(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3787121号

(P3787121)

(45)発行日　平成18年6月21日(2006.6.21)　(24)登録日　平成18年3月31日(2006.3.31)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/82	(2006.01)	G01N	33/82	
G01N 21/76	(2006.01)	G01N	21/76	
G01N 21/77	(2006.01)	G01N	21/77	Z
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	Z
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	H

請求項の数 19　(全 12 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002-548433 (P2002-548433)
(86)(22)出願日	平成13年12月6日 (2001.12.6)
(65)公表番号	特表2004-515763 (P2004-515763A)
(43)公表日	平成16年5月27日 (2004.5.27)
(86)国際出願番号	PCT/GB2001/005395
(87)国際公開番号	WO2002/046746
(87)国際公開日	平成14年6月13日 (2002.6.13)
審査請求日	平成16年12月3日 (2004.12.3)
(31)優先権主張番号	0029729.1
(32)優先日	平成12年12月6日 (2000.12.6)
(33)優先権主張国	英国 (GB)

(73)特許権者　503206352
イミュノディアグノスティック・システムズ・リミテッド
イギリス国、エヌイー３５・９ピーディー、タイン・アンド・ウェア、ボルドン、ボルドン・ビジネス・パーク（番地なし）
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100088683
弁理士　中村　誠
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビタミンD代謝産物の検出方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

血漿または血清サンプル中に存在するビタミンD代謝産物の測定方法であって、

（ａ）　任意のビタミンD代謝産物が検出および／または測定され得るように、血清または血漿サンプル中の任意のビタミンD代謝産物を、該代謝物が結合しているタンパク質から分離させるために、該血清または血漿サンプルに８－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩、３－（アセトニルベンジル）－４－ヒドロキシクマリンおよび水和性溶媒を含む非競合置換剤を添加すること；および

（ｂ）　（ａ）のサンプル中のビタミンD代謝産物の量を検出または測定すること；

を含む測定方法。

【請求項２】

前記ビタミンD代謝産物が２５－ヒドロキシビタミンD又はその類似体である、請求項１に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンD代謝産物の測定方法。

【請求項３】

前記水和性溶媒がメタノールである、請求項１又は２に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンD代謝産物の測定方法。

【請求項４】

ビタミンD代謝産物の量が結合アッセイにおいて測定される、請求項１乃至３のいずれか１項に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンD代謝産物の測定方法。

【請求項５】

前記結合アッセイが競合結合アッセイである、請求項４に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定方法。
【請求項６】
前記競合結合アッセイが、
（ａ） ビタミンＤ代謝産物を結合し得る結合因子を上に固定化した支持体を提供する工程と；
（ｂ） 測定されるビタミンＤ代謝産物を含むサンプルを前記支持体に接触させる工程と；
（ｃ） 前記ビタミンＤ代謝産物の標識形を前記支持体に接触させる工程と；
（ｄ） 前記支持体に結合されたままの前記標識ビタミンＤ代謝産物の量を測定する工程と；
を含み、前記支持体に結合している標識ビタミンＤ代謝産物の量が前記サンプル中のビタミンＤ代謝産物の量と比例している、請求項５に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定方法。
【請求項７】
前記支持体上に固定化されている前記結合因子がＤＢＰである、請求項６に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定方法。
【請求項８】
前記支持体上に固定化されている前記結合因子がビタミンＤ代謝産物に対する抗体である、請求項６に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定方法。
【請求項９】
前記ビタミンＤ代謝産物がビオチン、アビジン、蛍光分子、又は化学ルミネセンス分子により標識されている、請求項６乃至８のいずれか１項に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定方法。
【請求項１０】
前記結合アッセイがイムノアッセイである、請求項４に記載の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定方法。
【請求項１１】
請求項１乃至１０のいずれか１項に記載の方法を含む、被検者のビタミンＤ状態を決定する方法。
【請求項１２】
８－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩、３－（アセトニルベンジル）－４－ヒドロキシクマリンおよび水和性溶媒を含む非競合置換剤。
【請求項１３】
前記水和性溶媒がメタノールである、請求項１２に記載の非競合置換剤。
【請求項１４】
血漿または血清サンプル中のビタミンＤ代謝産物の測定における、請求項１２又は１３に記載の非競合置換剤の使用。
【請求項１５】
請求項１乃至１１のいずれか１項に記載の方法における、請求項１２又は１３に記載の非競合置換剤の使用。
【請求項１６】
請求項１２又は１３に記載の置換剤を含む、サンプル中のビタミンＤ代謝産物の測定において使用するためのキット。
【請求項１７】
方法の結果とサンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の量との間の相関を示すキーを更に含む、請求項１６に記載のキット。
【請求項１８】
サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物を測定するための手段を更に含む、請求項１

６又は１７に記載のキット。
【請求項１９】
１又は２以上の支持体、標識、タンパク質、抗体及び使用のためのインストラクションを更に含む、請求項１６乃至１８のいずれか１項に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、血漿または血清のサンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の量を測定するための方法、および特にビタミンＤ代謝産物結合タンパク質のサンプルからの事前抽出の必要のない、血漿または血清のサンプル中のビタミンＤ代謝産物の量の測定を可能にする方法に関する。本発明はまた、疾患の診断における使用のための、被検者のビタミンＤ状態を決定するための方法、および本発明の方法の実施での使用のための薬剤およびキットに関する。
【０００２】
ビタミンＤの状態は、被検者におけるビタミンＤまたはビタミンＤ代謝産物の循環レベルの指標であり、子供のくる病および成人の骨軟化症を含む多数の疾患の原因における重要な要因である。高カルシウム血症および低カルシウム血症の基礎をなす原因を識別するのにも有用である。ビタミンＤおよびその代謝は、臨床上の大きな興味のある主題であり、従って体液中のビタミンＤおよび代謝産物の測定のための方法の改良に向けた努力が着実に増加してきている。
【０００３】
ビタミンＤは、ビタミン$Ｄ_2$またはビタミン$Ｄ_3$のいずれかとしてヒトが利用できる。ビタミン$Ｄ_2$は酵母および菌類からのエルゴステロールの照射によって体外より生成され、強化食品または医薬品の形で摂取したときにヒトに見られる。これに対してビタミン$Ｄ_3$は、紫外線光への暴露時に７－デヒドロコレステロールから動物中で形成される。ヒトにおいて、この反応は皮膚で発生する。ビタミン$Ｄ_3$は、たとえば魚の肝油などから食餌においても利用可能である。ビタミンＤはビタミン$Ｄ_2$またはビタミン$Ｄ_3$の形で、細胞の外側に見られ、循環するビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）に固く結合された、循環する代謝産物、すなわち２５－ヒドロキシビタミンＤに迅速に変換される。ビタミンＤのその代謝産物への迅速な変換により、ビタミンＤの測定は被検者のビタミンＤ状態の有用な指標を与えない。１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤなどの、ビタミンＤの他の代謝産物は、２５－ヒドロキシビタミンＤなどの非１α－ヒドロキシル化代謝産物よりも１０００倍低い濃度で循環するため、全循環ビタミンＤ代謝産物の概算に大きく寄与しない。この理由のため、１α－ヒドロキシル化代謝産物はビタミンＤ状態の直接のまたは有用な指標を提供しない。２５－ヒドロキシビタミンＤは、高い血清濃度を持つ代謝産物であり、測定が容易である。それゆえ被検者のビタミンＤ状態の最も一般的なマーカーとなっている。
【０００４】
２５－ヒドロキシビタミンＤ測定の確立された方法は、主に２４，２５－ジヒドロキシビタミンＤであるが、２５，２６－ジヒドロキシビタミンＤおよび他の　代謝産物などの、他のビタミンＤヒドロキシル化代謝産物からの寄与を含む結果を供給する。これらの他の　ヒドロキシル化代謝産物は全循環ビタミンＤ代謝産物の測定値の１～７％に寄与し、残りは２５－ヒドロキシ　ビタミンＤである。研究を含む多くの用途で、循環ビタミンＤ代謝産物の全量を測定することは十分であるが、他の用途では、２５－ヒドロキシビタミンＤの詳細な測定を可能とするために、これらの代謝産物の分離が必要である。血清または血漿サンプル中の２５－ヒドロキシビタミンＤレベルの測定は、被検者のビタミンＤ状態を決定する好ましい方法であることが一般に受入れられている。
【０００５】
２５－ヒドロキシビタミンＤは、ＤＢＰ（Ｇｃグロブリンとしても知られる）に固く結合して、血清または血漿中で循環していることがわかっている。疎水性であり、ＤＢＰに結合していることに加えて、アルブミンなどの他の結合タンパク質に強く結合することがわ

かっている。そのような結合タンパク質、特にＤＢＰの存在は、２５－ヒドロキシビタミンＤの血清または血漿レベルの測定における主要な問題を示す。

【０００６】

この問題に対処するために、２５－ヒドロキシビタミンＤの測定のための方法は現在まで、分析されるサンプルからのＤＢＰまたは他の結合タンパク質の除去に依存してきた。これは通常、ビタミンＤ代謝産物からＤＢＰを分離し、サンプルからＤＢＰを除去し、ビタミンＤ代謝産物を残す抽出工程を含む。抽出は、サンプルにクロロホルム、ヘキサンまたは酢酸エチルおよびヘキサンなどの溶媒を添加することによる溶媒ベース抽出を含む、多くの方法によって実施される。有機層および水層は分離され、溶媒は蒸発される。残渣は次にエタノールなどの水和性溶媒中で再構成される。逆相カートリッジ抽出法も使用されている。他の従来方法は、個々のビタミンＤ代謝産物の分離を実施し、サンプルから結合タンパク質などの干渉因子を除外するための、ＨＰＬＣおよびクロマトグラフィーの使用を含む。

【０００７】

抽出および分離の方法の簡易化は、ビタミンＤおよびその代謝産物のアッセイの改良における重要な特色である。たとえば、クロマトグラフィ工程は、結合タンパク質を沈殿させるための、アセトニトリルなどの水和性溶媒の使用により削除されている。結合タンパク質は次に、遠心分離によって上澄から分離され、上澄は次にイムノアッセイまたは競合結合アッセイによって分析されて、存在するビタミンＤ代謝産物の量が決定される。

【０００８】

有機溶媒によるビタミンＤ結合タンパク質の血清サンプルからの除去は効率的であるが、工程は揮発性有機溶媒の蒸発を必要とし、これは臨床生化学実験室でのルーチン使用には魅力的ではない。アセトニトリルなどの水和性溶媒の使用は、溶媒蒸発の必要性を大幅に削減したが、これらは毒性である欠点を持つ。加えて、分離抽出工程の必要性はアッセイ時間を不可避的に延長させる。

【０００９】

Ｂｏｕｌｌｉｏｎ等（Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．３０／１１　１７３１－１７３６　（１９８４））は、「２５－ヒドロキシビタミンＤの２つの直接（非クロマトグラフィ）アッセイ（Ｔｏｗ　Ｄｉｒｅｃｔ（Ｎｏｎ－Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｉｃ）Ａｓｓａｙｓ　ｆｏｒ　２５－Ｈｙｄｒｏｘｙ　Ｖｉｔａｍｉｎ　Ｄ）」について述べている。述べられたアッセイは、多くの従来方法で必要とされているクロマトグラフィ工程を必要としないが、溶媒沈殿の使用によるサンプルからのビタミンＤ結合タンパク質の抽出はなお必要とする。したがって本論文で述べられているアッセイは、上述の欠点を被る。

【００１０】

Ｈｏｌｉｃｋ等（５，９８１，７７９）は、牛乳および他の生物学的流体中のビタミンＤおよびその代謝産物をアッセイする方法について述べている。述べられた固相アッセイの１つは、サンプル中のビタミンＤ代謝産物を測定するために競合結合アッセイを使用し、（ａ）標識ビタミンＤを結合できるタンパク質または抗体を上に固定化した固相支持体を提供する工程と；（ｂ）固相に結合させるために、固相を標識ビタミンＤ溶液に接触させる工程と；（ｃ）未結合の標識ビタミンＤを除去するために固相を洗浄する工程と；（ｄ）標識化合物を置換するのに足る時間、固相にビタミンＤまたはその代謝産物を含むと疑われるサンプルを接触させる工程と；（ｅ）（ｄ）の液体を収集する工程と；（ｆ）試験サンプル中のビタミンＤまたは代謝産物の量と比例する、液体中の標識ビタミンＤの量を測定する工程と；を含む。牛乳を試験サンプルとして実施した場合の本方法を、図３に概略図として示す。

【００１１】

上述した方法は、実質的に「遊離ホルモン」アッセイである。例示した例において、サンプルはわずかなＤＢＰを含む牛乳である。疎水性ビタミンＤは、他の牛乳タンパク質に結合して、その結合はＤＢＰへの結合と比べると、比較的低い親和性となる。これは牛乳サンプルのアッセイにおいて、サンプル由来ビタミンＤと標識　ビタミンＤトレーサーとの

適切な競合が実現される基盤である。かなりの量のＤＢＰを含むサンプル、たとえばＤＢＰレベルが～４００ｍｇ／Ｌ、約６％の血清のα－グロブリン画分である血清において、「遊離」（すなわちＤＢＰに結合していない）ビタミンＤは、全体で非常に少ない割合である　（血清で０．０４％）。そのようなアッセイは、これらのサンプルにおけるビタミンＤ代謝産物の測定には適しておらず、その見解は、血清サンプルへの応用に関して例示されたアッセイにより、Ｈｏｌｉｃｋらが最近の論文でさらに支持している。しかし、例示された牛乳アッセイと血清アッセイとの唯一の著しい相違は、ＤＢＰおよび他のタンパク質をサンプルから除去するための、追加の溶媒抽出段階の必要性である（１１ｔｈ　Ｗｏｒｋｓｈｏｐ　ｏｎ　Ｖｉｔａｍｉｎ　Ｄ、２７、Ｍａｙ－１、２０００年６月、米国ナッシュビル（Ｎａｓｈｖｉｌｌｅ，ＵＳＡ））。元のアッセイで牛乳の代わりに血清を用いると、管上のＤＢＰに最初に結合された標識ビタミンＤは、その９８％は非占有Ｄ結合部位である、サンプル中に存在するＤＢＰと均衡するのみである。そのようなアッセイはしたがって、ビタミンＤ類似体に結合するサンプルの能力の尺度を供給し、サンプルのビタミンＤ含有量は供給しない。

【００１２】

Ｈｏｌｉｃｋの特許は、牛乳サンプル中のビタミンＤ（または代謝産物）の測定が、抽出工程の必要なしに可能であることを教示する。血清中のビタミンＤ測定の問題が克服できる有効な方法は教示していない。

【００１３】

血清、血漿または他の生物学的流体におけるステロイドホルモンの測定は、分離抽出手順の必要なしに、直接イムノアッセイによって実施される。これは関連ステロイド結合タンパク質に結合するが、イムノアッセイで使用される抗体と交差反応しないステロイド類似体の使用により実施される。ステロイド類似体は、ステロイド結合タンパク質を飽和し、ステロイドを置換して、ステロイドをイムノアッセイの抗体に結合させる。

【００１４】

アッセイ抗体と交差反応しないビタミンＤ類似体などの（特異的）競合置換体の使用は（直接ステロイド測定法への類似性により）「直接」アッセイを提供できる必要がある。第一に、ＤＢＰの濃度は血清サンプル中で非常に高く、通常～４００ｍｇ／Ｌ（～７μｍｏｌ／ｌ）、および通常、わずか～２％のＤＢＰが２５－ヒドロキシ－ビタミンＤ結合を持ち、残りの～９８％ＤＢＰは非占有のままであり、潜在的な競合置換体を結合する。結果として、特異的競合置換体の濃度は、ＤＢＰを飽和するのに足る必要があり、親和性が２５－ヒドロキシビタミンＤの親和性より低い場合は過剰である必要がある。ビタミンＤ類似体はビタミンＤ化学の複雑性により、特に高価である。第二に、ＤＢＰの（天然ビタミンＤ代謝産物に対する）特異性は、多数の各種ビタミンＤ類似体の利用可能性があっても、２５－ヒドロキシビタミンＤに匹敵するＤＢＰへの親和性を持つのはごくわずかであることを意味している。

【００１５】

本発明は、血清または血清のサンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物を測定するための改良された方法を提供することによって、従来技術に関する問題を克服または改善することを目的とする。

【００１６】

したがって本発明の第一の態様において、被検者の血漿または血清サンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物を測定する方法が提供され、該方法は：

（ａ）任意のビタミンＤ代謝産物が検出および／または測定され得るように、血清または血漿サンプル中の任意のビタミンＤ代謝産物を、該代謝物が結合しているタンパク質から分離させるために、該血清または血漿サンプルに非競合置換剤を添加することと；

（ｂ）（ａ）のサンプル中のビタミンＤ代謝産物の量を検出または測定することと；

を含む。

【００１７】

したがって本発明は、血清または血漿サンプル中のビタミンＤ代謝産物を測定するための

簡単であるが効率的な方法への切迫した必要性を満足する。それは、タンパク質との競合やサンプルからの抽出の必要なしにビタミンＤ代謝産物の量を検出または測定できるようにするために、結合タンパク質からのビタミンＤ代謝産物の効率的な分離を可能にする非競合置換剤の驚くべき発見に基づいている。本質的に、本発明は初めて、測定されるビタミンＤ代謝産物の類似体または競合物ではない、ビタミンＤ代謝産物分析での使用のための置換剤を提供する。抽出工程と競合置換剤の両方の必要性の消滅は、以前の方法よりも効率的かつ費用効率の高い方法を可能にし、それゆえ臨床生化学研究室での日常使用または個人使用により適している。

【００１８】

本発明は、好ましくは被検者からの、血漿または血清の任意のサンプルに対して行える。血漿または血清が分析される被検者はビタミンＤ状態を判定することが望ましい人である。好ましくは、被検者は哺乳類である。さらに好ましくは被検者はヒトであり、最も好ましくは子供である。

【００１９】

血漿または血清のサンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の測定は、サンプル中の任意のビタミンＤ代謝産物の存在の検出と、またはさらに好ましく存在するビタミンＤ代謝産物の量の決定との両方を含んでいてもよい。量は、ビタミンＤ代謝産物の欠乏または過剰を示すかどうかを詳述するキーと比較してもよい。

【００２０】

任意の１又は２以上のビタミンＤ代謝産物は、本発明の方法で測定できる。好ましい実施形態において、一部の用途では存在する２種類以上の代謝産物を測定することが好ましいことが予見されるが、特異性のビタミンＤ代謝産物はサンプル中で測定される。代謝産物の例には、２５－ヒドロキシビタミンD_2、２５－ヒドロキシビタミンD_3、２４，２５－ジヒドロキシビタミンD_3および２５，２６－ジヒドロキシビタミンＤが含まれる。２５－ヒドロキシビタミンD_2またはD_3、あるいはその類似体は、本発明の方法で測定される好ましい代謝産物である。

【００２１】

本発明の方法は、ＤＢＰからのビタミンＤ代謝産物の分離、または置換に限定されないが、ビタミンＤ代謝産物の、それが結合している任意の因子からの分離に使用されうる。通常、そのような因子はたとえば血清アルブミンなどの、タンパク質となる。

【００２２】

置換とは、一部またはすべてのビタミンＤ代謝産物の、それがサンプル中で結合する因子からの全体的または部分的分離を意味する。好ましくは、結合因子からのビタミンＤ代謝産物の置換は、たとえば結合アッセイにおいて、ビタミンＤ代謝産物を検出および／または測定可能にするのに足る。サンプル中に存在する実質的にすべてのビタミンＤ代謝産物は、それが測定できるように、結合因子から十分に置換されることが好ましい。この状況において、「実質的に」とは、少なくとも９５％、９８％および好ましくは少なくとも９９％のビタミンＤ代謝産物が置換されることを意味する。これは本発明の方法に基づく試験の精度を確保する。

【００２３】

結合タンパク質からのビタミンＤ代謝産物の置換、または分離を実施できる任意の非競合剤を、本発明の方法の工程（ａ）で使用できる。本発明における使用のための好ましい薬剤は、ビタミンＤ代謝産物と結合因子との間の結合を妨害または破壊することによって作用する化学試薬である。置換剤としての使用のための好ましい化学試薬は、ビタミンＤ代謝産物の置換を助ける十分な親和性によって、アルブミンなどのビタミンＤ結合タンパク質に結合する化学試薬である。本発明の最も好ましい実施形態において、置換剤は好ましくは、緩衝液中に８－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩、３－（アセトニルベンジル）－４－ヒドロキシクマリンおよび水和性溶媒を含む化学試薬である。たとえばリン緩衝生理的食塩水などの、どの適切な緩衝液でも使用できる。適切な水和性溶媒は当業者に既知となり、エタノール、アセトニトリル、プロパン－１－オール、プロパ

ン－２－オール、アセトン、ジメチルホルムアミドおよびメチルスルホキシドを含む。好ましい水和性溶媒はメタノールである。置換剤を生成するための、３つの試薬の適切な濃度および割合は、当業者がただちに確認できる。試薬の好ましい濃度は０．５～１０ｇ／ｌ、さらに好ましくは１．６０ｇ／ｌの－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩と；５０～１０００ｍｇ／ｌ、およびさらに好ましくは１６０ｍｇ／ｌの３－（アセチロニルベンジル）－４－ヒドロキシクマリンと、１０～３００ｍｌ／ｌ、さらに好ましくは１６０ｍｌ／ｌのメタノールなどの水和性溶媒である。

【００２４】

ビタミンＤ代謝産物がサンプル中で結合因子から置換されると、サンプル中のビタミンＤ代謝産物の存在または量が決定される。この目的にはどの適切な方法も使用でき、そのような方法は当業者によく知られることとなる。適切な方法の例には競合または非競合結合などの結合アッセイ、イムノアッセイ、または未結合ビタミンＤ代謝産物の直接標識が含まれる。

【００２５】

サンプル中のビタミンＤ代謝産物の量を測定する工程（ｂ）は、工程（ａ）に続いて、または工程（ａ）と同時に実施される。好ましくは工程（ｂ）は、工程（ａ）と同時に実施され、したがって血清または血漿サンプル中のビタミンＤ代謝産物の、単一工程のアッセイまたは測定が提供される。

【００２６】

サンプル中の置換ビタミンＤ代謝産物を測定するための好ましい方法の１つは、競合結合アッセイによるものである。適切な競合結合アッセイは各種の形式を取り、当業者に周知となる。代表的な競合結合アッセイは、受容体をリガンドの標識形および同じリガンドの非標識形を含むことが疑われるサンプルに接触させることを含む。受容体に結合することがわかっている標識リガンドの量は、サンプル中の未標識リガンドの割合を示す。あるいは、競合結合アッセイは、リガンドの標識形に結合する受容体を供給することと、リガンドの未標識形を含むことが疑われるサンプルを受容体に添加することと、存在する未標識リガンドの量を示す置換標識リガンドの量を測定することと、を含む。

【００２７】

本発明の第一の態様の、好ましい実施形態において、サンプル中の置換ビタミンＤ代謝産物の量を測定する方法であって：（ａ）ビタミンＤ代謝産物を結合できる結合因子を上に固定化した支持体を提供する工程と；（ｂ）支持体を測定されるビタミンＤ代謝産物を含むサンプルと接触させる工程と；（ｃ）支持体をビタミンＤ代謝産物の標識形と接触させる工程と；（ｄ）支持体に結合されたままになっている標識ビタミンＤ代謝産物の量を測定する工程であって、支持体に結合された標識ビタミンＤ代謝産物の量がサンプル中のビタミンＤ代謝産物の量に比例している、工程と；を含む方法が提供される。

【００２８】

結合アッセイを置換工程と同時に実施することが好ましい場合、第一の態様の方法は（ａ）ビタミンＤ代謝産物を結合する結合因子カプセルを上に固定化した支持体を提供する工程と；（ｂ）支持体を被検者の血清または血漿サンプルに接触させる工程と；（ｃ）ビタミンＤ代謝産物の、それが結合したタンパク質からの分離を行うための非競合置換剤を支持体に添加する工程と；（ｄ）支持体にビタミンＤ代謝産物の標識形を接触させる工程と；（ｅ）支持体に結合されたままになっている標識ビタミンＤ代謝産物の量を測定する工程であって；支持体に結合されている標識ビタミンＤ代謝産物の量がサンプル中のビタミンＤ代謝産物の量と比例している、工程と；を含む。

【００２９】

支持体上に固定化される結合因子は、ビタミンＤ代謝産物の標識または未標識形を結合可能などの因子でもよい。結合因子は、アルブミンまたはＤＢＰなどのタンパク質、あるいは興味のある特定のビタミンＤ代謝産物に対して特異性抗体でもよい。最も好ましい実施形態において、結合因子はビタミンＤ代謝産物に対する抗体である。好ましくは、抗体はポリクローナルである。

【００３０】
別の実施形態において、ビタミンＤ代謝産物はイムノアッセイによって測定できる。イムノアッセイのどの適切な形でも使用でき、これらは当業者に既知となる。たとえば、置換ビタミンＤはビタミンＤ代謝産物特異性抗体の支持体に捕捉され、次に第二の標識ビタミンＤ代謝産物特異性抗体を使用して定量される。
【００３１】
上記の方法では、どの適切な標識手段も使用できる。適切な標識は、アルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ビオチン－ストレプトアビジンなどの酵素標識、フルオレシンまたはローダミンなどの蛍光標識、またはルミノール、アクリジウムエステルおよび１，２－ジオキセタンなどの化学発光標識を含む。上の組合せ、たとえばアビジン－ＨＲＰの代用として、アビジン－フルオレシンも含まれる。
【００３２】
本発明の第二の実施形態において、被検者のビタミンＤ状態を判定する方法が提供され、該方法は：
（ａ）未結合ビタミンＤ代謝産物およびタンパク質を含むサンプルを作製するために、血清または血漿のサンプルに非競合置換剤を添加してサンプル中の任意のビタミンＤ代謝産物を、それが結合しているタンパク質から分離することと；
（ｂ）（ａ）のサンプル中のビタミンＤ代謝産物の量を測定することと；
を含む。
【００３３】
被検者のビタミンＤ状態は高度に有益であり、くる病、および高または低カルシウム症を含む多数の疾患状態の基礎をなす原因を判断するのに使用される。したがって本発明の第二の態様の、好ましい実施形態において、方法は被検者の疾患の原因を判定することに関連し、ここで好ましくは被検者はヒト、最も好ましくは子供である。
【００３４】
本発明はインビトロで、被検者から除去した血清または血漿のサンプルについて実施する。したがっておそらく、本方法は被検者から血清または血漿サンプルを最初に除去する追加の工程を含む。本発明はそれゆえ非観血的法に関し、その結果は被検者のビタミンＤ状態、ひいては疾患の背景の判定に使用される。しかし方法は、それに基づいて治療に関する即時の医療的決定が行われねばならない結果を提供するものではない。
【００３５】
本発明の第三の態様において、第一の態様に関連して定義された置換剤が提供される。
【００３６】
本発明の第四の態様において、第三の態様の薬剤の使用が提供される。血清または血漿のサンプル中のビタミンＤ代謝産物を測定するための、または被検者のビタミンＤ状態を判定するための方法において、好ましくは本発明の第一および第二の態様の方法において置換剤が使用される。
【００３７】
本発明の第五の態様において、本発明の第二の態様による置換剤を含む、第一および第二の態様の方法における使用のためのキットが提供される。キットは好ましくは、アッセイの結果とサンプル中に存在するビタミンＤ代謝産物の量との間の相関を示すキーを含む。さらに好ましい実施形態において、キットは、本発明の第一の態様の工程（ｂ）を実施するための手段を含んでいてもよい。そのような手段は、１又は２以上の支持体、標識ビタミンＤ代謝産物、抗体、標識上のタンパク質を含むことがある。キットは好ましくは使用説明も含む。
【００３８】
好ましい実施形態は、必要な変更を加えて各態様に適用される。
以下に、図１～図３を参照しながら、実施例（但し、本発明を限定するものではない。）を用いて本発明を説明する。
【００３９】

【実施例】
抗ビタミンＤコーティングされたマイクロタイタープレートの調製
ロバ抗（ヒツジＩｇＧ）血清およびヒツジ抗ビタミンＤはどちらも、該当するＩｇＧ画分を与えるために硫酸ナトリウム沈殿によって精製された。マイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ）はロバ抗（ヒツジＩｇＧ）、１０mMリン酸緩衝生理的食塩水（ＰＢＳ）中に３０ｍｇ／ｌのＩｇＧのウェルあたり２５０μｌの精製ＩｇＧでコーティングして、室温にて一晩インキュベートした。コーティングされたプレートは、１０mMリン酸緩衝生理的食塩水、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）で３回洗浄した。ヒツジ抗ビタミンＩｇＧ、ＰＢＳ中の１ｎｇ／ｍｌ、０．１％Ｐｏｌｙｐｅｐ（Ｓｉｇｍａ）、０．０５％アジ化ナトリウム、ウェルあたり２００μｌを添加し、プレートを２～８℃にて保管した。プレートを使用前にＰＢＳＴで洗浄した。

【００４０】
ビタミンＤビオチンの調製
２４，２５－ジヒドロキシビタミンＤのメタノール溶液（２００μｌ／ｍｇ／ｍＬ）を水中で過剰の過ヨウ素酸ナトリウムによって室温にて１時間処理し、ＨＰＬＣクロマトグラフィ（Ｈｙｐｅｒｓｉｌ　Ｃ１８カラム４．６mm×１２５mm、５０％メタノール／水、５０％～１００％メタノールの溶出勾配）によって精製した。（２５，２６，２７－ｎｏｒ）－ビタミンＤ－２４－アルデヒドを含む溶出画分は、過剰のカルボキシメチルオキシム（Ｓｉｇｍａ）メタノールで４時間処理し、ＨＰＬＣクロマトグラフィ（上と同じ）で精製して２４－ＣＭＯ－ビタミンＤを得た。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルは、ジオキサン中での過剰のＮ－ヒドロキシスクシンイミドおよびジクロロヘキシルカルボジミドを用いた２４－ＣＭＯ－ビタミンＤの処理によって調製した。２４－ＣＭＯ－ビタミンＤのＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルおよびビオチンＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（Ｓｉｇｍａ）　をジオキサン溶液中のビスアミノポリエチレングリコール（Ｓｉｇｍａ）　に加えて、室温にて３時間反応させた。過剰の２４－ＣＭＯ－ビタミンＤおよびビオチンは　透析によって除去し、ビタミンＤ－ビオチンコンジュゲートを－２０℃にて保存した。

【００４１】
ビタミンＤ置換剤
ビタミンＤ置換剤の好ましい処方は、８－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩（０．５～１０ｇ／ｌ、好ましくは１．６ｇ／ｌ）、３－（α－アセトニルベンジル）－４－ヒドロキシクマリン（５０～１０００ｍｇ／ｌ、好ましくは１６０ｍｇ／ｌ）およびメタノール（１０～３００ｍｌ／ｌ、好ましくは１６０ｍｌ／ｌ）を含む、リン酸緩衝生理的食塩水溶液などの、任意の従来の緩衝液である。

【００４２】
酵素イムノアッセイ
代表的なアッセイ手順は以下のとおりである：サンプルの一部（血清または血漿２５μｌ）を、上述のビタミンＤ置換剤１ｍｌで希釈する。希釈サンプルの一部（１００μｌ）を抗ビタミンＤ抗体コーティングのマイクロタイタープレートに添加し、続いてビタミンＤ－ビオチンコンジュゲートの溶液（１００μｌ）を添加し、室温にて９０分間インキュベートする。プレートを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を含む１０mMリン酸緩衝生理的食塩水によって３回洗浄した。ＰＢＳＴ中で１：２０００に希釈されたアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート（Ｓｉｇｍａ）を加え、室温で３０分間インキュベートし、続いてＰＢＳＴで３回洗浄した。ＴＭＢサブストレート試薬（Ｍｏｓｓ　Ｉｎｃ．）を加え、３０分間にわたって色を顕出させた。反応を停止させるために０．５Ｍ　ＨＣｌを添加した後、４５０ｎｍにて吸収を記録した。

【００４３】
校正曲線は分析されるサンプルの各バッチを用いて作成され、各サンプルの２５－ヒドロキシビタミンＤ値は、各サンプルで得られた吸収値を用いて校正曲線から直接読み取れる。これはグラフ用紙にプロットされた校正曲線から手動で、またはさらに普通には適切な

データ処理ソフトウェアによって実施できる。

【００４４】

図１に、直接２５－ヒドロキシビタミンＤ酵素イムノアッセイの典型的な較正曲線を示す。

【００４５】

２５－ヒドロキシビタミンＤ

４５０ｎｍにおける吸収

患者サンプルを用いて直接２５－ヒドロキシビタミンＤ酵素イムノアッセイの有効性を証明するために、どちらもアッセイ前にサンプル調製の一部として抽出工程を利用する、２つの市販のラジオイムノアッセイと、アッセイを比較した。２つのラジオイムノアッセイは、ビタミンＤの充足度の評価の一部として、ヒト血清または血漿中の２５－ヒドロキシビタミンＤおよび他の代謝産物の定量に臨床的に幅広く使用されている。直接２５Ｄ酵素イムノアッセイは、２つの確立された抽出ラジオイムノアッセイと良好な一致および相関を示し、それゆえ血清または血漿試料中の２５－ヒドロキシビタミンＤ（および他の代謝産物）の定量での、直接２５ヒドロキシビタミンＤ酵素イムノアッセイの有用性を証明する（図２および３）。

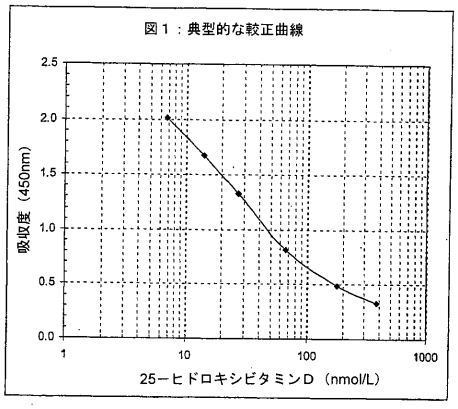
【図面の簡単な説明】

【図１】　直接２５－ヒドロキシビタミンＤ酵素イムノアッセイの典型的な較正曲線。

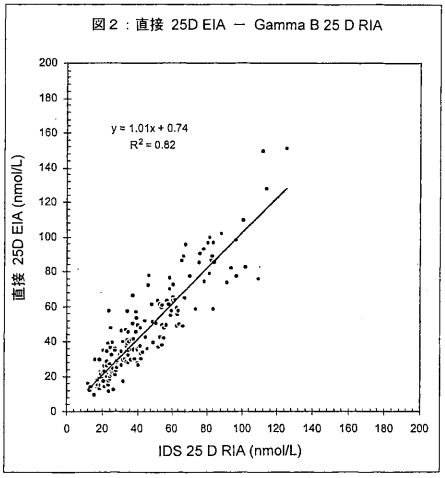
【図２】　１８０の血清または血漿患者サンプルを用いた、本発明の直接酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）とＩｍｍｕｎｏｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＬｔｄｓのＧａｍｍａ　Ｂ　２５－ヒドロキシビタミンＤラジオイムノアッセイ（ＩＤＳカタログ番号ＡＡ－３５Ｆ１）との相関を示す図。

【図３】　５５の血清または血漿患者サンプルを用いた、直接酵素イムノアッセイとＤｉａｓｏｒｎ　２５－ヒドロキシビタミンＤ ^{125}Ｉ　ＲＩＡ（カタログ番号６８１００Ｅ、Ｄｉａｓｏｒｉｎ、米国ミネソタ州スティルウォーター（Ｓｔｉｌｌｗａｔｅｒ、Ｍｉｎｎｅｓｏｔａ、ＵＳＡ））との相関を示す図。

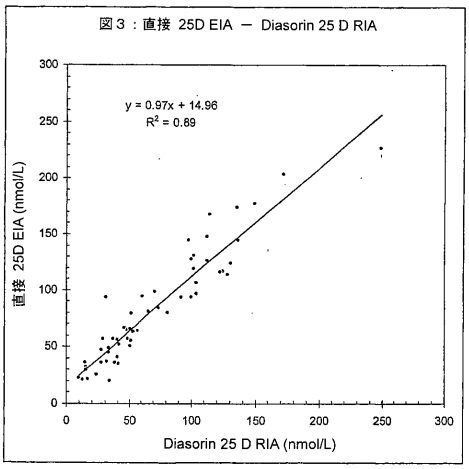
【図１】


図１：典型的な較正曲線
吸収度（450nm）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
25ーヒドロキシビタミンD（nmol/L）

【図２】


図２：直接 25D EIA ー Gamma B 25 D RIA
y = 1.01x + 0.74
R2 = 0.82
直接 25D EIA (nmol/L)
IDS 25 D RIA (nmol/L)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200

【図３】


図３：直接 25D EIA ー Diasorin 25 D RIA
y = 0.97x + 14.96
R2 = 0.89
直接 25D EIA (nmol/L)
Diasorin 25 D RIA (nmol/L)
0
50
100
150
200
250
300

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
G01N 33/543	***(2006.01)***	G01N	33/53	U
G01N 33/58	***(2006.01)***	G01N	33/543	575
		G01N	33/58	Z

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
(72)発明者 ローリー、デビッド
イギリス国、エヌイー３５・９ピーディー、タイン・アンド・ウェア、ボルドン、ボルドン・ビジネス・パーク、イミュノディアグノスティック・システムズ・リミテッド
(72)発明者 バーンズ、アレクサンダー・カークレー
イギリス国、エヌイー３５・９ピーディー、タイン・アンド・ウェア、ボルドン、ボルドン・ビジネス・パーク、イミュノディアグノスティック・システムズ・リミテッド
(72)発明者 ガードナー、マイケル・ジェームス
イギリス国、エヌイー３５・９ピーディー、タイン・アンド・ウェア、ボルドン、ボルドン・ビジネス・パーク、イミュノディアグノスティック・システムズ・リミテッド

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 国際公開第９８／０２１５８０（WO，Ａ１）
国際公開第９９／０６７２１１（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 33/82
G01N 21/76
G01N 21/77
G01N 21/78
G01N 33/53
G01N 33/543
G01N 33/58