

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 C12Q 1/60, 1/44, 1/26	A1	(11) 国際公開番号 WO96/23902 (43) 国際公開日 1996年8月8日 (08.08.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/00641 (22) 国際出願日 1995年4月3日 (03.04.95) (30) 優先権データ 特願平7/13607 1995年1月31日 (31.01.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋3丁目13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) 日野浩一 (HINO, Kouichi) [JP/JP] 中村光浩 (NAKAMURA, Mitsuhiro) [JP/JP] 真鍋満久 (MANABE, Mitsuhsa) [JP/JP] 〒130 東京都墨田区業平5丁目5番12号 第一化学薬品株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CN, KR, 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 QUANTITATIVE ANALYSIS OF CHOLESTEROL (54) 発明の名称 コレステロールの定量方法 (57) Abstract A method of quantitative analysis of cholesterol contained in a high-specific-gravity lipoprotein by adding to a lipoprotein-containing specimen a substance which forms a complex with a lipoprotein other than the high-specific-gravity lipoprotein and a surfactant, and enzymatically determining the cholesterol content. The method permits the quantitative analysis of cholesterol contained in a high-specific-gravity lipoprotein with a simple operation at a high efficiency without the necessity for pre-treatment such as centrifugal separation. This method is applicable to various automatic analyzers and useful also in the field of clinical examination.		

(57) 要約

リポタンパク質を含む検体に、高比重リポタンパク質以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質及び界面活性剤を添加した後、酵素的測定法によりコレステロールを測定する高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法。

遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率良く高比重リポタンパク質中のコレステロールを定量することができる。また、種々の自動分析装置に適用することができ、臨床検査の分野においても有用である。

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

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	イギリス	MC	モナコ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GU	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイアランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	US	アメリカ合衆国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド		

明 細 書

コレステロールの定量方法

技術分野

本発明は、遠心分離などの前処理の必要がなく、少ない試料で簡便な操作により効率良く高比重リポタンパク質中のコレステロールを測定する方法に関する。

背景技術

コレステロール等の脂質は、血清中においてアポタンパクと結合し、リポタンパク質を形成している。リポタンパク質は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポタンパク、低比重リポタンパク（LDL）、高比重リポタンパク（HDL）等に分類される。これらのリポタンパク質のうち、LDLは動脈硬化惹起性を有し、一方HDLは抗動脈硬化作用を示すことが知られている。

疫学的には、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻度と逆相関を示すことが証明されており、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的として、HDL中のコレステロールの測定が広く行われている。

HDL中のコレステロールの測定方法としては、例えば超遠心分離によってHDLを他のリポタンパク質と分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法等が知られている。しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にはほとんど用いられていなかった。

HDL中のコレステロールの測定方法として、現在臨床検査の領域で一般に広く用いられている方法は、検体に沈殿剤を加えてHDL以外のリポタンパク質を凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈殿法である。

この方法は、超遠心法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈殿剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量の検体量を必要とし、また分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化することはできなかった。

一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されてい

る。例えば、胆汁酸塩又は非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法（特開昭63-126498号公報）が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応速度はLDL濃度に比例し、その後HDL中のコレステロール濃度に比例することを利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポタンパク質中のコレステロールの反応を完全に分別することはできず、測定される対象がLDL中のコレステロールからHDL中のコレステロールへと、段階的ではなく、オーバーラップしながら徐々に変化していくため、正確な方法とはいえない難かった。

また、HDL以外のリポタンパク質を予め凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法（特開平6-242110号公報）が知られている。しかしながら、この方法は、少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。また、沈殿の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析機器に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

従って、本発明の目的は、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率良く測定することができ、種々の自動分析装置に適用することができるHDL中のコレステロールの定量方法を提供することにある。

かかる実情において、本発明者らは鋭意研究を行った結果、検体に、HDL以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質と界面活性剤を添加した後、酵素的にコレステロールを測定すれば、HDL中のコレステロールを効率良く定量することができ、しかも自動分析装置にも適用できることを見出し、本発明を完成した。

発明の開示

本発明は、リポタンパク質を含む検体に、高比重リポタンパク質以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質及び界面活性剤を添加した後、酵素的測定法によりコレステロールを測定することを特徴とする高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法に係るものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられるHDL以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質としては、HDLとHDL以外のリポタンパク質とで親和性に差がある物質であれば良く、例えばデキストラン硫酸、リンタングステン酸、ヘパリン等のポリアニオン；マグネシウムイオン、カルシウムイオン等の2価金属イオン；ポリエチレングリコール等の水溶性高分子；HDL以外のリポタンパク質に対する抗体などが挙げられる。これらの物質は1種又は2種以上を組み合わせ用いることができる。また、これらのうち、特にポリアニオンと2価金属イオンを組み合わせ用いるのが好ましい。

これらの物質の使用量は特に制限されず、また物質の種類により異なるが、これらの物質とHDL以外のリポタンパク質とが測定時に複合体を形成していればよく、凝集物を形成していても、又は形成していなくてもよい。例えば、ポリアニオンと2価金属イオンを組み合わせ用いる場合、試料と混合したときの濃度が、ポリアニオン0.02～2重量%、2価金属イオン10～500mMとなるのが好ましく、特にポリアニオン0.05～1重量%、2価金属イオン20～200mMとなる範囲で用いるのが好ましい。

また、本発明で用いられる界面活性剤としては、コレステロールの酵素的測定系に対して阻害効果を有するもの、すなわちリポタンパク質を溶解しないものが好ましく、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等が挙げられる。これらのうち、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしてはポリオキシエチレンセチルエーテル（HLB14）（市販品としてはエマルゲン220（花王社製）等）が；ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとしてはポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（HLB15）（市販品としてはエマルゲン913（花王社製）等）が；ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物としては、市販品としてプルロニックF88（旭電化社製）等が；ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩としてはポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム（市販品としてはエマル20C（花王社製）等）が；アルキルベンゼンスルホン酸塩としてはドデシルベンゼンスルホン酸ナ

トリウムが好ましい。

これらの界面活性剤は、1種又は2種以上を組み合わせて用いることができ、その使用量は特に制限されないが、試料と混合した時の濃度が0.01～5重量%、特に0.05～1重量%になるような範囲で用いるのが好ましい。

本発明においては、まずHDL以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質及び界面活性剤を検体に添加するが、その際には、これらの物質を混合して同一の試薬として添加しても、またそれぞれ別個の試薬として添加してもよい。

次に、このようにHDL以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質及び界面活性剤を添加した検体を、直接コレステロールの測定に付す。すなわち、遠心分離などの前処理を行う必要はない。

コレステロールの測定方法としては、公知の酵素的測定法のいずれをも用いることができ、例えば酵素試薬として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を組み合わせて用いる方法、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせて用いる方法等が挙げられる。これらのうち、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を組み合わせて用いる方法が好ましい。

酵素試薬を添加した後、一定時間のシグナル量を測定することにより、測定対象であるコレステロール濃度を求めることができ、更に分析の正確度を高める目的で、酵素試薬を添加した後、定まった2点の時間におけるシグナル量を比較することによっても(2 point法)、コレステロールの濃度を求めることができる。

また、これらの酵素試薬等を添加した後、最終的にコレステロールを検出する方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体を更に組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法等が挙げられる。

実施例

次に、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

リポタンパク質を含む血清検体No. 1～No. 10について、本発明方法及び従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を

比較した。結果を表1に示す。

すなわち、検体4 μl に、リタングステン酸ナトリウム0.2%、塩化マグネシウム100mM及びポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物（プルロニックF-68、旭電化社製）0.5%を含む試薬300 μl を加え、次にコレステロールエステラーゼ0.2U/ ml 、コレステロールオキシダーゼ0.2U/ ml 、パーオキシダーゼ0.3U/ ml 、N,N-ジメチルメタトルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.005%及び0.1%Triton X-100を含むコレステロール測定試薬100 μl を加えた。その後、545nmにおける吸光度の差を測定することにより、HDL中のコレステロール濃度を求めた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

一方、沈殿法によりHDL中のコレステロールを測定するには、デキストラン硫酸0.3%及び塩化マグネシウム2%を含む水溶液0.2mlを、検体0.2mlと混和し、3000rpmで10分間遠心分離を行った。この上清50 μl を採取し、前記と同様のコレステロール測定試薬3mlと混合し、37℃で10分間インキュベートした後、545nmにおける吸光度を測定し、HDL中のコレステロール濃度を求めた。

表 1

検体No.	コレステロール濃度 (mg/dl)	
	本発明方法	沈殿法
1	7.9	8.0
2	6.5	6.4
3	6.4	6.4
4	6.4	5.8
5	1.5	1.8
6	8.1	8.8
7	4.7	4.8
8	3.8	3.8
9	4.7	4.6
10	3.3	3.2

表1の結果より、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈殿法と同程度の測定値が得られた。

実施例2

リポタンパク質を含む検体No. 11～No. 20について、本発明方法及び

従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。結果を表2に示す。

すなわち、検体4 μl に、リンタングステン酸ナトリウム0.2%、デキストラン硫酸1.8 g/l、塩化マグネシウム100 mM及びポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物（プルロニックF-68、旭電化社製）0.2%を含む試薬300 μl を加え、次に実施例1と同様のコレステロール測定試薬100 μl を加えた。以下、実施例1と同様にして、HDL中のコレステロール濃度を求めた。

また、沈殿法についても実施例1と同様にして測定した。

表 2

検体No.	コレステロール濃度 (mg/dl)	
	本発明方法	沈殿法
1 1	4 7	4 5
1 2	3 8	3 4
1 3	3 6	3 2
1 4	5 4	5 2
1 5	2 6	2 2
1 6	9 3	9 2
1 7	6 1	6 2
1 8	3 6	3 2
1 9	5 5	5 0
2 0	7 5	7 4

表2の結果より、本発明方法は少ない試料を用い、簡便な操作で行うことができるにもかかわらず、従来の沈殿法と同程度の測定値が得られた。

産業上の利用可能性

本発明によれば、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率良くHDL中のコレステロールを定量することができる。また、少ない試料で、簡便な操作により、特異的な測定が可能であるため、種々の自動分析装置に適用することができ、臨床検査の領域においても極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1. リポタンパク質を含む検体に、高比重リポタンパク質以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質及び界面活性剤を添加した後、酵素的測定法によりコレステロールを測定することを特徴とする高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法。
2. 高比重リポタンパク質以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質及び界面活性剤を添加した検体を、直接コレステロールの測定に付す請求項1記載の高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法。
3. 高比重リポタンパク質以外のリポタンパク質と複合体を形成する物質が、ポリアニオン、2価金属イオン、水溶性高分子化合物又は高比重リポタンパク質以外のリポタンパク質に対する抗体である請求項1又は2記載の高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法。
4. 界面活性剤が、リポタンパク質を溶解しないものである請求項1～3のいずれか1項記載の高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法。
5. コレステロールの測定を、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を組み合わせて行う請求項1～4のいずれか1項記載の高比重リポタンパク質中のコレステロールの定量方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/60, 44, 26

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 C12Q1/60, 44, 26

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

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.
A	JP, 6-242110, A (Kokusai Shiyaku K.K.), September 2, 1994 (02. 09. 94) (Family: none)	1 - 5
A	JP, 63-126498, A (Boehringer Mannheim GmbH.), May 30, 1988 (30. 05. 88) & EP, 265933, A & DE, 880511, A	1 - 5

☐ 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

June 2, 1995 (02. 06. 95)

Date of mailing of the international search report

June 20, 1995 (20. 06. 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. C12Q1/60, 44, 26

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. C12Q1/60, 44, 26

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

国際調査で使用了電子データベース (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
A	JP, 6-242110, A (国際試薬株式会社), 2. 9月. 1994 (02. 09. 94) (ファミリーなし)	1-5
A	JP, 63-126498, A (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼル シャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング), 30. 5月. 1988 (30. 05. 88) & EP, 265933, A & DE, 880511, A	1-5

☐ 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、展示等に関する文献
「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

02. 06. 95

国際調査報告の発送日

20.06.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

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)

伊藤 明

電話番号 03-3581-1101 内線

4 B 6 8 0 7

3 4 4 8