



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201323613 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 16 日

(21) 申請案號：101127102

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 27 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/44 (2006.01)

G01N33/92 (2006.01)

(30) 優先權：2011/07/29 日本

2011-166458

(71) 申請人：協和梅德庫斯股份有限公司 (日本) KYOWA MEDEX CO., LTD. (JP)  
日本

(72) 發明人：木村豪秀 KIMURA, TAKEHIDE (JP) ; 宮內一人 MIYAUCHI, KAZUHITO (JP) ;  
桑田英之 KUWATA, HIDEYUKI (JP)

(74) 代理人：何金塗；丁國隆

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：5 共 50 頁

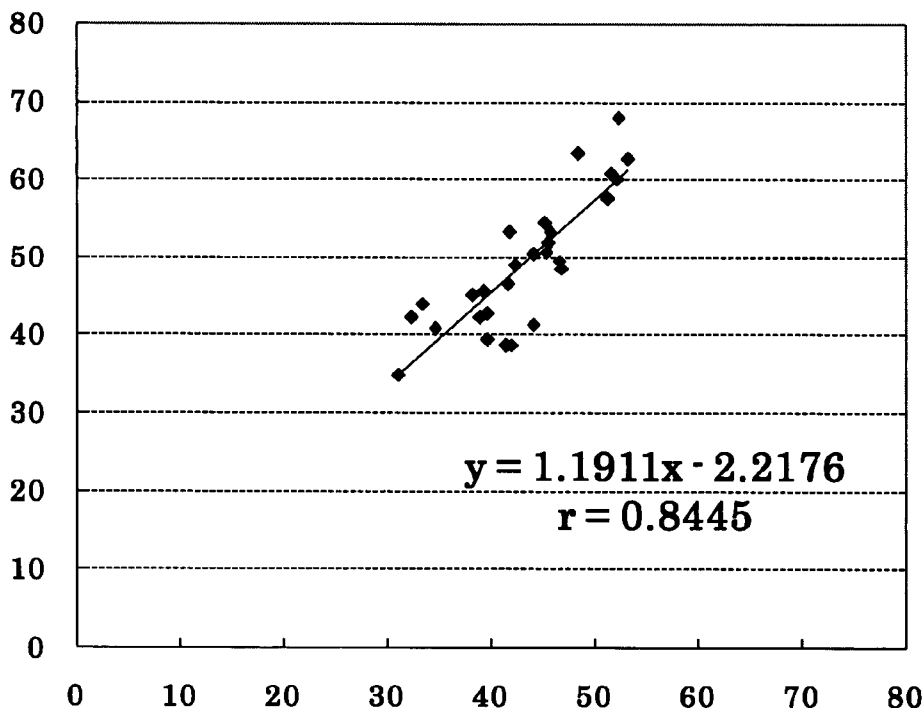
(54) 名稱

鞘磷脂之測定方法及測定用套組

DETERMINING METHOD OF SPHINGOMYELIN AND KIT FOR DETERMINATION

(57) 摘要

本發明提供一種用以簡便且正確地測定檢體中鞘磷脂之方法、及套組。一種檢體中鞘磷脂之測定方法，其特徵為：將檢體和不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、及膽鹼氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶 D、及膽鹼氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201323613 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：101127102

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 27 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/44 (2006.01)

G01N33/92 (2006.01)

(30)優先權：2011/07/29 日本

2011-166458

(71)申請人：協和梅德庫斯股份有限公司 (日本) KYOWA MEDEX CO., LTD. (JP)  
日本

(72)發明人：木村豪秀 KIMURA, TAKEHIDE (JP) ; 宮內一人 MIYAUCHI, KAZUHITO (JP) ;  
桑田英之 KUWATA, HIDEYUKI (JP)

(74)代理人：何金塗；丁國隆

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：5 共 50 頁

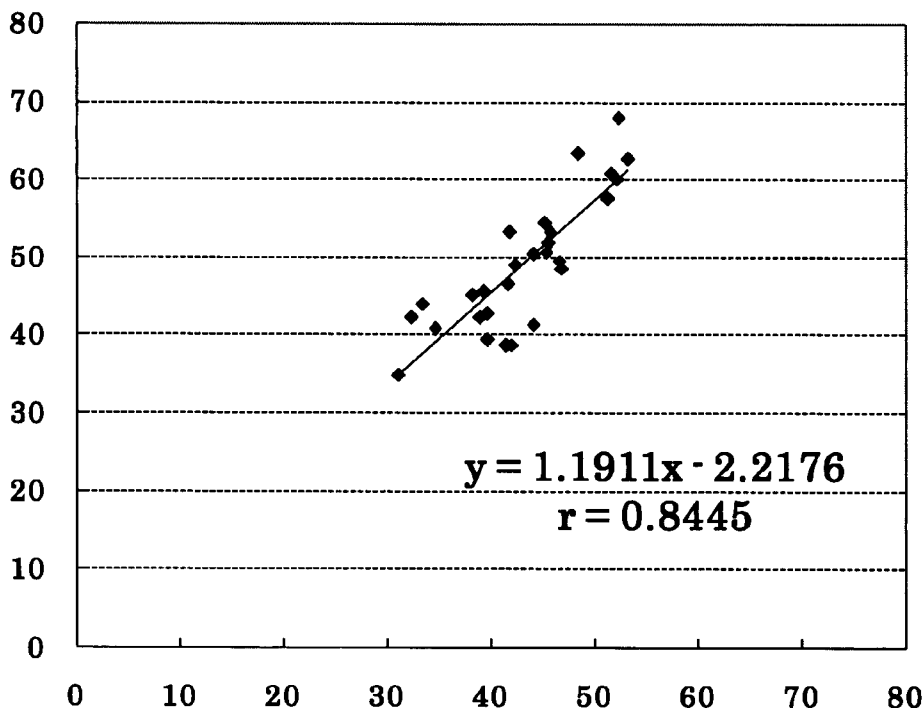
(54)名稱

鞘磷脂之測定方法及測定用套組

DETERMINING METHOD OF SPHINGOMYELIN AND KIT FOR DETERMINATION

(57)摘要

本發明提供一種用以簡便且正確地測定檢體中鞘磷脂之方法、及套組。一種檢體中鞘磷脂之測定方法，其特徵為：將檢體和不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、及膽鹼氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶 D、及膽鹼氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。



# 發明專利說明書

PD1128965(11)

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101127102

※申請日：

101.7.27

※IPC 分類：

C12Q 1/44 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

鞘磷脂之測定方法及測定用套組

DETERMINING METHOD OF SPHINGOMYELIN AND KIT FOR  
DETERMINATION

## 二、中文發明摘要：

本發明提供一種用以簡便且正確地測定檢體中鞘磷脂之方法、及套組。

一種檢體中鞘磷脂之測定方法，其特徵為：

將檢體和不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、及膽鹼氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、及膽鹼氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for simply and accurately determining sphingomyelin in a specimen, and a kit.

A determining method of sphingomyelin in a specimen is characterized by reacting a specimen with phospholipase D that does not react with sphingomyelin and lysophosphatidylcholine and reacts with phosphatidylcholine, lysophospholipase or monoglycerolipase, and cholineoxidase; removing hydrogen peroxide generated; and then reacting with phospholipase D that does not react with glycerol-3-phosphorylcholine and free fatty acid and reacts with sphingomyelin and cholineoxidase; and determining hydrogen peroxide generated.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第 4 圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於鞘磷脂之測定方法及測定用套組。

### 【先前技術】

在血液中含有高密度脂蛋白(以下簡稱HDL)、低密度脂蛋白(以下簡稱LDL)、超低密度脂蛋白(以下簡稱VLDL)、乳糜微粒(以下簡稱CM)等之脂蛋白。各脂蛋白，其膽固醇、三酸甘油酯、磷脂質、蛋白質等之構成成分比率並不相同，在生物體內具有不同之作用。在脂蛋白中主要包含三種磷脂質，亦即，磷脂膽鹼(phosphatidylcholine)(以下簡稱PC)、溶血磷脂膽鹼(lysophosphatidylcholine)(以下簡稱LPC)、及鞘磷脂(以下簡稱SM)。

在該等三種磷脂質中，PC及SM為主要的磷脂質，各自佔有全磷脂質之約70%及20%。周知之SM在人類及動物模型之動脈粥狀瘤(atheroma)蓄積。在人類之動脈硬化巢存在之LDL，相較於血漿中之LDL，含有多量SM(非專利文獻1)。

另一方面，在人類之臨床研究，血漿中SM、及SM/PC比率，顯示相對於缺血性心疾病之獨立的危險因素(非專利文獻2至4)。

在此之前，以SM之測定方法而言，有使用薄層層析之方法或使用高速液體層析之方法(非專利文獻5)之報告被發表，不過卻具有操作繁雜且測定需要長時間等之缺點。又，亦有利用來自細菌之鞘磷脂酶(sphingomyelinase)之酵素的測定法之報告被發表(專利文獻1、非專利文獻

2)。本測定法係藉由以細菌之鞘磷脂酶將鞘磷脂水解成為磷酸膽鹼 (phosphorylcholine) 及正醯基鞘胺醇 (n-acylsphingosine)，以鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 將產生的磷酸膽鹼水解成為膽鹼，產生的膽鹼與膽鹼氧化酵素 (cholineoxidase) 反應，並測定產生的過氧化氫，來測定鞘磷脂之方法。但是，本測定法會有起因於鹼性磷酸酶之使用之對其他測定項目之測定影響，或鞘磷脂酶與 SM 一起，亦可與 LPC 反應的特異性等之問題 (非專利文獻 6)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻 1] 日本特表 2009-519713 號公報

[非專利文獻]

[非專利文獻 1] *Circulation*, Vol. 110(22), p. 3465-3471 (2004).

[非專利文獻 2] *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, Vol. 20, p. 2614-2618 (2000).

[非專利文獻 3] *Nutrition & Metabolism*, Vol. 3, p. 5 (2006).

[非專利文獻 4] *Am. J. Epidemiol.*, Vol. 163, p. 903-912 (2006).

[非專利文獻 5] *Dairy Sci.*, Vol. 88, p. 482-488 (2005).

[非專利文獻 6] *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 27, p. 1725-1729 (2004).

**【發明內容】**

## [發明欲解決之課題]

本發明之目的在於提供一種用以簡便且正確地測定檢體中之SM之方法、及套組。

## [解決課題之手段]

本發明人等，對上述解決課題進行戮力研討，首先發現在選擇地測定含有PC、LPC及SM之檢體中SM之方法，藉由使用將LPC與溶血磷脂酶或單甘油脂酶反應而產生之不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D，而可進行SM之特異地測定，因而完成本發明。亦即，本發明係關於以下之[1]至[17]項。

[1]一種檢體中SM之測定方法，其特徵為：

將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、及膽鹼氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、及膽鹼氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。

[2]一種檢體中SM之測定方法，其特徵為：將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素、及還原型輔酶氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。

[3]如[1]項之方法，其中將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶及膽

鹼氧化酵素之反應在過氧化氫酶(catalase)之存在下進行；將不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、及膽鹼氧化酵素之反應在過氧化氫酶抑制劑之存在下進行。

[4]如[2]項之方法，其中將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素之反應在過氧化氫酶之存在下進行；將不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素之反應在過氧化氫酶抑制劑之存在下進行。

[5]如[3]或[4]項之方法，其中過氧化氫酶抑制劑為疊氮化合物(azide)。

[6]如[1]或[2]項之方法，其中過氧化氫之去除係在過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體(chromogen)中其一之存在下進行；而過氧化氫之測定係在過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體之存在下進行。

[7]如[1]至[5]項中任一項之方法，其中過氧化氫之測定係在過氧化酶、及白色型色原體之存在下進行。

[8]如[1]至[7]之項中任一項之方法，其中不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D係來自鏈黴菌屬(*Streptomyces* sp.)之磷脂酶D。

[9]如[1]至[8]之項中任一項之方法，其中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D係來自色褐鏈黴菌(*Streptomyces chromofuscus*)之磷脂

酶 D。

[10]一種檢體中之 SM 測定用套組，其特徵為包含：

第 1 試藥，其含有不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼氧化酵素、及過氧化氫酶；及 2 試藥，其含有不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、及過氧化氫酶抑制劑。

[11]一種檢體中之鞘磷脂測定用套組，其特徵為包含：第 1 試藥，其含有不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體中其一；第 2 試藥，其包含不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、及氧化偶合顯色型色原體之另一者。

[12]一種檢體中之鞘磷脂測定用套組，其特徵為包含：

第 1 試藥，其含有不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、及過氧化氫酶；及第 2 試藥，其含有不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、及過氧化氫酶抑制劑。

[13]一種檢體中之 SM 測定用套組，其特徵為包含：

第 1 試藥，其含有不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體中其一；及第 2 試藥，其含有不與甘

油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、及氧化偶合顯色型色原體之另一者。

[14]如[10]或[12]記載之套組，其中過氧化氫酶抑制劑為疊氮化合物。

[15]如[10]、[12]或[14]記載之套組，其中過氧化酶及白色型色原體係各自含於第1試藥及第2試藥之個別之試藥。

[16]如[10]至[15]之項中任一項之套組，其中不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D係來自鏈黴菌屬之磷脂酶D。

[17]如[10]至[16]之項中任一項之套組，其中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D係來自色褐鏈黴菌之磷脂酶D。

[發明之效果]

藉由本發明係提供一種用以簡便且正確測定檢體中之SM之方法及套組。

### 【實施方式】

[實施發明之形態]

< SM之測定方法 >

本發明之SM測定方法係SM之分離操作並非必要之方法。

本發明之SM之測定方法，係一種檢體中SM之測定方法，其特徵為將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、及膽鹼氧化酵素反應，並去除產生之過氧化氫，接著，和不與甘油-3-磷酸

膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、及膽鹼氧化酵素反應，並測定產生之過氧化氫。具體而言，可例舉包含下述步驟之方法。

(1)將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、及與膽鹼氧化酵素反應，並產生過氧化氫、甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸之步驟；

(2)去除在步驟(1)產生的過氧化氫之步驟；

(3)將步驟(2)後之反應液中之SM，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、及膽鹼氧化酵素反應，並產生過氧化氫之步驟；及

(4)測定在步驟(3)產生的過氧化氫之步驟。

作為上述步驟(1)中檢體，係使用SM濃度為已知之標準品，根據上述步驟進行測定，在製成表示SM濃度與測定值間之關係之校正曲線後，藉由使用實際之檢體，根據上述步驟進行測定，並將所得測定值與先前製成的校正曲線核對，來決定檢體中之SM濃度。

又，以在步驟(3)所使用之膽鹼氧化酵素而言，即使在步驟(1)所使用之膽鹼氧化酵素，亦可為重新添加的膽鹼氧化酵素。

上述步驟所致本發明SM測定方法之原理圖係如第1圖所示。

在上述方法之步驟(1)，PC係藉由不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D而變換成膽鹼，被膽鹼氧化酵素變換成為過氧化氫。又，LPC係被溶血磷脂酶或單甘油

脂酶變換成甘油-3-磷酸膽鹼與游離脂肪酸。在步驟(1)產生的過氧化氫，在步驟(2)被去除。在本發明之測定方法，過氧化氫之去除意指將自PC產生的過氧化氫變換成不會對SM之測定產生影響之物質。過氧化氫之去除，例如藉由將自PC產生的過氧化氫與過氧化氫酶反應，並將過氧化氫變換成水，或者藉由將自PC產生的過氧化氫與過氧化酶及後述之一對氧化偶合型色原體中之一反應而變換成無色之物質來進行。

其後，在步驟(3)中，藉由不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D，而使SM變換成膽鹼，膽鹼進一步被膽鹼氧化酵素變換成過氧化氫。在此，在步驟(2)產生的甘油-3-磷酸膽鹼與游離脂肪酸，因不與不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D反應，故被認為係自反應液中殘存之SM產生過氧化氫。自該SM產生的過氧化氫在步驟(4)被測定。

又，本發明之SM測定方法，係一種檢體中SM之測定方法，其特徵為：將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素反應，去除產生之過氧化氫，接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素反應，測定產生之過氧化氫者。具體而言，可例舉包含下述步驟之方法。

(1)將檢體和不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、氧化型輔酶、膽鹼脫氫

酵素及還原型輔酶氧化酵素反應，並產生過氧化氫、還原型輔酶、甘油-3-磷酸膽鹼、及游離脂肪酸之步驟；

(2) 去除步驟(1)產生的過氧化氫之步驟；

(3) 將步驟(2)後反應液中之SM，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素、及還原型輔酶氧化酵素反應，並產生過氧化氫及還原型輔酶之步驟；及

(4) 測定在步驟(3)產生的過氧化氫之步驟。

作為上述步驟(1)中檢體，係使用SM濃度為已知之標準品，根據上述步驟進行測定，並在作成表示SM濃度與測定值間關係之校正曲線後，藉由使用實際之檢體，以上述步驟進行測定，並將所得測定值與先前製成的校正曲線核對，來決定檢體中之SM濃度。

又，以步驟(3)所使用之膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、及還原型輔酶氧化酵素而言，可為步驟(1)所使用之膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素，亦可為重新添加之物。

上述步驟所致本發明SM測定方法之原理圖係如第2圖所示。

在上述方法之步驟(1)，PC係藉由不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D而變換成膽鹼，並被膽鹼氧化酵素、氧化型輔酶及還原型輔酶氧化酵素變換成過氧化氫。又，LPC係被溶血磷脂酶或單甘油脂酶變換成甘油-3-磷酸膽鹼與游離脂肪酸。在步驟(1)產生的過氧化氫在步驟(2)被去除。在本發明之測定方法，過氧化氫之去除意

指將自PC產生的過氧化氫變換成不致對SM測定產生影響之物質。過氧化氫之去除，例如藉由將自PC產生的過氧化氫與過氧化氫酶反應，並將過氧化氫變換成水，或者藉由將自PC產生的過氧化氫與過氧化酶及後述之一對氧化偶合型色原體中其一反應而變換成無色物質來進行。

其後，在步驟(3)，藉由不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D，而使SM變換成膽鹼，膽鹼則進一步藉由膽鹼氧化酵素變換成過氧化氫。在此，在步驟(2)產生的甘油-3-磷酸膽鹼與游離脂肪酸，因不與不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D反應，故被認為自反應液中殘存之SM產生過氧化氫。自該SM產生的過氧化氫係以步驟(4)測定。

在本發明之測定方法，步驟(1)與步驟(2)，可階段地進行，亦可同時進行，不過較佳為同時進行。步驟(1)與步驟(2)之反應溫度通常為10至50°C，較佳為20至40°C，反應時間通常為1至60分鐘，較佳為2至30分鐘。

在步驟(2)，使用過氧化氫酶，去除在步驟(1)產生的過氧化氫之情形，步驟(3)之反應較佳為在過氧化氫酶抑制劑之存在下進行。以過氧化氫酶抑制劑而言，可例舉例如疊氮化合物等。就疊氮化合物而言，可例舉例如疊氮化鋰、疊氮化鈉、疊氮化鉀等。

在步驟(4)，步驟(3)產生的過氧化氫，可藉由使例如過氧化酶與後述白色型色原體或一對氧化偶合型色原體反應，並測定產生的色素之吸光度來測定。尤其是，在

步驟(1)產生的過氧化氫之去除，係在使用過氧化酶與一對氧化偶合型色原體中其一來進行之情形，較佳係在步驟(3)之反應，添加另一氧化偶合型色原體。在此情形，在步驟(3)產生的過氧化氫，在步驟(4)，可藉由將該過氧化氫於過氧化酶存在下，與一對氧化偶合型色原體反應，並測定產生的色素之吸光度來測定。

在本發明之測定方法，步驟(3)與步驟(4)可階段地進行，亦可同時進行，較佳為同時進行。步驟(3)與步驟(4)之反應溫度，通常為10至50°C，較佳為20至40°C，反應時間通常為1至60分鐘，較佳為2至30分鐘。

本發明之測定方法，乾化學(dry chemistry)或即時試驗(point-of-care testing, POCT)均可適用，不過較佳是在後述水性介質中進行。

另外，將自PC產生的過氧化氫與過氧化酶及後述氧化顯色型色原體反應而變換成色素，並測定反應液之吸光度(A1)後，藉由將自SM產生的過氧化氫同樣地變換成色素，並測定反應液之吸光度(A2)，且自吸光度(A2)減去吸光度(A1)，而可測定SM。在該方法，可使用螢光物質[例如4-羥苯乙酸、3-(4-羥苯基)丙酸、香豆素等]、發光物質(例如發光胺(luminol)化合物、顯光素(lucigenin)化合物等)以替代氧化顯色型色原體。在使用螢光物質之情形，係藉由測定反應液之螢光強度，又，在使用發光物質之情形，係藉由測定發光強度來測定SM。又，可藉由以過氧化氫電極測定自PC產生的過氧化氫、與自SM產生的過氧化氫，來測定SM。該等方法亦包含於本發明之

測定方法。

進一步，在步驟(2)中使用過氧化氫酶進行過氧化氫之去除之情形，在步驟(3)產生的過氧化氫，係在步驟(4)，在過氧化氫酶抑制劑及過氧化酶存在下，藉由將該過氧化氫與螢光物質或發光物質反應，並測定產生的螢光或發光之強度來測定。以螢光物質及發光物質而言，可例舉例如前述之螢光物質及發光物質。

就本發明中檢體而言，可例舉例如全血、血漿、血清、腦脊髓液(cerebrospinal fluid)、唾液、羊水、尿、汗、胰臟液(pancreatic juice)等，不過較佳為血漿及血清。

以本發明中不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D而言，雖與PC反應，不過只要是與SM、LPC均不反應之磷脂酶D，則並無特別限定，可例舉例如來自動物、植物或微生物之磷脂酶D、根據基因工程方法所製造的磷脂酶D等。以來自微生物之磷脂酶D而言，可例舉例如來自鏈黴菌屬之磷脂酶D等。又，以磷脂酶D而言，可使用市售品。以市售之磷脂酶D而言，可例舉例如磷脂酶D(PLDP；旭化成公司製)等。又，在本發明，亦可組合不與SM及LPC反應而與PC反應之二種以上之磷脂酶D作使用。

就本發明中溶血磷脂酶而言，只要是具有對LPC之水解活性之物，則並無特別限定，可例舉以例如來自動物、植物或微生物之溶血磷脂酶、基因工程方法所製造之溶血磷脂酶等。又，作為溶血磷脂酶，亦可使用市售

品。以市售之溶血磷脂酶而言，可例舉例如溶血磷脂酶(LYPL；旭化成公司製)等。

就本發明中單甘油脂酶而言，只要是相對於LPC具有水解活性之物則並無特別限定，可例舉例如來自動物、植物或微生物之單甘油脂酶、以基因工程方法所製造之單甘油脂酶等。又，作為單甘油脂酶，亦可使用市售品。以市售之單甘油脂酶而言，可例舉例如單甘油脂酶(MGLP；旭化成公司製)等。

在本發明，可組合二種以上之溶血磷脂酶或單甘油脂酶使用。

在本反應之SM之測定方法中，不與SM及LPC反應而與PC反應的磷脂酶D之反應液中濃度，只要是可測定本發明之SM之濃度，則並無特別限制，通常為0.001至200,000U/L，較佳為0.005至100,000U/L。

在本反應之SM測定方法中溶血磷脂酶或單甘油脂酶之反應液中濃度，只要是可測定本發明之SM濃度，則並無特別限制，通常為0.001至200,000U/L，較佳為0.005至100,000U/L。

就本發明中膽鹼氧化酵素而言，只要是具有氧化膽鹼，產生過氧化氫之能力的酵素，則並無特別限制，亦可使用例如來自動物、植物或微生物之膽鹼氧化酵素之外，尚可使用以基因工程方法所製造之膽鹼氧化酵素等。又，亦可使用膽鹼氧化酵素(CLOD；協和發酵公司製)、膽鹼氧化酵素(CHO-301；東洋紡績公司製)等之市售品。在本發明，亦可組合二種以上之膽鹼氧化酵素使用。

就在本反應之SM測定方法中膽鹼氧化酵素之反應液中之濃度而言，只要是可測定本發明之SM濃度，則並無特別限制，通常為0.001至200,000U/L，較佳為0.005至20,000U/L。

就本發明中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D而言，只要是不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D，則並無特別限制，例如亦可使用來自動物、植物或微生物之磷脂酶D、具有磷脂酶D活性之脂蛋白脂酶之外，尚可使用以基因工程方法所製造的磷脂酶D等。以來自微生物之磷脂酶D而言，可例舉例如來自色褐鏈黴菌之磷脂酶D等。又，就不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D而言，亦可使用市售品。以市售之不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D而言，可例舉磷脂酶D(PLD；旭化成公司製)等。又，在本發明，亦可組合二種以上不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D使用。

就在本反應之SM測定方法中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D之反應液中之濃度而言，只要是可測定本發明之SM濃度，則並無特別限制，通常為0.001至500,000U/L，較佳為0.005至250,000U/L。

就本發明中膽鹼脫氫酵素而言，只要是在氧化型輔酶之存在下具有氧化膽鹼，產生還原型輔酶之能力的酵素，則並無特別限制，除了例如來自動物、植物或微生物

物之膽鹼脫氫酶之外，亦可使用以基因工程方法所製造之膽鹼脫氫酵素等。又，在本發明，亦可組合二種以上膽鹼脫氫酵素使用。

本反應之SM測定方法中以膽鹼脫氫酵素之反應液中濃度而言，只要是可測定本發明之SM之濃度，則並無特別限制，通常為0.001至200,000U/L，較佳為0.005至100,000U/L。

就使用膽鹼脫氫酵素測定中所使用之氧化型輔酶而言，可例舉例如 $\text{NAD(P)}^+$ 、thio- $\text{NAD(P)}^+$ 等。就膽鹼脫氫酵素之反應而產生之還原型輔酶而言，可例舉例如 $\text{NAD(P)H}$ 、thio- $\text{NAD(P)H}$ 等。

就使用於本發明之SM測定方法之氧化型輔酶之反應液中濃度而言，只要是可測定本發明之SM濃度，則並無特別限制，通常為0.01至400毫莫耳/升，較佳為0.1至100毫莫耳/升。

就本發明中還原型輔酶氧化酵素而言，只要是具有由以膽鹼脫氫酵素反應而產生之還原型輔酶來產生過氧化氫之能力之酵素，則並無特別限制，可例舉例如 $\text{NAD(P)H}$ 氧化酵素等。就還原型輔酶氧化酵素而言，可使用市售品。就市售之還原型輔酶氧化酵素而言，可例舉 $\text{NADH}$ 氧化酶(CosmoBio公司製)等。

就使用於本發明之SM測定方法之還原型輔酶氧化酵素之反應液中濃度而言，只要是可測定本發明之SM濃度，則並無特別限制，通常為0.01至400,000U/L，較佳為0.02至200,000U/L。

就使用於本發明之SM測定方法之過氧化氫酶而言，只要是可將過氧化氫變換成水與氧分子之酵素，則並無特別限制，除了例如來自動物、植物或微生物之過氧化氫酶之外，亦可使用以基因工程方法所製造之過氧化氫酶等。又，就過氧化氫酶而言，亦可使用市售品。就市售之過氧化氫酶而言，可例舉過氧化氫酶(CAT；Kikkoman公司製)、過氧化氫酶(CAT-R；Kikkoman公司製)、來自牛肝臟之過氧化氫酶(Sigma Aldrich公司製)等。又，在本發明，亦可組合二種以上之過氧化氫酶使用。

就使用於本發明之SM測定方法之過氧化氫酶之反應液中濃度而言，只要是可測定本發明之SM濃度，則並無特別限制，通常為0.001至1,000,000U/L，較佳為0.01至500,000U/L。

就在本發明所使用之水性介質而言，只要是可進行本發明SM測定方法之水性介質，則並無特別限制，可例舉例如脫離子水、蒸餾水、緩衝液等，不過較佳為緩衝液。就使用於緩衝液之緩衝劑而言，可例舉例如參(羥甲基)胺基甲烷緩衝劑、磷酸緩衝劑、硼酸緩衝劑、Good氏緩衝劑等。

就Good氏緩衝劑而言，可例舉例如2-咪啉基乙烷磺酸(MES)、雙(2-羥乙基)亞胺基參(羥甲基)甲烷(Bis-Tris)、N-(2-乙醯胺)亞胺基二乙酸(ADA)、哌啶-N,N'-雙(2-乙烷磺酸)(PIPES)、N-(2-乙醯胺)-2-胺基乙烷磺酸(ACES)、3-咪啉基-2-羥丙烷磺酸(MOPSO)、N,N-雙(2-

羥乙基)-2-氨基乙烷磺酸(BES)、3-咪啉基丙烷磺酸(MOPS)、N-[參(羥甲基)甲基]-2-氨基乙烷磺酸(TESE)、2-[4-(2-羥乙基)-1-哌啶基]乙烷磺酸(HEPES)、3-[N,N-雙(2-羥乙基)氨基]-2-羥丙烷磺酸(DIPSO)、N-[參(羥甲基)甲基]-2-羥基-3-氨基丙烷磺酸(TAPSO)、哌啶-N,N'-雙(2-羥丙烷磺酸)(POPSO)、3-[4-(2-羥乙基)-1-哌啶基]-2-羥丙烷磺酸(HEPPSO)、3-[4-(2-羥乙基)-1-哌啶基]丙烷磺酸[(H)EPPS]、N-[參(羥甲基)甲基]甘氨酸(Tricine)、N,N-雙(2-羥乙基)甘氨酸、N-參(羥甲基)甲基-3-氨基丙烷磺酸(TAPS)、N-環己基-2-氨基乙烷磺酸(CHES)、N-環己基-3-氨基-2-羥丙烷磺酸(CAPSO)、N-環己基-3-氨基丙烷磺酸(CAPS)等。緩衝液之濃度只要是適合於測定的濃度，則並無特別限制，不過通常為0.001至2.0莫耳/升，較佳為0.005至1.0莫耳/升。

就在本發明所使用之過氧化酶而言，只要是可進行本發明之SM測定方法之過氧化酶，則並無特別限制，可例舉例如來自西洋山葵菜之過氧化酶等。

就使用於本發明SM測定方法之過氧化酶之反應液中濃度而言，只要是可進行本發明之SM測定之濃度，則並無特別限制，通常為0.01至500,000U/L，較佳為1至200,000U/L。

就使用於本發明之SM測定方法之白色型色原體而言，只要是可進行本發明SM測定方法之白色型色原體，則無特別限制。白色型色原體，在過氧化酶之存在下，與過氧化氫反應，單獨具有產生色素之功能。

就白色型色原體而言，可例舉例如 10-N-羧甲基胺甲醯基-3,7-雙(二甲基胺基)-10H-啡噻吡(CCAP)、10-N-甲基胺甲醯基-3,7-雙(二甲基胺基)-10H-啡噻吡(MCDP)、N-(羧甲基胺基羰基)-4,4'-雙(二甲基胺基)二苯胺鈉鹽(DA-64)、10-N-(羧甲基胺基羰基)-3,7-雙(二甲基胺基)-10H-啡噻吡鈉鹽(DA-67)、4,4'-雙(二甲基胺基)二苯基胺、雙[3-雙(4-氯苯基)甲基-4-二甲基胺基苯基]胺(BCMA)等。

就使用於本發明 SM 之測定方法之白色型色原體之反應液中之濃度而言，只要是可進行本發明 SM 之測定之濃度，則並無特別限制，通常為 0.001 至 5g/L，較佳為 0.01 至 1g/L。

就使用於本發明 SM 之測定方法之氧化偶合顯色型色原體而言，只要是可進行本發明 SM 之測定方法之氧化偶合顯色型色原體，則無特別限制。氧化偶合顯色型色原體，在過氧化酶之存在下，具有與過氧化氫反應而產生色素之功能。在產生該色素之反應，可使用一對氧化偶合顯色型色原體之組合。另一方面，氧化偶合顯色型色原體，在過氧化酶之存在下，亦具有與過氧化氫反應，將過氧化氫變換成無色物質之功能。在將該過氧化氫變換成無色物質之反應，係僅使用一對氧化偶合顯色型色原體中之一。就一對氧化偶合顯色型色原體之組合而言，可例舉偶合劑與苯胺類之組合，偶合劑與酚類之組合。

就偶合劑而言，可例舉例如 4-胺基安替比林

(aminoantipyrine)(4-AA)、3-甲基-2-苯并噻唑啉酮肼等。

就苯胺類而言，可例舉N-(3-磺酸基丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羥-3-磺酸基丙基)-3-甲基苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(2-羥-3-磺酸基丙基)-3,5-二甲基苯胺(MAOS)、N-乙基-N-(2-羥-3-磺酸基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(DAOS)、N-乙基-N-(3-磺酸基丙基)-3-甲基苯胺(TOPS)、N-(2-羥-3-磺酸基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(HDAOS)、N,N-二甲基-3-甲基苯胺、N,N-二(3-磺酸基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺酸基丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺酸基丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-磺酸基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-(3-磺酸基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺酸基丙基)-3,5-二甲基苯胺、N-乙基-N-(2-羥-3-磺酸基丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羥-3-磺酸基丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀醯基乙二胺(EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙醯基乙二胺、N-乙基-N-(2-羥-3-磺酸基丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺(F-DAOS)等。

就酚類而言，可例舉酚、4-氟酚、3-甲基酚、3-羥基-2,4,6-三碘苯甲酸(HTIB)等。

就使用於本發明SM之測定方法之氧化偶合顯色型色原體之反應液中濃度而言，只要是可進行本發明SM之測定之濃度，則並無特別限制，通常為0.001至5g/L，較佳為0.01至1g/L。

#### < SM測定用套組 >

本發明之SM測定用套組係使用於本發明之SM之測

定方法。就本發明之SM測定用套組而言，可例舉例如2試藥系統之套組、3試藥系統之套組等，不過較佳為包含第1試藥與第2試藥之2試藥系統之套組。

本發明SM測定用套組，可為被凍結乾燥之狀態，亦可為溶解於水性介質之狀態。在使用被凍結乾燥狀態之套組測定檢體中SM之情形，在測定前溶解於水性介質而使用。就水性介質而言，可例舉例如前述之水性介質等。

在本發明之SM測定用套組，可使用不與前述SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶；或者不與單甘油脂酶、膽鹼氧化酵素、甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素、還原型輔酶氧化酵素、過氧化氫酶、過氧化氫酶抑制劑、白色型色原體、氧化偶合顯色型色原體。

在包含第1試藥及第2試藥的2試藥系統之SM測定用套組中，不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D係含於第1試藥。溶血磷脂酶或單甘油脂酶係含於第1試藥。不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應、而與SM反應之磷脂酶D係含於第2試藥。膽鹼氧化酵素雖含於第1試藥，不過進一步可含於第2試藥。膽鹼脫氫酵素雖含於第1試藥，不過進一步亦可含於第2試藥。氧化型輔酶雖可含於第1試藥，不過進一步亦可含於第2試藥。還原型輔酶氧化酵素，雖可含於第1試藥，進一步亦可含於第2試藥。過氧化氫酶係含於第1試藥。過氧化氫酶抑制劑係含於第2試藥。過氧化酶雖係含於第1試藥，不過進一步亦可含

於第2試藥。白色型色原體係含於第2試藥。過氧化氫之去除係在過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體中其一之存在下進行之情形，則一對氧化偶合顯色型色原體中之其一含於第1試藥。過氧化氫之測定係在過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體之存在下進行之情形，一對氧化偶合顯色型色原體中之其一含於第1試藥，另一為含於第2試藥之態樣較佳。

本發明之SM測定用套組中不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D之第1試藥中濃度，通常為0.002至400,000U/L，較佳為0.01至200,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D之第1試藥中含量，在以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.002至400,000U/L、較佳為0.01至200,000U/L之含量。

本發明之SM測定用套組中溶血磷脂酶或單甘油脂酶之第1試藥中濃度，通常為0.002至400,000U/L，較佳為0.01至200,000U/L。經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，在溶血磷脂酶或單甘油脂酶之第1試藥中含量，以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.002至400,000U/L、較佳為0.01至200,000U/L之含量。

本發明之SM測定用套組中膽鹼氧化酵素之第1試藥中之濃度，通常為0.002至400,000U/L，較佳為0.01至200,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，膽鹼氧化酵素之第1試藥中含量，以水性介質所溶解之狀態之濃度，通常為0.002至400,000U/L，較佳為0.01至200,000

U/L之含量。

在本發明之SM測定用套組中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D之第2試藥中濃度，通常為0.004至800,000U/L，較佳為0.02至400,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D之第2試藥中之含量，在以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.004至800,000U/L、較佳為0.02至400,000U/L之含量。

本發明之SM測定用套組中膽鹼脫氫酵素之第1試藥中濃度通常為0.002至400,000U/L，較佳為0.01至200,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，膽鹼脫氫酵素之第1試藥中含量，在以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.002至400,000U/L、較佳為0.01至200,000U/L之含量。

本發明之SM測定用套組中氧化型輔酶之第1試藥中濃度，通常為0.02至800毫莫耳/升，較佳為0.2至200毫莫耳/升。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，氧化型輔酶之第1試藥中含量，以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.02至800毫莫耳/升、較佳為0.2至200毫莫耳/升之含量。

在本發明之SM測定用套組中還原型輔酶氧化酵素之第1試藥中濃度，通常為0.02至800,000U/L，較佳為0.04至400,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，還原型輔酶氧化酵素之第1試藥中含量，以水性介質所溶解

狀態之濃度，通常為0.02至800,000U/L、較佳為0.04至400,000U/L之含量。

本發明之SM測定用套組中過氧化氫酶之第1試藥中濃度，通常為0.002至1,500,000U/L，較佳為0.02至750,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，過氧化氫酶之第1試藥中含量，以水性介質所溶解之狀態之濃度，通常為0.002至1,500,000U/L、較佳為0.02至750,000U/L之含量。

在本發明之SM測定用套組中過氧化酶之第1試藥中濃度，通常為0.01至500,000U/L，較佳為1至200,000U/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，過氧化酶之第1試藥中含量，以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.01至500,000U/L，較佳為1至200,000U/L之含量。

本發明之SM測定用套組中白色型色原體之第2試藥中濃度，通常為0.002至7.5g/L，較佳為0.02至1.5g/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，白色型色原體之第2試藥中含量，以水性介質所溶解之狀態之濃度，通常為0.002至7.5g/L、較佳為0.02至1.5g/L之含量。

本發明之SM測定用套組中氧化偶合顯色型色原體之第1試藥及第2試藥中濃度，通常為0.002至7.5g/L，較佳為0.02至1.5g/L。在經凍結乾燥狀態之SM測定用套組，氧化偶合顯色型色原體之第1試藥及第2試藥中含量，以水性介質所溶解狀態之濃度，通常為0.002至7.5g/L、較佳為0.02至1.5g/L之含量。

在本發明之SM測定用套組，可依照需要亦可含有水

性介質、穩定化劑、防腐劑、干涉物質(interference substance)之影響抑制劑、反應促進劑、界面活性劑等。就水性介質而言，可例舉例如前述水性介質等。就穩定化劑而言，可例舉例如乙二胺四乙酸(EDTA)、蔗糖、氯化鈣、甘胺酸、麩胺酸鈉、色氨酸等。就防腐劑而言，可例舉例如疊氮化鈉、抗生物質、Bioace等。就干涉物質之影響抑制劑而言，例如用以抑制抗壞血酸影響之抗壞血酸氧化酶、用以抑制膽紅素影響之亞鐵氰化物(ferrocyanide)等。以反應促進劑而言，可例舉例如輔脂酶(colipase)等之酵素、硫酸鈉、氯化鈉等之鹽類等。就界面活性劑而言，可例舉例如非離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、陰離子性界面活性劑、兩性界面活性劑等。就非離子性界面活性劑而言，可例舉例如聚氧乙烯系界面活性劑等。

茲記載本發明SM測定用套組之具體的態樣如下，但本發明之SM測定用套組並非限定於該等。

• 套組 1

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼氧化酵素、過氧化氫酶、過氧化酶

第 2 試藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、過氧化氫酶抑制劑、白色型色原體

• 套組 2

第 1 試 藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼氧化酵素、過氧化氫酶、過氧化酶

第 2 試 藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、膽鹼氧化酵素、過氧化氫酶抑制劑、白色型色原體

• 套組 3

第 1 試 藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化氫酶、過氧化酶

第 2 試 藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、過氧化氫酶抑制劑、白色型色原體

• 套組 4

第 1 試 藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化氫酶、過氧化酶

第 2 試 藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化氫酶抑制劑、白色型色原體

• 套組 5

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

• 套組 6

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、膽鹼氧化酵素、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

• 套組 7

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反

應之磷脂酶D、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者  
• 套組 8

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

• 套組 9

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與 SM 反應之磷脂酶 D、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

• 套組 10

第 1 試藥

不與 SM 及 LPC 反應而與 PC 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油酯酶、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試 藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

• 套組 11

第 1 試 藥

不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試 藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

• 套組 12

第 1 試 藥

不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中其一

第 2 試 藥

不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、一對氧化偶合顯色型色原體中之另一者

茲根據實施例進一步詳細說明本發明如下，不過該等並非限定任何本發明之範圍。另外，在本實施例及參考例，係使用下述製造商之試藥及酵素。

PIPES(同仁化學研究所公司製)、EMSE(Daitochemix公司製)、氯化鈣2水合物(和光純藥工業公司製)、4-AA(埼京化成公司製)、過氧化酶(POD; 東洋紡績公司製)、過氧化氫酶(Kikkoman公司製)、CLOD(膽鹼氧化酵素; 協和發酵公司製)、疊氮化鈉(和光純藥工業公司製)、MGLP(單甘油脂酶; 旭化成公司製)、PLDP(旭化成公司製)、PLD(旭化成公司製)、磷脂膽鹼(Sigma Aldrich公司製)、溶血磷脂膽鹼(Sigma Aldrich公司製)、SM(Sigma·Aldrich公司製)、Triton X-100(聚氧乙烯系界面活性劑: Sigma·Aldrich公司製)。

#### [實施例1]

就PC、LPC及SM之各磷脂質，以下述方法研討(1)PLDP、(2)PLD、及(3)MGLP之相對於各酵素之反應性。

#### < 套組 >

如第1表所示，調製包含下述第1試藥及第2試藥之套組(套組A至F)。

#### 第1試藥

PIPES(pH7.0)	15 g/L
EMSE	0.3 g/L
Triton X-100	0.05 g/L
MGLP	

#### 第2試藥

PIPES(pH7.5)	15 g/L
4-AA	0.5 g/L
疊氮化鈉	0.2 g/L
POD	20kU/L
氯化鈣2水合物	0.3 g/L
CLOD	30kU/L
PLDP或PLD	

第 1 表

套組	第1試藥		第2試藥	
	酵素	濃度	酵素	濃度
套組A	無	-	無	-
套組B	無	-	PLDP	30kU/L
套組C	無	-	PLD	4kU/L
套組D	MGLP	10kU/L	無	-
套組E	MGLP	10kU/L	PLDP	30kU/L
套組F	MGLP	10kU/L	PLD	4kU/L

## &lt; 檢體 &gt;

使用生理食鹽水、SM標準液(SM濃度：100mg/dL)、PC標準液(PC濃度：100mg/dL)、LPC標準液(LPC濃度：100mg/dL)作為檢體。

## &lt; 使用套組A之測定～相對於標準液之吸光度 &gt;

檢體係使用生理食鹽水(磷脂質：0.0mg/dL)與SM標準液，套組係使用套組A，以日立7170S型自動分析機，根據下述方法，決定相對於SM標準液之「吸光度」。

添加生理食鹽水(2.5 $\mu$ L)及第1試藥(240 $\mu$ L)於反應細

胞，在 37°C 加溫 5 分鐘，以主波長 600nm、副波長 700nm 測定其反應液之吸光度 ( $E_{1\text{生理食鹽水}}$ )，接著，在該反應液中添加第 2 試藥 (80 $\mu$ L)，進一步在 37°C 加溫 5 分鐘後，以主波長 600nm、副波長 700nm 測定反應液之吸光度 ( $E_{2\text{生理食鹽水}}$ )。將自  $E_{2\text{生理食鹽水}}$  減去  $E_{1\text{生理食鹽水}}$  之值作為  $\Delta E_{\text{生理食鹽水}}$ 。

除了檢體係使用 SM 標準液以替代生理食鹽水以外，其他則進行與上述相同之反應，自  $E_{2\text{SM}}$  減去  $E_{1\text{SM}}$  作為  $\Delta E_{\text{SM}}$ 。如式 (I) 所示，自  $\Delta E_{\text{SM}}$  減去上述  $\Delta E_{\text{生理食鹽水}}$  所得之值作為相對於 SM 標準液之「吸光度」(A)。

$$\text{相對於 SM 標準液之「吸光度」(A)} = \Delta E_{\text{SM}} - \Delta E_{\text{生理食鹽水}} \quad (\text{I})$$

各自使用 PC 標準液、及 LPC 標準液以替代 SM 標準液，同樣地，決定相對於 PC 標準液之「吸光度」(A)、及相對於 LPC 標準液之「吸光度」(A)。

< 使用套組 B 至 F 之測定 ~ 相對於標準液之吸光度 >

各自使用套組 B 至 F 以替代套組 A，並決定相對於各套組中各標準液之「吸光度」。相對於各套組中各標準液之「吸光度」如第 3 圖所示。

由第 3 圖可明白下述事項。首先，在使用套組 A 之情形，可知因就任一磷脂質，亦無法獲得「吸光度」，故任一之磷脂質，亦不與膽鹼氧化酵素反應。由使用套組 B 之反應可知，PLDP 與 PC 進行特異反應，並產生膽鹼。由使用套組 C 之反應可知，PLD 亦與任一磷脂質反應，並產生膽鹼。

由使用套組D之反應可知就任一磷脂質，因與MGLP之反應並不產生膽鹼。

在使用套組E之情形，可知僅PC產生膽鹼。由與使用套組B的反應之比較，吾人考慮PC不與MGLP反應而與PLDP，並產生膽鹼。又，由LPC可知，由於無法獲得「吸光度」，故由LPC及MGLP之反應而產生之甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸，並不與PLDP反應，而不產生膽鹼。

由使用套組F之反應可知，在PC與SM之情形，產生膽鹼。由與使用套組C的反應之比較，吾人認為PC及SM不與MGLP反應而與PLD反應，並產生膽鹼。一方面，吾人可知，因LPC無法獲得「吸光度」，故使LPC與MGLP反應而產生之甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸，並不與PLD反應，而不產生膽鹼。

因此，吾人可明白藉由在含有PC、LPC及SM之檢體中使PLDP作用，而僅PC與PLDP反應，且將產生的膽鹼變換成過氧化氫予以去除，同時藉由在殘存之LPC與SM中使MGLP作用後，再使PLD作用，而僅LPC與MGLP反應，且因產生的甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸不與PLD反應，故藉由僅檢體中SM與PLD反應而產生膽鹼，並測定由該膽鹼產生的過氧化氫，而可僅測定SM。

#### [實施例2]

調製包含下述第1試藥及第2試藥之SM測定用套組。

#### 第1試藥

PIPES(pH6.25)	15 g/L
EMSE	0.3 g/L

過氧化氫酶	300kU/L
PLDP	10kU/L
MGLP	10kU/L
CLOD	10kU/L
Triton X-100	0.05g/L

## 第 2 試藥

PIPES(pH7.5)	15g/L
4-AA	0.5g/L
疊氮化鈉	0.2g/L
POD	20kU/L
PLD	4kU/L
CLOD	10kU/L
氯化鈣 2 水合物	0.3g/L
Triton X-100	8g/L

## [實施例 3]

作為實施例 2 之測定用套組、及對照套組係使用鞘磷脂分析套組 (Sphingomyelin Assay Kit)(Cayman Chemical Company 公司製)，根據以下順序決定人類血清 28 檢體之各檢體中 SM 濃度。

## (1) 校正曲線之製成

標準液係使用生理食鹽水 (SM: 0.0mg/dL) 與明顯可知 SM 濃度為 35.0mg/dL 之標準血清，套組係使用實施例 2 之套組，藉由日立 7170S 型自動分析機，而作成表示 SM 濃度與「吸光度」之關係的校正曲線。

在此記載之「吸光度」係表示以下述反應所測定的 2

種吸光度(E1及E2)為基礎，自E2減去E1所得之值。

添加標準液(2.5 $\mu$ L)及第1試藥(240 $\mu$ L)至反應細胞，在37 $^{\circ}$ C加溫5分鐘，以主波長600nm、副波長700nm測定該反應液之吸光度(E1)，接著，在該反應液中添加第2試藥(80 $\mu$ L)，進一步在37 $^{\circ}$ C加溫5分鐘後，以主波長600nm、副波長700nm測定反應液之吸光度(E2)。

#### (2)在人類血清檢體中「吸光度」之測定

在(1)之校正曲線之製成，除了使用人類血清檢體(28檢體)以替代標準液以外，其他進行與(1)之「吸光度」計算方法相同之操作，測定該檢體之各檢體中「吸光度」。

#### (3)人類血清檢體中之SM濃度之決定

由以(2)測定的「吸光度」與(1)製成的校正曲線，測定各檢體中SM濃度。

#### (4)對照套組所致SM濃度之決定

依照對照套組之使用說明書，使用對照套組，來決定相同人類血清28檢體中SM濃度。

由根據使用對照套組的測定所決定的各檢體中之SM濃度、與使用實施例2之套組之測定所決定的各檢體中之SM濃度，在研討了使用對照套組之測定與使用實施例2套組之測定間相關性，則可獲得第4圖所示相關圖。如該相關圖所示，可明白相關係數(r)成為0.8445，在兩測定間有良好的相關關係。

#### [實施例4]

使用SM標準液(SM濃度：100mg/dL)，調製10階段之

稀釋系列，就各稀釋檢體，藉由與實施例3相同之方法來測定吸光度。其結果如第5圖所示。

由第5圖明顯可知，藉由使用實施例2套組之測定，而在SM濃度與吸光度之間獲得非常良好的直線性。

#### [實施例5]

使用實施例2套組研討相對於SM之特異性。檢體係使用生理食鹽水、SM標準液(SM濃度：100mg/dL)、PC標準液(PC濃度：100mg/dL)、LPC標準液(LPC濃度：100mg/dL)，藉由實施例3之方法來測定相對於各檢體之「吸光度」。

另一方面、使用為磷脂質測定用套組之「Determiner L PL」(協和Medex公司製)以替代實施例2之套組，以與實施例3相同之方法來測定相對於各檢體之「吸光度」。測定結果如第2表所示。

第2表

	吸光度(mAbs)	
	實施例2	Determiner PL
生理食鹽水	0.0	0.0
SM(SM)	136.1	139.0
磷脂膽鹼(PC)	2.7	141.0
溶血磷脂膽鹼(LPC)	5.4	198.2

由第2表明顯可知，在使用「Determiner L PL」的測定，係使SM、PC、LPC全部磷脂質反應，不過在使用實施例2套組之測定，則僅SM反應。因此，可確認實施例2之套組係將SM進行特異地測定之套組。

[產業上之可利用性]

藉由本發明而可提供對動脈硬化等之診斷為有效的血液中SM之測定方法、及測定用套組。

【圖式簡單說明】

第1圖係使用本發明之膽鹼氧化酵素之SM測定方法之原理圖。

第2圖係使用本發明之膽鹼脫氫酵素之SM測定方法之原理圖。

第3圖係表示實施例1之套組(套組A至F)中相對於SM、LPC及PC之各磷脂質之標準液的「吸光度」圖。縱軸表示吸光度(mAbs)、橫軸表示各套組(套組A至F)。

第4圖表示使用實施例2之套組之測定、與使用對照套組之測定間之相關圖。縱軸表示根據使用實施例2套組之測定所決定的檢體中SM濃度(mg/dL)；橫軸表示根據使用對照套組之測定，所決定的檢體中SM濃度(mg/dL)。

第5圖係表示使用實施例2套組之測定中，SM濃度與吸光度間關係之圖表。縱軸表示吸光度(mAbs)、橫軸表示SM濃度(mg/dL)。

【主要元件符號說明】

無。

## 七、申請專利範圍：

## 1. 一種檢體中鞘磷脂之測定方法，其特徵為：

將檢體和不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼 (lysophosphatidylcholine) 反應而與磷脂膽鹼 (phosphatidylcholine) 反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、及膽鹼氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶 D、及膽鹼氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。

## 2. 一種檢體中鞘磷脂之測定方法，其特徵為：將檢體和不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素反應；去除產生之過氧化氫；接著，和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶 D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素反應；並測定產生之過氧化氫。

## 3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中將檢體和不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶 D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶及膽鹼氧化酵素之反應，在過氧化氫酶 (catalase) 之存在下進行；將不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶 D 及膽鹼氧化酵素之反應，在過氧化氫酶抑制劑之存在下進行。

## 4. 如申請專利範圍第2項之方法，其中將檢體和不與鞘磷

脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素之反應，在過氧化氫酶之存在下進行；將和不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、氧化型輔酶、膽鹼脫氫酵素及還原型輔酶氧化酵素之反應，在過氧化氫酶抑制劑之存在下進行。

5. 如申請專利範圍第3或4項之方法，其中過氧化氫酶抑制劑為疊氮化合物(azide)。
6. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中過氧化氫之去除係在過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體中其一之存在下進行；而過氧化氫之測定係在過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體之存在下進行。
7. 如申請專利範圍第1至5項中任一項之方法，其中過氧化氫之測定係在過氧化酶、及白色型色原體之存在下進行。
8. 如申請專利範圍第1至7項中任一項之方法，其中不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D，係來自鏈黴菌屬(*Streptomyces* sp.)之磷脂酶D。
9. 如申請專利範圍第1至8項中任一項之方法，其中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D，係來自色褐鏈黴菌(*Streptomyces chromofuscus*)之磷脂酶D。
10. 一種檢體中鞘磷脂測定用套組，其特徵為包含：  
第1試藥，其含有不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應

而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼氧化酵素、及過氧化氫酶；及第2試藥，其含有不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、及過氧化氫酶抑制劑。

11. 一種檢體中鞘磷脂測定用套組，其特徵為包含：

第1試藥，其含有不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼氧化酵素、過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體中其一；及第2試藥，其包含不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、及氧化偶合顯色型色原體之另一者。

12. 一種檢體中之鞘磷脂測定用套組，其特徵為包含：

第1試藥，其含有不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、及過氧化氫酶；及第2試藥，其含有不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、及過氧化氫酶抑制劑。

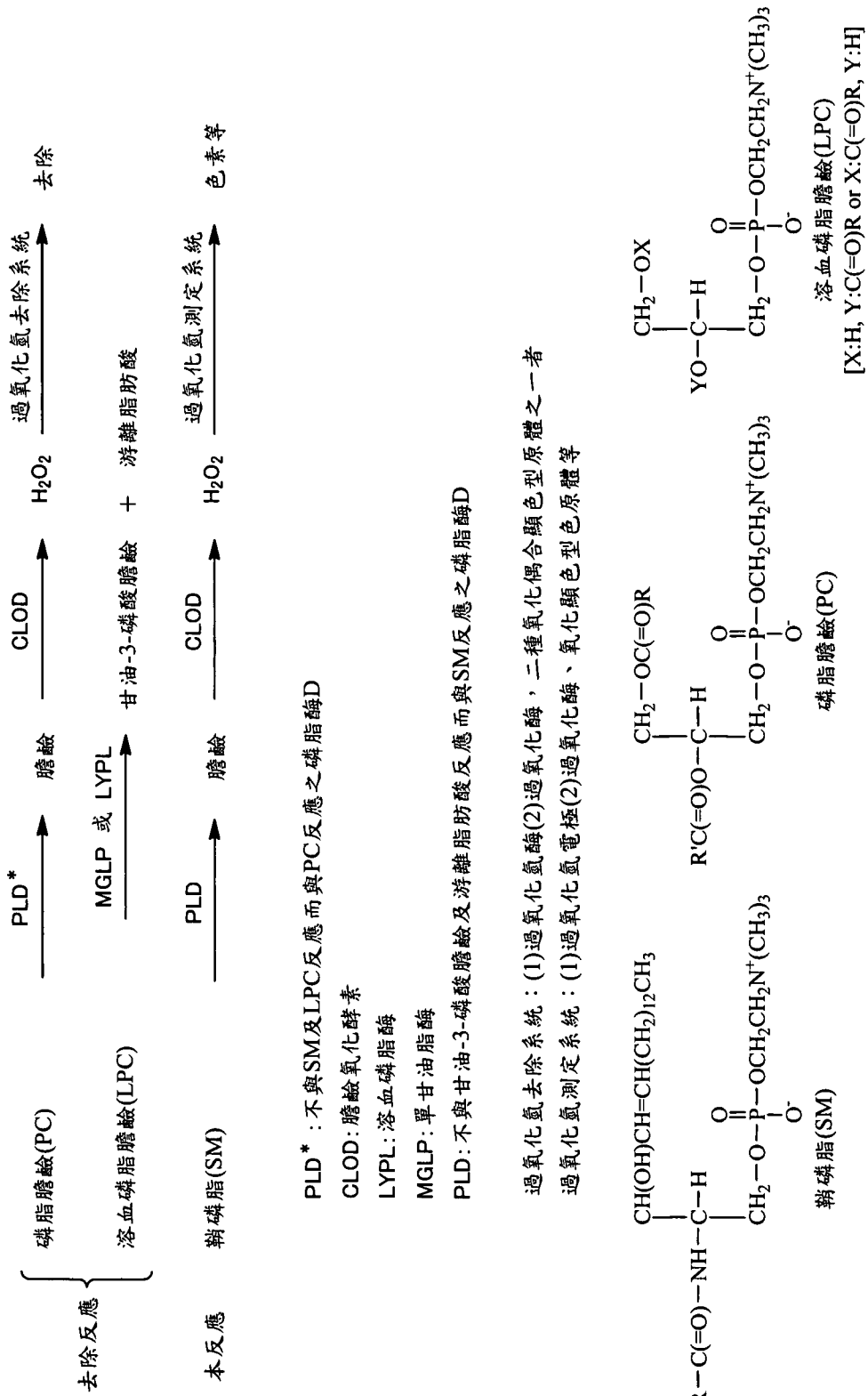
13. 一種檢體中鞘磷脂測定用套組，其特徵為包含：

第1試藥，其含有不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D、溶血磷脂酶或單甘油脂酶、膽鹼脫氫酵素、氧化型輔酶、還原型輔酶氧化酵素、過氧化酶、及一對氧化偶合顯色型色原體中其一；及第2試藥，其含有不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D、及氧化偶合顯色型

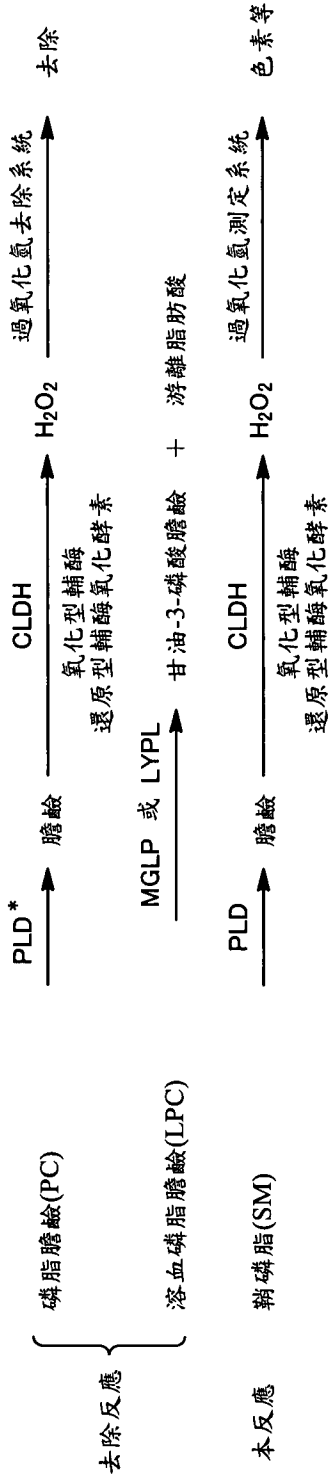
色原體之另一者。

14. 如申請專利範圍第10或12項之套組，其中過氧化氫酶抑制劑為疊氮化合物。
15. 如申請專利範圍第10、12或14項之套組，其中過氧化酶及白色型色原體，係各自含於第1試藥及第2試藥之個別的試藥。
16. 如申請專利範圍第10至15項中任一項之套組，其中不與鞘磷脂及溶血磷脂膽鹼反應而與磷脂膽鹼反應之磷脂酶D，係來自鏈黴菌屬之磷脂酶D。
17. 如申請專利範圍第10至16項中任一項之套組，其中不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與鞘磷脂反應之磷脂酶D，係來自白色褐鏈黴菌之磷脂酶D。

八、圖式：  
第1圖



第2圖



PLD\* : 不與SM及LPC反應而與PC反應之磷脂酶D

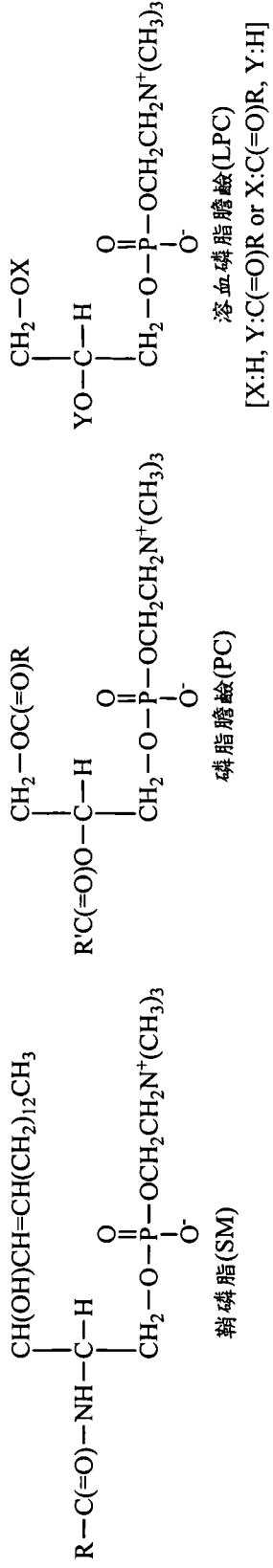
CLDH: 膽鹼脫氫酵素

LYPL: 溶血磷脂酶

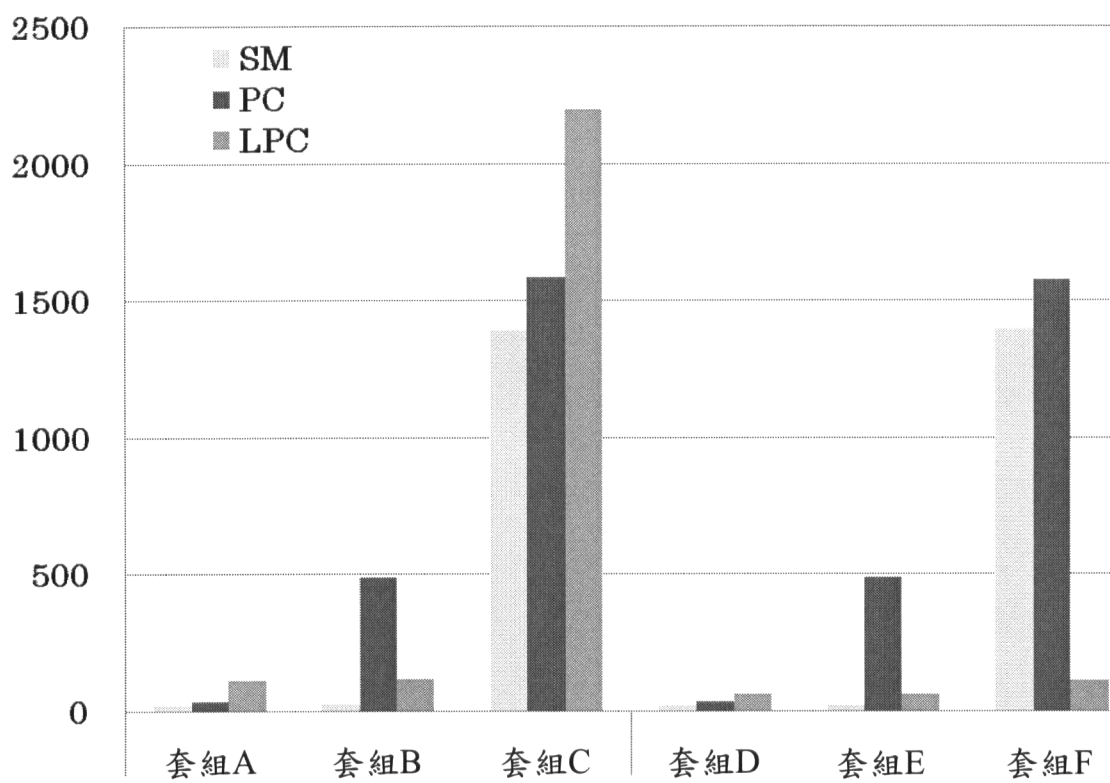
MGLP: 單甘油酯酶

PLD: 不與甘油-3-磷酸膽鹼及游離脂肪酸反應而與SM反應之磷脂酶D

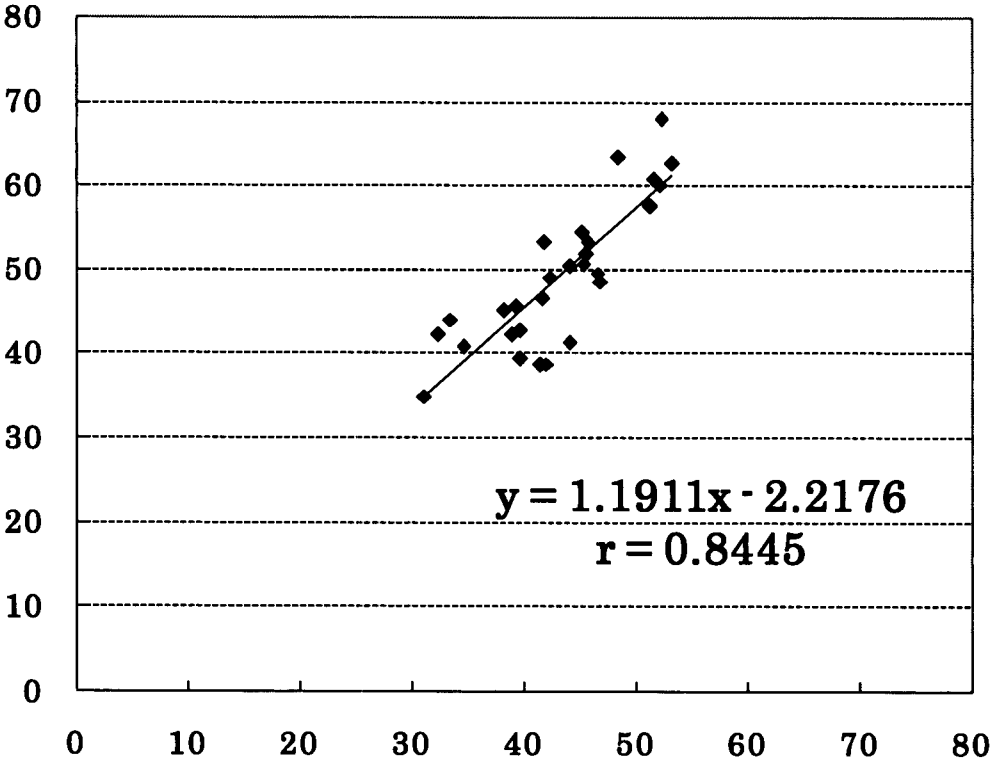
過氧化氫去除系統：(1)過氧化氫酶(2)過氧化酶，二種氧化偶合顯色型原體之一者  
 過氧化氫測定系統：(1)過氧化氫電極(2)過氧化酶、氧化顯色型原體等



第3圖



第4圖



第5圖

