(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3553656号
(P3553656)
(45)発行日　平成16年8月11日(2004.8.11)　(24)登録日　平成16年5月14日(2004.5.14)

(51)Int.Cl.[7]	F I
G01N 33/579	G01N 33/579
C12Q 1/34	C12Q 1/34
C12Q 1/37	C12Q 1/37

請求項の数 8　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願平6-216295
(22)出願日　平成6年9月9日(1994.9.9)
(65)公開番号　特開平7-128337
(43)公開日　平成7年5月19日(1995.5.19)
審査請求日　平成13年9月3日(2001.9.3)
(31)優先権主張番号　特願平5-248550
(32)優先日　平成5年9月10日(1993.9.10)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　000195524
生化学工業株式会社
東京都中央区日本橋本町２丁目１番５号
(74)代理人　100105647
弁理士　小栗　昌平
(74)代理人　100105474
弁理士　本多　弘徳
(74)代理人　100108589
弁理士　市川　利光
(74)代理人　100115107
弁理士　高松　猛
(74)代理人　100090343
弁理士　濱田　百合子
(72)発明者　田中　重則
東京都小平市小川西町五丁目３番１５号
最終頁に続く

(54)【発明の名称】（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
三重らせん構造を主体とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンを含み得る試料を、強アルカリ性条件下で３０℃～６０℃で５～３０分間前処理し、反応妨害因子として試料中に含まれる可能性のある、エンドトキシン単独またはエンドトキシンとＧ因子系反応妨害因子とを破壊もしくは不活性化した後、リムルス試薬によるリムルス反応に付すことを特徴とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。
【請求項２】
リムルス試薬が非特異的リムルス試薬であることを特徴とする請求項１記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。
【請求項３】
アルカリ金属水酸化物を試料中に存在させて強アルカリ性条件下とする請求項１または２記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。
【請求項４】
試料中のアルカリ金属水酸化物の濃度を０．０３～２．０モル／Ｌの条件下で前処理する請求項３記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。
【請求項５】
三重らせん構造を主体とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンと金属イオンとを含み得る試料を、キレート剤の存在下において強アルカリ性条件下で３０℃～６０℃で５～３０分間前処理し、反応妨害因子として試料中に含まれる可能性のある、エンドトキシン単独また

はエンドトキシンとＧ因子系反応妨害因子とを破壊もしくは不活性化した後、リムルス試薬によるリムルス反応に付すことを特徴とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。

【請求項６】
三重らせん構造を主体とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンと金属イオンとを含み得る試料を、キレート剤の存在下において強アルカリ性条件下で前処理した後、リムルス試薬によるリムルス反応に付すことを特徴とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。

【請求項７】
前記前処理を、試料にキレート剤を添加後、強アルカリ性条件下で行うか、または試料にキレート剤を添加する際に強アルカリ性条件下とする請求項６記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。

【請求項８】
リムルス試薬が、カブトガニ血リンパ凝固系のＣ因子系成分を実質的に含まないか、あるいはＣ因子系反応が阻害され、エンドトキシンと反応せず、（１→３）－β－Ｄ－グルカンに特異的なものである、請求項７記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、（１→３）－β－Ｄ－グルカン（以下「β－グルカン」ともいう）の測定方法に関する。特に、反応妨害因子として試料中に含まれる可能性のある、リムルスＣ因子系反応に関与するエンドトキシン（以下「Ｅｔ」とも記す）単独またはＥｔおよびリムルスＧ因子とβ－グルカンとの特異的反応を妨害する反応妨害因子（以下「Ｇ因子系反応妨害因子」ともいう）の双方を含む可能性のある試料中あるいはリンゲル液、透析液等の金属イオンを含み得る試料中のβ－グルカンをリムルス試薬を用いて高い精度で測定できる方法に関するものである。

【０００２】
【従来の技術】
リムルス試薬に含まれるカブトガニ・アメボサイト・ライセート（以下単に「ライセート」ともいう）には、Ｅｔと反応して活性化されるカスケードタイプの凝固系（Ｃ因子系）とβ－グルカンと反応して活性化されるカスケードタイプの凝固系（Ｇ因子系）とが共存しており（図１）、ライセートはβ－グルカンだけでなく、Ｅｔとも反応する。前者の系のみを利用してＥｔを特異的に測定する方法、後者の系のみを利用してβ－グルカンを特異的に測定する方法がそれぞれ知られている（Ｏｂａｙａｓｈｉ Ｔ. ｅｔ ａｌ., Ｃｌｉｎ. Ｃｈｉｍ. Ａｃｔａ, １４９, ５５－６５（１９８５））。

【０００３】
また、真菌感染症の患者は血液中のβ－グルカンが増加し、血液中のβ－グルカンを測定することによって真菌感染症を診断できることも知られている。
このようなＧ因子系を利用するβ－グルカン測定法は、検出感度が非常に高いため生体試料中の微量検出に適しており、特に深在性真菌感染症の診断への有効性が検討確認され、臨床検査に使用され始めている。

【０００４】
β－グルカンのＧ因子に対する反応は、分子量のみならず、その高次構造が関与し、三重らせん構造をとるものはＧ因子を活性化せず、一重らせん構造をとるときＧ因子を活性化することが知られている（Ｓａｉｔｏ Ｈ. ｅｔ ａｌ., Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ. Ｒｅｓ., ２１７, １８１－１９０（１９９１）；Ｔａｎａｋａ Ｓ. ｅｔ ａｌ., Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ. Ｒｅｓ., ２１８, １６７－１７４（１９９１）；Ａｋｅｔａｇａｗａ Ｊ. ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｂｉｏｃｈｅｍ., １１３, ６８３－６８６（１９９３））。一方、β－グルカンは、天然には、その最も安定な形である三重らせん構造で存在していることが多く、かつＥｔと共存している場合が多い。

【０００５】

そのため、ライセート全体を原料にしている通常のリムルス試薬（非特異的リムルス試薬）では、Ｇ因子系とＣ因子系が存在しているため、β－グルカンだけでなくＥｔとも反応してしまい、β－グルカンの測定はできなかった。
これを解決するために、従来は、ライセートからＧ因子系成分を分画、再構成すること（例えば、Ｏｂａｙａｓｈｉ　Ｔ．　ｅｔ　ａｌ．，　前出）、またはＣ因子を特異的に阻害または吸着、除去すること（例えば、ＷＯ９１／１９９８１、ＷＯ９２／１６６５１）により、Ｃ因子系成分を実質的に含まないか、あるいはＣ因子系反応が阻害されて、エンドトキシンと反応しないβ－グルカン特異的リムルス試薬として試料中のβ－グルカンを測定していた。

【０００６】

また、上記のようなＧ因子系の分画・再構成、Ｃ因子系の吸着除去または特異的阻害等の手段によらず、試料に前処理を施すことによってＥｔを不活性化した後、ライセートを作用させ、β－グルカンを測定する方法が提案されている（特開平２－１４１６６６号公報）。この方法は、被検試料液を加熱処理するものであるが、現実には１００℃、２時間の処理が必要であり、かつ、この処理では三重らせん構造のβ－グルカンは、一重らせん構造にほとんど変換せず、従ってβ－グルカンの全量を測定できない。

【０００７】

ところで、生体試料、特に血液中のβ－グルカンをライセートのＧ因子系によるカスケード反応を利用して測定する場合には、該反応がライセート中のセリンプロテアーゼの反応を利用するため、血液中に含まれる種々のＧ因子系反応妨害因子（例えば、トロンビンやＸａ因子はライセート中の凝固酵素と類似の作用を示すため、偽陽性因子となり、α_2－プラスミンインヒビター、α_1－アンチトリプシンおよびアンチトロンビンＩＩＩはＧ因子系反応を強力に阻害し、偽陰性因子となる）を失活あるいは除去するための前処理が必要である。

【０００８】

この目的のために従来は、血液試料から多血小板血漿（ＰＲＰ）を調製し、これに過塩素酸を加えて３７℃で加温処理した後に、変性析出物を遠心分離して除去し、その上澄液を採取し、アルカリで中和して被検液とする方法が採用されていた（Ｏｂａｙａｓｈｉ　Ｔ．　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｌａｂ．　Ｃｌｉｎ．　Ｍｅｄ．　１０４，　３２１－３３０１（１９８４））　が、変性析出物の分離操作が煩雑で全操作工程も多く、操作中に反応系に影響を与える物質による汚染の危険性があるなどの問題があった。

【０００９】

そこで、本発明者は、先に遠心分離操作が不要でかつ迅速な前処理方法として、アルカリ金属水酸化物で処理する方法等（特願平５－１００４２６号明細書）を提案した。
しかし、先の出願ではリムルス反応妨害因子の除去が主眼であり、Ｅｔとβーグルカンをそれぞれ特異的に測定する場合には、各物質に対して特異的な特別なライセート試薬を用いる必要があった。すなわち、該方法の長所を維持しながら、Ｅｔの不活化とＧ因子系反応妨害因子の不活化とを同時に満足する条件は見出すことができず、ＥｔおよびＧ因子系反応妨害因子存在下で非特異的リムルス試薬を用いてβ－グルカンを測定することは困難であった。また、そのような試料条件で、かつβ－グルカンが三重らせん構造をとっていると、非特異的リムルス試薬を使用した場合、これを十分に再現性よく測定することは更に困難であった。
一方、リンゲル液、リン酸緩衝生理食塩水、細胞培養用培地および血液透析における透析液などの金属イオンを含み得る試料中のβ－グルカンをリムルス試薬を用いて測定する場合、これらの試料中のβ－グルカンが三重らせん構造であると、この構造が安定化され、Ｇ因子系反応が十分に進行しないため、β－グルカンの全量を正確に測定できいないという問題があった。

【００１０】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の従来の問題点を解決しようとするもので、試料中にエンドトキシンおよ

び／またはＧ因子系反応妨害因子を含み、かつ試料中のβ－グルカンが三重らせん構造をとる場合においてもリムルス試薬として非特異的リムルス試薬を用いることができる前処理法を提供すると共にβ－グルカンを極めて高い検出率で迅速に効率よく測定できる方法を提供する。
さらに、本発明は、試料中に金属イオンを含み、かつ試料中にβ－グルカンが三重らせん構造をとる場合においても、β－グルカンの三重らせん構造がＧ因子活性化能を有する構造に変換されて、β－グルカンを極めて高い検出率で迅速に効率よく測定できる方法を提供する。

【００１１】

【課題を解決するための手段】

本発明は、（１） 三重らせん構造を主体とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンを含み得る試料を、強アルカリ性条件下で３０℃～６０℃で５～３０分間前処理し、反応妨害因子として試料中に含まれる可能性のある、エンドトキシン単独またはエンドトキシンとＧ因子系反応妨害因子とを破壊もしくは不活性化した後、リムルス試薬によるリムルス反応に付すことを特徴とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法、（２）リムルス試薬が非特異的リムルス試薬であることを特徴とする前記（１）記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法、（３） アルカリ金属水酸化物を試料中に存在させて強アルカリ性条件下とする前記（１）または（２）記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法、（４）試料中のアルカリ金属水酸化物濃度を０．０３～２．０モル／Ｌの条件下で前処理することを特徴とする前記（３）に記載の測定方法、（５）三重らせん構造を主体とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンと金属イオンとを含み得る試料を、キレート剤の存在下において強アルカリ性条件下で３０℃～６０℃で５～３０分間前処理し、反応妨害因子として試料中に含まれる可能性のある、エンドトキシン単独またはエンドトキシンとＧ因子系反応妨害因子とを破壊もしくは不活性化した後、リムルス試薬によるリムルス反応に付すことを特徴とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法、（６）三重らせん構造を主体とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンと金属イオンとを含み得る試料を、キレート剤の存在下において強アルカリ性条件下で前処理した後、リムルス試薬によるリムルス反応に付すことを特徴とする（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法、（７）前記前処理を、試料にキレート剤を添加後、強アルカリ性条件下で行うか、または試料にキレート剤を添加する際に強アルカリ性条件下とする前記（６）記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法、（８）リムルス試薬が、カブトガニ血リンパ凝固系のＣ因子系成分を実質的に含まないか、あるいはＣ因子系反応が阻害され、エンドトキシンと反応せず、（１→３）－β－Ｄ－グルカンに特異的なものである、前記（７）記載の（１→３）－β－Ｄ－グルカンの測定方法である。

【００１２】

以下本発明を具体的に説明する。
第一の本発明は、試料を強アルカリ性条件下で前処理することによって、エンドトキシン、Ｇ因子系反応妨害因子等の、リムルス試薬によってβ－グルカンを測定する際に反応を妨害する反応妨害因子を破壊もしくは不活性化させ、β－グルカンが三重らせん構造をとっている場合はこれを解いてＧ因子を活性化する構造に変換させ、次いでリムルス試薬と混合して、公知の方法で合成ペプチド基質の変化またはライセートのゲル化もしくはそれに伴う濁度の変化等を検出することにより、β－グルカンを測定するものである。
第二の本発明は、試料をキレート剤の存在下において強アルカリ性条件下で前処理することによって、リンゲル液、透析液等の金属イオンを含み得る試料中の金属イオンの影響を排除してβ－グルカンの三重らせん構造をＧ因子活性化能を有する構造に変換させ、次いでリムルス試薬を用いて上記と同様にβ－グルカンを測定するものである。

【００１３】

本発明において対象とする「試料」とはβ－グルカンを測定しようとする試料であれば、特に制限はないが、特に反応妨害因子を含む場合で、かつβ－グルカンが三重らせん構造である場合に有効である。ここで、「反応妨害因子」とは、Ｃ因子系反応を開始するＥｔ

のほかに、Ｇ因子系反応妨害因子、即ち、β－グルカンによって開始される図１に示したライセートのＧ因子系の段階的酵素反応（カスケード反応）のいずれかの段階においてβ－グルカンとは無関係に反応する前記偽陽性因子又は反応を阻害する偽陰性因子である。尚、Ｇ因子系反応妨害因子は、Ｃ因子系においても同様に機能するため、リムルス反応妨害因子ともいう。具体的には、β－グルカンを含有する水溶液、医薬品、リンゲル液、透析液、細胞培養用培地、緩衝液、生理食塩水などのほか、真菌由来のβ－グルカンが含まれる可能性のある真菌感染症患者の体液（血漿、血清、全血などの血液試料、尿、脊髄液、腹水など）が例示される。

【００１４】

リムルス試薬としては、上記第一の発明には非特異的リムルス試薬を使用できるが、Ｇ因子系反応に特異的な成分からなるか、あるいはＣ因子系反応が阻害され、Ｅｔと反応しないβ－グルカン特異的なリムルス試薬を使用することもできる。後者の使用は、β－グルカンの三重らせん構造の変換とＧ因子系反応妨害因子の除去を主眼に前処理できるから、Ｅｔの不活性化の条件を無視でき、前処理条件の寛容度が広がる効果がある。上記第二の発明においては、Ｅｔの破壊もしくは不活性化を必須要件としておらず、三重らせん構造の変換とＧ因子系反応妨害因子の除去を主眼とした前処理を行うので、Ｅｔを含む可能性のある試料を対象とする場合はβ－グルカン特異的なリムルス試薬を使用することが好ましい。

【００１５】

ここで、「非特異的リムルス試薬」とは、リムルス・ポリフェムス、タキプレウス・トリデンタツス、タキプレウス・ギガス、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ等のカブトガニの血リンパ液から、公知の方法（例えば、Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，８０，１０１１－１０２１（１９７６）参照）で調製した通常のカブトガニ・アメボサイト・ライセートを包含する意味であり、少なくとも図１のＧ因子系反応およびＣ因子系反応に関与する血リンパ凝固系のＧ因子系成分およびＣ因子系成分を含むものを言う。ただし、後述の合成ペプチド基質等を含むものでもかまわない。

ここで、「金属イオン」とは、β－グルカンの三重らせん構造がＧ因子活性化能を有する構造に変換されるのを阻害するか、あるいは変換されたβ－グルカンが三重らせん構造に戻るのを促進するような金属イオンであり、Mg^{2+}，　Ca^{2+}などのアルカリ土類金属のイオンやMn^{2+}，　Fe^{2+}，　Fe^{3+}，　Al^{3+}，　Ga^{3+}などの遷移元素のイオンである。

【００１６】

本発明において利用し得る非特異的リムルス試薬は前記のような機能を有するものであれば、製法、組成等には限定されない。

本発明に使用される前処理方法は、試料を強アルカリ性とすることが必須条件であるが、更に試料中に金属イオンが含有される場合には、強アルカリ性条件下で前処理する際にキレート剤を共存させる必要がある。これは強アルカリ処理によってβ－グルカンの三重らせん構造がＧ因子活性化能を有する構造に変換されるのを、ある種の金属イオン、すなわちMg^{2+}，　Ca^{2+}などのアルカリ土類金属のイオンやMn^{2+}，　Fe^{2+}，　Fe^{3+}，　Al^{3+}，　Ga^{3+}などの遷移元素のイオンが阻害するのを解除するためである。

試料を強アルカリ性とする方法に特に制限はないが、アルカリ金属の水酸化物を用いることが好ましい。その具体例としては、水酸化カリウム（ＫＯＨ）、水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）等が例示できる。

【００１７】

アルカリ金属水酸化物を用いる場合、その濃度としては、通常、０．０３～２．０モル／Ｌが例示できる。

キレート剤としては、試料中に含まれる金属イオンをキレート化合物に変換し、遊離の金属イオン濃度を上記の阻害作用を表す最低濃度以下にできるものであり、かつリムルス反応を阻害しない限り特に制限はないが、未知の金属イオンを含む試料を処理する場合には

、多くの金属イオンと安定で強固なキレート化合物を生成するものが好ましい。この様なキレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ニトリロ三酢酸、トランス－１，２－ジアミノシクロヘキサン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸、ジエチレントリアミン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’－五酢酸、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸、グリコールエーテルジアミン四酢酸、トリエチレンテトラミン六酢酸、ジアミノプロパノール四酢酸、ジアミノプロパン四酢酸、エチレンジアミンテトラキス（メチレンホスホン酸）、クエン酸、およびそれらのアルカリ塩が例示できる。

試料の前処理は、基本的には、試料を強アルカリ性にすることができるもの（以下単にアルカリともいう）および必要によりキレート剤を試料に添加混合することにより行うことができる。アルカリとキレート剤を共に添加するときの添加順序は、アルカリ添加後にキレート剤を添加しない限りいずれでもよいが、試料にキレート剤を添加した後、アルカリを添加する方が低濃度のキレート剤添加で試料中のβ－グルカンの構造変換が容易に起こる（これは強アルカリ性条件下では、金属イオンはキレート剤に配位するよりもβ－グルカンの分子鎖間に配位しやすく、三重らせんからの一重らせん構造等への変換を阻止するためと思われる。）。これらの前処理剤添加後、所望により、恒温槽中もしくはオートクレーブ中で、あるいは電子レンジ等を用いて高周波によって加温することもできる。この際の処理温度は、通常、０～１３５℃、特に３０～６０℃の範囲が好ましく、処理時間は１～６０分、特に５～３０分の範囲が好ましい。

【００１８】

本発明の方法により前処理された被検液中では、該処理前のβ－グルカンがＧ因子を活性化しない三重らせん構造であっても、その構造は迅速にＧ因子を活性化する構造に変換され、また仮に該処理前のβ－グルカンが三重らせん構造ではない、すでにＧ因子活性化能を有する状態のものであってもその構造は保持される。

【００１９】

すなわち、本発明において測定されるβ－グルカンは、特に制限されず、真菌類等に存在するものを含み、その分子構造、高次構造、由来等は特に制限はない。また、これらのβ－グルカンは、真菌感染症患者の体液中に含まれるものを包含する。

本発明においてβ－グルカンの三重らせん構造の他構造への変換は、具体的には^{13}Ｃ－ＮＭＲ等により確認できる。

【００２０】

上記の本発明の前処理剤で試料を処理した被検液は、次いでリムルス試薬と混合されるが、この混合液は、Ｇ因子系反応を完遂するために至適ｐＨ付近に調整されることが好ましく、通常ｐＨ７～９になるように従来公知の緩衝液により所望に調整される。なお、本発明の前処理で不活性化した偽陽性因子、偽陰性因子およびＥｔは、後述の実施例等から活性が再生することはないことが判明している。また、逆に、該前処理剤で処理された比較的高濃度の塩基性（アルカリ性）被検液と該Ｇ因子系成分との混合において、該前処理剤が該Ｇ因子系中の各成分に悪影響を与えることがないのも該緩衝作用によるものであると考えられる。

【００２１】

該反応混合液において、上記被検液のβ－グルカンを測定するには、前述したように図１のライセートのＧ因子系カスケード反応によって活性化されて生成するクロッティングエンザイムの基質に対するアミダーゼ活性またはプロテアーゼ活性を公知の方法で測定すればよい。ここで、基質とは、合成のものでも天然のものでも任意であり、クロッティングエンザイムによって加水分解されて容易に検出可能な生成物に導かれ、反応混合液に酵素反応に基づく変化を生じさせる基質であり、この変化を定性または定量的に測定できればかまわない。

【００２２】

例えば、合成ペプチド基質を含むリムルス試薬と前処理された被検液とを接触させて反応を行うことによってアミダーゼ活性を測定することができる。このような合成ペプチド基質としては、上記クロッティングエンザイムの基質となり得るペプチド（例えば、メトキ

シカルボニル－Ｄ－ヘキサヒドロチロシル－Ｇｌｙ－Ａｒｇ；Ｎ末端が保護されたＬｅｕ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ、Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ａｒｇ等の配列からなるペプチド）のＣ末端のアルギニンのカルボキシル基に発色性残基（例えば、ｐ－ニトロアニリン、ｐ－（Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノ）アニリン、ｐ－（Ｎ－エチル－Ｎ－β－ヒドロキシエチル）アニリン等）、発蛍光性残基（例えば、７－アミノ－４－メチルクマリン等）、発光性残基あるいはアンモニアなどがアミド結合により置換した合成ペプチド基質が例示される。すなわち、アミダーゼ活性の測定はクロッティングエンザイムがこれらの合成基質に作用して生成する反応生成物（ｐ－ニトロアニリン、アンモニア等）を測定することによって行うことができる。具体的には、Ｅｔの測定に採用されている方法を例示することができ、例えば、前記カスケード反応および必要に応じて生成物の他色素等への変換反応を行わせ、反応によって生成する色素、蛍光物質、発光物質またはアンモニアをそれぞれ分光光度計（特公昭６３－２６８７１、特公平３－６６３１９等）、蛍光光度計、発光測定装置、アンモニア検出用電極（特開昭６２－１４８８６０）等によってβ－グルカンを測定する方法が挙げられる。

【００２３】

一方、クロッティングエンザイムのプロテアーゼ活性の測定には、例えばリムルス試薬に含まれる通常の天然基質であるコアギュローゲンに、カスケード反応で生成したクロッティングエンザイムが作用してコアギュリンゲルが形成する反応を、例えば適当な機器（例えば、濁度測定装置、粘度測定装置等）で測定するか、または肉眼で判定するＥｔの測定に採用されている方法（特公平４－１４３１０等）を利用することができる。

【００２４】

本発明によるβ－グルカンの測定法は、真菌感染症、特に診断が極めて困難な深在性真菌感染症の早期診断に有用である。

すなわち、患者から採取した血液由来試料を本発明の前処理剤で処理した後、β－グルカンを測定し、血液中のβ－グルカンが正常値を有意に超えた時に、患者が真菌感染症に罹患していると判断することができる。

【００２５】

本発明においては、前記前処理剤とリムルス試薬の各種類を適宜組み合わせることにより、所望の測定用キットを構成することができる。該キットには、β－グルカンの一定量を含有する標準試薬、ブランク用蒸留水、反応試薬溶解・反応用緩衝液等を付加することができる。

該緩衝液としては、グッド緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳ（Ｎ－２－ヒドロキシエチルピペラジン－Ｎ′－２－エタンスルホン酸）緩衝液等）、トリス－塩酸緩衝液等が例示できる。

【００２６】

【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例１

１００％三重らせん構造からなるシゾフィラン（商品名ソニフィラン、科研製薬（株）販売、２μｇ／ｍＬ水溶液）０．１ｍＬとＥｔ（Ｅ．ｃｏｌｉ　０１１１：Ｂ４由来、Ｄｉｆｃｏ社販売、８０ｎｇ／ｍＬ水溶液）０．１ｍＬの混液に０．２ｍＬの各種濃度のＮａＯＨ水溶液（前処理剤）を加え、混合後、６０℃で１０分間加温した。これを注射用蒸留水で１０００倍希釈し、ソニフィラン０．５ｎｇ／ｍＬ、Ｅｔ０．０２ｎｇ／ｍＬ（Ｅｔが破壊されない場合の濃度）の溶液を調製した。これら処理液を被検液として、ブランクには注射用蒸留水を用いて、Ｅｔおよびβ－グルカンフリーのマイクロプレート（トキシペットプレート９６Ｆ、生化学工業（株）販売）のウェルに別々に５０μＬずつとった。

【００２７】

被検液に存在するβ－グルカンおよびＥｔの量は、以下の方法で定量した。前記Ｏｂａｙａｓｈｉ，Ｔ．らの方法に従って、カブトガニ・アメボサイト・ライセートから調製した

Ｇ因子系成分と発色合成基質（Ｂｏｃ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－ｐＮＡ（ｐ－ニトロアニリド））とを含むβ－グルカン特異的発色合成基質法リムルス試薬（以下「Ｇテスト」という）、または発色合成基質法非特異的リムルス試薬（トキシカラー、生化学工業（株）販売）、またはエンドトキシン特異的発色合成基質法リムルス試薬（エンドスペシー、生化学工業（株）販売）を使用し、被検液５０μＬ　に０．　２モル／Ｌ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．　６）で溶解したＧテスト液５０μＬ、または０．２モル／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．０）で溶解したトキシカラー液またはエンドスペシー液５０μＬを加え、３７℃で３０分間加温して反応させ、次いで０．　０４％（重量／容量）の亜硝酸ナトリウム（１モル／Ｌ　塩酸溶液）５０μＬ　、０．　３％（重量／容量）スルファミン酸アンモニウム５０μＬ　ならびに０．　０７％（重量／容量）Ｎ－１－ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩（１４％（容量／容量）Ｎ－メチル－２－ピロリドン溶液）５０μＬ　を順次加えてジアゾカップリングし、マイクロプレートリーダーにより６３０ｎｍを対照波長として５４５ｎｍで吸光度を測定することによって定量した。

【００２８】

また、前処理剤溶液のＮａＯＨ濃度を種々変化させて被検液中のＮａＯＨ濃度を種々調整した場合の三重らせん構造β－グルカンの構造変化をＳａｉｔｏ　Ｈ．　ｅｔ　ａｌ．（Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．　Ｒｅｓ．，　７４，　２２７－２４０（１９７９））の方法に従って、^{13}Ｃ－ＮＭＲにより測定した。その三重らせん構造の割合と前処理された被検液の各テストの測定値（吸光度）を表１に示す。

【００２９】

【表１】

表１

試料No.	実験系（注）		ＮａＯＨ濃度（モル／Ｌ）	Ｇテスト（吸光度）	トキシカラー（吸光度）	エンドスペシー（吸光度）	三重らせんβ－グルカンの割合（％）
	Ｅｔ	β－グルカン					
1-1	＋	－	0	0.000	0.802	0.796	－
1-2	－	＋	0	0.000	0.000	0.000	100
1-3	＋	＋	0.016	0.204	0.448	0.216	2
1-4	＋	＋	0.031	1.201	1.202	0.000	0
1-5	＋	＋	0.063	1.208	1.207	0.000	0
1-6	＋	＋	0.125	1.208	1.208	0.000	0
1-7	＋	＋	0.25	1.208	1.208	0.000	0
1-8	＋	＋	0.50	1.207	1.208	0.000	0
1-9	＋	＋	1.0	1.201	1.202	0.000	0
1-10	＋	＋	1.5	1.201	1.201	0.000	0

注：＋、－は、添加、無添加を表す。

【００３０】

なお、表１中、ＮａＯＨ濃度（モル／Ｌ）は、被検液における濃度を示し、吸光度はブランク値を差し引いた値を表示した。また、被検液としてＥｔ水溶液を蒸留水に置換、またはソニフィラン水溶液を蒸留水に置換した場合も示した。

表１によれば、Ｇテストにおいて、注射用蒸留水のみによる処理では、β－グルカンは全く検出されず、ＮａＯＨの濃度が０．０３モル／Ｌ以上では、吸光度の値が一定となる（試料Ｎｏ．１－１および１－４～１０）。このことは、前処理した被検液におけるβ－グルカンの構造変化を観察した結果から、β－グルカンの三重らせん構造が解けるに従って吸光度が増加していることと対応する。　また、トキシカラーにおいては、注射用蒸留水のみによる処理では、Ｅｔには反応するが、β－グルカンとはやはり全く反応しない（試料Ｎｏ．１－１および１－２）。ＮａＯＨ濃度が、０．０３モル／Ｌ以上の場合に吸光度が一定となり、β－グルカンが検出できるようになる（試料Ｎｏ．１－４～１０）。エンドスペシーの場合は、注射用蒸留水のみによる処理では、Ｅｔに反応し、β－グルカンとは全く反応しない（試料Ｎｏ．１－１および１－２）。ＮａＯＨ濃度が０．０３モル／Ｌ以上の場合に吸光度が０となり、Ｅｔの活性が失われることが判る。

【００３１】

すなわち、本実施例では、試料が水溶液の場合、ＮａＯＨ濃度が０．０３モル／Ｌ付近以上で、６０℃、１０分間前処理することにより、Ｅｔを不活性化するとともにβ－グルカンの三重らせん構造を解いてＧ因子活性化能を有する構造に変換してＧ因子を活性化するため、吸光度の値が一定となり、被検液中のβ－グルカンの真の値をβ－グルカン特異的リムルス試薬ではもちろんのこと、非特異的リムルス試薬を用いても、正確かつ高い信頼度を以て再現性よく検出することが可能であることが明らかである。

【００３２】

実施例２

健常人ＰＲＰ１８０μＬに、９９％三重らせん構造からなるレンチナン（味の素（株）販売、２００ｎｇ／ｍＬ水溶液）１０μＬとＥｔ（Ｓｅｒｒａｔｉａｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ由来、Ｓｉｇｍａ社販売、８ｎｇ／ｍＬ水溶液）１０μＬとを添加し、これに蒸留水あるいは各種濃度のＫＯＨ水溶液８００μＬを加え、混合後、３７℃で３０分加温した。氷冷後、処理混液のうち、５０μＬを試験管にとり、ＨＣｌ水溶液５０μＬを加えて中和し、これにＧテスト液、トキシカラー液あるいはエンドスペシー液１００μＬを加え、３７℃で３０分間加温して反応させ、次いで０．０４％亜硝酸ナトリウム（０．４８モル／Ｌ塩酸溶液）、０．３％スルファミン酸アンモニウム、０．０７％Ｎ－１－ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩を各０．５ｍＬずつ順次加えてジアゾカップリングし、５４５ｎｍで吸光度を測定した。沈殿を生じた場合は、遠心分離して、その上清を測定した。　該前処理された被検液の各テストの測定値（吸光度）を表２に示す。

【００３３】

【表２】

表２

試料No.	実験系（注）		KOH濃度（モル／L）	Gテスト（吸光度）	トキシカラー（吸光度）	エンドスペシー（吸光度）
	Et	β－グルカン				
2-1	－	－	0	0.024	0.025	0.021
2-2	＋	－	0	0.024	0.046	0.042
2-3	－	＋	0	0.052	0.054	0.021
2-4	＋	＋	0	0.052	0.073	0.044
2-5	＋	＋	0.031	0.683	1.109	0.413
2-6	＋	＋	0.063	1.008	1.605	0.851
2-7	＋	＋	0.125	1.021	1.618	0.895
2-8	＋	＋	0.250	1.021	1.289	0.274
2-9	＋	＋	0.5	1.024	1.066	0.045
2-10	＋	＋	0.7	1.024	1.018	0.000
2-11	＋	＋	1.0	1.026	1.017	0.000
2-12	＋	＋	2.0	1.020	1.015	0.000

注：＋、－は、添加、無添加を表す。

【００３４】

なお、表２中、ＫＯＨ濃度（モル／Ｌ）は、被検液における濃度を示し、吸光度はブランク値を差し引いた値を表示した。ブランクは、ＰＲＰの代わりに蒸留水を用い、前処理剤として注射用蒸留水を用いた。また、被検液としてＥｔ水溶液を注射用蒸留水に置換、および／またはレンチナン水溶液を蒸留水に置換した場合も示した。

【００３５】

表２によれば、ＰＲＰ中には、リムルス反応妨害因子が存在するため、注射用蒸留水のみによる処理では、β－グルカンもＥｔもほとんど検出されず（Ｎｏ．２－１～４）、この因子は、０．０６モル／Ｌ以上のＫＯＨ中で、３７℃、３０分間加温処理することにより

、不活性化されることが判る（試料Ｎｏ．２－６～１２）。また、Ｅｔは処理ＫＯＨ濃度の増加に伴って、活性が低下し、０．７モル／Ｌ以上の処理によって、完全に不活性化する（試料Ｎｏ．２－１０～１２）。一方、９９％三重らせん構造をとるレンチナンは、０．０６モル／Ｌ以上のＫＯＨで処理すると、三重らせんが変化し、高い反応性を示す。すなわち、Ｅｔとβ－グルカンが共存する血漿を処理時０．７モル／Ｌ以上となるＫＯＨ水溶液で３７℃、３０分間前処理すれば、Ｅｔとβ－グルカンが共存している検体でもβ－グルカン特異的試薬であるＧテストを用いなくとも両者に反応する通常のリムルス試薬（非特異的リムルス試薬）により、β－グルカンのみを正確に検出できることが判る（試料Ｎｏ．２－１０～１２）。

【００３６】

また、実際に臨床検体を実施例２に準じて前処理剤で処理し、トキシカラーで測定したところ、深在性真菌症患者検体のみが高値を示した。

実施例３

表３に示す金属イオンを含む水溶液に１００％三重らせん構造からなるシゾフィラン（商品名ソニフィラン）を１．０ｎｇ／ｍＬとなるように添加したもの０．２ｍＬに、０．１モル／ＬのＥＤＴＡ４Ｎａ塩溶液０．０２５ｍＬを添加し氷冷下５分間放置後、３モル／Ｌ水酸化ナトリウム溶液０．０２５ｍＬを添加するか（逐次添加）、あるいは０．２０モル／ＬのＥＤＴＡ４Ｎａ塩溶液を含む１．５モル／Ｌ水酸化ナトリウム０．０５ｍＬを添加（同時添加）した後、室温下１０分間放置後、注射用蒸留水で１０倍希釈し、その内の０．０５ｍＬを被検液として、実施例１と同様にＧテストを用いてその反応性を調べた。結果を表３に示す。表中には金属イオンを含まないソニフィラン水溶液をＥＤＴＡ４Ｎａ塩を含まない水酸化ナトリウム溶液で処理（処理時０．３モル／Ｌ）した場合を１００％、またＥＤＴＡ４Ｎａ溶液および水酸化ナトリウム溶液の代わりに注射用蒸留水を用いた場合を０％とした相対活性を示した。なお、金属イオンを含む試料を測定する際のＥＤＴＡ４Ｎａ塩の添加効果を調べるために上記逐次添加においてＥＤＴＡ４Ｎａ塩溶液の代わりに等量の注射用蒸留水を用いた実験も行った。また上記逐次添加の添加順序を逆にした実験も行った。

【００３７】

【表３】

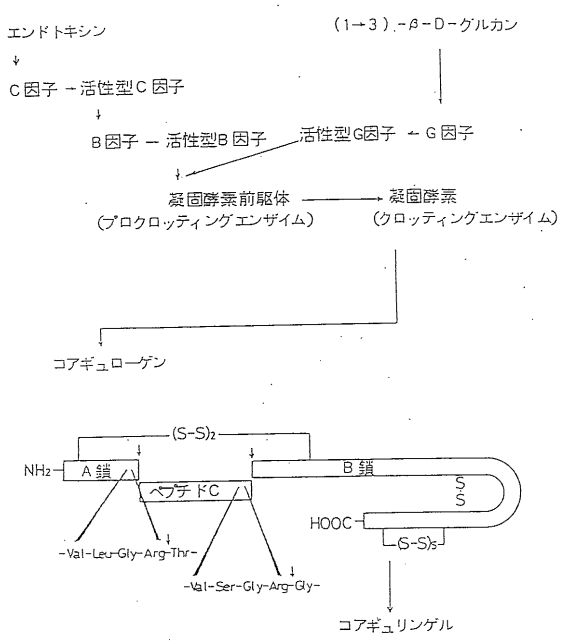
表３

金属イオン水溶液	EDTA4NaとNaOHの添加の有無（＋／－）と添加方法 EDTA4Na (A)	NaOH (B)	添加方法	相対活性（%）
注射用蒸留水　(対照例)	－	－		0
注射用蒸留水　(対照例)	－	＋		１００
10 mM $MgCl_2$	－	＋		２．６
10 mM $MgCl_2$	＋	＋	逐次(A→B)	１２４．０
10 mM $MgCl_2$	＋	＋	逐次(B→A)	０．６
10 mM $CaCl_2$	－	＋		２．８
10 mM $CaCl_2$	＋	＋	同時	１０５．９
0.5 mM $FeCl_2$	－	＋		２．０
0.5 mM $FeCl_2$	＋	＋	逐次(A→B)	９８．８
0.5 mM $FeCl_3$	－	＋		０
0.5 mM $FeCl_3$	＋	＋	同時	９５．６
0.05 mM $MnSO_4$	－	＋		４．０
0.05 mM $MnSO_4$	＋	＋	逐次(A→B)	１０５．０
リンゲル液（含2.24mM $CaCl_2$）	＋	＋	同時	１１３．２
人工腎臓用透析液	－	＋		３．８
人工腎臓用透析液（含1.5mM $CaCl_2$, 0.5mM $MgCl_2$）	＋	＋	同時	９７．５
PBS (+)（含0.901mM $CaCl_2$, 0.492mM $MgSO_4$）	＋	＋	逐次(A→B)	１０７．４
ハンクス液（含1.26mM $CaCl_2$, 0.812mM $MgSO_4$）	＋	＋	逐次(A→B)	１０５．２

【００３８】
表３の結果より、三重らせん構造をとるシゾフィランの水溶液中にMg^{2+}やCa^{2+}が存在するとアルカリのみで処理してもＧテスト反応性は高まらないが、キレート剤をアルカリ添加と同時あるいは添加前に添加すると、シゾフィランのＧテスト反応性が高まり、高感度に検出定量できることが判った。
上記実験において水酸化ナトリウムの代わりに水酸化カリウムを用いた実験を行ったが、上記とほぼ同様の結果が得られた。

【００３９】
【発明の効果】
本発明は、三重らせん構造を主体とするβ－グルカンの他に、Ｅｔおよび／またはＧ因子系反応妨害因子（リムルス反応妨害因子）を含む試料中のβ－グルカンを測定する際に、該試料を強アルカリ性の前処理剤で処理するという簡便な手段を採用することによって、上記Ｅｔおよび／またはＧ因子系反応妨害因子の反応系への影響を完全に除去することができ、かつβ－グルカンがＧ因子を活性化しない三重らせん構造をとっていても、それをＧ因子活性化能を有する構造に変換できるので、Ｅｔにも反応性を有する非特異的リムルス試薬を使用してβ－グルカンを正確に定量できる。また、本発明は三重らせん構造を主体とするβ－グルカンの他に金属イオンを含む試料中のβ－グルカンを測定する際に、該試料をキレート剤の存在下において強アルカリ性の前処理剤で処理することにより、強アルカリ処理によってβ－グルカンの三重らせん構造がＧ因子活性化能を有する構造に変換されるのを、金属イオンが阻害する現象を防止することができるので、透析液、リンゲル液などの金属イオンを含み得る試料中のβ－グルカンを正確に定量することができる。さらに、本発明の測定法を使用して生体由来試料中のβ－グルカンを測定すると高精度で再現性の高い結果が得られる。本発明のβ－グルカンの測定法を臨床検査に応用することによって、通常の検査法では診断がきわめて困難な深在性真菌感染症の診断を迅速かつ正確に行うことができる。
【図面の簡単な説明】
【図１】カブトガニ・アメボサイト・ライセートの（１→３）－β－Ｄ－グルカン及びエンドトキシンによるカスケード反応の反応機構を示す。

【図１】



フロントページの続き

(72)発明者　明田川　純
東京都立川市幸町四丁目５２番地の１

審査官　加々美　一恵

(56)参考文献　特開平０２－１４１６６６（ＪＰ，Ａ）
特開平０４－０５２５５８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G01N 33/579