

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年4月30日 (30.04.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/054538 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/545* (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/069587
- (22) 国際出願日: 2008年10月22日 (22.10.2008)
- (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 2007-274325
 2007年10月22日 (22.10.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アルフレッサファーマ株式会社 (ALFRESA PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5408575 大阪府大阪市中央区石町二丁目2番9号 Osaka (JP). 日油株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番3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): 柳谷真理 (YANAGIYA, Mari) [JP/JP]; 〒5670806 大阪府茨木市庄二丁目24番3号アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内 Osaka (JP). 田中睦 (TANAKA, Mutsumi) [JP/JP]; 〒5670806 大阪府茨木市庄二丁目24番3号アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内 Osaka (JP). 小坂美恵子 (KOSAKA, Mieko) [JP/JP]; 〒5670806 大阪府茨木市庄二丁目24番3号アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 南條博道 (NANJO, Hiromichi); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号翁ビル5階 Osaka (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告書

(54) Title: METHOD AND KIT FOR MEASUREMENT OF ACROLEIN ADDUCT IN SAMPLE UTILIZING AGGLUTINATION REACTION OF IMMUNOLOGICAL MICROPARTICLE

(54) 発明の名称: 免疫学的微小粒子の凝集反応を用いる検体のアクロレイン付加体の測定方法および測定用キット

(57) Abstract: Disclosed is a method for measuring an acrolein adduct in a sample, which comprises the following steps (a) to (c): (a) mixing the sample containing the acrolein adduct with a solution containing an immunoglobulin capable of recognizing the acrolein adduct specifically; (b) adding a solution that contains a microparticle comprising a substance capable of specifically binding to the immunoglobulin capable of specifically recognizing the acrolein adduct and a blocking agent bound to the substance to the mixed solution produced in the step (a) and agitating the resulting mixture; and (c) measuring the degree of the agglutination reaction of the microparticle in the mixed solution produced in the step (b), wherein the degree of the agglutination reaction is decreased in accordance with the amount of the acrolein adduct in the sample. The method enables to measure an acrolein adduct without the need of any complicated procedure.

(57) 要約: 本発明の検体中のアクロレイン付加体を測定する方法は、(a) 該アクロレイン付加体を含む検体と、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含有する溶液とを混合する工程; (b) 該工程 (a) で得られた該混合液に、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含有する溶液を添加して混合する工程; および (c) 該工程 (b) で得られた該混合液において、該微小粒子の凝集反応の程度を測定する工程であって、該凝集反応の程度が、該検体中のアクロレイン付加体の量に応じて減少する、工程; を含む。本発明によれば、煩雑な操作を必要とせずアクロレイン付加体を測定することができる。

WO 2009/054538 A1

明 細 書

免疫学的微小粒子の凝集反応を用いる検体のアクロレイン付加体の測定方法
および測定用キット

5

技術分野

本発明は、物質を結合した微小粒子を用いる免疫学的測定法に関する。特に、主として工業、環境、および臨床検査の分野における、抗原抗体反応を利用したアクロレイン付加体の免疫学的測定方法ならびに免疫測定試薬キットに関する。

10

背景技術

近年、臨床検査などの各種検査では自動化および測定時間の短縮が図られている。その検査の方法として、生体試料中の物質を測定するために免疫反応を利用する測定方法が広く用いられている。免疫学的測定方法としては、

15

R I A法、E I A法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、金コロイド凝集法、イムノクロマト法などの多くの方法がある。その中でも、ラテックス凝集法や金コロイド凝集法は、反応液の分離や洗浄操作を必要としないホモジニアス系での測定が可能のため、測定の自動化や短時間での測定に適している。

20

特に、金コロイド粒子は5 nm～100 nmの大きさであり、これはラテックス粒子より小さいため、より微量の物質の測定に利用可能である（特開2005-283250号公報および特開2004-325192号公報）。

これらの測定法における主反応成分は、被測定物質に特異的に反応（例えば、結合）する物質を結合したラテックス粒子や金コロイド粒子などの微小粒子である。微小粒子上に存在する抗体などの特異的結合物質が被測定物質と結合することにより、微小粒子の凝集が生じる。その凝集は、被測定物質

25

の量依存的に生じるので、その現象を機械的に測定することで、被測定物質量を算出することができる。

このような凝集による測定用の担体粒子としては、上記のラテックス粒子や金コロイド粒子の他に、例えば、ポリエチレングリコールを結合した微粒子担体（特開2004-300253号公報）、スチレン誘導体およびビニル系化合物からなる微小担体（特開平7-133232号公報）、表面が異方性を有する高分子粒子（特開平10-87841号公報）、独特の手段により調製されたリポソーム（特開平9-5325号公報および特開平9-29937号公報）などを用い得ることが知られている。

10 また、測定の精度を向上させるために、担体粒子とともに用いる試薬についても種々の検討が行われている。例えば、高濃度のC-反応性蛋白質に対する抗体を担持したラテックス粒子とともに、ホスホリルコリン基とカチオン性基とを有する化合物を用いる測定方法が知られている（特開2001-318099号公報）。また、凝集イムノアッセイ法において、ホスホリルコリン基およびビニル基を有する単量体を単独重合したポリマー、あるいは
15 ホスホリルコリン基およびビニル基を有する単量体とビニル基を有する単量体とを共重合したポリマーを用いる方法がある（国際公開第02/018953号パンフレット）。さらに、梅毒感染診断用試薬として、抗原を担持した担体とともに、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来するセグメントおよび親水性モノマーに由来するセグメントを有する共重合体を用いる測定試薬がある（特開2007-155623号公報および特開
20 2007-155624号公報）。

しかしながら、特に、分子量が小さい被測定物質である薬剤や化学物質などは、特異的結合物質と被測定物質との結合部位が少なく、凝集反応が生じ
25 にくいため、凝集反応を用いたホモジニアスな測定系を組むことは困難であった。そのため、特別に、被測定物質、あるいはハプテンを複数個結合させ

た競合体を反応系に添加することなどの工夫が必要であった。

発明の開示

本発明の目的は、上記のように凝集反応を用いた測定系を組みにくい低分子物質であるアクロレイン付加体のホモジニアスな測定方法、およびその測定キットを提供することである。

本発明では、被測定物質であるアクロレイン付加体を含む検体；アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含有する溶液；およびアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子溶液を混合することにより、低分子であるアクロレイン付加体を特別な競合体を添加することなく、より簡便に測定することを可能にした。

本発明は、検体中のアクロレイン結合物を測定する方法を提供し、該方法は、

(a) 該アクロレイン付加体を含む検体と、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含有する溶液とを混合する工程；

(b) 該工程 (a) で得られた該混合液に、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含有する溶液を添加して混合する工程；および

(c) 該工程 (b) で得られた該混合液において、該微小粒子の凝集反応の程度を測定する工程であって、該凝集反応の程度が、該検体中のアクロレイン付加体の量に応じて減少する、工程；

を含む。

1つの実施態様では、上記のアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンは、ホルミルデヒドロピペリジン構造を特異的に認識するモノクローナル抗体である。

ある実施態様では、上記のイムノグロブリンに特異的に結合する物質は、該イムノグロブリンと特異的に結合する抗体であり、好適にはモノクローナル抗体である。

5 さらなる実施態様では、上記のブロッキング剤は、免疫試薬調製時に使用される一般的なブロッキング剤であり、好適にはウシ血清アルブミンである。

さらなる実施態様では、上記のイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子含有溶液は、緩衝剤および蛋白質を含有し、蛋白質としてはウシ血清アルブミンが好適である。

10 1つの実施態様では、上記微小粒子は、ラテックスまたは金コロイドである。

本発明はまた、アクロレイン付加体測定用試薬キットを提供し、該キットは、

アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含む、第一試薬；および

15 アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含む、第二試薬；を含む。

さらなる実施態様では、上記の第二試薬は、緩衝剤および蛋白質を含有し、蛋白質としてはウシ血清アルブミンが好適である。

20 本発明によれば、被測定物質であるアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリン、ならびに該イムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を使用することにより、アクロレイン付加体のホモジニアスな系でのより簡便な測定が可能になる。本発明の方法はホモジニアスで簡便な測定系なので、自動分析装置での測定に適用可能である。そのため、アクロレイン付加体の測定における時間の短縮および
25 労力の軽減につながる。

図面の簡単な説明

図1は、 $N\epsilon$ - (3-ホルミル-3, 4-デヒドロピペリジノ) - リジン (FDP-Lys) の濃度と吸光度変化量との関係を示すグラフ (アクロレイン付加体測定用検量線) である。

発明を実施するための最良の形態

本発明における測定対象物質であるアクロレイン ($CH_2=CH-CHO$) は、石油、石炭、木材、およびプラスチックの燃焼により生成するだけでなく、タバコ煙、排気ガス、油脂の加熱などによっても生成する化学物質であり、強い細胞毒性を有することが知られている。近年、アクロレインは、脂質の過酸化によっても生成することも明らかとなり、生体内での影響が注目されている。アクロレインは、臨床検査の分野で酸化ストレスマーカーとして、特に脳卒中・無症候性脳梗塞のマーカーとして、臨床検査分野で測定対象物質とされている (特開2005-334476号公報参照)。

アクロレインは、通常、蛋白質中のリジンの ϵ - アミノ基に結合して、ホルミルデヒドロピペリジノ-リジン構造 (FDP-Lys という場合もある) を有する物質として存在している。本発明においては、この構造体をアクロレイン付加体 (ACR-Lys という場合もある) といい、このようなアクロレイン付加体を被測定物質とする。

本発明において、測定に供する被測定物質であるアクロレイン付加体を含む検体としては、血液、血漿、血清、尿、糞便 (懸濁液)、髄液、腹水などの生体試料; 環境中より得られたサンプルまたはその抽出物などが挙げられる。

被測定物質であるアクロレイン付加体を特異的に認識 (アクロレイン付加体に特異的に結合) するイムノグロブリンは、特に限定されないが、アクロ

レイン付加体との結合の特異性が良好である点から、アクロレイン付加体に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が好ましい。さらに好ましくは、アクロレイン付加体のホルミルデヒドロピペリジン構造を特異的に認識するモノクローナル抗体が挙げられる。ポリクローナル抗体としては、
5 例えば、特開平11-80023号公報に記載のACR-Lysに対する抗血清が挙げられる。また、モノクローナル抗体としては、例えば、特開平11-147899号公報に記載のモノクローナル抗体を用いることができる。

上記イムノグロブリンに特異的に結合する物質としては、イムノグロブリンに特異的に結合し得るプロテインA、プロテインG、イムノグロブリンを
10 認識する抗体などが挙げられる。結合の特異性が良好である点から、イムノグロブリンを認識する抗体が好ましい。さらに、イムノグロブリンを認識するモノクローナル抗体が好ましい。

本発明で用いられるブロッキング剤は、免疫試薬調製時に通常使用される一般的なブロッキング剤であればよい。例えば、ウシ血清アルブミンが好ま
15 しい。

本発明において、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的結合する物質とブロッキング剤とを結合させるための微小粒子は、免疫測定試薬に通常使用され得る微小粒子であればよい。例えば、ラテックスおよび金属コロイドが好ましい。金属コロイドの場合、金コロイドが一般的に利用されやすい点で好ましい。金コロイド粒子は、市販されているもの
20 を用いてもよく、あるいは当業者が通常用いる方法（例えば、塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法）により調製したものをを用いてもよい。金コロイド粒子の粒径は、通常10nm~100nm、好ましくは30nm~60nmの範囲である。

25 本発明の方法に用いられる上記イムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子（以下、結合微小粒子という場合

がある)は、例えば、微小粒子として金コロイド粒子を用いる場合、以下のように調製し得る：金コロイド粒子溶液(540nmにおける吸光度が約2.0)1Lに対して、通常、0.1mg~100mg、好ましくは1mg~10mgのアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンと特異的に結合する物質(例えば、抗体)を添加し、冷蔵または室温下で5分~24時間攪拌する。次いで、ウシ血清アルブミンなどでブロッキングし、遠心分離を行うことにより、目的の結合微小粒子(この場合は、結合金コロイド粒子)を得ることができる。得られた微小粒子は、測定に必要な濃度となるように緩衝液に分散させる。緩衝液のpHは5~9が好ましく、濃度は1~100mMが好ましい。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、コハク酸緩衝液、あるいはグリシルグリシン、MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、HEPES(2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸)、TES(N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸)、MOPS(3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、PIPES(ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸))、Bis-Tris(ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン)などのグッド緩衝液が好適に用いられる。

緩衝液は、必要に応じて、糖および糖アルコール、アジ化ナトリウム、アルブミン、塩化ナトリウムなどの塩類、防腐剤などの添加物を含有してもよい。糖および糖アルコールとしては、グルコース、マンノース、サッカロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられ、その濃度は、0.01~10w/v%が好ましい。アルブミンとしては、ウシ血清アルブミン(BSA)が好ましく、その濃度は0.001~1w/v%が好ましい。防腐剤としてはアジ化ナトリウムが好ましく、その濃度は、0.01~0.5w/v%が好ましい。その他の添加物としては、Twee

n 20、ポリエチレングリコールラウリルエーテル、5-ブロモサリチル酸、サリチル酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベンゼンスルホン酸ナトリウム、フェノール、チモールなどが挙げられる。

被測定物質であるアクロレイン付加体とアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンとの結合反応、および得られた反応液と該イムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子の凝集反応において、反応温度、pH、緩衝液の種類、共存する塩の種類や濃度、その他の共存物質などの反応条件は、従来の免疫学的反応と同様である。例えば、一般的に行われているように、反応促進の目的で、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、デキストラン、コンドロイチン硫酸ナトリウムなどの水溶性高分子を反応系に添加してもよい。

本発明において、検体中の被測定物質であるアクロレイン付加体を測定する方法は、

(a) 該アクロレイン付加体を含む検体と、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含有する溶液とを混合する工程；

(b) 該工程 (a) で得られた該混合液に、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子 (すなわち、結合微小粒子) を含有する溶液を添加して混合する工程；および

(c) 該工程 (b) で得られた該混合液において、該微小粒子の凝集反応の程度を測定する工程であって、該凝集反応の程度が、該検体中のアクロレイン付加体の量に応じて減少する、工程；を含む。

この方法において、被測定物質であるアクロレイン付加体の濃度依存的に、ラテックスや金コロイドなどの結合微小粒子の凝集反応を生じさせ、その程度を機械的に測定する。本発明の方法においては、凝集反応の程度は、検体

中のアクロレイン付加体の量に応じて減少する。

本発明の方法は、例えば、以下のように行われる：被測定物質であるアクロレイン付加体を含む検体または該検体を緩衝液などで適切に希釈したものなどと、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリン含有溶液とを混合し、複合体を形成させる。次いで、この複合体を含む反応液に、上記のように得られたアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子（結合微小粒子）溶液を添加して混合することにより、被測定物質の濃度依存的に凝集反応を生じさせる。微小粒子として金コロイドを用いる場合は、この凝集反応に起因する所定の波長における吸光度変化を測定する。測定結果を、予め作成しておいた金コロイド凝集反応の吸光度変化と被測定物質の量との関係を表す検量線に当てはめることにより、容易に検体中の被測定物質の量を求めることができる。なお、吸光度変化が一定値よりも上であるか下であるかによって判定することにより、定性および半定量をすることも可能である。

微小粒子として金コロイドを用いる場合、反応開始後の吸光度変化は、一波長測定であっても二波長測定であってもよい。二波長測定の場合は、測定波長は、第一波長610nm～800nm、好ましくは630nm～750nmと、第二波長360nm～580nm、好ましくは500nm～550nmである。一波長測定の場合は、上記二波長測定の場合の第一波長または第二波長のいずれか一方の波長領域の波長で測定することができる。本発明の方法において吸光度変化とは、以下の2通りの測定により得られた値であり、いずれであってもよい：

(1) 反応開始後に反応液の吸光度を適当な間隔で2回測定し、その差を吸光度変化とする；または

(2) 反応開始後に反応液の吸光度を連続的に測定し、時間当たりの吸光度

変化率（その最大変化率を用いる場合もある）を吸光度変化とする。

上記測定には、分光光度計、マイクロプレートリーダー、生化学自動分析装置などが利用できる。特に、本発明の方法を生化学自動分析装置での測定に適用することにより、多数の検体を短時間に測定することが可能である。

5 本発明によれば、本発明の方法に用いるためのアクロレイン付加体測定用試薬キットが提供される。このキットは、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含む第一試薬；およびアクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含む第二試薬；を含む。

10 上記イムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含む第二試薬には、さらに緩衝剤と蛋白質とを含むことが好ましい。蛋白質としてはウシ血清アルブミンが好適に用いられる。

上記の試薬は、どのような形態で提供されてもよく、それぞれ個別に密封包装されて提供されることが好ましい。上記キットは、検量線作成用の被測定物質の標準品、使用時に各物質を溶解して適切な濃度の溶液を調製するための緩衝液、使用説明書などを含んでいてもよい。

実施例

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

（実施例1：金コロイド液の調製）

95℃の蒸留水1Lに10w/v%塩化金酸溶液2mLを攪拌しながら加え、1分後に2w/v%クエン酸ナトリウム溶液10mLを加え、さらに20分間攪拌した後、30℃に冷却した。冷却後、0.1w/v%炭酸カリウムでpH7.1に調節した。

(実施例2：抗マウスIgGラットモノクローナル抗体およびウシ血清アルブミン結合金コロイド試薬の調製)

抗マウスIgGラットモノクローナル抗体 (Production of Antibodies, Reagents for Immunology and Services社) を、0.05w/v%アジ化ナトリウムを含む10mM HEPES (pH7.1) で希釈して20μg/mLの濃度にした。この液50mLを上記実施例1で調製した約1Lの金コロイド液に加え、冷蔵下で2時間攪拌した。0.5w/v%ウシ血清アルブミンを含有する5.46w/v%マンニトール、および0.05w/v%アジ化ナトリウムを含む10mM HEPES (pH7.1) を110mL添加し、37℃にて90分間攪拌することによりブロッキング処理を行った。8000回転で40分間遠心分離し、上清を除去した。次いで、3w/v%マンニトール、0.1w/v%BSA、および0.05w/v%アジ化ナトリウムを含む5mM HEPES (pH7.5) (A溶液) を約1L加え、抗体結合金コロイドを分散させた後、8000回転で40分間遠心分離し、上清を除去し、A溶液を加えて抗体結合金コロイドを分散させ、全量を70mLとし、抗マウスIgGラットモノクローナル抗体結合金コロイド溶液を調製した。

次いで、抗マウスIgGラットモノクローナル抗体およびウシ血清アルブミン結合金コロイド溶液70mLに、A溶液を280mL添加し、抗マウスIgGラットモノクローナル抗体結合金コロイド試薬を調製した。

(実施例3：アクロレイン付加体測定用第一試薬の調製)

1.0w/v%塩化ナトリウム、0.5w/v%EDTA、および0.35w/v%ポリオキシエチレンラウリルエーテルを含む0.2M PIPES (pH6.5) の溶液に、抗アクロレインモノクローナル抗体 (日油株式

会社)を $1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、ならびに反応促進剤としてポリエチレングリコールを $1.0\sim 2.5 \text{w}/\text{v}\%$ 程度添加して、アクロレイン付加体測定用第一試薬とした。

5 (実施例4：アクロレイン付加体の測定)

本実施例では、第一試薬として、実施例3で調製したアクロレイン付加体測定用第一試薬を、そして第二試薬として、実施例2で調製した抗マウスIgGラットモノクローナル抗体およびウシ血清アルブミン結合金コロイド試薬を用いた。アクロレイン付加体として、アクロレインとリジンの ϵ のアミノ基との反応結合物である $\text{N}\epsilon$ -(3-ホルミル-3,4-デヒドロピペリジノ)-リジン(日油株式会社)(FDP-Lysという)を、それぞれ0、250、500、1000、2000、および4000 nmol/mLになるように、1.0%NaCl溶液に溶解した試料を調製した。FDP-Lys含有試料 $6 \mu\text{L}$ に、第一試薬を $170 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で約5分間加温した後、第二試薬を $85 \mu\text{L}$ 加えて 37°C にて反応させて、日立7070自動分析装置により、波長546 nmおよび660 nmでの測光ポイントとして18から31ポイントにおける吸光度変化量を測定した。図1にFDP-Lys濃度と吸光度変化量との関係を示す。

図1に示すように、被測定物質であるFDP-Lysの濃度依存的に、凝集反応による吸光度変化量が変化(減少)した。すなわち、検体中の被測定物質であるアクロレイン付加体量を、凝集反応の吸光度変化量として測定し、検量線と比較することによって定量できることがわかる。

産業上の利用可能性

25 本発明の方法は、B/F分離を必要としないホモジニアスな系でのアクロレイン付加体の測定方法であるため、自動化にも非常に適している。例えば、

臨床検査分野で普及している自動分析装置を利用することができる。したがって、工業、環境、臨床検査などの分野における、抗原抗体反応を利用したアクロレイン付加体の免疫学的測定方法に好適である。

請求の範囲

1. 検体中のアクロレイン付加体を測定する方法であって、

5 (a) 該アクロレイン付加体を含む検体と、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含有する溶液とを混合する工程；

(b) 該工程 (a) で得られた該混合液に、アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含有する溶液を添加して混合する工程；および

10 (c) 該工程 (b) で得られた該混合液において、該微小粒子の凝集反応の程度を測定する工程であって、該凝集反応の程度が、該検体中のアクロレイン付加体の量に応じて減少する、工程；
を含む、方法。

15 2. 前記イムノグロブリンが、前記アクロレイン付加体のホルミルデヒドロピペリジン構造を特異的に認識するモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

20 3. 前記イムノグロブリンに特異的に結合する物質が、該イムノグロブリンに対する抗体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

4. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載の方法。

25 5. 前記ブロッキング剤が、ウシ血清アルブミンである、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

6. 前記微小粒子を含有する溶液が、緩衝剤および蛋白質を含有する、請求

項1から5のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記蛋白質がウシ血清アルブミンである、請求項6に記載の方法。

5 8. 前記微小粒子が、ラテックスまたは金コロイドである、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

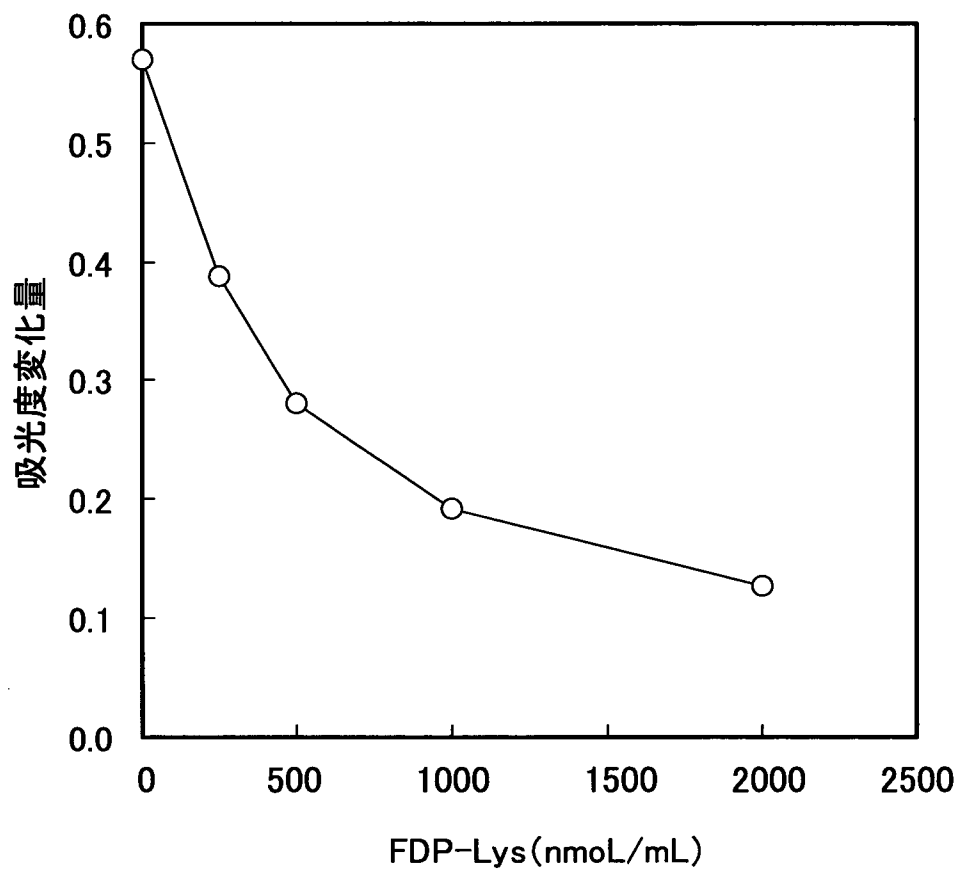
9. アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンを含む第一試薬；および

10 アクロレイン付加体を特異的に認識するイムノグロブリンに特異的に結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含む第二試薬；を含む、アクロレイン付加体測定用試薬キット。

15 10. 前記イムノグロブリンに特異的結合する物質とブロッキング剤とを結合させた微小粒子を含む第二試薬が、緩衝剤および蛋白質を含む、請求項9に記載のキット。

11. 前記蛋白質がウシ血清アルブミンである、請求項10に記載のキット。

第1図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/069587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/53(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i,
G01N33/545(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i

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)
G01N33/53, G01N33/531, G01N33/543, G01N33/545, G01N33/553, G01N33/577

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

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 2002-181820 A (Ikagaku Co., Ltd.), 26 June, 2002 (26.06.02), (Family: none)	1-11
A	JP 9-221314 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 26 August, 1997 (26.08.97), (Family: none)	1-11
A	JP 64-148 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 05 January, 1989 (05.01.89), & EP 305536 A & WO 88/006611 A	1-11

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 21 November, 2008 (21.11.08)	Date of mailing of the international search report 02 December, 2008 (02.12.08)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i

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. G01N33/53, G01N33/531, G01N33/543, G01N33/545, G01N33/553, G01N33/577

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	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008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
A	JP 2002-181820 A (株式会社いかがく) 2002.06.26 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 9-221314 A (日本化薬株式会社) 1997.08.26 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 64-148 A (日本化薬株式会社) 1989.01.05 & EP 305536 A & WO 88/006611 A	1-11

☐ 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、一般的な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

21.11.2008

国際調査報告の発送日

02.12.2008

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)	2 J	9 5 0 7
竹中 靖典		
電話番号 03-3581-1101	内線	3252