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

特許第5285000号
(P5285000)

(45)発行日　平成25年9月11日(2013.9.11)　(24)登録日　平成25年6月7日(2013.6.7)

(51)Int.Cl.			F I		
G01N	1/10	(2006.01)	G01N	1/10	A
C12Q	1/44	(2006.01)	C12Q	1/44	
C12Q	1/26	(2006.01)	C12Q	1/26	
C12Q	1/32	(2006.01)	C12Q	1/32	
G01N	33/92	(2006.01)	G01N	33/92	B

請求項の数 11　(全 15 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-37021(P2010-37021)
(22)出願日　平成22年2月23日(2010.2.23)
(65)公開番号　特開2011-174721(P2011-174721A)
(43)公開日　平成23年9月8日(2011.9.8)
審査請求日　平成24年7月4日(2012.7.4)

(73)特許権者　306037311
富士フイルム株式会社
東京都港区西麻布２丁目２６番３０号
(74)代理人　110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者　猪股　弘子
神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地
富士フイルム株式会社内
(72)発明者　フマウィド　マリジョイ
神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地
富士フイルム株式会社内

審査官　秋田　将行

最終頁に続く

(54)【発明の名称】低密度リポ蛋白コレステロールの測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
超低密度リポ蛋白（VLDL）、低密度リポ蛋白（LDL）及び高密度リポ蛋白（HDL）を含む検体を、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で処理することを含む、検体中のVLDLとHDLを低減又は除去する方法。
【請求項２】
体液中の低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)の測定方法であって、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で体液を処理し、（ａ）コレステロールエステラーゼ及び（ｂ）コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを用いて低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)を測定する方法。
【請求項３】
リポ蛋白のうち、超低密度リポタンパク（VLDL）と複合体を形成するアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を用いる、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
リポ蛋白のうち、高密度リポタンパク（HDL）と複合体を形成するアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を用いる、請求項２又は３に記載の方法。
【請求項５】
アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物が、ポリ（アリルアミン）、ポリ（アリルアミン）塩酸塩、アリルアミン塩酸塩の共重合体、ジアリルアミン塩酸塩重合体、又はジアリルアミン塩酸塩の共重合体の何れかである（但し、アリルアミン及び

ジアリルアミンは所望により修飾されていてもよい）、請求項２から４の何れか１項に記載の方法。
【請求項６】
アリルアミン塩酸塩の共重合体及びジアリルアミン塩酸塩の共重合体が、アリルアミン塩酸塩又はジアリルアミン塩酸塩と－ＳＯ２－との共重合体である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物が、ポリ（アリルアミン）、又はジアリルアミン塩酸塩と－ＳＯ２－との共重合体である、請求項４又は５に記載の方法。
【請求項８】
コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼにより低密度リポ蛋白コレステロールから生成した過酸化水素にペルオキシダーゼと色原体とを作用させて発色反応を行なうことにより低密度リポ蛋白コレステロールを測定する、請求項２から７の何れか１項に記載の方法。
【請求項９】
（ａ）コレステロールエステラーゼ、（ｂ）コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、及び（ｃ）アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を含有する、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)を測定するための試薬。
【請求項１０】
（ａ）コレステロールエステラーゼ、（ｂ）コレステロールオキシダーゼ、（ｃ）ペルオキシダーゼ、（ｄ）色原体、及び（ｅ）アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を含む、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)測定用キット。
【請求項１１】
（ａ）コレステロールエステラーゼ、（ｂ）コレステロールオキシダーゼ、（ｃ）ペルオキシダーゼ、（ｄ）色原体、及び（ｅ）アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を含む、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C) 測定用乾式分析素子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物が非LDL(VLDL、HDL)と特異的に複合体を形成することを含む、検体中の低密度リポ蛋白コレステロール（LDL-C）を測定する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
血液中に存在する脂質は、遊離脂肪酸がアルブミンと結合している以外はリポ蛋白の構造の中に組み込まれており、カイロミクロン（CHM）、超低密度リポ蛋白（VLDL）、低密度リポ蛋白（LDL）、高密度リポ蛋白（HDL）等として存在している。コレステロールは特にVLDL、LDL、及びHDLに分布している。LDLはコレステロールを運搬する働きをするが、高値になると動脈硬化を促進することが知られている。低密度リポ蛋白コレステロール（LDL-C）の血中レベルを測定することにより、動脈硬化の発症および進展の指標となることが知られている。
【０００３】
非特許文献１には、ポリアニオン化合物を用いて主にHDL以外のリポタンパク質を特異的に凝集させることが記載されている。しかし、非特許文献１に記載のポリアニオン化合物では、非LDL（VLDL、HDL）と特異的に複合体を形成させることは困難であった。
【０００４】
非特許文献２には、ポリエチレンイミンとカチオン交換樹脂を用いてVLDL、HDLを除去して、リポ蛋白コレステロールを定量することが記載されている。しかし、非特許文献２の方法には、15分以上のインキュベーションが必要であり、かつ、2種類の試薬が必要で

あるという問題があった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Burstein M, et al. Rapid Method for the Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions. J. Lipid Research 11: 583, 1970
【非特許文献２】CC Heuck and G Schlierf, Beta-lipoprotein cholesterol quantitation with polycationsClin Chem 1977 23: 536-540
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
本発明は、体液中の低密度リポ蛋白コレステロール（LDL）を高い選択性で測定できる方法を提供することを解決すべき課題とした。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、非LDLと複合体を形成可能なアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を発見するに至った。本発明の化合物を用いることで、単一化合物で、かつ短時間で非LDL（特に、VLDL及びHDL）と複合体を形成することが可能となる。これにより、LDL中の成分、コレステロール、中性脂肪、アポ蛋白などを測定することが可能となる。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。
【０００８】
本発明によれば、超低密度リポ蛋白（VLDL）、低密度リポ蛋白（LDL）及び高密度リポ蛋白（HDL）を含む検体を、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で処理することを含む、検体中のVLDLとHDLを低減又は除去する方法が提供される。
【０００９】
本発明によればさらに、体液中の低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)の測定方法であって、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で体液を処理し、（ａ）コレステロールエステラーゼ及び（ｂ）コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを用いて低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)を測定する方法が提供される。
【００１０】
好ましくは、リポ蛋白のうち、超低密度リポタンパク（VLDL）と複合体を形成するアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を用いる。
好ましくは、リポ蛋白のうち、高密度リポタンパク（HDL）と複合体を形成するアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を用いる。
【００１１】
好ましくは、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物が、ポリ（アリルアミン）、ポリ（アリルアミン）塩酸塩、アリルアミン塩酸塩の共重合体、ジアリルアミン塩酸塩重合体、又はジアリルアミン塩酸塩の共重合体の何れかである（但し、アリルアミン及びジアリルアミンは所望により修飾されていてもよい）。
【００１２】
好ましくは、アリルアミン塩酸塩の共重合体及びジアリルアミン塩酸塩の共重合体が、アリルアミン塩酸塩又はジアリルアミン塩酸塩と－ＳＯ２－との共重合体である。
好ましくは、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物が、ポリ（アリルアミン）、又はジアリルアミン塩酸塩と－ＳＯ２－との共重合体である。
【００１３】
好ましくは、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼにより低密度リポ蛋白コレステロールから生成した過酸化水素にペルオキシダーゼと色原体とを作

用させて発色反応を行なうことにより低密度リポ蛋白コレステロールを測定する。

【００１４】

本発明によればさらに、（ａ）コレステロールエステラーゼ、（ｂ）コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、及び（ｃ）アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を含有する、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)を測定するための試薬が提供される。

【００１５】

本発明によればさらに、（ａ）コレステロールエステラーゼ、（ｂ）コレステロールオキシダーゼ、（ｃ）ペルオキシダーゼ、（ｄ）色原体、及び（ｅ）アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を含む、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)測定用キットが提供される。

【００１６】

本発明によればさらに、（ａ）コレステロールエステラーゼ、（ｂ）コレステロールオキシダーゼ、（ｃ）ペルオキシダーゼ、（ｄ）色原体、及び（ｅ）アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を含む、低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)測定用乾式分析素子が提供される。

【発明の効果】

【００１７】

本発明によれば、単一化合物のみを用いて短時間において、低密度リポ蛋白コレステロールを高い選択性で測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】図１は、実施例１におけるアガロース電気泳動（コレステロール染色の結果）を示す。

【図２】図２は、比較例１におけるアガロース電気泳動（コレステロール染色の結果）を示す。

【図３】図３は、実施例２におけるＬＤＬ－Ｃの測定の結果を示す。

【図４】図４は、比較例２におけるＬＤＬ－Ｃの測定の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

なお、本明細書中では％で表された濃度は重量％濃度を意味する。

本発明は、超低密度リポ蛋白（VLDL）、低密度リポ蛋白（LDL）及び高密度リポ蛋白（HDL）を含む検体を、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で処理することを含む、検体中のVLDLとHDLを低減又は除去する方法に関する。さらに本発明は、体液中の低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)の測定方法であって、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で体液を処理し、（ａ）コレステロールエステラーゼ及び（ｂ）コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを用いて低密度リポ蛋白コレステロール(LDL-C)を測定する方法に関する。

【００２０】

体液としては、血液、血清、血漿、又は尿などを用いることができる。体液試料としては、血液、血清、血漿、又は尿をそのまま使用してもよく、あるいは適宜の前処理を施したものを使用してもよい。

【００２１】

本発明で用いるアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物を構成するモノマーとしては、アリルアミン（一級アミン）、ジアリルアミン（二級アミン）、アルキルジアリルアミン（三級アミン）、ジアリルジアルキルアミン（四級アミン）などを挙げることができる。アミンはフリー体でもよいし、例えば塩酸塩、酢酸塩、硫酸塩などの塩でもよい。アミノ基がアルキル基（例えば、メチル基、エチル基など）、アルコシキカルボニル基（例えば、メトキシカルボニル基）などで保護されていてもよい。ポリアミ

ンは、ポリアミンのホモポリマーでもよいし、二酸化硫黄、マレイン酸などとのコポリマーでもよい。アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物は、好ましくは、ポリ（アリルアミン）、ポリ（アリルアミン）塩酸塩、アリルアミン塩酸塩の共重合体、ジアリルアミン塩酸塩重合体、又はジアリルアミン塩酸塩の共重合体の何れかである（但し、アリルアミン及びジアリルアミンは所望により修飾されていてもよい）。

なお、本発明において「塩酸塩の重合体、共重合体」とは、モノマー塩酸塩を重合したものを意味するのではなく、製造法によらず、モノマーの重合後のポリマーの該当するアミン部分が塩酸塩になっていることを意味する。

【００２２】

アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物の分子量は、好ましくは300以上200,000以下であり、より好ましくは1000以上50000以下であり、さらに好ましくは1000以上10000以下である。

【００２３】

アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物の具体例としては、例えば、日東紡のＰＡＡシリーズ、ＰＡＳシリーズを使用することができる。本発明で使用できる日東紡のＰＡＡシリーズ、ＰＡＳシリーズのポリマー化合物の特徴を以下に示すが、本発明で使用できる化合物はこれらに限定されるものではない。

【００２４】

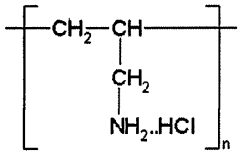
【表１】

		MW
ポリ（アリルアミン）	PAA-01	1,000
	PAA-03	3,000
	PAA-05	5,000
	PAA-08	8,000
	PAA-15C	15,000
	PAA-25	25,000
ｼﾞｱﾘﾙｱﾐﾝ重合体	PAS-21	4,000
メチルジアリルアミン塩酸塩重合体	PAS-M-1L	5,000
	PAS-M-1	20,000
ｼﾞｱﾘﾙｱﾐﾝｰ SO2 重合体	PAS-92	5,000
部分ﾒﾄｷｼｶﾙﾎﾞﾝﾆﾙ化ｱｱﾘﾙｱﾐﾝ重合体	PAA-U5000	15,000
ｱﾘﾙｱﾐﾝ塩酸塩・ｼﾞﾒﾁﾙｱﾘﾙｱﾐﾝ塩酸塩共重合体	PAA-1112CL	1,000
ﾒﾁﾙｼﾞｱﾘﾙｱﾐﾝ塩酸塩・SO2 共重合体	PAS-2201CL	4,000
ｼﾞｱﾘﾙｱﾐﾝ塩酸塩・ﾏﾚｲﾝ酸共重合体	PAS-410C	

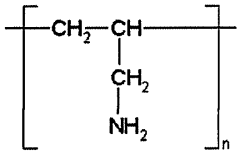
【００２５】

【表２】

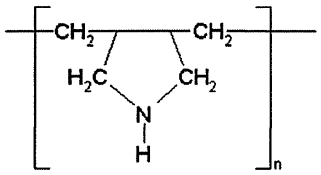
ポリアリルアミン塩酸塩
PAA-HCl



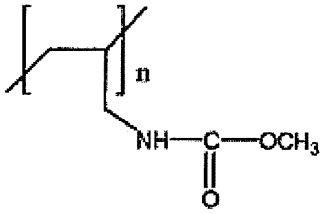
ポリアリルアミン
PAA



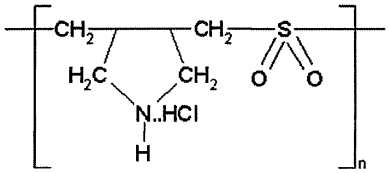
ジアリルアミン
PAS-21



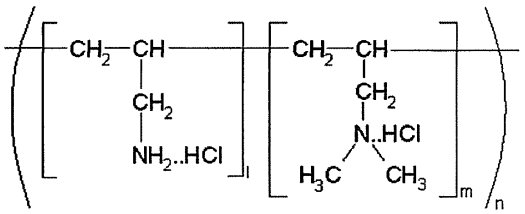
部分メトキシカルボニル化アリルアミン重合体
PAA-U5000



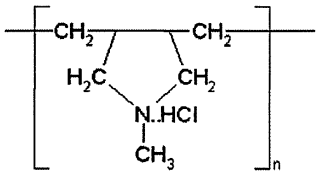
ジアリルアミン-SO2重合体
PAS-92



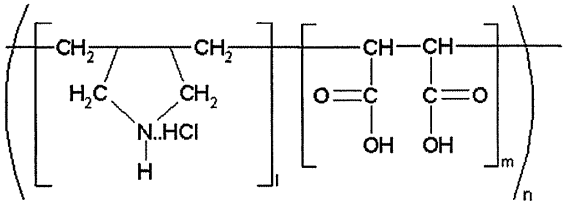
アリルアミン塩酸塩・ジメチルアリルアミン塩酸塩共重合体
PAA-1112CL



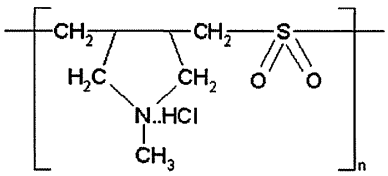
メチルジアリルアミン塩酸塩重合体
PAS-M-1L, PAS-M-1



ジアリルアミン塩酸塩・マレイン酸共重合体
PAS-410C



メチルジアリルアミン塩酸塩・二酸化硫黄共重合体
PAS-2201CL



lとm：モル比
n: 重合度

【００２６】

使用するアリルアミンまたはジアリルアミン単位を有するポリマー化合物の量は適宜決定することができるが、測定系が溶液の場合、試薬と検体が混合した状態でアリルアミンまたはジアリルアミン単位を有するポリマー化合物の最終濃度が0.001％～30％、好ましくは0.01％～10％、より好ましくは0.1％～5％である。

測定系がドライ試薬である乾式分析素子の場合、アリルアミンまたはジアリルアミン単位を有するポリマー化合物は1m2当たり0.01～20g程度の量を用いることができ、より好ましくは1m2当たり0.1～10g程度の量を用いることができる。

検体（体液など）を、アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物で体液を処理するためには、検体と上記ポリマー化合物とを混和し、1秒～60分後、より好ましくは1秒～30分後、さらに好ましくは5秒～15分後に遠心分離またはろ過することによって、非LDLを除去することができる。検体とアリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物との混和は、転倒混和、ボルテックス、ピペッティングなど通常の混和操作で行うことができる。

【００２７】

本発明の方法において用いられる酵素としては、例えば、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またはコレステロールデヒドロゲナーゼを挙げることができる。コレステロールエステラーゼとしてリパーゼを用いることもできる。酵素由来の微生物は特に限定されるものではないが、例えば、コレステロールエステラーゼに関しては、Schizophyllum commune由来又はPseudomonas sp.由来、その他の微生物由来のエステラーゼなどを用いることができる。コレステロールオキシダーゼに関しては、Pseudomonas sp由来、Streptomyces sp.由来、その他微生物由来のオキシダーゼを用いることができる。本発明で用いる酵素は微生物由来の酵素又は周知の方法で製造されたリコンビナント酵素のいずれであってもよい。

【００２８】

Schizophyllum commune由来のコレステロールエステラーゼとしては、例えば、東洋紡社製のCOE-302、Pseudomonas sp由来の由来のコレステロールエステラーゼとしては東洋紡社製のCOE-311、LPL-312、LPL-314、旭化成社製のCEN等が挙げられる。Pseudomonas sp由来由来のコレステロールオキシダーゼとしては、キッコーマン社製のCHO-PELやCHO-PEWL等が挙げられる。

【００２９】

本発明の方法では、これらの試薬のほかに、コレステロールを検出するための試薬として、周知の酵素試薬、色原体、及びpH緩衝剤を用いることができる。

より具体的には、酵素としてペルオキシダーゼを挙げることができ、色原体としては、4-アミノアンチピリン(4-AA)、水素供与性カップリングして発色するフェノール性又はアニリン性のトリンダー試薬、及びロイコ色素などを挙げることができる。トリンダー試薬としては、好ましくはアニリン性試薬を用いることがき、例えば、同仁化学研究所製のN-エチル- N-スルホプロピル-3-メトキシアニリン（ADPS）、N-エチル- N-スルホプロピルアニリン（ALPS ）、N-エチル- N-スルホプロピル-3-メチルアニリン（TOPS）、N-エチル- N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン（ADOS ）、N-エチル- 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（DAOS）、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-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-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン（TOOS）等が挙げられる。

【００３０】

pH緩衝剤の例としては、炭酸塩、硫酸塩、燐酸塩やBiochemistry, 5, pp.467-477, 1966に記載のGoodのpH緩衝剤などがある。これらのpH緩衝剤は、例えば、蛋白質・酵素の基礎実験法、堀尾武一ほか著、南江堂、1981年、Biochemistry, 5, pp.467-477, 1966等の文献の記載を参考にして選択することができる。

前記緩衝剤のpHは用いる酵素の至適pHに応じて決定することができるが、好ましくはｐH5.0～8.0の範囲に調整することができ、より好ましくはｐH6.0～7.0の範囲に調整することができる。

【００３１】

測定系が溶液の場合における本発明の測定方法について説明するが、本発明の範囲は下記の特定の態様に限定されることはない。試薬液の組成としては、次の(1)～(6)を含む組成の溶液が好ましい。

(1)コレステロールエステラーゼ
(2)コレステロールオキシダーゼ
(3)アリルアミン又はジアリルアミン単位を有するポリマー化合物
(4)ペルオキシダーゼ
(5)色原体（4-AA及びトリンダー試薬）
(6)pH緩衝剤

【００３２】

これらの試薬を最適な濃度に調整した試薬液1～1000μL、好ましくは100～500μLを約20℃～約45℃の範囲の一定温度で、好ましくは約30℃～約40℃の範囲内の一定温度で1～10

分間、予めインキュベーションする。この試薬溶液に溶液試料0.5～50μL、好ましくは1～20μLを加え、一定温度でインキュベートしながら色原体の発色に応じた波長の時間経時変化を測定する。予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の被験物質の量を求めることができる。

【００３３】

必要な酵素量は適宜決定することができるが、例えば、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、及びペルオキシダーゼのいずれの酵素も0.2～500U/mLの範囲で用いることが好ましく、0.2～100U/mLの範囲で用いることがより好ましく、より好ましくは1～50U/mLで用いることができる。

【００３４】

測定系が溶液の場合、必要に応じて界面活性剤を1種又は2種以上組み合わせることもできる。界面活性剤の濃度は特に限定されないが、例えば0.01～20％の濃度で用いることが好ましく、より好ましくは0.1～15％の濃度で用いることができる。

【００３５】

測定系がドライ試薬である乾式分析素子を用いた本発明の測定方法について説明する。乾式分析素子は、水不透過性支持体の上に、少なくとも１層の接着層及び多孔性の展開層を有するように構成することができる。

多孔性層は繊維質又は非繊維質のいずれであってもよく、液体試料の展開層として機能することから、液体計量作用を有する層であることが好ましい。液体計量作用とは、層の表面に点着供給された液体試料を、その中に含有する成分を実質的に偏在させることなく、層の面方向に単位面積当りほぼ一定量の割合で広げる作用である。展開層には、展開面積や展開速度等を調節するために、特開昭60-222770号公報、特開昭63-219397号公報、特開昭62-182652号公報に記載された親水性高分子又は界面活性剤を配合することができ、界面活性剤として多環ポリグリシドール化合物を配合することもできる。

【００３６】

繊維性の多孔層は、特開昭55-164356号公報、特開昭57-66359号公報、特開昭60-222769号公報等に代表されるような、ポリエステル繊維のものが好ましい。非繊維性多孔層としては、ポリスルホン酸等の有機高分子であることが好ましい。

接着層は、前記水不透過性支持体、及び前記多孔層を接着する機能を有する層であり、ゼラチン及びこれらの誘導体(例、フタル化ゼラチン)、セルロース誘導体(例、ヒドロキシプロピルセルロース)、アガロース、アクリルアミド重合体、メタアクリルアミド重合体、アクリルアミド又はメタアクリルアミドと各種ビニル性モノマーとの共重合体等の親水性ポリマーが利用できる。

【００３７】

親水性ポリマーを含む水溶液を周知の方法で均一に塗布するが、塗布の方法は公知の方法を利用できる。塗布には、例えば、ディップ塗布、押し出し塗布、ドクター塗布、ホッパー塗布、カーテン塗布等を適宜選択して用いることができる。

【００３８】

接着層の上に多孔層を塗布することもできるが、好ましくは、予め編み物として供給されている布や多孔膜をラミネートするのが好ましい。ラミネートの方法は、特開昭55-164356号公報に記載のように、親水性ポリマーを含む接着層の表面を水で一様に湿潤させておき、その上に布や多孔性膜を重ねて軽くほぼ一様に圧力をかけて接着させる方法で接着させることができる。接着層の厚さは、0.5～50μmが好ましく、より好ましくは、1～20μmである。

【００３９】

光透過性支持体の材料として好ましいものはポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、セルローストリアセテート等のセルロースエーテル類である。親水性層の吸水層、検出層、実質的に無孔性の試薬層等を支持体に強固に接着させるために、通常、支持体に下塗り層を設けるか、親水化処理を施すことができる。支持体の厚みは、特に制限されないが、10～1000μmが好ましく、300～800μmがより好ましい。光透過性のある支持体の場合

、最終的な検出は、支持体側又は多孔層側のいずれでもよいが、光不透過性の場合、多孔層側から検出する。

必要に応じ、安定化剤、ｐH緩衝剤、架橋剤（硬膜剤又は硬化剤）、界面活性剤、ポリマー等を含有させることができ、これらは接着層又は多孔層に含有させることができる。

LDL-C検出用乾式分析素子の好ましい層構成を以下に説明する。

LDL-C検出用乾式分析素子は、ゼラチン水溶液で塗布された接着層および多孔層からなっている。接着層はゼラチン、ペルオキシダーゼ、色材の試薬を含む。接着層の上は、布または膜でラミネートされている。その布または膜上に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またはコレステロールデヒドロゲナーゼ、界面活性剤、pH緩衝剤が塗布されている。

【００４０】

乾式分析素子に用いられるコレステロール測定用試薬組成物及び光学的変化を生じる試薬組成物について説明する。

試薬組成物は、第1の多孔性層に含まれてもよいが、接着層及び多孔性層の両方の層に含まれてもよい。あるいは全部又は大部分の試薬組成物がいずれかの層に含まれていてもよく、あるいは接着層と多孔性層以外の層に試薬組成物を添加しておいてもよい。

【００４１】

LDL-C検出用乾式分析素子において、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またはコレステロールデヒドロゲナーゼのいずれの酵素も1 m^2あたり0.1～30 kU程度の量で用いることが好ましい。より好ましくは1 m^2あたり0.5～15 kU程度の量を用いることができる。

【００４２】

界面活性剤は、いずれも1 m^2あたり0.2～30 g程度の量を用いることができ、より好ましくは1 m^2あたり1～20 g程度の量を用いることができる。

【００４３】

ペルオキシダーゼとしては、特に由来は限定されないが、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼが好ましい。使用量としては1～200kU/m^2程度が好ましく、より好ましくは10～100 kU/m^2程度を用いることができる。

【００４４】

前記色原体に関しては、4-アミノアンチピリン（4-AA）とカップリングして発色する前記試薬の組み合わせが好ましく、特に好ましくは、N-エチル- N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン（TOOS）を用いることができる。使用する色原体の量は特に限定されないが、例えば4-AA及び水素供与性カップリング剤をともに0.1～10g/m^2程度用いることが好ましく、より好ましくは、0.1～5g/m^2程度用いることができる。

【００４５】

LDL-Cを検出するための乾式分析素子におけるその他試薬組成物には、必要に応じて安定化剤、ｐH緩衝剤、架橋剤（硬膜剤又は硬化剤）、界面活性剤、又はポリマー等など添加剤の1種又は2種以上を含有させることができる。これらの添加剤は、乾式分析素子の接着層及び／又は多孔層に含有させることができる。

緩衝剤のpHは用いる酵素の至適pHに応じて決定することができ、好ましくはpH5.0～8.0の範囲に調整することができる。より好ましくは、pH6.0～7.0の範囲に調整することができる。

【００４６】

乾式分析素子は、例えば、一辺約5 mmから約30 mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-283331号公報、実開昭56-142454号公報、特開昭57-63452号公報、実開昭58-32350号公報、特表昭58-501144号公報等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることができる。この態様は、製造、包装、輸送、保存、及び測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いることもでき、あるいは小片を開口のある容器内に収めて用い、又は小片を開口カードに貼付または収めて用いることもでき、さらには裁断した小片をそのまま

用いることもできる。

【００４７】

乾式分析素子を用いる場合、例えば約2μL～約30μL、好ましくは4μL～15μLの範囲の水性液体試料液（例えば血液や尿などの体液試料など）を多孔性液体試料展開層に点着することができ、点着した乾式分析素子を約20℃～約45℃の範囲の一定温度で、好ましくは約30℃～約40℃の範囲内の一定温度で1～10分間インキュベーションすることができる。乾式分析素子内の発色又は変色を光透過性支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の被験物質の量を求めることができる。

【００４８】

測定操作は、例えば特開昭60-125543号公報、特開昭60-220862号公報、特開昭61-294367号公報、特開昭58-161867号公報などに記載の化学分析装置により極めて容易に行なうことができ、これにより高精度の定量分析を行なうことができる。目的や必要精度によっては目視により発色の度合いを判定して半定量的な測定を行ってもよい。

【００４９】

乾式分析素子は、分析を行なうまでは乾燥状態で貯蔵・保管することができ、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないいわゆる溶液法より簡便性及び迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行なうことができる検査方法としても優れている。

【００５０】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【００５１】

（実施例１）

（１）ポリアミン水溶液の調製

ポリ（アリルアミン）PAA-05(日東紡)またはジアリルアミン塩酸塩二酸化硫黄共重合体PAS-92(日東紡)を用い、0.1M MOPS Buffer（pH7.0）にて2%水溶液を調製した。

【００５２】

（２）リポタンパク溶液の調製

低密度リポタンパクLDL(Athens Research & Technology, Inc)、超低密度リポタンパクVLDL(Athens Research & Technology, Inc)、高密度リポタンパク（Athens Research & Technology, Inc）、ヒト血清アルブミンHSA（Sigma-Aldrich）、ヒト血清グロブリンHSG（Sigma-Aldrich）を用い、下記リポタンパク溶液を調製した。

150mg/dL LDL-Cと60mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

150mg/dL LDL-Cと100mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

【００５３】

（３） アガロース電気泳動による検出

（２）にて調製したリポタンパク溶液100μLに(1)にて調製した2%ポリアミン水溶液100μLを添加し、ピペッティングにて混和した（ポリアミン終濃度1%）。混和直後、3000rpmにて10分間遠心分離し、上清を採取した。

【００５４】

アガロースゲル電気泳動REPシステム（ヘレナ研究所）を用い、REP LIPO-30 プレート（ヘレナ研究所）にて上清1μLを電気泳動させた。コレトリコンボ ＣＨ／ＴＧにてコレステロール、中性脂肪を染色し、上清に残ったリポタンパクを検出した。

【００５５】

図１に検体としてLDL、VLDL混合溶液を用いた場合の結果、及びLDL、HDL混合溶液を用いた場合の結果を示す。図１の左図において、0.1M MOPS Bufferのみ(レーン1)と比較すると、PAA-05(レーン2)、PAS-92（レーン3）いずれにおいてもVLDLのバンドが消失していることが分かる。また図１の右図においてPAA-05(レーン2)ではHDLのバンドが消失、PAS-

92（レーン3）ではHDLのバンド濃度が1/3程度に低下していることが分かる。

【００５６】

以上より、本発明のポリアミン水溶液を用いることで、非LDLのうち特にVLDL、さらにはHDLの除去が可能となることが確かめられた。

【００５７】

（比較例１）

（１）ポリエチレンイミン水溶液の調製

ポリエチレンイミン1800(PEI)（和光純薬)を用い、0.1M MOPS Buffer（pH7.0）にて2%水溶液を調製した。

【００５８】

（２）リポタンパク溶液の調製

低密度リポタンパクLDL(Athens Research & Technology, Inc)、超低密度リポタンパクVLDL(Athens Research & Technology, Inc)、高密度リポタンパク（Athens Research & Technology, Inc）、ヒト血清アルブミンHSA（Sigma-Aldrich）、ヒト血清グロブリンHSG（Sigma-Aldrich）を用い、下記リポタンパク溶液を調製した。

60mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

150mg/dL LDL-Cと60mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

100mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

150mg/dL LDL-Cと100mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

【００５９】

（３）アガロース電気泳動による検出

（２）にて調製したリポタンパク溶液100μLに(1)にて調製した2%ポリエチレンイミン水溶液100μLを添加し、ピペッティングにて混和した（ポリエチレンイミン終濃度1%）。混和直後、3000rpmにて10分間遠心分離し、上清を採取した。

【００６０】

アガロースゲル電気泳動REPシステム（ヘレナ研究所）を用い、REP LIPO-30 プレート（ヘレナ研究所）にて上清1μLを電気泳動させた。コレトリコンボ ＣＨ／ＴＧにてコレステロール、中性脂肪を染色し、上清に残ったリポタンパクを検出した。

【００６１】

図２に検体としてVLDL溶液、LDLとVLDL混合溶液を用いた場合の結果、及びHDL溶液、LDLとHDL混合溶液を用いた場合の結果を示す。図２の左図において、0.1M MOPS Bufferのみと比較すると、PEIで処理したもののVLDLはバンドがシフトされているが、大量に残っている。また図２の右図においてもHDLのバンドが消滅せず、大量に残っている。以上より、ポリエチレンイミンではVLDLとHDLを除去することができないことが分かる。

【００６２】

（実施例２）

（１）リポタンパク溶液の調製

低密度リポタンパクLDL(Athens Research & Technology, Inc)、超低密度リポタンパクVLDL(Athens Research & Technology, Inc)、高密度リポタンパク（Athens Research & Technology, Inc）、ヒト血清アルブミンHSA（Sigma-Aldrich）、ヒト血清グロブリンHSG（Sigma-Aldrich）を用い、下記リポタンパク溶液を調製した。

【００６３】

50mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）

75mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）

150mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）

250mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）

75mg/dL LDL-Cと30mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

75mg/dL LDL-Cと60mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

150mg/dL LDL-Cと50mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

150mg/dL LDL-Cと100mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）

【００６４】
（２）LDL-C測定用乾式分析素子
ゼラチン下塗りされている180μmのポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに、4-アミノアンチピリン、TOOS（同仁研究所社製)、ペルオキシダーゼ（東洋紡社製）を含むゼラチン水溶液を乾燥後の厚さが14μmになるように塗布し、乾燥した。次に上記フィルム上に約30g/m^{2}の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエステル紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編み物布地を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させた。次に、上記の布地上に下記組成の水溶液を塗布乾燥した。
【００６５】

MOPS (pH 7.0)	1.67 g/m2
ポリグリセリルジスチルフェニルエーテル	2.98 g/m2
Pluronic L121	14.90 g/m2
コレステロールエステラーゼ、（リポプロテインリパーゼ、東洋紡）	3.21 kU/m2
コレステロールオキシダーゼ、（recombinant E.Coli, キッコマン）	4.52 kU/m2
PVP K90	15.00 g/m2
PAS-92	1.03 g/m2

【００６６】
（３）LDL-C測定の評価
（１）にて調製したリポタンパク溶液10μLを（２）で作成したスライドに点着した。37℃にて6分間反応させ、6分後の540nmのODを測定した。LDLのみの検体で検量線を作成し、その検量線で他のサンプル（LDL＋非LDL）のコレステロール濃度を算出した。図３に示した通り、HDLまたはVLDLのLDLとの混合検体では、非LDLの測りこみがあまりないことが確認された。
【００６７】
（比較例２）
（１）リポタンパク溶液の調製
低密度リポタンパクLDL(Athens Research & Technology, Inc)、超低密度リポタンパクVLDL(Athens Research & Technology, Inc)、高密度リポタンパク（Athens Research & Technology, Inc）、ヒト血清アルブミンHSA（Sigma-Aldrich）、ヒト血清グロブリンHSG（Sigma-Aldrich）を用い、下記リポタンパク溶液を調製した。
【００６８】
50mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）
75mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）
150mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）
250mg/dL LDL-C（5% HSA、2%HSGを含む）
75mg/dL LDL-Cと30mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）
75mg/dL LDL-Cと60mg/dL VLDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む
150mg/dL LDL-Cと50mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）
150mg/dL LDL-Cと100mg/dL HDL-C混合溶液（5% HSA、2%HSGを含む）
【００６９】
（２）LDL-C測定用乾式分析素子
ゼラチン下塗りされている180μmのポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに4-アミノアンチピリン、TOOS（同仁研究所社製)、ペルオキシダーゼ（東洋紡社製）を含むゼラチン水溶液を乾燥後の厚さが14μmになるように塗布し、乾燥した。次に上記フィルム上に約30g/m^{2}の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエステル紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編み物布地を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させた。次に、上記の布地上に下記組成の水溶液を塗布乾燥した。
【００７０】

MOPS (pH 7.0)	1.67 g/m2
ポリグリセリルジスチルフェニルエーテル	2.98 g/m2

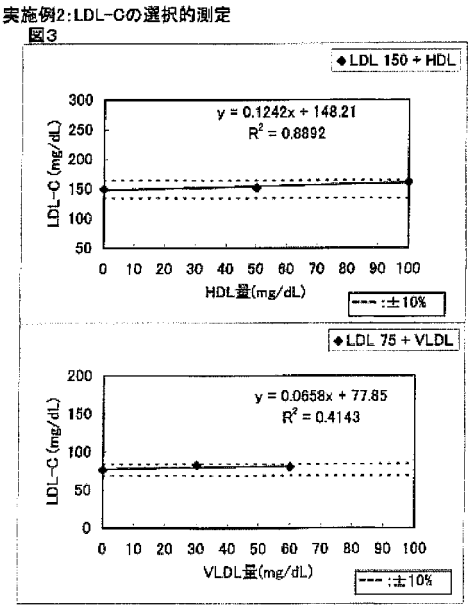
Pluronic L121 14.90 g/m2
コレステロールエステラーゼ、（リポプロテインリパーゼ、東洋紡） 3.21 kU/m2
コレステロールオキシダーゼ、（recombinant E.Coli, キッコマン） 4.52 kU/m2

【００７１】

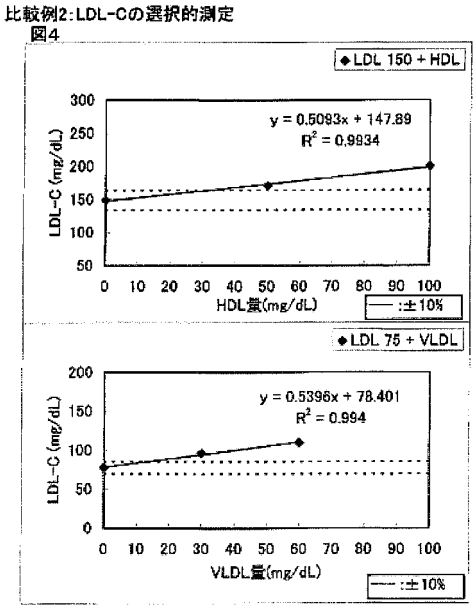
（３）LDL-C測定の評価

（１）にて調製したリポタンパク溶液10μLを（２）で作成したスライドに点着した。37℃にて6分間反応させ、6分後の540nmのODを測定した。LDLのみの検体で検量線を作成し、その検量線で他のサンプル（LDL＋非LDL）のコレステロール濃度を算出した。図４に示した通り、非LDL(HDLまたはVLDL)のLDLとの混合検体では、非LDLが大量に測りこまれている（LDL濃度が110％以上）ことが確認された。

【図３】

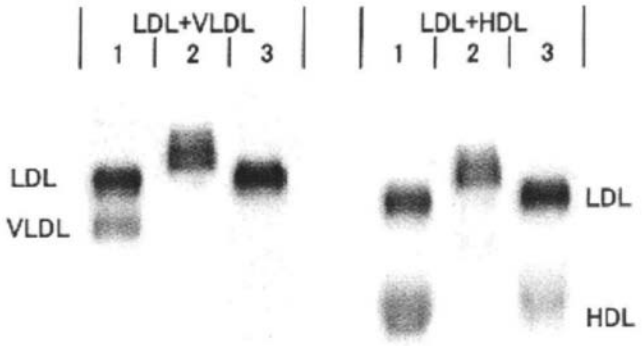


【図４】



【図１】

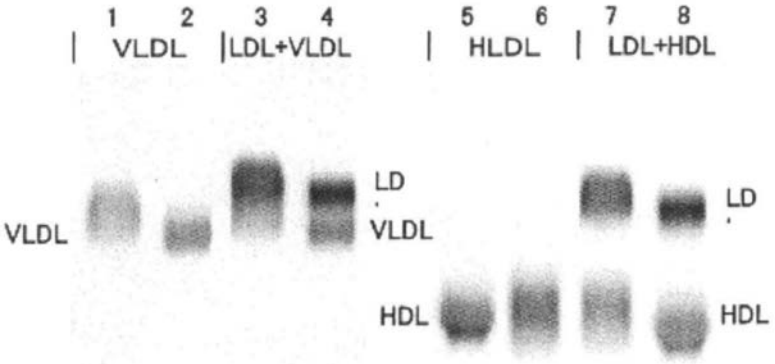
図1
実施例1:アガロース電気泳動(コレステロール染色の結果)



1: 0.1M MOPS Buffer(pH7.0)のみで処理
2: 1% PAA-05
3: 1% PAS-92

【図２】

図2
比較例1 アガロース電気泳動(コレステロール染色の結果)



1, 3, 5, 7: 1% PEI1800
2, 4, 6, 8: 0.1M MOPS Buffer

PEI: ポリエチレンイミン

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/52	***(2006.01)***	G01N	33/52	B
G01N 33/48	***(2006.01)***	G01N	33/48	B

(56)参考文献 特公平２－６２８２３（ＪＰ，Ｂ２）
特開平６－２１３８９９（ＪＰ，Ａ）
特開平１０－８４９９７（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－３０６１７（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－２７３２６４（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－０３５４２７（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－２０２３１４（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５１２５９８（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５１６６１３（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５２３３２５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５２９０３５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第００／１７３８８（WO，Ａ１）
国際公開第０１／３８８６２（WO，Ａ１）
国際公開第２００７／００７３９２（WO，Ａ１）
国際公開第２００７／０８８９７５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／０５５９１６（WO，Ａ１）
SUGIUCHI, H., et al., Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer, Clin. Chem., １９９８年, Vol.44, No.3, p.522-531
Lorenz Kerscher, Sigbert Schiefer, Brigitte Draeger, Josef Maier, and Joachim Ziegenhorn, Precipitation Methods for the Determination of LDL-Cholesterol, Clinical BioChemistry, １９８５年 ４月, Vol.18, No.2, P.118-125

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)

Ｇ０１Ｎ １／００－ １／４４
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
Ｃ１２Ｑ １／００－ １／７０