(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年10月3日(03.10.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/189642 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/92 (2006.01) *C12Q 1/44* (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/013766

(22) 国際出願日： 2019年3月28日(28.03.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-062143 2018年3月28日(28.03.2018) JP

(71) 出願人: デンカ生研株式会社(**DENKA SEIKEN CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 佐藤 謙亨 (**SATOH, Noriyuki**); 〒9591834 新潟県五泉市木越字鏡田１３５９－１ デンカ生研株式会社 鏡田工場内 Niigata (JP). 伊海田 誠(**IKAIDA, Makoto**); 〒9591834 新潟県五泉市木越字鏡田１３５９－１ デンカ生研株式会社 鏡田工場内 Niigata (JP). 平尾 裕子(**HIRAO, Yuhko**); 〒9591834 新潟県五泉市木越字鏡田１３５９－１ デンカ生研株式会社 鏡田工場内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所 (**TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM**); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目７番１０号山京別館８０１ Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** QUANTIFICATION METHOD, QUANTIFICATION REAGENT AND QUANTIFICATION KIT FOR LIPOPROTEIN CHOLESTEROL

(54) 発明の名称： リポ蛋白コレステロールの定量方法、定量試薬及び定量キット

(57) **Abstract:** Provided are: a method for quantifying a lipoprotein cholesterol in a sample of interest more accurately; and a quantification reagent and a quantification kit which can be used in the method. The present invention is a lipoprotein cholesterol quantification method for quantifying a lipoprotein cholesterol in a lipoprotein-containing sample of interest optionally using a quantification reagent, the method including adding a phospholipid to the sample or the quantification reagent. The present invention is also a reagent for use in the quantification of cholesterol in a lipoprotein, which can be used in the method of the present invention and contains a phospholipid. The present invention is also a kit for quantifying a lipoprotein cholesterol, which can be used for the method of the present invention and includes a phospholipid.

(57) 要約：要約 被検試料中のリポ蛋白コレステロールをより正確に定量できる方法、この方法に用いられる定量試薬及び定量キットを提供する。本発明は、リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを、所望により定量試薬を用いて定量するリポ蛋白コレステロールの定量方法であって、前記被検試料中又は前記定量試薬中にリン脂質を添加することを含む。また、本発明は、前記本発明の方法に用いられるリポ蛋白中のコレステロールの定量試薬であって、リン脂質を含有する定量試薬である。更に、本発明は、前記本発明の方法に用いられるリポ蛋白コレステロールの定量キットであって、リン脂質を含む定量キットである。

WO 2019/189642 A1

明　細　書

発明の名称 ：

リポ蛋白コレステロールの定量方法、定量試薬及び定量キット

技術分野

[0001] 本発明は、リポ蛋白中のコレステロールの定量方法、定量試薬及び定量キットに関する。

背景技術

[0002] 血液中に含まれるリポ蛋白は、超遠心分離による密度の違いから、カイロミクロン、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLと呼ぶことがある）、中間密度リポ蛋白（以下、IDLと呼ぶことがある）、低密度リポ蛋白（以下、LDLと呼ぶことがある）、高密度リポ蛋白（以下、HDLと呼ぶことがある）に分けられる。近年はこれらのリポ蛋白は比重や大きさによってさらに細分化されており、例えば、LDLの中で小型で高密度のものとして、小粒子低密度リポ蛋白（以下、small, dense LDL又はsdLDLと呼ぶことがある）などがある。これらのリポ蛋白は、トリグリセリドやコレステロールなどの脂質や蛋白等の含有量が違っており、それぞれ生体内で異なった作用を示すことが知られている。

[0003] 現在までに知られているリポ蛋白中のコレステロールの測定法として、超遠心法、NMR法などが存在する。超遠心は遠心によりリポ蛋白の密度の差を利用して画分する方法であり、作業に熟練が必要なこと、日数がかかること、また費用も高額となる欠点がある。NMR法は磁気共鳴によりリポ蛋白の粒子数を計測する方法であるが、特殊な機械が必要であり、一般的ではない。

[0004] 近年、これらの煩雑な操作が不要で、自動分析装置において使用可能なダイレクト法が急速に普及してきた。HDLを測定する方法としては、例えば、特許文献１には、凝集剤として硫酸化シクロデキストリンを用いて、ＨＤＬ以外のリポ蛋白を十分に反応させた後、ポリエチレングリコールで修飾した酵素を作用させて、ＨＤＬ中のコレステロールを特異的に測定する方法が開示されている。特許文献２には、ＨＤＬ以外のリポ蛋白に対して反応阻害性の

界面活性剤と、ＨＤＬを特異的に溶解する界面活性剤を使用する方法が開示されている。特許文献３には、第一工程でＨＤＬ以外のリポ蛋白をカタラーゼで消去し、第二工程でＨＤＬに特異的に作用する界面活性剤を用いてＨＤＬを測定する方法が開示されている。更に特許文献４には、初めにＨＤＬ以外のリポ蛋白に対する抗体を作用させ、次いでＨＤＬの溶解を行い、コレステロールを検出する方法が開示されている。small, dense LDLを測定する方法としては、例えば、特許文献５には、第一工程でsmall, dense LDL以外のリポ蛋白のコレステロールをsmall, dense LDL以外に作用する界面活性剤を用いて消去し、次いで残存したsmall, dense LDL中のコレステロールを定量する方法が開示されている。特許文献６には、第一工程でスフィンゴミエリナーゼを用いてsmall, dense LDL以外のLDLのリポ蛋白のコレステロールを消去し、次いで残存したsmall, dense LDL中のコレステロールを定量する方法が開示されている。また、カイロミクロン（カイロミクロンレムナントを含む）、VLDL（VLDLレムナントを含む）及びIDLを合わせた密度1.019g/cm3未満のトリグリセリドリッチリポ蛋白（TRL）の測定方法としては、特許文献７には、TRL以外のリポ蛋白のコレステロールをTRL以外に作用する界面活性剤を用いて消去し、次いで残存したTRL中のコレステロールを定量する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平８－１３１１９７号公報

特許文献2：特開平１１－５６３９５号公報

特許文献3：ＷＯ９８／２６０９０号公報

特許文献4：特開平９－９６６３７号公報

特許文献5：特開２０１３－１４８５８９号公報

特許文献6：ＷＯ０９／０４８１４３号公報

特許文献7：特開２０１７－２０９０３５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、被検試料中のリポ蛋白コレステロールをより正確に定量できる方法、この方法に用いられる定量試薬及び定量キットを提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、被検試料中又は定量試薬中にリン脂質を添加することで、測定値の直線性（被検試料の希釈レベルとコレステロールの反応吸光度との相関の直線性）が向上することを見出した。この知見を利用することにより、より正確にリポ蛋白中のコレステロールを測定できることに想到し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[１] リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを、所望により定量試薬を用いて定量するリポ蛋白コレステロールの定量方法であって、前記被検試料中又は前記定量試薬中にリン脂質を添加することを含む定量方法。

[２] 前記リン脂質がホスファチジルコリン（ＰＣ）又はリゾホスファチジルコリン（ＬＰＣ）である［１］に記載の方法。

[３] 前記リン脂質がリン脂質様界面活性剤である[１］に記載の方法。

[４] 前記リン脂質が、定量されるコレステロールを含むリポ蛋白とは異なるリポ蛋白質である［１］に記載の方法。

[５] 前記リン脂質が高密度リポ蛋白質（ＨＤＬ）である［４］に記載の方法。

[６] 前記リポ蛋白がトリグリセリドリッチリポ蛋白（ＴＲＬ）である［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

[７] 前記リポ蛋白がsmall, dense ＬＤＬである［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

[８] 前記リポ蛋白コレステロールを定量試薬を用いて定量する［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

[９] ［１］～［８］のいずれかに記載の方法に用いられるリポ蛋白中のコレ

ステロールの定量試薬であって、リン脂質を含有する定量試薬。

［１０］［９］に記載の試薬の、リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを定量するための試薬としての使用。

［１１］［１］～［８］のいずれかに記載の方法に用いられるリポ蛋白コレステロールの定量キットであって、リン脂質を含む定量キット。

［１２］［１１］に記載のキットの、リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを定量するためのキットとしての使用。

発明の効果

[0009] 本発明により、被検試料中のリポ蛋白コレステロールをより正確に定量することができる新規な方法、この方法に用いられる定量試薬及び定量キットが提供された。

図面の簡単な説明

[0010] [図1-1]実施例１において、希釈系列１（ヒト血清を生理食塩水で希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図1-2]実施例１において、希釈系列２（ヒト血清をHDLを含む希釈液Ａで希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図1-3]実施例１において、希釈系列３（ヒト血清をHDLを含む希釈液Ｂで希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図2-1]実施例２において、希釈系列４（ヒト血清を生理食塩水で希釈）の希釈レベルに対し、sdLDL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図2-2]実施例２において、希釈系列５（ヒト血清をHDLを含む希釈液Ｂで希釈）の希釈レベルに対し、sdLDL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図3-1]実施例１のTRL-C試薬１－１（HDL-C：0mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１（ヒト血清を生理食塩水で希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図3-2]実施例３のTRL-C試薬１－２（HDL-C：2mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図3-3]実施例４のTRL-C試薬１－３（HDL-C：3mg/dL）を用いた場合に、希釈

系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-1]実施例１のTRL-C試薬１－１（リン脂質：0mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１（ヒト血清を生理食塩水で希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-2]実施例５のTRL-C試薬１－４（リン脂質PC：400mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-3]実施例６のTRL-C試薬１－５（リン脂質PC：800mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-4]実施例７のTRL-C試薬１－６（リン脂質PC：1600mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-5]実施例８のTRL-C試薬１－７（リン脂質LPC：400mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-6]実施例９のTRL-C試薬１－８（リン脂質LPC：800mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図4-7]実施例１０のTRL-C試薬１－９（リン脂質LPC：1600mg/dL）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図5-1]実施例１のTRL-C試薬１－１（LIPIDURE 非添加）を用いた場合に、希釈系列１（ヒト血清を生理食塩水で希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図5-2]実施例１１のTRL-C試薬１－１０（LIPIDURE BL206）を用いた場合に、希釈系列１（ヒト血清を生理食塩水で希釈）の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図5-3]実施例１２のTRL-C試薬１－１１（LIPIDURE BL1002）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図5-4]実施例１３のTRL-C試薬１－１２（LIPIDURE SF08）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

[図5-5]実施例１４のTRL-C試薬１－１３（LIPIDURE SF16）を用いた場合に、希釈系列１の希釈レベルに対し、TRL-Cの反応吸光度をプロットした図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、被検試料中のリポ蛋白に含まれるコレステロールを、所望により定量試薬を用いて定量するにあたり、被検試料中又は定量試薬中にリン脂質を添加することを特徴とする。

[0012] リポ蛋白中に含まれるコレステロールとしては、エステル型コレステロール（コレステロールエステル）及び遊離型コレステロールがある。本発明において単に「コレステロール」という場合にはこれらの両者を包含する。

[0013] 本発明の方法で定量しようとするリポ蛋白中のコレステロールとは、トリアシルグリセロール（トリグリセリド、中性脂肪）および、細胞の生命維持に不可欠なコレステロールを多く含む球状粒子に含まれるコレステロールである。

[0014] コレステロールを含むリポ蛋白は、電気泳動法又は超遠心にて分類され、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質（VLDL）、中間密度リポタンパク質（IDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、small, dense LDL、高密度リポタンパク質（HDL）等が挙げられる。また、リポ蛋白としては、カイロミクロン（カイロミクロンレムナントを含む）、VLDL（VLDLレムナントを含む）及びIDLを合わせた密度1.019g/cm^{3}未満のトリグリセリドリッチリポ蛋白（TRL）

を挙げることもできる。

[0015] 本発明の方法に供される被検試料（検体）としては、リポ蛋白を含み、リポ蛋白中のコレステロールを定量しようとするものであれば特に限定されないが、通常、血液（全血、血清及び血漿を包含する）等の体液やその希釈物である。

[0016] 本発明のリポ蛋白コレステロールの定量方法は、この分野において周知のいずれの方法をも採用することができる。例えば、定量試薬を用い、コレステロールにコレステロールオキシダーゼおよびコレステロールエステラーゼを作用させ、生成した過酸化水素をペルオキシダーゼと水素供与体および水素受容体によりキノン色素に変え、該色素を吸光度測定して定量する方法が挙げられる。これらは広く用いられている周知の酵素的な定量方法であり、WO98/47005やWO98/26090にも記載されている。なお、本発明においては、被検試料中にリン脂質を添加することができれば、コレステロールをいかなる方法でも測定することができる。例えば、定量試薬を用いない方法としては、超遠心法やNMR法などが挙げられる。

[0017] 本発明において、所望により使用するコレステロールの定量試薬としては、後述するリン脂質の他に、例えば、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、水素供与体および水素受容体を含有する試薬を用いることができる。

[0018] 本発明の方法で供されるリン脂質は、部分構造としてリン酸エステルを持つ脂質であり、生体中で主に細胞膜の主要構成成分として存在している。本発明におけるリン脂質としては、グリセロールを骨格とするグリセロリン脂質やスフィンゴシンを骨格とするスフィンゴリン脂質が挙げられる。グリセロリン脂質としては、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、リゾホスファチジルコリン（ＬＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルグリセロールなどが挙げられる。スフィンゴリン脂質としては、スフィンゴミエリン及びスフィンゴエタノールアミンなどが挙げられる。

[0019] また、本発明におけるリン脂質には、リン脂質様界面活性剤、及びリン脂質を部分構造として含む物質も包含される。リン脂質様界面活性剤とは、部分構造としてリン酸エステルを持つ界面活性剤であり、リン脂質様界面活性剤としては、ホスホリルコリン基（ＰＣ基）を有する構造のものが好ましく、具体的には、LIPIDURE BL206（日油社）、LIPIDURE BL1002（日油社）、LIPIDURE SF08（日油社）、LIPIDURE SF16（日油社）などが挙げられる。リン脂質を部分構造として含む物質としては、リポ蛋白、リポソーム、細胞膜などの生体膜などが挙げられ、リポ蛋白としては、例えば、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質（VLDL）、中間密度リポタンパク質（IDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、small, dense LDL、高密度リポタンパク質（HDL）等が挙げられる。

[0020] 本発明におけるリン脂質としてリポ蛋白を使用する場合には、本発明の方法で定量しようとするコレステロールを含むリポ蛋白とは異なるリポ蛋白を用いる。例えば、トリグリセリドリッチリポ蛋白（TRL）中のコレステロールを定量する場合には、TRLとは異なるリポ蛋白、例えば、高密度リポタンパク質（HDL）を用いることができる。

[0021] 本発明におけるリン脂質は、単独で用いてもよいし、複数種類を組み合わせて用いてもよい。

[0022] 本発明においては、反応液中に一定量以上のリン脂質が存在していれば良く、被検試料中又は定量試薬中にリン脂質を添加する。リン脂質は被検試料（検体）を希釈する際等に使用する希釈液に添加することにより、被検試料中に添加しても良く、また、リン脂質を定量試薬中に予め添加しておき、測定時に添加されるように構成しても良い。

[0023] リン脂質の添加量は、リン脂質を被検試料中に添加する場合には、被検試料を希釈するための希釈液中のリン脂質の濃度が、通常1～1000 mg/dL、好ましくは10～500 mg/dL、更に好ましくは50～300 mg/dLの範囲となるように添加するのがよい。

[0024] リン脂質を定量試薬中に添加する場合のリン脂質の添加量は、リン脂質の

種類により異なる。例えば、リン脂質がグリセロリン脂質又はスフィンゴリン脂質に場合には、定量試薬中のリン脂質が、通常50～5000 mg/dL、好ましくは200～3000 mg/dL、更に好ましくは500～2000 mg/dLの範囲となるように添加するのがよい。また、リン脂質がリポ蛋白質の場合には、定量試薬中のリポ蛋白コレステロールが、通常0.05～100 mg/dL、好ましくは0.1～50 mg/dL、更に好ましくは0.5～10 mg/dLの範囲となるように添加するのがよい。

[0025] 本発明の方法は、リポ蛋白を含む被検試料に上記定量試薬をそのまま反応させてコレステロールを定量することも可能であるが、被検試料中の定量対象となるリポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを選択的に消去する第１工程（工程(1)）と、反応系内に残存する定量対象となるリポ蛋白中のコレステロールを定量する第２工程（工程(2)）により本発明の方法を行うと、定量対象となるリポ蛋白中のコレステロールをより正確に定量することができる。

[0026] 本発明中においてリポ蛋白に対して「反応する」という言葉を用いる場合は、界面活性剤や酵素によってリポ蛋白の構造が変化し、内部のコレステロールに対して酵素が作用しやすくなることを意味する。

[0027] 本発明における工程(1)では、定量対象となるリポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを選択的に消去する。ここで「消去」とはコレステロールを分解し、かつ、その分解物が次の工程(2)で検出されないようにすることを意味する。定量対象となるリポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるコレステロールを選択的に消去する方法としては、例えば被検試料に、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールエステラーゼを作用させ、生じた過酸化水素を除去する方法が挙げられる。過酸化水素を除去する方法としては、カタラーゼを作用させて水と酸素に分解する方法、又はペルオキシダーゼの作用により例えば過酸化水素と反応して無色キノンを生じる水素供与体化合物を無色キノンに転化する方法等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0028] なお、第１工程において特定のリポ蛋白中のコレステロールを選択的に消

去する方法は、LDLコレステロールの定量方法（例えばWO98/47005等）やHDLコレステロールの定量方法（例えばWO98/26090等）等に広く採用され、周知となっているものである。本発明の工程(1)も、これらの周知の方法により実施することが可能である。

[0029] 本発明におけるリン脂質は、上記工程(1)において添加すると、測定値の直線性（被検試料の希釈レベルとコレステロールの反応吸光度との相関の直線性）が更に向上するという点で好ましい。

[0030] 続く工程(2)では、前述した周知の方法により、前記工程(1)で消去されずに残存する定量対象となるリポ蛋白中のコレステロールを酵素的に定量する。前記工程(1)でコレステロールオキシダーゼおよびコレステロールエステラーゼを用いる場合には、工程(2)では、工程(1)で用いたコレステロールオキシダーゼおよびコレステロールエステラーゼをそのまま用いることができ、新たに添加する必要はない。

[0031] なお、工程(1)において生じた過酸化水素をカタラーゼで分解し、工程(2)でこのカタラーゼを阻害する必要がある場合は、工程(2)において例えばアジ化ナトリウムのようなカタラーゼ阻害剤を用いてカタラーゼを阻害する。

[0032] 本発明の工程(1)および工程(2)においては、少なくとも１種の界面活性剤を用いることができる。好適な界面活性剤を用いれば、それぞれの工程における酵素反応を促進することができる。

[0033] 本発明で使用することができるコレステロールオキシダーゼとしては、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する能力を有する酵素であれば特に限定されず、例えば動物又は微生物由来のコレステロールオキシダーゼがあげられる。これらは、遺伝子操作により作られたものでもよく、化学修飾の有無も問わない。また、本発明で使用することができるコレステロールエステラーゼとしては、エステル型コレステロールに作用するものであれば、特に制限されるものではない。

[0034] 本発明で使用する、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの各酵素の使用量は、特に制限されるものではなく、適宜設定でき

るが、通常、0.001U～2000U/mLで、好ましくは0.1～1000U/mLで使用される。

[0035] 本発明で使用する水素供与体としてはアニリン誘導体が好ましく、アニリン誘導体としては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－（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－（3－スルホプロピル）アニリン（HALPS）、N－（3－スルホプロピル）－3－メトキシ－5－アニリン（HMMPS）等があげられる。

[0036] 水素受容体としては4－アミノアンチピリンやメチルベンゾチアゾロンヒドラゾン等を用いることができる。

[0037] 反応液には通常の生化学反応に用いられる各種の緩衝液を使用することができ、緩衝液のｐＨは５～８の間であるのが好ましい。溶液としては、グッド、トリス、リン酸、グリシンの緩衝溶液が好ましく、グッド緩衝液であるビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシエチル）メタン（Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ）、ピペラジン－１、４－ビス（２－エタンスルフォン酸）（ＰＩＰＥＳ）、ピペラジン－１、４－ビス（２－エタンスルフォン酸）、１．５ナトリウム塩、一水和物（ＰＩＰＥＳ１．５Ｎａ）、２－ヒドロキシ－３－モルホリノプロパンスルホン酸（ＭＯＰＳＯ）、Ｎ、Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルフォン酸（ＢＥＳ）、２－［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル］エタンスルフォン酸（ＨＥＰＥＳ）およびピペラジン－１、４－ビス（２－ヒドロキシ－３－プロパンスルフォン酸）（ＰＯＰＳＯ）が好ましい。

[0038] 本発明における各工程は、pH5～pH10で行うことが好ましく、pH6～pH8で行うことがさらに好ましい。

[0039] 反応温度は各工程とも20℃～45℃で行うことが好ましく、25℃～40℃で行うことがさらに好ましい。反応時間は各工程とも1～10分間で行うことが好ましく、3～7分で行うことがさらに好ましい。

[0040] 本発明の定量方法を実施するに当たり、用いる試薬を複数の試薬組成物に分けてもよい。本発明においては、試薬としては例えば定量対象となるリポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去する工程（すなわち工程(1)）を行うための試薬組成物（第一試薬）と、定量対象となるリポ蛋白中のコレステロールを測定する工程（すなわち工程(2)）を行うための試薬組成物（第二試薬）の２種類の試薬組成物を調製し、これら２種類の試薬組成物を組み合わせたものをリポ蛋白コレステロールの定量キットとすることができる。

[0041] 工程(1)を行うための試薬組成物には、上述したような定量対象となるリポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去するのに適した界面活性剤が含まれる。該試薬組成物にはさらに、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、アニリン誘導体等の水素供与体、過酸化水素を消去するカタラーゼ等を含ませればよい。

[0042] 工程(2)を行うための試薬組成物には、少なくとも、上記したようなすべてのリポ蛋白に対して反応する界面活性剤が含まれる。該試薬組成物にはさらに、4-アミノアンチピリン等の水素受容体、ペルオキシダーゼ等を含ませることができる。

[0043] 本発明におけるリン脂質は、工程(1)を行うための試薬組成物（第一試薬）中に含有させると、測定値の直線性（被検試料の希釈レベルとコレステロールの反応吸光度との相関の直線性）が更に向上するという点で好ましい。

[0044] 試薬組成物中のリン脂質の含有量はリン脂質の種類により異なるが、リン脂質がグリセロリン脂質又はスフィンゴリン脂質に場合には、試薬組成物中のリン脂質の濃度は、通常50～5000 mg/dL、好ましくは200～3000 mg/dL、更に好ましくは500～2000 mg/dLの範囲である。また、リン脂質がリポ蛋白質の場合には、試薬組成物中のリポ蛋白コレステロールの濃度は、通常0.05～100 mg/dL、好ましくは0.1～50 mg/dL、更に好ましくは0.5～10 mg/dLの範囲である。

[0045] 工程(1)を行うための試薬組成物及び工程(2)を行うための試薬組成物には、必要に応じて、１価の陽イオン（例えば一価の金属イオン）、２価の陽イ

オン（例えば二価の金属イオン）もしくはそれらの塩、ポリアニオン（例えばヘパリン、デキストラン硫酸塩、リンタングステン酸塩）、血清アルブミンを添加してもよい。また、各試薬組成物のpHは、中性付近、例えばpH5～pH9、好ましくはpH6～8であり、緩衝液を添加してpHを調整すればよい。

[0046] 本発明の方法によりを定量対象となるリポ蛋白中のコレステロールを定量するには、被検試料に工程(1)を行うための試薬組成物を添加し反応させ、次いで工程(2)を行うための試薬組成物を添加し反応させ、吸光度を測定することにより行えばよい。

[0047] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0048] 実施例１

市販のHDL濃縮液（BRT社）を、HDL-C濃度が約50mg/dLになるように生理食塩水で希釈した希釈液Ａ、およびHDL-C濃度が約100mg/dLになるように生理食塩水で希釈した希釈液Ｂを調製した。

[0049] ヒト血清１を、生理食塩水を用いて下記表１の通りに5段階希釈した希釈系列１、希釈液Ａを用いて下記表２の通りに5段階希釈した希釈系列２、希釈液Ｂを用いて下記表３の通りに5段階希釈した希釈系列３を調製した。

[0050] [表1]

（希釈系列１）

Dilution Lv.	0	1	2	3	4	5
ヒト血清１	0μL	100μL	200μL	300μL	400μL	500μL
生理食塩水	500μL	400μL	300μL	200μL	100μL	0μL

[0051] [表2]

（希釈系列２）

Dilution Lv.	0	1	2	3	4	5
ヒト血清１	0μL	100μL	200μL	300μL	400μL	500μL
希釈液A	500μL	400μL	300μL	200μL	100μL	0μL

[0052]

[表3]

（希釈系列３）

Dilution Lv.	0	1	2	3	4	5
ヒト血清１	0μL	100μL	200μL	300μL	400μL	500μL
希釈液B	500μL	400μL	300μL	200μL	100μL	0μL

[0053] 以下の第一試薬（TRL-C試薬１－１）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0054] 第一試薬（TRL-C試薬１－１）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

[0055] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0056] TRL-C測定用試薬を用いて、希釈系列１、希釈系列２、希釈系列３を検体としたときの反応吸光度を、日立７１８０型自動分析装置により、以下の方法で測定した。

検体3μLに第一試薬を150μL加え、37℃で5分間反応させ、次いで、第二試薬を50μL加えて5分間反応させた後に、反応吸光度を主波長600nm、副波長700nmで測定した。

[0057] 希釈系列１、希釈系列２、希釈系列３の各希釈レベルをx軸に、TRL-Cの反

応吸光度をy軸にしたときの結果を図１－１～図１－３に示す。

図１に示したように、生理食塩水を用いて調製された希釈系列１に比べ、HDLを含む希釈液Ａ又は希釈液Ｂを用いて調製された希釈系列２および希釈系列３の方が良好な希釈直線性を示した。

[0058] 実施例２

ヒト血清２を、生理食塩水を用いて下記表４の通りに5段階希釈した希釈系列４、実施例１に記載の希釈液Ｂを用いて下記表５の通りに5段階希釈した希釈系列５を調製した。

[0059] [表4]

（希釈系列４）

Dilution Lv.	0	1	2	3	4	5
ヒト血清２	0μL	100μL	200μL	300μL	400μL	500μL
生理食塩水	500μL	400μL	300μL	200μL	100μL	0μL

[0060] [表5]

（希釈系列５）

Dilution Lv.	0	1	2	3	4	5
ヒト血清２	0μL	100μL	200μL	300μL	400μL	500μL
希釈液B	500μL	400μL	300μL	200μL	100μL	0μL

[0061] デンカ生研社製のsdLDL-C測定用試薬を用いて、希釈系列４、希釈系列５を検体としたときの反応吸光度を、日立７１８０型自動分析装置により、以下の方法で測定した。

検体3μLに第一試薬を150μL加え、37℃で5分間反応させ、次いで、第二試薬を50μL加えて5分間反応させた後に、反応吸光度を主波長600nm、副波長700nmで測定した。

[0062] 希釈系列４、希釈系列５の各希釈レベルをx軸に、sdLDL-Cの反応吸光度をy軸にしたときの結果を図２－１及び図２－２に示す。

図２に示したように、生理食塩水を用いて調製された希釈系列４に比べ、HDLを含む希釈液Ｂを用いて調製された希釈系列５の方が良好な希釈直線性を示した。

[0063] 実施例３

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－２）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0064] 第一試薬（TRL-C試薬１－２）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
コレステロールエステラーゼ	2U/mL
コレステロールオキシダーゼ	2U/mL
カタラーゼ	1200U/mL
TOOS	2.0mmol/L
ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8]	0.25%(w/v)
HDL濃縮液	2mg/dL (HDL-C)

[0065] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
４－アミノアンチピリン	4.0mmol/L
ペルオキシダーゼ	20単位/mL
アジ化ナトリウム	0.05%(w/v)
ポリオキシエチレンアルキルエーテル	0.5%(w/v)

[0066] 実施例４

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－３）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0067] 第一試薬（TRL-C試薬１－３）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
コレステロールエステラーゼ	2U/mL
コレステロールオキシダーゼ	2U/mL
カタラーゼ	1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

HDL濃縮液 3mg/dL (HDL-C)

[0068] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0069] 実施例１、実施例３～４に記載のTRL-C測定用試薬を用いて、実施例１に記載の希釈系列１を検体としたときのTRL-Cの反応吸光度を、実施例１と同様の方法でそれぞれ測定した。希釈系列の希釈レベルをx軸に、TRL-Cの反応吸光度をy軸にしたときの結果を図３－１～図３－３に示す。

図３－１～図３－３に示したように、HDLを含まないTRL-C試薬を使用して測定した場合に比べ、HDLを含むTRL-C試薬を使用して測定した場合の方が良好な希釈直線性を示した。

[0070] 実施例５

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－４）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0071] 第一試薬（TRL-C試薬１－４）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質（ホスファチジルコリン（PC））400mg/dL

[0072] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0073] 実施例６

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－５）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0074] 第一試薬（TRL-C試薬１－５）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質（ホスファチジルコリン（PC））800mg/dL

[0075] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0076] 実施例７

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－６）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0077] 第一試薬（TRL-C試薬１－６）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質（ホスファチジルコリン（PC））1600mg/dL

[0078] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0079] 実施例８

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－７）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0080] 第一試薬（TRL-C試薬１－７）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS	2.0mmol/L
ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8]	0.25%(w/v)
リン脂質（リゾホスファチジルコリン（LPC））	400mg/dL

[0081] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
４－アミノアンチピリン	4.0mmol/L
ペルオキシダーゼ	20単位/mL
アジ化ナトリウム	0.05%(w/v)
ポリオキシエチレンアルキルエーテル	0.5%(w/v)

[0082] 実施例９

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－８）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0083] 第一試薬（TRL-C試薬１－８）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
コレステロールエステラーゼ	2U/mL
コレステロールオキシダーゼ	2U/mL
カタラーゼ	1200U/mL
TOOS	2.0mmol/L
ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8]	0.25%(w/v)
リン脂質（リゾホスファチジルコリン（LPC））	800mg/dL

[0084] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
４－アミノアンチピリン	4.0mmol/L
ペルオキシダーゼ	20単位/mL
アジ化ナトリウム	0.05%(w/v

)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0085] 実施例１０

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－９）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0086] 第一試薬（TRL-C試薬１－９）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質（リゾホスファチジルコリン（LPC）） 1600mg/dL

[0087] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0088] 実施例１、実施例５～１０に記載のTRL-C測定用試薬を用いて、実施例１に記載の希釈系列１を検体としたときのTRL-Cの反応吸光度を、実施例１と同様の方法でそれぞれ測定した。希釈系列の希釈レベルをx軸に、TRL-Cの反応吸光度をy軸にしたときの結果を図４－１～図４－７に示す。

図４－１～図４－７に示したように、リン脂質を含まないTRL-C試薬を使用して測定した場合に比べ、リン脂質を含むTRL-C試薬を使用して測定した場合の方が良好な希釈直線性を示した。

[0089] 実施例１１

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－１０）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0090] 第一試薬（TRL-C試薬１－１０）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
コレステロールエステラーゼ	2U/mL
コレステロールオキシダーゼ	2U/mL
カタラーゼ	1200U/mL
TOOS	2.0mmol/L
ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8]	0.25%(w/v)
リン脂質様界面活性剤（LIPIDURE BL206（日油社））	0.25%(w/v)

[0091] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
４－アミノアンチピリン	4.0mmol/L
ペルオキシダーゼ	20単位/mL
アジ化ナトリウム	0.05%(w/v)
ポリオキシエチレンアルキルエーテル	0.5%(w/v)

[0092] 実施例１２

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－１１）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0093] 第一試薬（TRL-C試薬１－１１）

PIPES, pH6.8	50mmol/L
コレステロールエステラーゼ	2U/mL
コレステロールオキシダーゼ	2U/mL
カタラーゼ	1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質様界面活性剤（LIPIDURE BL1002（日油社）） 0.25%(w/v)

[0094] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0095] 実施例１３

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－１２）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0096] 第一試薬（TRL-C試薬１－１２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質様界面活性剤（LIPIDURE SF08（日油社）） 0.25%(w/v)

[0097] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0098] 実施例１４

以下の第一試薬（TRL-C試薬１－１３）、第二試薬（TRL-C試薬２）からなるTRL-C測定用試薬を調製した。

[0099] 第一試薬（TRL-C試薬１－１３）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

コレステロールエステラーゼ 2U/mL

コレステロールオキシダーゼ 2U/mL

カタラーゼ 1200U/mL

TOOS 2.0mmol/L

ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル[HLB:12.8] 0.25%(w/v)

リン脂質様界面活性剤（LIPIDURE SF16（日油社）） 0.25%(w/v)

[0100] 第二試薬（TRL-C試薬２）

PIPES, pH6.8 50mmol/L

４－アミノアンチピリン 4.0mmol/L

ペルオキシダーゼ 20単位/mL

アジ化ナトリウム 0.05%(w/v)

ポリオキシエチレンアルキルエーテル 0.5%(w/v)

[0101] 実施例１、実施例１１～１４に記載のTRL-C測定用試薬を用いて、実施例１に記載の希釈系列１を検体としたときのTRL-Cの反応吸光度を、実施例１と同様の方法でそれぞれ測定した。希釈系列の希釈レベルをx軸に、TRL-Cの反応吸光度をy軸にしたときの結果を図５－１～図５－５に示す。

図５－１～図５－５に示したように、リン脂質様界面活性剤を含まないTRL-C試薬を使用して測定した場合に比べ、リン脂質様界面活性剤を含むTRL-C試薬を使用して測定した場合の方が良好な希釈直線性を示した。

請求の範囲

[請求項1] リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを、所望により定量試薬を用いて定量するリポ蛋白コレステロールの定量方法であって、前記被検試料中又は前記定量試薬中にリン脂質を添加することを含む定量方法。

[請求項2] 前記リン脂質がホスファチジルコリン（ＰＣ）又はリゾホスファチジルコリン（ＬＰＣ）である請求項１記載の方法。

[請求項3] 前記リン脂質がリン脂質様界面活性剤である請求項１記載の方法。

[請求項4] 前記リン脂質が、定量されるコレステロールを含むリポ蛋白とは異なるリポ蛋白質である請求項１記載の方法。

[請求項5] 前記リン脂質が高密度リポ蛋白質（ＨＤＬ）である請求項４記載の方法。

[請求項6] 前記リポ蛋白がトリグリセリドリッチリポ蛋白（ＴＲＬ）である請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記リポ蛋白がsmall, dense ＬＤＬである請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 前記リポ蛋白コレステロールを定量試薬を用いて定量する請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

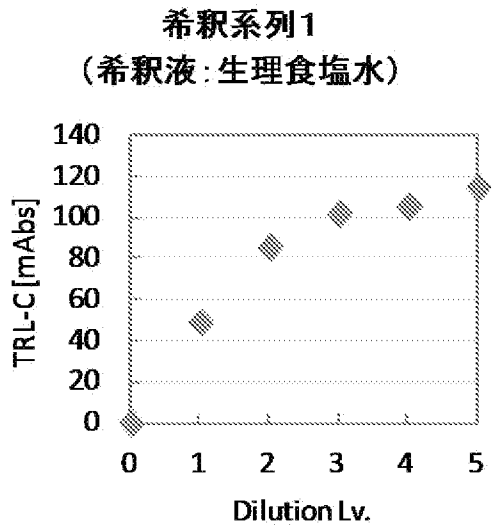
[請求項9] 請求項１～８のいずれか１項に記載の方法に用いられるリポ蛋白中のコレステロールの定量試薬であって、リン脂質を含有する定量試薬。

[請求項10] 請求項９に記載の試薬の、リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを定量するための試薬としての使用。

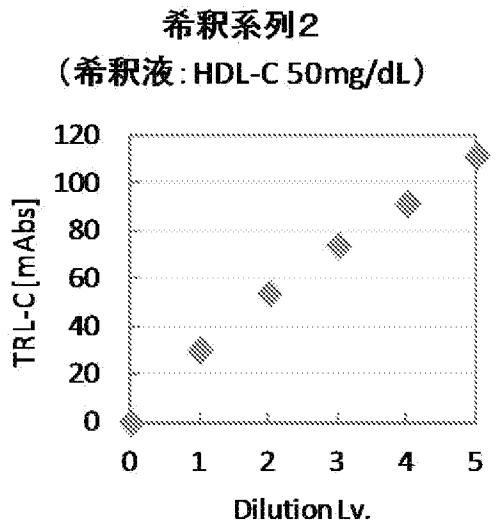
[請求項11] 請求項１～８のいずれか１項に記載の方法に用いられるリポ蛋白コレステロールの定量キットであって、リン脂質を含む定量キット。

[請求項12] 請求項１１に記載のキットの、リポ蛋白を含む被検試料中のリポ蛋白コレステロールを定量するためのキットとしての使用。

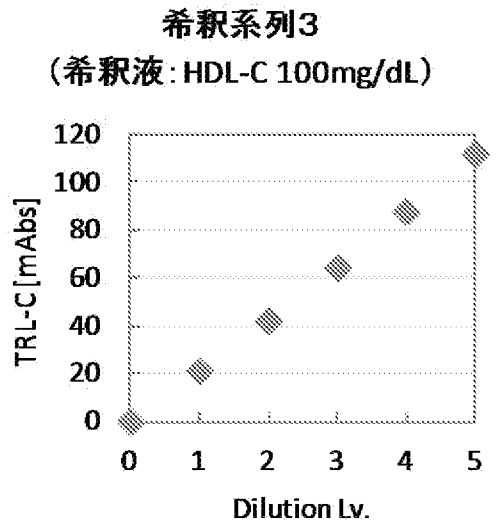
[図1-1]


希釈系列1
（希釈液：生理食塩水）
TRL-C [mAbs]
140
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

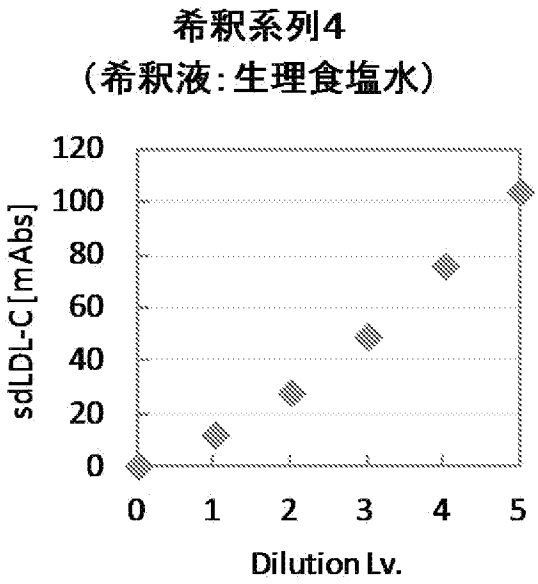
[図1-2]


希釈系列2
（希釈液：HDL-C 50mg/dL）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

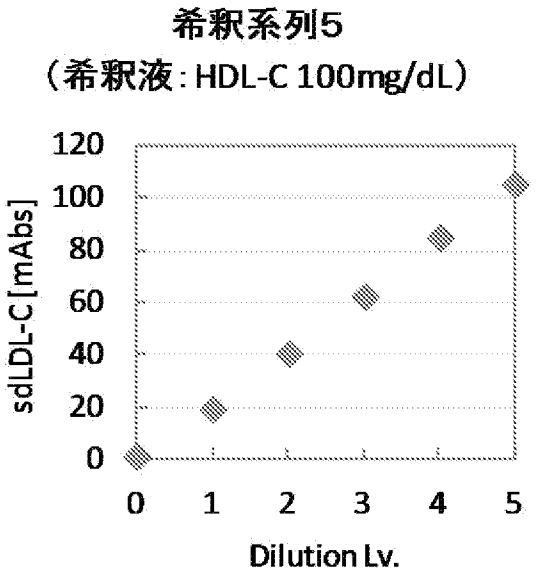
[図1-3]


希釈系列3
（希釈液：HDL-C 100mg/dL）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

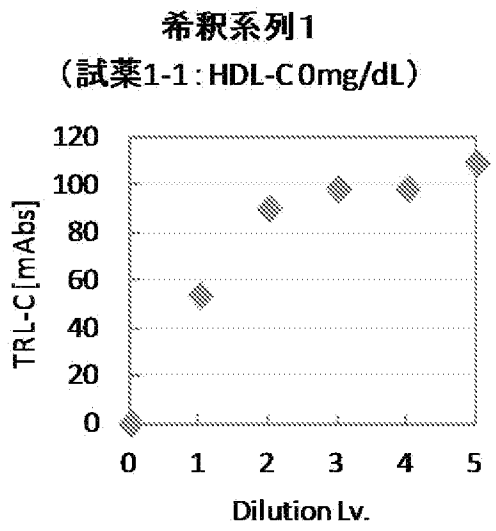
[図2-1]


希釈系列4
（希釈液：生理食塩水）
sdLDL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

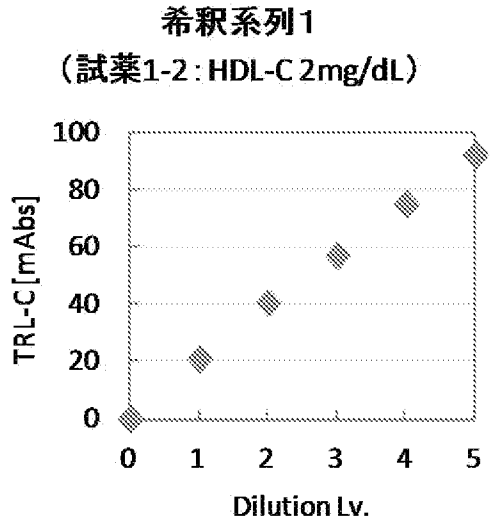
[図2-2]


希釈系列5
（希釈液：HDL-C 100mg/dL）
sdLDL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

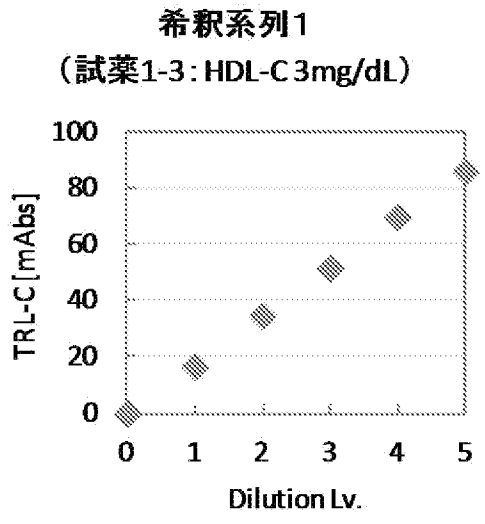
[図3-1]


希釈系列1
（試薬1-1：HDL-C 0mg/dL）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

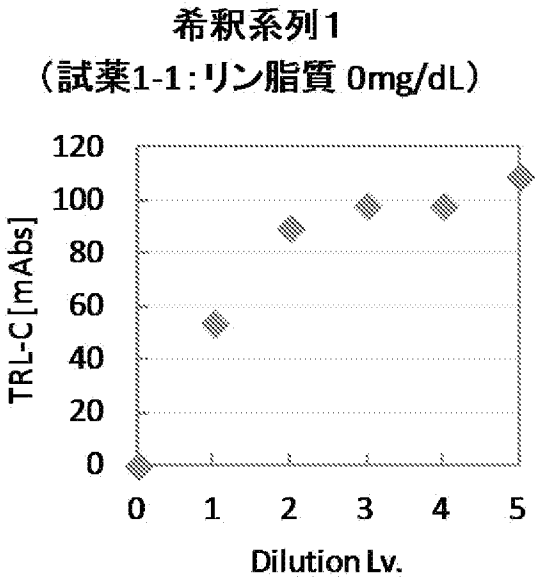
[図3-2]


希釈系列1
（試薬1-2：HDL-C 2mg/dL）
TRL-C [mAbs]
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

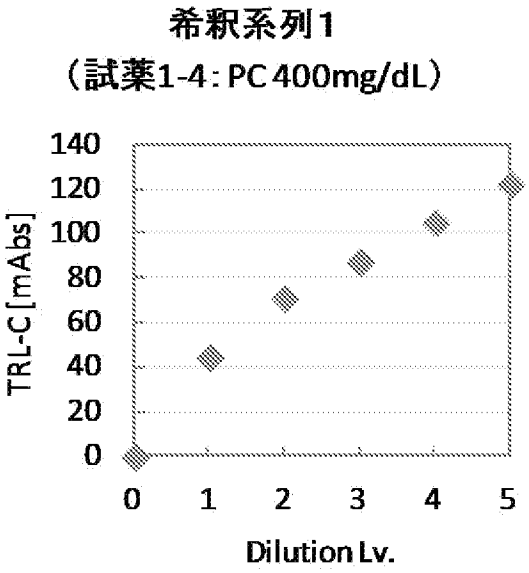
[図3-3]


希釈系列1
（試薬1-3：HDL-C 3mg/dL）
TRL-C [mAbs]
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

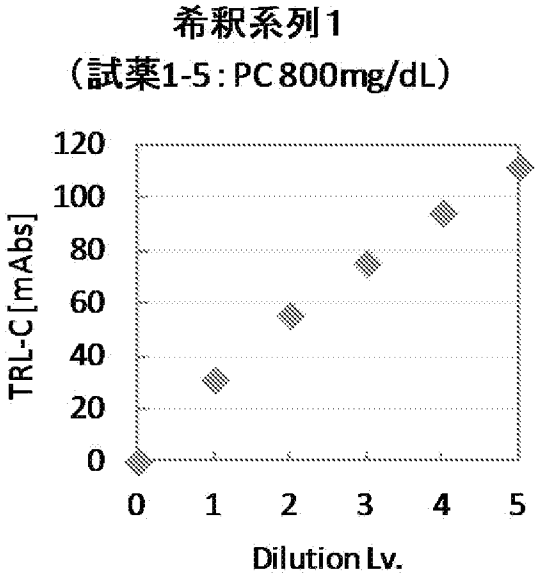
[図4-1]


希釈系列1
（試薬1-1：リン脂質 0mg/dL）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

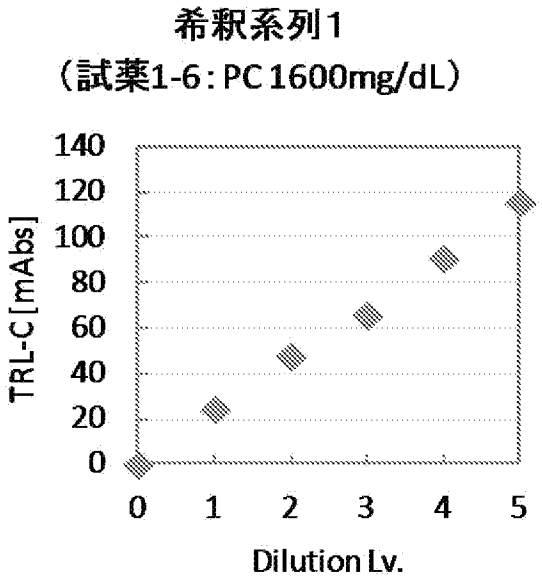
[図4-2]


希釈系列1
（試薬1-4：PC 400mg/dL）
TRL-C [mAbs]
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

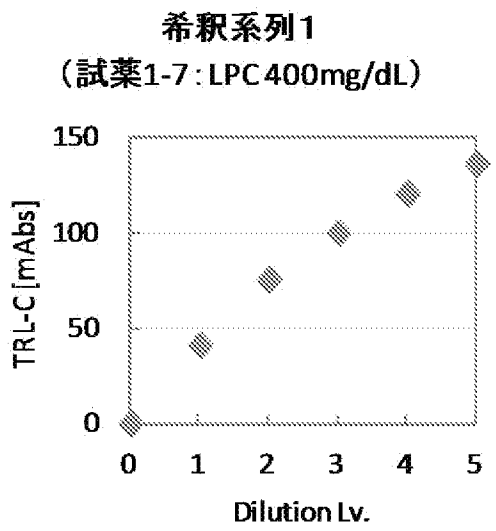
[図4-3]


希釈系列1
（試薬1-5：PC 800mg/dL）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

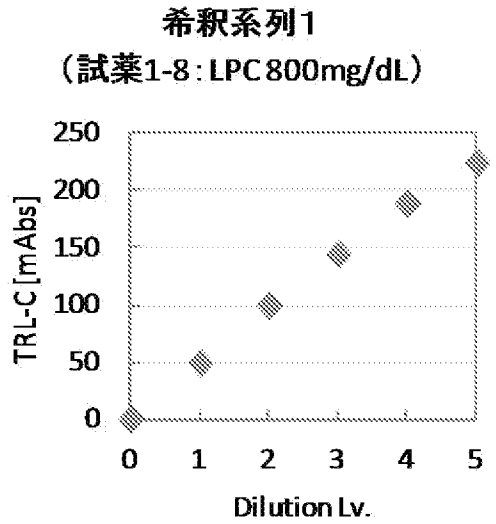
[図4-4]


希釈系列1
（試薬1-6：PC 1600mg/dL）
TRL-C [mAbs]
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

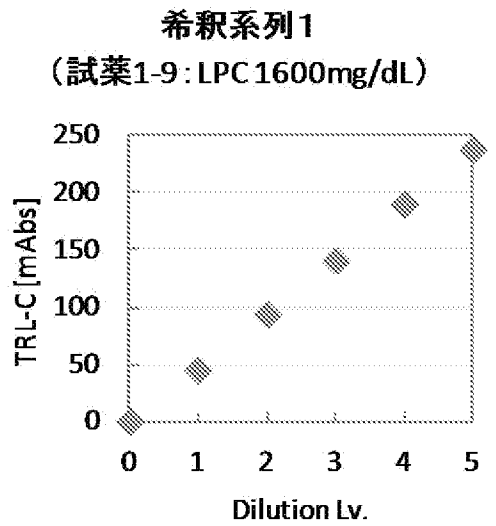
[図4-5]


希釈系列1
（試薬1-7：LPC400mg/dL）
150
100
50
0
TRL-C [mAbs]
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

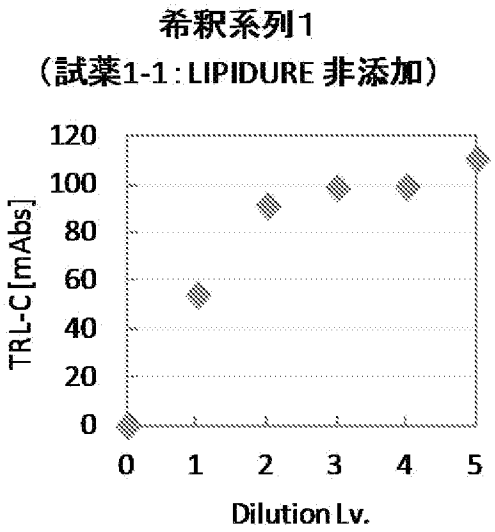
[図4-6]


希釈系列1
（試薬1-8：LPC800mg/dL）
250
200
150
100
50
0
TRL-C [mAbs]
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

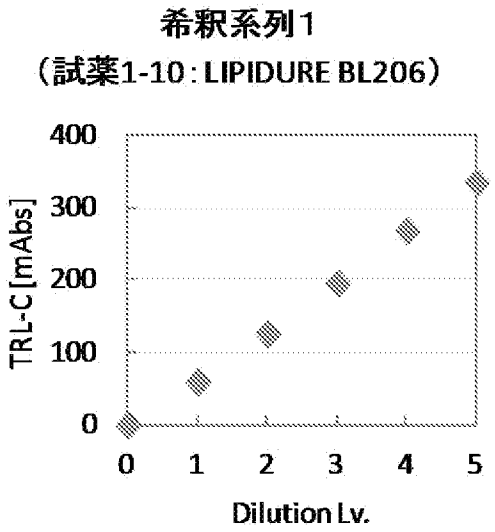
[図4-7]


希釈系列1
（試薬1-9：LPC1600mg/dL）
250
200
150
100
50
0
TRL-C [mAbs]
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

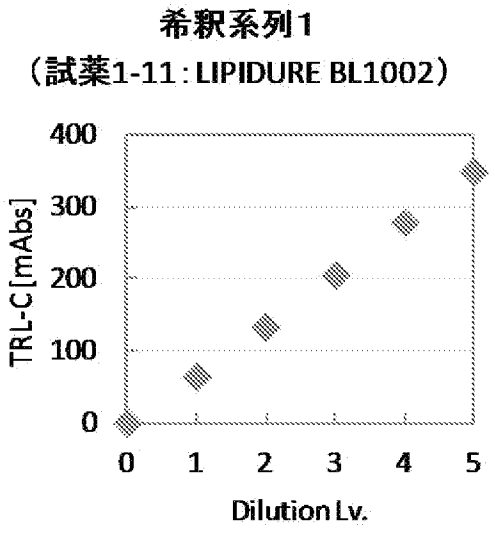
[図5-1]


希釈系列1
（試薬1-1：LIPIDURE 非添加）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

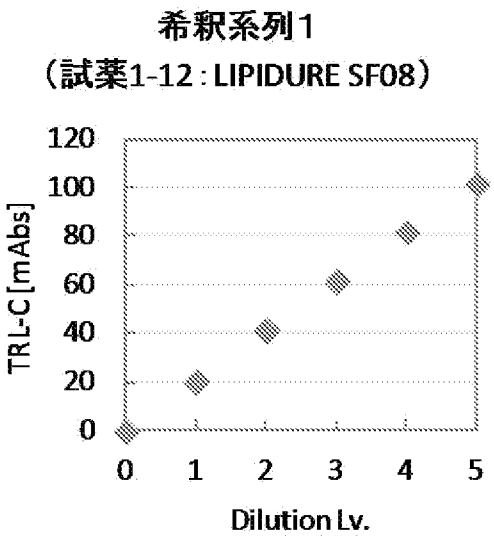
[図5-2]


希釈系列1
（試薬1-10：LIPIDURE BL206）
TRL-C [mAbs]
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

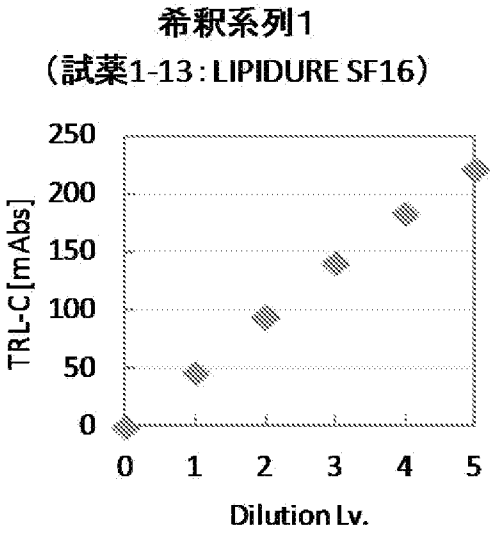
[図5-3]


希釈系列1
（試薬1-11：LIPIDURE BL1002）
TRL-C [mAbs]
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5
Dilution Lv.

[図5-4]


希釈系列1
（試薬1-12：LIPIDURE SF08）
TRL-C [mAbs]
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

[図5-5]


希釈系列1
（試薬1-13：LIPIDURE SF16）
TRL-C [mAbs]
250
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
Dilution Lv.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/013766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. G01N33/92(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)n, C12Q1/44(2006.01)n

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)
Intel. G01N33/92, C12Q1/26, C12Q1/44

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-156681 A (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 15 July 2010, entire text, all drawings, in particular, see paragraphs [0030]-[0045], [0072], [0074], etc. & JP 2014-62919 A	1-12
X	JP 2005-257308 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) 22 September 2005, entire text, in particular, see claims, etc. (Family: none)	1,2,4,8-12

☒ 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
17 June 2019 (17.06.2019)	25 June 2019 (25.06.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/013766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-537018 A (OXFORD BIOSENSORS LIMITED) 22 October 2009, see entire text, etc. & JP 2009-537019 A & US 2009/0130696 A1 & US 2009/0203054 A1 & WO 2007/132222 A1 & WO 2007/132223 A1 & EP 2018568 A1 & EP 2027471 A1	1-12
A	WO 2009/116268 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 24 September 2009, see entire text, etc. & US 2011/0091993 A1 & US 2013/0302826 A1 & EP 2256497 A1	1-12
A	佐藤謙亨、他４名，新しいHDL亜分画コレステロール直説法の開発， 日本臨床検査自動化学会会誌，2015, vol. 40, no. 3, pp. 198-204, non-official translation (SATOH, Noriaki et al., "New development of a HDL subclass cholesterol direct method", Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation)	1-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０１３７６６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/92(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)n, C12Q1/44(2006.01)n

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.　G01N33/92, C12Q1/26, C12Q1/44

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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	関連する請求項の番号
X	JP 2010-156681 A（協和メデックス株式会社）2010.07.15, 全文・全図、特に、段落［００３０］－［００４５］、［００７２］、［００７４］等参照 & JP 2014-62919 A	1-12
X	JP 2005-257308 A（富士写真フイルム株式会社）2005.09.22, 全文、特に、［特許請求の範囲］等参照（ファミリーなし）	1,2,4,8-12

☑　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」国際出願日前の出願または特許であるが、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
１７．０６．２０１９	２５．０６．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　４０７５
草川　貴史
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

Ｃ（続き）．　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	関連する請求項の番号
A	JP 2009-537018 A (オックスフォード　バイオセンサーズ　リミテッド) 2009.10.22, 全文等参照 & JP 2009-537019 A & US 2009/0130696 A1 & US 2009/0203054 A1 & WO 2007/132222 A1 & WO 2007/132223 A1 & EP 2018568 A1 & EP 2027471 A1	1-12
A	WO 2009/116268 A1 (積水メディカル株式会社) 2009.09.24, 全文等参照 & US 2011/0091993 A1 & US 2013/0302826 A1 & EP 2256497 A1	1-12
A	佐藤謙亨、他４名, 新しいＨＤＬ亜分画コレステロール直説法の開発, 日本臨床検査自動化学会会誌, 2015, Vol.40,No.3, Page.198-204	1-12