(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3614472号
(P3614472)
(45)発行日　平成17年1月26日(2005.1.26)　(24)登録日　平成16年11月12日(2004.11.12)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12Q 1/60	C12Q 1/60
C12Q 1/26	C12Q 1/26
C12Q 1/32	C12Q 1/32
G01N 33/50	G01N 33/50

請求項の数 6　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平6-216258
(22)出願日　平成6年9月9日(1994.9.9)
(65)公開番号　特開平8-70894
(43)公開日　平成8年3月19日(1996.3.19)
審査請求日　平成13年2月22日(2001.2.22)

(73)特許権者　000170565
国際試薬株式会社
兵庫県神戸市西区高塚台４丁目３番２号
(74)代理人　100088904
弁理士　圧司　隆
(72)発明者　岸　浩司
神戸市西区室谷１丁目１－２　国際試薬株式会社　研究開発センター内
(72)発明者　白波瀬　泰史
神戸市西区室谷１丁目１－２　国際試薬株式会社　研究開発センター内
(72)発明者　渡津　吉史
神戸市西区室谷１丁目１－２　国際試薬株式会社　研究開発センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コレステロールの定量方法及び定量用試薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

還元型補酵素Ｃ(1')、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、還元型補酵素Ｃ(1')の酸化型補酵素Ｃ(1)は酸化型補酵素Ｃ(2)とは異なる補酵素である）、及び検体中のコレステロールを基質として△４－コレステノンを生成する可逆反応をなすコレステロール脱水素酵素の存在下で、還元型補酵素Ｃ(1')から酸化型補酵素Ｃ(1)を生成し、酸化型補酵素Ｃ(2)から還元型補酵素Ｃ(2')を生成するサイクリング反応を行って、還元型補酵素Ｃ(1')又は還元型補酵素Ｃ(2')の変化量を測定することを特徴とするコレステロールの定量方法。

【請求項２】

前記酸化型補酵素Ｃ(1)若しくは還元型補酵素Ｃ(2')のいずれか一方の補酵素及びコレステロールには作用せず、他方の補酵素を還元型若しくは酸化型変換物に変換させる脱水素酵素と、該脱水素酵素の基質との存在下で、還元型補酵素Ｃ(1')又は還元型補酵素Ｃ(2')の変化量を測定することを特徴とする請求項１に記載のコレステロールの定量方法。

【請求項３】

還元型補酵素Ｃ(1')、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、還元型補酵素Ｃ(1')の酸化型補酵素Ｃ(1)は酸化型補酵素Ｃ(2)とは異なる補酵素である）、及び検体中のコレステロールを基質とするコレステロール脱水素酵素を含有するコレステロールの定量用試薬。

【請求項４】

前記コレステロールの定量用試薬が第一の試薬と第二の試薬からなり、前記第一の試薬は前記酸化型補酵素Ｃ(2)及び前記コレステロール脱水素酵素を含有し、前記第二の試薬は

前記還元型補酵素Ｃ(1')を含有することを特徴とする請求項３に記載のコレステロールの定量用試薬。
【請求項５】
還元型補酵素Ｃ(1')と、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、還元型補酵素Ｃ(1')は酸化型補酵素Ｃ(2)の還元型補酵素Ｃ(2')とは異なる補酵素である）と、検体中のコレステロールを基質とするコレステロール脱水素酵素と、酸化型補酵素Ｃ(1)若しくは還元型補酵素Ｃ(2')のいずれか一方の補酵素及びコレステロールには作用せず、他方の補酵素に作用する脱水素酵素と、該脱水素酵素の基質とを含有するコレステロールの定量用試薬。
【請求項６】
酸化型補酵素Ｃ(1)と、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、酸化型補酵素Ｃ(1)は還元型補酵素Ｃ(2')の酸化型補酵素Ｃ(2)とは異なる補酵素である）と、検体中のコレステロールを基質とするコレステロール脱水素酵素と、酸化型補酵素Ｃ(1)若しくは還元型補酵素Ｃ(2')のいずれか一方の補酵素及びコレステロールには作用せず、他方の補酵素に作用する脱水素酵素と、該脱水素酵素の基質とを含有するコレステロールの定量用試薬。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、主として臨床検査や食品検査の分野での使用を目的とする微量のコレステロールの定量方法及び定量用試薬に関する。
【０００２】
【発明の背景】
コレステロールは、日常の臨床や健康診断などで良く知られている検査対象であり、一般に動脈硬化の危険因子と言われている。近年、このような成人病に対するコレステロールに関心が高まる中、血清のリポ蛋白の分画であるＨＤＬ（高比重リポ蛋白）やＬＤＬ（低比重リポ蛋白）に存在するコレステロールが測定される機会が多くなっている。更に、最近はレムナント様リポ蛋白分画中のコレステロールも注目され、尿中や唾液中に存在するコレステロールについても臨床研究が進められている。また一方では、日常生活における食事療法に関心が高まっており、食事療法の指標として、食品中に存在するコレステロールの定量分析についても研究開発が進められている。
【０００３】
このように、臨床検査のみならず食品検査の分野でも、コレステロールを定量する機会が増加しているが、従来のコレステロール定量方法はさまざまな問題が指摘されている。従来の方法としては、酵素としてコレステロールオキシダーゼを用いた方法が良く知られている。しかし、この方法では、ビリルビンやアスコルビン酸などの還元性物質の影響を受けやすく、呈色の安定性が良くないという問題がある。他のコレステロール定量方法としては、ガスクロマトグラフィーによる方法があるが、これは酵素を用いる方法に比べ操作が煩雑で、測定精度が低いという欠点がある。
【０００４】
【従来の技術】
本発明者らは、先にコレステロール脱水素酵素を用いた方法（特開平５－１７６７９７号公報参照）を開発し、この方法により前述のコレステロールオキシダーゼを用いた方法での問題を解決できた。
【０００５】
ところで、コレステロールの定量の機会が増える中で、特に微量のコレステロールを定量することが多くなっている。具体的には、例えば尿のように検体中に存在するコレステロール量自体が微量な場合であり、食品検査の場合も同様である。また、臨床検査で小児や老人などは採血量が少ないため、測定時に検体量がごく少量になり、試薬の総量に対して検体としてのコレステロール量が相対的に微量になる場合がある。さらに、抽出操作などで検体が希釈される場合も、測定時はコレステロール量が微量となる。
【０００６】

このような微量のコレステロールを定量するには、前述のコレステロールオキシダーゼを用いた方法では十分な感度が得られないと共に、より一層還元性物質の影響を受けるという問題がある。また、コレステロール脱水素酵素を用いた方法でも、微量のコレステロールを定量する場合、しばしば感度が低いことに遭遇することがある。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上述のような従来の方法を改良して、微量のコレステロールを定量できる方法及びそのための試薬を提供することにより、とりわけ臨床検査や食品検査の分野に貢献することにある。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、先にコレステロール脱水素酵素を用いた方法（特開平５－１７６７９７号公報参照）を開発した際、本酵素が可逆反応を示すことを確認しており、今回さらに本酵素が少なくともチオＮＡＤ（Ｐ）類及びＮＡＤ（Ｐ）類のような別の補酵素にも作用することを解明し、サイクリング反応に適用させることができた。従来から脱水素酵素が全てサイクリング反応に適用できるとは言えず、例えばギ酸脱水素酵素のように可逆反応を示さないものや、乳酸脱水素酵素のように、チオＮＡＤ（Ｐ）類には作用せず、ＮＡＤ（Ｐ）類にのみ作用するものもある。

【０００９】

即ち、上述の目的を達成するために鋭意研究を重ねてきたところ、補酵素の組み合わせによるサイクリング反応下で、コレステロール脱水素酵素を作用させ、そのときの補酵素の変化量を測定することにより問題が解決でき、上述の目的を達成できることを見い出し、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

【００１０】

本発明のコレステロールの定量方法は、還元型補酵素Ｃ(1')、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、還元型補酵素Ｃ(1')の酸化型補酵素Ｃ(1)は酸化型補酵素Ｃ(2)とは異なる補酵素である）、及び検体中のコレステロールを基質として△４－コレステノンを生成する可逆反応をなすコレステロール脱水素酵素の存在下で、還元型補酵素Ｃ(1')から酸化型補酵素Ｃ(1)を生成し、酸化型補酵素Ｃ(2)から還元型補酵素Ｃ(2')を生成するサイクリング反応を行って、還元型補酵素Ｃ(1')又は還元型補酵素Ｃ(2')の変化量を測定することを特徴とするものである。

【００１１】

好ましくは、前記酸化型補酵素Ｃ(1)若しくは還元型補酵素Ｃ(2')のいずれか一方の補酵素及びコレステロールには作用せず、他方の補酵素を還元型若しくは酸化型変換物に変換させる脱水素酵素と、該脱水素酵素の基質との存在下で、還元型補酵素Ｃ(1')又は還元型補酵素Ｃ(2')の変化量を測定することを特徴とするものである。

【００１２】

また、本発明のコレステロールの定量用試薬は、還元型補酵素Ｃ(1')、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、還元型補酵素Ｃ(1')の酸化型補酵素Ｃ(1)は酸化型補酵素Ｃ(2)とは異なる補酵素である）、及び検体中のコレステロールを基質とするコレステロール脱水素酵素を含有することを特徴とするものである。

【００１３】

好ましくは、本発明のコレステロールの定量用試薬は、還元型補酵素Ｃ(1')と、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、還元型補酵素Ｃ(1')は酸化型補酵素Ｃ(2)の還元型補酵素Ｃ(2')とは異なる補酵素である）と、検体中のコレステロールを基質とするコレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素Ｃ(1)若しくは還元型補酵素Ｃ(2')のいずれか一方の補酵素及びコレステロールには作用せず、他方の補酵素に作用する脱水素酵素と、該脱水素酵素の基質とを含有することを特徴とするものである。

本発明のコレステロールの定量用試薬として、酸化型補酵素Ｃ(1)と、酸化型補酵素Ｃ(2)（ただし、酸化型補酵素Ｃ(1)は還元型補酵素Ｃ(2')の酸化型補酵素Ｃ(2)とは異なる補酵

素である）と、検体中のコレステロールを基質とするコレステロール脱水素酵素と、酸化型補酵素Ｃ(1)若しくは還元型補酵素Ｃ(2')のいずれか一方の補酵素及びコレステロールには作用せず、他方の補酵素に作用する脱水素酵素と、該脱水素酵素の基質とを含有することを特徴とするものであっても良い。

【００１４】

本発明方法における検体とは、血清、そのリポ蛋白の分画、尿、唾液などの臨床検査対象物のみならず、食品も含まれる。本発明方法によれば、かかる検体中の微量なコレステロールの定量が可能となり、例えば血清のＨＤＬ分画中のコレステロールでは５０ｍｇ／ｄｌ以下、血清のレムナント様リポ蛋白分画中のコレステロールでは１０ｍｇ／ｄｌ以下、尿中のコレステロールでは５ｍｇ／ｄｌ以下の精度で定量できることが要求されており、本発明方法はかかる要求に応えることができる。

【００１５】

本発明におけるコレステロール脱水素酵素としては、例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ＮＡＤ）依存性コレステロール脱水素酵素、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート（ＮＡＤＰ）依存性コレステロール脱水素酵素など公知のものが挙げられる。

【００１６】

また、補酵素としては、コレステロール脱水素酵素の反応に関与し、サイクリング反応をなし得るものはすべて用いることができる。例えば、公知のものとしては、チオＮＡＤ（Ｐ）類、ＮＡＤ（Ｐ）類などを挙げることができる。

【００１７】

チオＮＡＤ（Ｐ）類としては、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（チオＮＡＤ）、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート（チオＮＡＤＰ）、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドフォスフェートなどがある。

【００１８】

また、ＮＡＤ（Ｐ）類としては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ＮＡＤ）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート（ＮＡＤＰ）、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチドフォスフェート、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドフォスフェートなどがある。

【００１９】

これら補酵素は、用いるコレステロール脱水素酵素に応じて適宜選択されるが、とりわけ、チオＮＡＤとＮＡＤとの組み合わせが好ましく、一方は酸化型の補酵素、他方は還元型の補酵素を用いる。

【００２０】

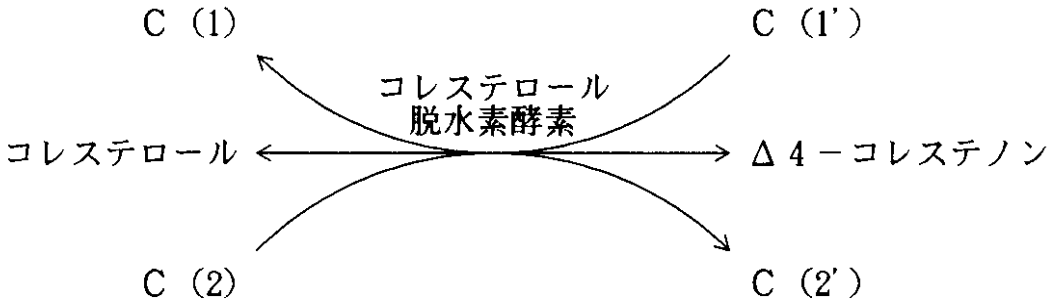
本発明におけるサイクリング反応は、自体公知の反応であり、酸化型及び還元型補酵素の組み合わせにより反応を進め、酸化型又は還元型補酵素の変化量を測定する。補酵素を組み合わせる際、それぞれの測定条件の異なるものを選ぶと検出が容易となる。例えばチオＮＡＤ（Ｐ）とＮＡＤ（Ｐ）との組合わせを選択した場合、それぞれの還元型における極大吸収の波長が相違しているため、その一方の波長で吸光度を測定することにより、該波長を極大吸収波長に持つ補酵素の変化量が測定できる。このとき該波長での吸光度の増加を動力学的測定又は終点測定のいずれかで測定すれば良い。

【００２１】

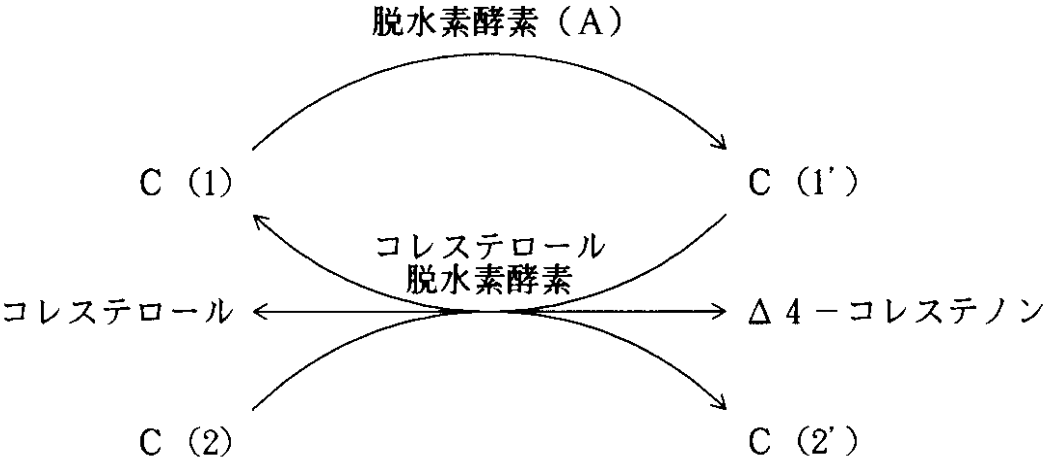
サイクリング反応によるコレステロールを基質とする可逆反応式は、下記の通りである。

【００２２】

【化１】



【００２３】
ここでＣは補酵素を表し、（１）　及び（２）　はその酸化型を表す。また（１’）は（１）　の還元型変換物を、（２’）は（２）　の還元型変換物をそれぞれ表す。例えば、Ｃ（２）　をチオＮＡＤ（Ｐ）類の酸化型としたとき、Ｃ（２’）は反応により生じたその還元型変換物を表し、Ｃ（１’）をＮＡＤ（Ｐ）類の還元型としたとき、Ｃ（１）　は同様にその酸化型変換物を表す。
【００２４】
Ｃ（１’）及びＣ（２）　の濃度は、それぞれ０．０２～１００ｍＭ、好ましくは０．０５～３０ｍＭであり、コレステロール脱水素酵素の濃度は、０．０５～１００Ｕ／ｍｌ、好ましくは１～５０Ｕ／ｍｌであるが、検体の種類などに応じて適宜決定される。
【００２５】
本発明では、下記に示すように他の脱水素酵素（Ａ）を組み合わせることができる。
【００２６】
【化２】



【００２７】
脱水素酵素（Ａ）は、Ｃ（２）　及びコレステロールに作用せず、Ｃ（１）　をＣ（１’）に変換させる脱水素酵素であり、Ｃ（１’）を再生するために添加される。脱水素酵素（Ａ）を用いることによって、Ｃ（１’）の添加量を少なくすることが可能となり、Ｃ（１’）を添加せずに、あるいはＣ（１）　とＣ（１’）との混合物を添加することによって、反応が進行する。
【００２８】
脱水素酵素（Ａ）及びその基質としては、例えばＣ（１）　がＮＡＤ類の酸化型の場合、アルコールデヒドロゲナーゼとエタノール又はアセトアルデヒド、グリセロールデヒドロゲナーゼとグリセロール又はジヒドロキシアセトン、グリセロール－３－リン酸デヒドロ

ゲナーゼとＬ－グリセロール－３－リン酸又はジヒドロキシアセトンリン酸、リンゴ酸デヒドロゲナーゼとＬ－リンゴ酸又はオキザロ酢酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼとＤ－グリセロアルデヒドリン酸とリン酸又は１，３－ジホスホ－Ｄ－グリセリン酸、Ｃ（１）　がＮＡＤＰ類の酸化型の場合、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼとグルコース－６－リン酸又はグルコノラクトン－６－リン酸、イソクエン酸デヒドロゲナーゼとイソクエン酸、グリオキシル酸デヒドロゲナーゼとＣｏＡとグリオキシル酸、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼと６－ホスホ－Ｄ－グリコン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼとＤ－グリセロアルデヒド－３－リン酸とリン酸又は１，３－ジホスホ－Ｄ－グリセリン酸、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼとベンズアルデヒドなどを用いることができる。

【００２９】

脱水素酵素（Ａ）の濃度は、Ｃ（１）　に対するＫｍ値（ｍＭ単位）の２０倍量（Ｕ／ｍｌ単位）以上、好ましくは１～１００Ｕ／ｍｌである。また、脱水素酵素（Ａ）の基質の濃度は、０．０５～２０ｍＭが好ましい。脱水素酵素（Ａ）を用いた場合、Ｃ（２’）の生成量を測定することによって、コレステロールの定量を行うことができる。

【００３０】

本発明のコレステロールの定量用試薬は、▲１▼コレステロール脱水素酵素、Ｃ（１’）、及びＣ（２）　を含む組成物、▲２▼コレステロール脱水素酵素、脱水素酵素（Ａ）、Ｃ（１）　単独又はＣ（１）　とＣ（１’）との混合物、及びＣ（２）　を含む組成物の２種類の組み合わせが考えられる。本発明の試薬は、正反応／逆反応の至適ｐＨの間のｐＨ条件に調整し得るように、緩衝剤を含んでいてもよい。

【００３１】

従来、コレステロール脱水素酵素とサイクリング反応とを組み合わせた報告はなく、本発明者らにより初めて、コレステロール脱水素酵素とサイクリング反応を組み合わせた結果、微量のコレステロールを定量できることが明らかになった。

【００３２】

本発明方法は、コレステロール脱水素酵素のみを用いた従来の方法に比べて格段に測定感度を増大させることが可能となり、本発明の試薬は、本発明方法を実施するための好適な試薬である。ここで得られる感度は、用いる緩衝液の種類、ｐＨなどの条件で異なり、また補酵素やコレステロール脱水素酵素の量、反応時間などに依存することが分かった。そして臨床検査で日常使用する自動分析装置での測定でも、高感度に測定できることが判明した。

【００３３】

【発明の効果】

本発明により、検体中に存在するコレステロール量自体が微量な場合、又は検体量自体がごく少量の場合であっても、コレステロールを正確に定量できるようになり、臨床検査や食品検査の分野で有用性が高い。

【００３４】

【実施例】

本発明をより詳細に説明するために実施例及び比較例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【００３５】

〔実施例１〕

以下の試薬を調製した。

試薬－１

リン酸一カリウム	５０mmol／ｌ
チオNAD$^+$	０．５mmol／ｌ
β－NADH	１．０mmol／ｌ
KCｌ	０．１５mol ／ｌ
CHES	２５mmol／ｌ
トリトンX－１００	０．３％
コール酸ナトリウム	０．３％
牛血清アルブミン（BSA）	０．１％
コレステロール脱水素酵素（CDH）	０．５単位／ｍｌ
pH	６．５～９．５

【００３６】
ｐＨ６．５～９．５の範囲で調製した試薬を用いて、ｐＨにおける感度の変動について検討した。６ｍｇ／ｄｌに調製した標準液１０μｌを、予め３７℃の恒温にした４００μｌの試薬－１に添加し、波長４１５ｎｍにおける１分間あたりの吸光度変化量を求め、その結果を図１に示した。図１に示されるように、ｐＨを変動させることによって、感度を調節できることが分かる。
【００３７】
〔実施例２〕
以下の試薬を調製した。

試薬－２

リン酸一カリウム	５０mmol／ｌ
チオNAD$^+$	０．５～３mmol／ｌ
β－NADH	１．０mmol／ｌ
KCｌ	０．１５mol ／ｌ
CHES	２５mmol／ｌ
トリトンX－１００	０．３％
コール酸ナトリウム	０．３％
BSA	０．１％
CDH	０．５単位／ｍｌ
pH	８．５

【００３８】
６ｍｇ／ｄｌに調製したコレステロール標準液１０μｌを、予め３７℃の恒温にした４００μｌの試薬－２に添加し、波長４１５ｎｍにおける１分間あたりの吸光度変化量をチオNAD$^+$ の濃度別に測定し、その結果を図２に示した。図２に示されるように、チオNAD$^+$ の濃度を変動させることによって、感度を調節できることが分かる。
【００３９】
〔実施例３〕
以下の試薬を調製した。

試薬－３

ＰＩＰＥＳ	２０mmol／ｌ
ＫＣｌ	０．１５mol ／ｌ
トリトンＸ－１００	０．３％
コール酸ナトリウム	０．３％
チオＮＡＤ$^{+}$	１．２５mmol／ｌ
ＢＳＡ	０．１％
ＣＤＨ	０．７～３．５単位／ｍｌ
ｐＨ	７．０

【００４０】

試薬－４

ＣＨＥＳ	１７５mmol／ｌ
トリトンＸ－１００	０．３％
コール酸ナトリウム	０．３％
β－ＮＡＤＨ	３．５mmol／ｌ
ｐＨ	９．１

【００４１】

３及び６ｍｇ／ｄｌに調製したコレステロール標準液を１０μｌとり、２５０μｌの試薬－３に添加する。５分間恒温後、１００μｌの試薬－４を添加する。添加後、１分目から３分目までの波長４０５ｎｍにおける吸光度を測定し、１分間あたりの吸光度変化量を求め、その結果を図３に示した。図３に示されるように、ＣＤＨ量を変動させることによって、感度を調節できる。

【００４２】

実施例１～３の結果から、目的とする検体中のコレステロール濃度に対応して、感度を調節できることが分かる。

【００４３】

〔実施例４〕

以下の試薬を調製した。

試薬－５

ＰＩＰＥＳ	２０mmol／ｌ
ＫＣｌ	０．１５mol ／ｌ
トリトンＸ－１００	０．３％
コール酸ナトリウム	０．３％
チオNAD^+	１．２５mmol／ｌ
ＢＳＡ	０．１％
ＣＤＨ	３Ｕ／ｍｌ
コレステロールエステラーゼ	６Ｕ／ｍｌ
ｐＨ	７．０

【００４４】
さらに比較対照試薬として、Ｔ－ＣＨＯ試薬・Ａ（カラー法，国際試薬株式会社製）、Ｔ－ＣＨＯ試薬・Ｋ「コクサイ」（ＵＶ法，国際試薬株式会社製）及びデタミナーＴＣＬ（カラー法，協和メディクス社製）を準備した。
【００４５】
約５６，４２，２８，１４，７，３．５，１．４及び０．７ｍｇ／ｄｌのコレステロールを含有する各検体を調製し、実施例３と同様の操作により、試薬－４及び試薬－５を用いて、吸光度変化量を測定した。また、比較対照試薬（カラー法及びＵＶ法）については、使用説明書に従って操作した。なお、各操作法における反応液中のコレステロール濃度を同じにするために、試薬容量／検体容量の比を３６／１とした。その結果を図４（コレステロール値：約５６～７ｍｇ／ｄｌ）及び図５（コレステロール値：約１４～０．７ｍｇ／ｄｌ）に示す。但し、比較対照試薬を用いた方法では、微量のコレステロール濃度における吸光度変化量の信頼性が低かったので、図５においては記載を省略した。
【００４６】
また、約１ｍｇ／ｄｌのコレステロールを含有する検体を調製し、上記の各操作法を複数回（１０回）行った際の各操作法における平均値、変動係数及び標準偏差を求め、表１にまとめた。
【００４７】
【表１】

試　薬	T-CHO 試薬・A（カラー法）	T-CHO 試薬・K ｺｸｻｲ（UV法）	ﾃﾞｸﾐﾅｰ TCL（カラー法）	試薬－4，5（本発明方法）
平均値（mg／dℓ）	1．118	1．229	1．223	1．335
変動係数（mg／dℓ）	0．024	0．117	0．06	0．015
標準偏差（％）	2．03	13．5	4．87	1．111

【００４８】

図４及び図５に示されるように、本発明方法によれば、高感度にコレステロールを測定することが可能となり、また表１に示されるように、約１ｍｇ／ｄｌのコレステロールを測定するときの再現性が明らかに、他法に比べて、向上することが分かる。

【図面の簡単な説明】

【図１】実施例１におけるｐＨ変動に対する感度の変動を示す図である。

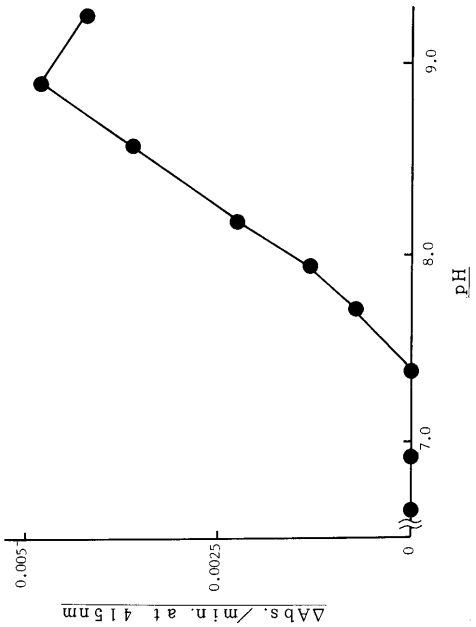
【図２】実施例２におけるチオＮＡＤ$^{+}$　濃度変動に対する感度の変動を示す図である。

【図３】実施例３における試薬中のＣＤＨ量変動に対する感度の変動を示す図である。

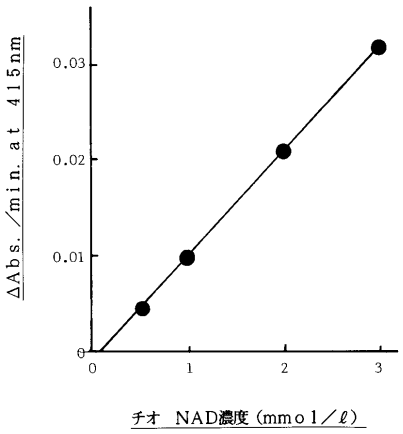
【図４】実施例４におけるコレステロール値変動（約５６～７ｍｇ／ｄｌ）に対する感度の変動を示す図である。

【図５】実施例４におけるコレステロール値変動（約１４～０．７ｍｇ／ｄｌ）に対する感度の変動を示す図である。

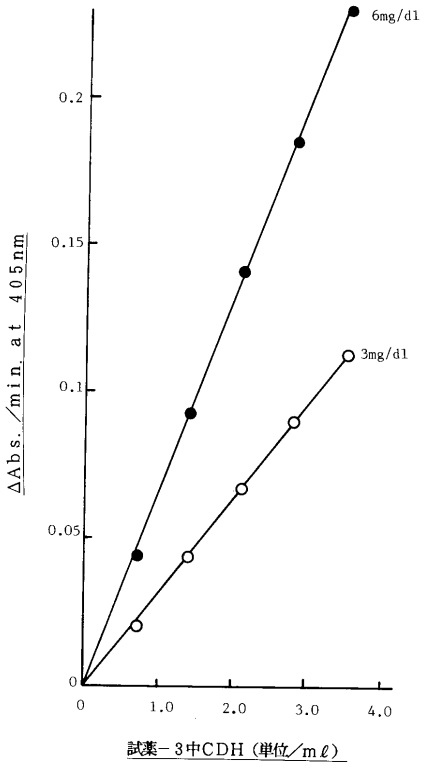
【図１】


ΔAbs./min. at 415nm
0.005
0.0025
0
9.0
8.0
7.0
pH

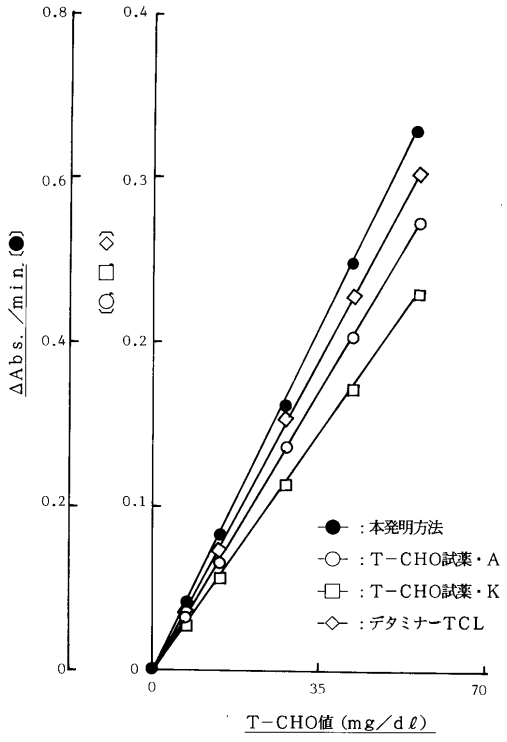
【図２】


ΔAbs./min. at 415nm
0.03
0.02
0.01
0
0
1
2
3
チオ NAD濃度（mmol/ℓ）

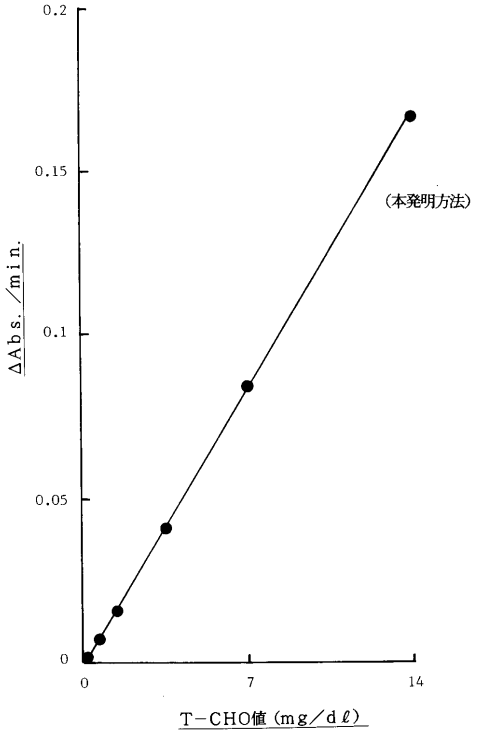
【図３】


ΔAbs./min. at 405nm
6mg/dl
3mg/dl
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
試薬－3中CDH（単位/mℓ）

【図４】


ΔAbs./min.（●）
（○ □ ◇）
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
35
70
：本発明方法
：T－CHO試薬・A
：T－CHO試薬・K
：デタミナーTCL
T－CHO値（mg/dℓ）

【図５】



フロントページの続き

審査官　斎藤　真由美

(56)参考文献　特公平０２－０４９７２０（ＪＰ，Ｂ２）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12Q 1/00-70
G01N 33/00-98
C12N 1/00-7/08
PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)