のいずれの界面活性剤も用いないアルドステロンの測定は、「スパック-Sアルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いるアルドステロンの測定との間の相関式の傾きが1.30であり、正確な測定ができないのに対して、キットF~Qの各キットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、緩衝剤(Ⅰ)、並びに、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を用いる本発明のアルドステロンの測定は、「スパック-Sアルドステロン キット」(富士レビオ社製)を用いるアルドステロンの測定との間の相関式の傾きが0.86~1.21であり、ほぼ1.0に近く、また、相関係数も0.97~1.00であり、ほぼ1.0に近かった。従って、緩衝剤(Ⅰ)、並びに、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を用いる本発明のアルドステロンの測定方法は、正確にアルドステロンを測定できる方法であることが判明した。

10

【実施例6】**【0184】**

実施例4のキットF~Q、及び、比較例2のキットdの各キットを用いるアルドステロンの測定における、プロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾール及びコルチゾンの各交差反応性物質に対する交差反応性を評価した。プロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾール及びコルチゾンはいずれも、アルドステロンと構造が類似したステロイドホルモンである。

20

【0185】

各交差反応性物質を、脱脂処理された血漿[Human Plasma, Defibrinated, Delipidized double charcoal stripped (Golden West Biologicals社製)]で希釈して調製した、 $10 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ ($=1 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^8 \text{pg/mL}$)の各交差反応性物質溶液を検体として用いて、実施例5の(2)の方法に従って測定を行い、実施例3と同じ式により、各交差反応性物質に対する交差率を決定した。その結果を第4表に示す。

【0186】

【表 4】

第4表

キット	界面活性剤	交差反応性物質に対する交差率(%)			
		プロゲステロン	コルチコステロン	コルチゾール	コルチゾン
d	—	0.00241	0.00330	0.00008	0.00019
F	Tween20	0.00039	0.00102	0.00002	0.00005
G	ノニオン OT-221	0.00036	0.00100	0.00003	0.00008
H	NP-40	0.00023	0.00083	0.00002	0.00003
I	TritonX-705	0.00026	0.00079	0.00002	0.00004
J	ナイミーン S220	0.00037	0.00122	0.00003	0.00005
K	ノニオン E230	0.00040	0.00140	0.00003	0.00007
L	ニューコール 740	0.00043	0.00125	0.00003	0.00005
M	プロノン 208	0.00162	0.00212	0.00006	0.00013
N	デオキシコール酸	0.00122	0.00237	0.00006	0.00011
O	パーソフト EP	0.00043	0.00125	0.00002	0.00009
P	CHAPS	0.00027	0.00117	0.00002	0.00006
Q	GLM-R-LV	0.00074	0.00179	0.00003	0.00008

【 0 1 8 7 】

第4表から明らかな通り、キットdを用いるアルドステロンの測定、すなわち、緩衝剤（I）のみを用い、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤のいずれの界面活性剤も用いない、アルドステロンの測定に比較して、キットF～Qの各キットを用いるアルドステロンの測定、すなわち、緩衝剤（I）と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも

10

20

30

40

50

1種の界面活性剤とを用いるアルドステロンの測定においては、各交差反応性物質に対する交差反応性が抑制されていた。従って、緩衝剤（Ⅰ）と、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、及び、両性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤とを用いる本発明のアルドステロンの測定方法は、正確にアルドステロンを測定できる方法であることが判明した。

【産業上の利用可能性】

【0188】

本発明により、臨床診断に有用な、検体中のステロイドホルモンの測定方法、測定用試薬、及び、測定用キットが提供される。

フロントページの続き

- (72)発明者 山口 雄平
静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内
- (72)発明者 大屋 沙織
静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内
- (72)発明者 永井 豪
静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

審査官 小澤 理

- (56)参考文献 特開2013-200208(JP,A)
国際公開第2008/100161(WO,A1)
特表2006-508351(JP,A)
Thermo Fisher Scientific Inc., Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook, カタログ, 2011年, No.1602127, Ver.2, p.5
前田, 外, 酵素結合抗体法(ELISA)によるキュウリモザイクウイルスの検出, 農学研究, 1986年, Vol.61, p.119-127
清水, 外, 病理標本における免疫組織化学の基礎(5), 日医大医学誌, 2010年, Vol.6, No.3, p.140-146
AL-DUJAILI, E. A. S. et al., Physiological and pathophysiological applications of sensitive ELISA methods for urinary deoxycorticosterone and corticosterone in rodents, Steroids, 2009年, Vol.74, No.12, p.938-944

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53
G01N 33/543
Caplus/REGISTRY(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)