

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 G01N 33/579	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/14931 (43) 国際公開日 1995年6月1日 (01.06.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01973 (22) 国際出願日 1994年11月22日 (22. 11. 94) (30) 優先権データ 特願平5/314026 1993年11月22日 (22. 11. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 田村弘志 (TAMURA, Hiroshi) [JP/JP] 〒208 東京都武蔵村山市中藤四丁目6番地の13 Tokyo, (JP) 小田俊男 (ODA, Toshio) [JP/JP] 〒207 東京都東大和市向原二丁目2番地の3 パークハイム向原202号 Tokyo, (JP) 田中重則 (TANAKA, Shigenori) [JP/JP] 〒187 東京都小平市小川西町五丁目3番15号 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 役 昌明 (YEN, Masaaki) 〒169 東京都新宿区百人町二丁目2番41号 Tokyo, (JP) (81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : METHOD OF ASSAYING LIMULUS REAGENT-REACTIVE SUBSTANCE (54) 発明の名称 リムルス試薬反応性物質の測定法 (57) Abstract A method of determining the concentration of Limulus reagent-reactive substance (endotoxin or (1→3)-β-D-glucan) in a specimen by the turbidimetric Limulus test without being affected by any interfering substance with high sensitivity and high accuracy, which method comprises treating a specimen solution with a Limulus reagent to cause gelation and irradiating the resulting solution with the rays of light having a wavelength of 340-420 nm to detect the rise of the solution turbidity caused by the gelation.		

(57) 要約

比濁法リムルステストによって、リムルス試薬反応性物質を測定する際に、妨害物質の影響を受けることなく、高感度かつ高精度に測定できる測定波長を決定することを目的として、検体溶液にリムルス試薬を作用させ、ゲル化を起こさせてゲル化に伴う反応液の濁度の上昇を検出し、検体中のリムルス試薬反応性物質（エンドトキシンまたは（1→3）-β-D-グルカン）の濃度を測定する測定法において、反応液に照射する光線の波長を340～420 nmに選定した。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明 細 書

リムルス試薬反応性物質の測定法

技術分野

この発明は、リムルス・アメボサイト・ライセート試薬（以下、リムルス試薬
5 という）を用いて、エンドトキシン、 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{グルカン}$ （以下、 β -
グルカンと略称する）などのリムルス試薬反応性物質を測定する測定法に関する。

背景技術

10 エンドトキシンが混入した血液、輸液、注射液を体内に注入すると、強い発熱
やショックなどの副作用を引き起こすことがあるので、輸液、注射液などの医薬
品の製造工程においては、エンドトキシンの混入を防ぐために、その都度エンド
トキシン量を測定しなければならない。

リムルス・アメボサイト・ライセートが、エンドトキシンと反応してゲル化す
15 る現象が見出され、従来より兎発熱試験に代わるエンドトキシンの測定法として、
この現象を応用した測定法が実施されている。

この測定法としては、ゲル化にともなう反応液（検体溶液とリムルス試薬を含
有する反応混合液）の濁りの程度を客観的に判定する目的で、反応液に特定の光
線を照射し、時間の経過とともに透過光量の減少（吸光度の増加）を検知して、
20 初期値との比率を求め、この比率が一定値に到達するまでの時間をゲル化時間と
判定してエンドトキシン濃度測定の指標とする測定法が知られている（反応速度
法による比濁法リムルステストの一種；比濁時間分析法；特公平5-31744
号公報参照）。

このような光学的な測定法においては、光源として波長660nm程度の光線
25 を放射する発光ダイオードが使用され、光量検出器としてフォト・ダイオード、
光電セルなどが使用されている。

また、 β -グルカンも、リムルス・アメボサイト・ライセートをゲル化させる

ことが知られている。

このような従来の光学的な測定法においては、光源から照射される光線の波長が、ゲル化して行く反応液の透過度または吸光度の検知に適した波長であるか否かについて考慮されていなかった。

- 5 また、検体溶液中に着色物質、タンパク、核酸等の妨害物質が存在しても、測定値が安定し、かつ、実用に供し得る感度を有することが必要であるにもかかわらず、従来の測定法においては、このような条件を満たしているとは言えなかった。

- 10 そこで、この発明の測定法は、比濁法リムルステストによって、エンドトキシンまたは β -グルカン等のリムルス試薬反応性物質を測定する際に、妨害物質の影響を受けることなく、高感度、高精度に測定できる光線の波長を決定することを目的として考えられたものである。

発明の開示

- 15 この発明は、検体溶液にリムルス試薬を作用させ、ゲル化を起こさせてゲル化に伴う反応液の濁度の上昇を光線を照射することによって検出し、検体中のリムルス試薬反応性物質を測定する測定法において、反応液に照射する光線の波長を340～420 nmの範囲から選定された波長とした。

- 20 光線の波長は390～410 nmの範囲から選定された波長であることが好ましい。また、リムルス試薬反応性物質としては、エンドトキシンまたは β -グルカンが挙げられる。

図面の簡単な説明

- 25 第1図は、この発明のリムルス試薬反応性物質の測定法で使用する濁度測定装置の一例を示す側面図、

第2図は、反応液に照射する光線の波長に対する吸光度値を示す特性曲線図、

第3図は、反応液の吸光度値の変化率と、リムルス試薬反応性物質（エンドトキシン）の濃度との関係を示す特性曲線図、

第4図は、反応液の吸光度値がある閾値に到達するまでの時間と、リムルス試

薬反応性物質（ β -グルカン）の濃度との関係を示す特性曲線図である。

発明を実施するための最良の形態

この発明で使用するリムルス試薬とは、リムルス・ポリフェムス (*Limulus polyphemus*)、タキプレウス・トリデンタツス (*Tachypleus tridentatus*)、タキプレウス・ギガス (*T. gigas*)、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ (*Carcinoscopus rotundicauda*) 等のカブトガニ血リンパ液から、通常の方法（例えば、*Journal of Biochemistry*, 80, 1011-1021(1976)参照）により調製した血球抽出物（リムルス・アメボサイト・ライセート）またはその加工物であり、エンドトキシンおよび/または β -グルカンがこれに作用してゲル化する試薬である。

上記加工物とは、例えば、リムルス・アメボサイト・ライセートをクロロホルム等の有機溶媒で抽出処理したり、界面活性剤を添加してエンドトキシンに対する感受性を向上させたものが挙げられる。また、リムルス・アメボサイト・ライセートには、通常、エンドトキシン感受性因子（C因子）および β -グルカン感受性因子（G因子）の両方が含まれるが、上記加工物としては、デキストラン硫酸、スルホプロピル基等を結合した担体等を用いてリムルス・アメボサイト・ライセートを処理し、上記C因子またはG因子の何れか一方の因子を分画もしくは除去してエンドトキシンまたは β -グルカンの一方のみに作用するように加工されたものが挙げられる。

さらに、リムルス・アメボサイト・ライセートに、例えば（1 $\rightarrow$ 3）- β -D-グルコシド構造単位が特定個数結合したポリグリコシドを共存させることによって、G因子の活性化を阻害し、エンドトキシンにのみ反応するように加工したものも上記加工物に包含される。なお、リムルス試薬は液体、粉末、固形物等のいずれの形態であってもよい。

この発明においてリムルス試薬反応性物質を測定すべき検体溶液は、特に限定されることはなく、血液、尿、髄液、輸液、注射液、水などが例示される。

検体溶液を、必要に応じて前処理（酸処理、アルカリ処理、加熱処理、界面活性剤処理等）し、適当な反応容器中でリムルス試薬を作用させ、ゲル化を起こさ

せてゲル化に伴う濁度の上昇を、反応液に340～420nmの範囲から選定された波長の光線を照射し、吸光度を測定することによって検出する。そして、既知濃度のリムルス試薬反応性物質を含む溶液について同様に測定して作成した検量線と測定により得られた値とを比較して検体溶液中のリムルス試薬反応性物質を定量することができる。検量線と測定により得られた値との比較は、予め作成されたプログラムに従って自動的に行なうこともできる。

光線の波長が340nmより小さい場合、および420nmより大きい場合には、検体溶液中に共存する可能性のある種々の妨害物質の影響を受けてリムルス試薬反応性物質の水溶液と同等の吸光度が得られない。なお、代表的な妨害物質としては280nmに極大吸収を有するタンパク、260nmに極大吸収を有する核酸など挙げられる。

検体溶液にリムルス試薬を作用させるには、検体溶液とリムルス試薬を混合して反応液とし、30～50℃、好ましくは35～45℃において15分～3時間、好ましくは30分～90分反応させればよい。

吸光度の測定方式は、反応を停止した後測定する方式（エンドポイント法）、または反応させながら測定する方式（反応速度法；カイネティック法）の何れであってもよい。反応速度法としては、反応液の吸光度（透過光量）が一定の値に達するまでの時間をゲル化時間とする方式（比濁時間分析法）、反応液の吸光度の変化率を測定する方式などが挙げられる。

なお、反応容器は、通常のリムルステストに使用される容器であればよく、実質的に光の透過に影響を及ぼさない材質および形状の容器が使用される。例えば、ガラス、プラスチック等の試験管またはマイクロプレートが好適である。

この発明を実施するための形態で使用する吸光度測定装置は、例えば、マイクロプレートを反応容器とした場合、第1図に示すように、キャリア5に載せられ、検体および試薬よりなる反応液14を入れる複数のウェル11を設けた測定用マイクロプレート1と、電球などの発光体31、スリット32、選定された特定波長の光線を透過させるフィルタ33よりなる光源3と、このフィルタ33で選定された光線を測定用マイクロプレート1のウェル11の列数に分割する光学繊維34と、反応液14を透過した光線の強度を電気信号に変換する光電変換素子4とよりなる光学系を

備えている。なお、マイクロプレート1の底面に設けられた孔21を有するアルミ板2は、温度分布を均一化するためのものである。

[発明を実施するための形態1：エンドポイント法によるエンドトキシンの測定]

5 この発明のリムルス試薬反応性物質の測定法において使用する光線の最適な波長を求めるために、次の実験を行なった。

市販のリムルス試薬 (Associates of Cape Cod社製造、生化学工業株式会社が「パイロテル」という名称で販売している試薬) 1 ml をガラス試験管に採り、大腸菌 0111:B4 株由来のエンドトキシン溶液 (0.25 EU/ml : EU
10 は、Endotoxin Unitの略) 1 ml を加え、37℃で30分間反応させた後、10%トリフルオロ酢酸 0.02 ml を添加して反応を停止させた。

次いで、

(条件A) 上記反応物に対して、タンパクとして25%ヒト血清アルブミン (HSA) 製剤 (ミドリ十字株式会社製) を終濃度で0.5%となるように添加し、

15 (条件B) 上記反応物に対して、黄色色素として5 mMのパラニトロアニリン (pNA) を終濃度で0.5 mMとなるように添加し、

(条件C) 上記反応物に対して、蒸留水 (DW) を条件Aおよび条件Bの水溶液と同量添加して、

3種の検体溶液を作り、これら3種の検体溶液に対して、波長範囲200 nm
20 ~900 nmにおける吸光度値 (濁度) を測定した。

それらの結果は、第2図の特性曲線図に示すとおりであり、タンパク共存状態 (条件A : HSA) でも、黄色色素共存状態 (条件B : pNA) でも、蒸留水 (条件C : DW) と同値を示し、かつ、比較的高い吸光度を呈する波長範囲は、波長340~420 nmであり、特に好ましい波長範囲は390~410 nmの範囲
25 であることが明らかになった。

そこで、この発明の測定法においては、この知見に基づいて波長340~420 nmの範囲の光線を使用して吸光度値の測定を行なって、リムルス試薬反応性物質の濃度の指標とするものである。

[発明を実施するための形態2：反応速度法によるエンドトキシンの測定]

市販されているリムルス試薬 (Associates of Cape Cod社製造、生化学工業株式会社が「パイロテルーT」という名称で販売している試薬) 0.05 ml を96穴マイクロプレート (生化学工業株式会社から発売されているトキシベットプレート96F) のウェルに採り、大腸菌0113株由来のエンドトキシン溶液の
5 0.01~100 EU/ml の範囲内で濃度が異なる5種類のもの各0.05 ml を加えた。それらに対して、

(条件A) タンパクとして25%ヒト血清アルブミン (HSA) 製剤を終濃度で0.5%となるように添加し、

10 (条件B) 黄色色素として5 mMのパラニトロアニリン (pNA) を終濃度で0.5 mMとなるように添加し、

(条件C) 蒸留水 (DW) を条件A、条件Bの各水溶液と同量添加して、
15 15種 (=5種類×3条件) の反応液を作り、マイクロプレートの各ウェルに採り、恒温槽を備えたマイクロプレートリーダー (生化学工業株式会社から発売されているウェルリーダーSK601) にセットし、攪拌した後、37℃で反応させながら、波長400 nmの光線を15秒間隔で照射して、吸光度値を測定した。

そして、上記吸光度値の変化率をエンドトキシンの各濃度に対して、それぞれ対数プロットしたところ、第3図に示す特性を得ることができた。

20 第3図の特性曲線図 (検量線) より、タンパク共存状態 (条件A: HSA)、黄色色素共存状態 (条件B: pNA) でも、蒸留水 (条件C: DW) とほぼ同じ吸光度値の変化率を示し、かつ、この変化率が、エンドトキシン濃度と正比例し、妨害物質が共存しても良好な直線性および再現性が得られることが明らかになった。

[発明を実施するための形態3: 反応速度法によるβ-グルカンの測定]

25 「パイロテルーT」0.05 ml をトキシベットプレート96Fのウェルに採り、β-グルカンとしてパキマン溶液 (0.1 N NaOHに溶解後、蒸留水で希釈) の0.01~1 ng/ml の範囲内で濃度が異なる3種類のもの各0.05 ml を加えた。それらに対して、

(条件A) タンパクとして25%ヒト血清アルブミン (HSA) 製剤を終濃度

で0.5%となるように添加し、

(条件B) 黄色色素として5 mMのパラニトロアニリン (pNA) を終濃度で0.5 mMとなるように添加し、

(条件C) 蒸留水 (DW) を条件A、条件Bの各水溶液と同量添加して、

- 5 9種 (= 3種類×3条件) の反応液を作り、波長410 nmの光線を使用したほかは発明を実施するための形態2と同様に操作した。

そして、吸光度値が、一定の閾値 (吸光度値が0.020) に到達するまでの時間 (ゲル化時間) t を、各 β -グルカン濃度に対して、それぞれ対数プロットしたところ、第4図に示す特性を得ることができた。

- 10 第4図の特性曲線図より、 β -グルカンの測定においても、妨害物質の影響を受けることなく、良好な直線性および再現性が得られることが明らかになった。

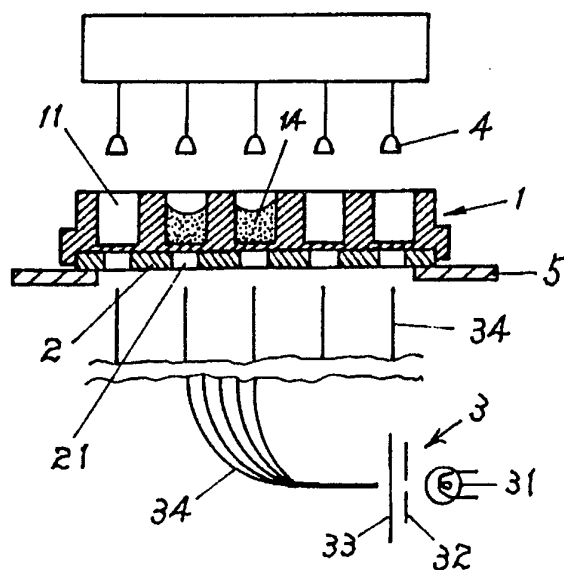
産業上の利用可能性

- 15 以上の発明を実施するための形態に基づく説明から明らかなように、この発明のリムルス試薬反応性物質の測定法によると、リムルス試薬反応性物質としてエンドトキシンまたは β -グルカンを用いた比濁法リムルステストにより測定する方法において、波長範囲が340~420 nm、好ましくは390~410 nmの光線を使用することにより、共存タンパクや共存色素の妨害を受けることなく、高感度、高精度で、安定した測定が可能になる。

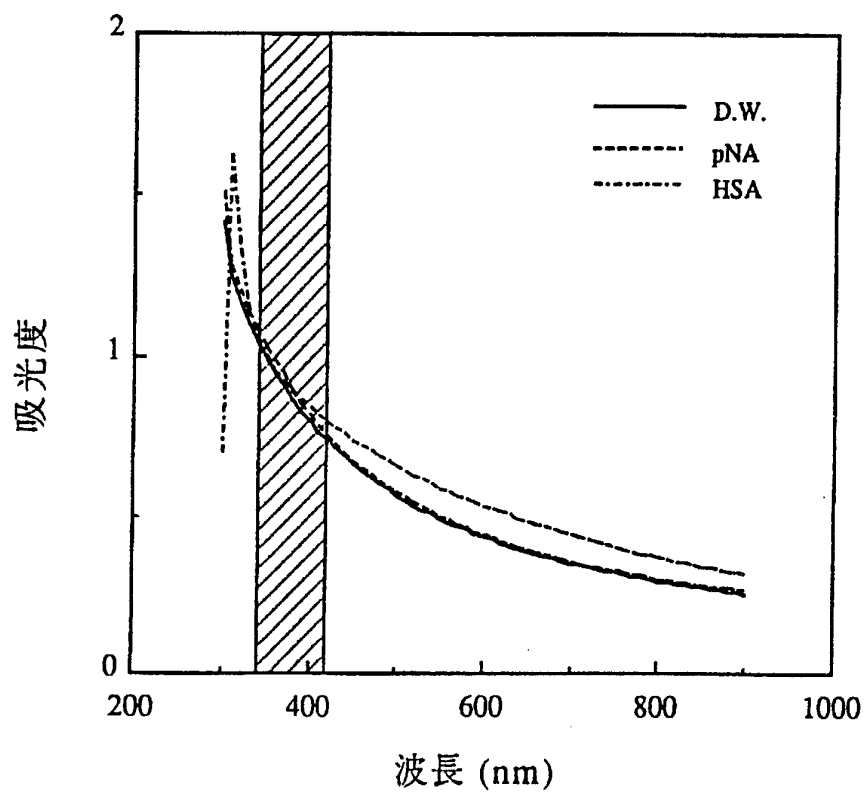
請 求 の 範 囲

1. 検体溶液にリムルス試薬を作用させ、ゲル化を起こさせてゲル化に伴う反応液の濁度の上昇を光線を照射することによって検出し、検体中のリムルス試薬反応性物質を測定する測定法において、反応液に照射する光線の波長を340～420 nmの範囲から選定された波長としたことを特徴とするリムルス試薬反応性物質の測定法。
2. 光線の波長が390～410 nmの範囲から選定された波長である請求の範囲1に記載のリムルス試薬反応性物質の測定法。
3. リムルス試薬反応性物質が、エンドトキシンまたは(1→3)- β -D-グルカンであることを特徴とする請求の範囲1に記載のリムルス試薬反応性物質の測定法。

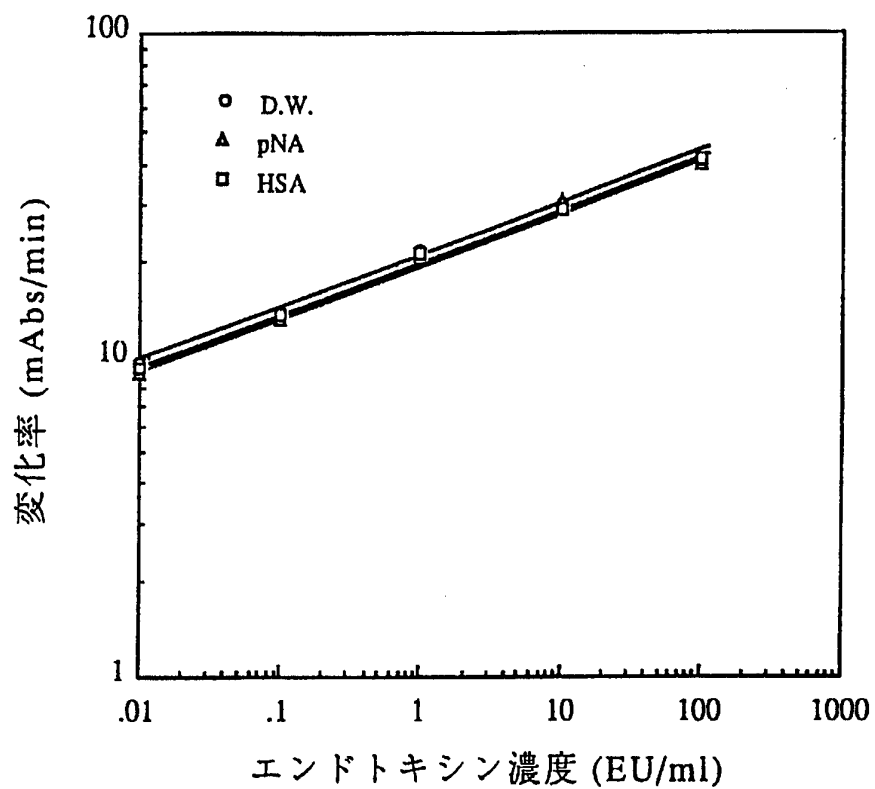
第1図



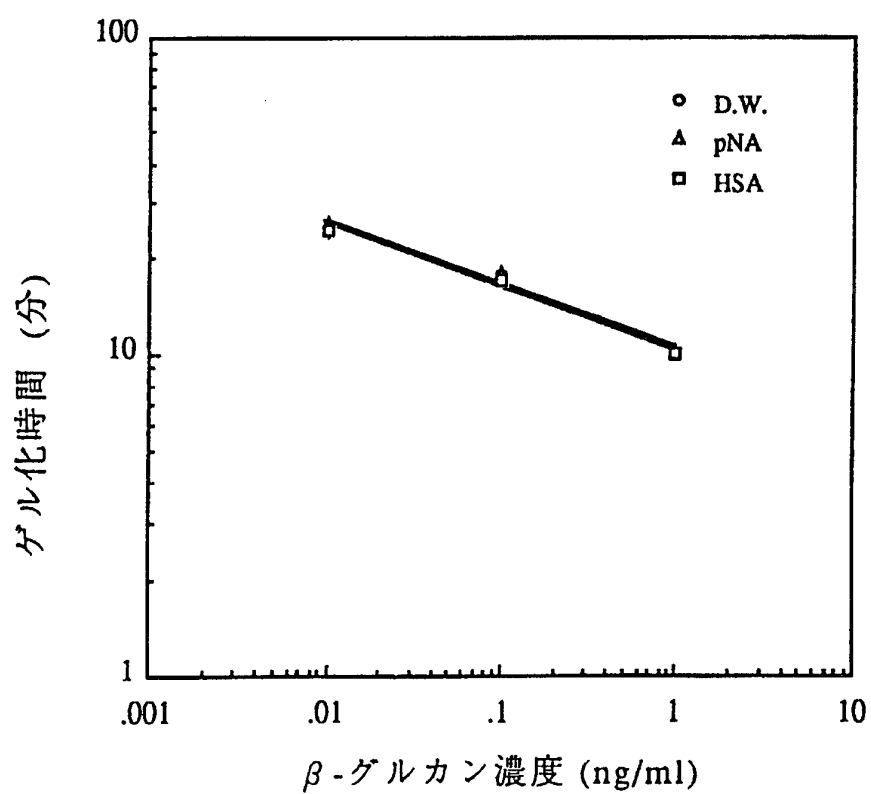
第2図



第3図



第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ G01N33/579

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ G01N33/579

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, A, 52-90990 (Warsington Biochemical Corp.), July 30, 1977 (30. 07. 77) & US, A, 4038029	1, 3 2
A	JP, A, 58-9050 (Organo Japan, Ltd.), January 19, 1983 (19. 01. 83), (Family: none)	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 19, 1995 (19. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 7, 1995 (07. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ G 01 N 33 / 579		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ G 01 N 33 / 579		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1926-1994年 日本国公開実用新案公報 1971-1994年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, A, 52-90990 (ワースイングトン・バイオケミカル コーポレーション), 30. 7月. 1977 (30. 07. 77) & US, A, 4038029	1, 3 2
A	JP, A, 58-9050 (オルガノ株式会社), 19. 1月. 1983 (19. 01. 83) (ファミリーなし)	1-3
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
19. 01. 95	07.02.95	
名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	
日本国特許庁 (ISA/JP)	亀田 宏之	2 J 9 0 1 5
郵便番号100		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3250