

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7680530号  
(P7680530)

(45)発行日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(24)登録日 令和7年5月12日(2025.5.12)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q	1/26		
C 1 2 Q 1/44 (2006.01)	C 1 2 Q	1/44		
G 0 1 N 33/92 (2006.01)	G 0 1 N	33/92	A	
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 1 2 N	9/06	Z	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z	
請求項の数 8 (全21頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2023-515477(P2023-515477)	(73)特許権者	000003296
(86)(22)出願日	令和4年4月19日(2022.4.19)		デンカ株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/018185		東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
(87)国際公開番号	WO2022/224960	(74)代理人	100110928
(87)国際公開日	令和4年10月27日(2022.10.27)		弁理士 速水 進治
審査請求日	令和5年9月22日(2023.9.22)	(72)発明者	伊藤 康樹
(31)優先権主張番号	特願2021-70615(P2021-70615)		東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
(32)優先日	令和3年4月19日(2021.4.19)		デンカ株式会社内
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(72)発明者	阿部 淳一
			東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
		(72)発明者	岡田 裕正
			東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
			デンカ株式会社内
		審査官	伊達 利奈
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試薬組成物およびキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1試薬組成物を試料に作用させる工程と、

第1試薬組成物を前記試料に作用させる前記工程の後、small dense LDL コレステロール(s d L D L - C)を定量するための第2試薬組成物を作用させることにより、残存するリポタンパク質中のコレステロールを定量する工程と、

を含む、前記試料中の前記s d L D L - Cを定量する方法の前記第1試薬組成物として用いられる試薬組成物であって、

コレステロールエステラーゼ活性、コレステロールオキシダーゼ活性およびスフィンゴミエリナーゼ活性を有し、

ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルを含む、試薬組成物。

【請求項2】

前記ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルにおけるポリオキシエチレンの重合度nが5以上80以下である、請求項1に記載の試薬組成物。

【請求項3】

当該試薬組成物中の前記ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルの含有量が当該試薬組成物全体に対して0.05%(w/v)以上0.6%(w/v)以下である、請求項1または2に記載の試薬組成物。

【請求項4】

当該試薬組成物が、ペルオキシダーゼ活性およびカタラーゼ活性からなる群から選択さ

れる少なくとも1つの活性をさらに有する、請求項1または2に記載の試薬組成物。

【請求項5】

当該試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含む、請求項1または2に記載の試薬組成物。

【請求項6】

請求項1または2に記載の試薬組成物からなる第1試薬組成物と、  
前記 s d L D L - C を定量するための第2試薬組成物と、  
を含む、前記試料中の前記 s d L D L - C の定量に用いられるキット。

【請求項7】

前記第2試薬組成物が、ペルオキシダーゼ活性を有する、請求項6に記載のキット。

10

【請求項8】

前記第1試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含み他方を含まず、

前記第2試薬組成物が、前記水素供与体および前記カップラーの前記一方を含まず前記他方を含む、請求項6に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試薬組成物およびキットに関する。

【背景技術】

20

【0002】

L D L コレステロールの測定方法に関する技術として、特許文献1（特開2000 - 325097号公報）に記載のものがある。同文献には、リポ蛋白質を含有する試料に、酵素と第1界面活性剤を加えることによりH D L コレステロールを選択的に酵素反応させる第1工程、次いで、第2界面活性剤を加えることにより、L D L コレステロールを選択的に酵素反応させる第2工程、及び第1または第2工程において、酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、H D L コレステロール及び/またはL D L コレステロールを測定することを含むリポ蛋白質コレステロールの測定方法について記載されている（請求項1）。そして、かかる方法によれば、反応液の濁度を上昇させるリポ蛋白質凝集剤を必要とせず、使用する酵素に制限がない上、L D L コレステロールを反応させる工程で新たに別の酵素を加える必要もなく、簡便でかつ安価にL D L コレステロールを定量することができ、また必要に応じてH D L コレステロールを光学的な測定を妨害するリポ蛋白質の凝集を形成することなく正確かつ安価に測定することができる測定方法及び測定試薬を提供することができるため、特に動脈硬化症等の臨床検査の分野に有用であるとされている（段落0055）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特開2000 - 325097号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、L D L コレステロールの中でも、small dense L D L コレステロール（s d L D L - C）を測定することを検討した。すると、特許文献1に記載の技術においては、測定の正確性の点で改善の余地があることが見出された。

【0005】

本発明は、正確性に優れるs d L D L - Cの測定技術を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明によれば、以下の試薬組成物およびキットが提供される。

50

[ 1 ] 第 1 試薬組成物を試料に作用させる工程と、

第 1 試薬組成物を前記試料に作用させる前記工程の後、small dense LDL コレステロール (sdLDL-C) を定量するための第 2 試薬組成物を作用させることにより、残存するリポタンパク質中のコレステロールを定量する工程と、

を含む、前記試料中の前記 sdLDL-C を定量する方法の前記第 1 試薬組成物として用いられる試薬組成物であって、

コレステロールエステラーゼ活性、コレステロールオキシダーゼ活性およびスフィンゴミエリナーゼ活性からなる群から選択される 1 または 2 以上の活性を有し、

ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルを含む、試薬組成物。

[ 2 ] 前記ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルにおけるポリオキシエチレンの重合度  $n$  が 5 以上 80 以下である、[ 1 ] に記載の試薬組成物。

10

[ 3 ] 当該試薬組成物中の前記ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルの含有量が当該試薬組成物全体に対して 0.05% (w/v) 以上 0.6% (w/v) 以下である、[ 1 ] または [ 2 ] に記載の試薬組成物。

[ 4 ] 当該試薬組成物が、ペルオキシダーゼ活性およびカタラーゼ活性からなる群から選択される少なくとも 1 つの活性をさらに有する、[ 1 ] 乃至 [ 3 ] いずれか 1 つに記載の試薬組成物。

[ 5 ] 当該試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含む、[ 1 ] 乃至 [ 4 ] いずれか 1 つに記載の試薬組成物。

[ 6 ] [ 1 ] 乃至 [ 5 ] いずれか 1 つに記載の試薬組成物からなる第 1 試薬組成物と、

20

前記 sdLDL-C を定量するための第 2 試薬組成物と、  
を含む、前記試料中の前記 sdLDL-C の定量に用いられるキット。

[ 7 ] 前記第 2 試薬組成物が、ペルオキシダーゼ活性を有する、[ 6 ] に記載のキット。

[ 8 ] 前記第 1 試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含み他方を含まず、

前記第 2 試薬組成物が、前記水素供与体および前記カップラーの前記一方を含まず前記他方を含む、[ 6 ] または [ 7 ] に記載のキット。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、正確性に優れる sdLDL-C の測定技術を提供することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図 1】 sdLDL-C の測定値の正確性の評価結果を示す図である。

【図 2】 sdLDL-C の測定値の正確性の評価結果を示す図である。

【図 3】 sdLDL-C の測定値の正確性の評価結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、実施の形態について説明する。本実施形態において、測定試薬等の組成物は、各成分を単独でまたは 2 種以上を組み合わせる含むことができる。また、本明細書において、数値範囲の「 $x \sim y$ 」は「 $x$  以上  $y$  以下」を表し、下限値  $x$  および上限値  $y$  をいずれも含む。

40

【0010】

はじめに、リポタンパク質について説明する。

リポタンパク質は、大きく Very Low Density Lipoprotein (VLDL)、Low Density Lipoprotein (LDL) および High Density Lipoprotein (HDL) の分画に分けられ、LDL はさらに small dense LDL (sdLDL) とそれ以外の亜分画に分けられる。sdLDL を小粒子 LDL、small LDL (SLDL)、dense LDL、small, dense LDL と呼ぶこともあり、またそれ以外の LDL を large LDL (LLDL)、Light LDL または large buoyant LDL (LbLDL) と呼ぶこともある。

【0011】

50

これらのリポタンパク質の分画および亜分画は、粒子サイズまたは密度により区別できる。

リポタンパク質の粒子サイズの直径については、報告者により異なるが、たとえば、VLDLが30nm～80nm（または30nm～75nm）であり、LDLが22nm～28nm（または19nm～30nm）であり、HDLが7～10nmである。

リポタンパク質の密度については、たとえば、VLDLが $1.006\text{ g/cm}^3$ 以下、LDLが $1.019\sim 1.063\text{ g/cm}^3$ 、HDLが $1.063\sim 1.21\text{ g/cm}^3$ である。

#### 【0012】

リポタンパク質のうち、LDL粒子直径は、たとえばグラジエントゲル電気泳動（GGE）（JAMA, 260, p.1917-21, 1988）、NMR（HANDBOOK OF LIPOPROTEIN TESTING 2nd Edition, Nader Rifai他編, p.609-623, AACC PRESS: The Fats of Life Summer 2002, LVDD 15 YEAR ANNIVERSARY ISSUE, Volume AVI No.3, p.15-16）により測定できる。また、密度は、たとえば超遠心分離による分析（Atherosclerosis, 106, p.241-253, 1994; Atherosclerosis, 83, p.59, 1990）に基づいて決定できる。

10

#### 【0013】

本実施形態において、測定しようとするsdLDLは、一般的にはLDL画分のうち直径が約22.0～約25.5nmの亜分画、または、密度 $1.040\sim 1.063\text{ g/cm}^3$ の亜分画を指す。

LDLを大きさにより亜分画に分けているのは、LDLのうち粒子径が小さいものが動脈硬化惹起性が高く、LDLの中でもより悪性度が高いので、LDLの中でも小さいものを分別測定する必要があったからである。LDL内で直径分布や密度分布は連続しており、密度がどの程度以上のものがとりわけ悪性度が高いというように明確に区別できるものではない。従って、上記の密度 $1.040\sim 1.063\text{ g/cm}^3$ という値もsdLDLの特性として確立したものではなく、広く用いられており確立した値といえるLDLの密度範囲 $1.019\sim 1.063\text{ g/cm}^3$ を中央点で分けた高密度側の値である。たとえば、sdLDLの密度について、別の報告では $1.044\sim 1.060\text{ g/cm}^3$ に分画される（Atherosclerosis:106 241-253 1994）。sdLDLの密度をどの範囲にするかは、報告者により若干の違いがあるが、いずれもその範囲で分別した場合のsdLDLの存在が臨床的な悪性度と関連している。

20

#### 【0014】

本明細書において、sdLDLという場合、具体的には、LDLのうち密度が大きいものであって、臨床的に動脈硬化惹起性がそれ以外のLDLよりも大きいものをいう。また、sdLDLは、好ましくはLDLの密度範囲のうち中央点より高い密度範囲に属するもの、より好ましくは密度 $1.044\sim 1.063\text{ g/cm}^3$ の範囲に属するLDLをいう。また、LDL以外のリポタンパク質という場合、VLDLまたはHDLを指し、さらにカイロミクロン、IDL（intermediate density lipoprotein）またはVHDL（very high density lipoprotein）を含めることもある。

30

#### 【0015】

本発明者は、試料中のsdLDL-Cを定量する際の正確性を向上すべく検討した。その結果、第1試薬組成物を試料に作用させる工程（第1工程）と、その後、sdLDLコレステロール（sdLDL-C）を定量するための第2試薬組成物を作用させることにより、残存するリポタンパク質中のコレステロールを定量する工程（第2工程）と、を含む方法によりsdLDL-Cを定量しようとする、第1工程において、第1試薬組成物のsdLDL以外のLDLへの作用の選択性を高度に制御することが重要であることが明らかになった。さらに具体的には、第1工程において、第1試薬組成物がsdLDL以外のLDLに選択的に作用することが重要であって、選択性が低すぎると、すなわち、第1試薬組成物が測定対象であるsdLDLにも作用しやすい試薬であると、第2工程での試料中のsdLDL-Cの定量の正確性が低下する懸念があることがわかった。

40

そこで、本発明者は、第1試薬組成物の作用の選択性をより好ましいものとするべくさら

50

に検討したところ、第1試薬組成物が特定の酵素活性を有するとともに、特定の界面活性剤を含む構成とすることにより、s d L D L以外のL D Lに高い選択性で作用する第1試薬組成物が安定的に得られることを見出した。

さらに、界面活性剤として、ポリオキシエチレンスチレン化フェニルエーテル誘導体またはポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテルを使用し得ることは知られている。しかし、本発明者らは鋭意研究する中で、ポリオキシエチレンスチレン化フェニル誘導体の中でもポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルを存在させることで、試料と第1試薬組成物が反応した際のL L D Lへの選択性が高まり、その結果s d L D L - Cを正確に測定できることを新たに見いだした。

以下、各試薬組成物についてさらに具体的に説明する。

10

#### 【0016】

(試薬組成物(第1試薬組成物))

本実施形態において、試薬組成物は、第1試薬組成物を試料に作用させる工程と、第1試薬組成物を試料に作用させる工程の後、s d L D L - Cを定量するための第2試薬組成物を作用させることにより、残存するリポタンパク質中のコレステロールを定量する工程と、を含む、試料中のs d L D L - Cを定量する方法の第1試薬組成物として用いられる試薬組成物である。第1試薬組成物の性状は、具体的には液体である。

以下、第1試薬組成物として用いられる試薬組成物を、単に「第1試薬組成物」とも呼ぶ。

第1試薬組成物は、コレステロールエステラーゼ活性、コレステロールオキシダーゼ活性およびスフィンゴミエリナーゼ活性からなる群から選択される1または2以上の活性を有し、ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルを含む。

20

#### 【0017】

本実施形態においては、第1試薬組成物が特定のノニオン界面活性剤を含むとともに、特定の酵素活性を有するため、試料に第1試薬組成物を添加したときに、試料中のs d L D L以外のL D Lに高い選択性で安定的に作用して消去することができる。また、s d L D L以外のL D L中のコレステロールを高い選択性で安定的に反応系外に導くことができる。

#### 【0018】

ここで、「界面活性剤が作用(反応)する」とは、界面活性剤がリポタンパク質を分解し、リポタンパク質中のコレステロールが遊離することをいう。たとえば、「s d L D L以外のリポタンパク質に作用(反応)する界面活性剤」という場合、界面活性剤がs d L D Lに全く作用しないことは要求されず、主にs d L D L以外のリポタンパク質に作用すればよい。「s d L D L以外のL D Lに作用(反応)する界面活性剤」という場合も同様に、界面活性剤が主にs d L D L以外のL D Lに作用すればよい。「消去」とは、被検体試料中の物質を分解し、その分解物が次の工程において検出されないようにすることを意味する。すなわち、「s d L D L以外のリポタンパク質中のコレステロールを消去する」とは、被検体試料中のs d L D L以外のリポタンパク質を分解し、その分解産物であるこれらリポタンパク質中のコレステロールがその後の工程で検出されないようにすることをいう。「s d L D L以外のL D L中のコレステロールを消去する」についても同様に、被検体試料中のs d L D L以外のL D L中のコレステロールがその後の工程で検出されないようにすることをいう。

30

40

#### 【0019】

「反応系外に導く」とは、具体的には、H D LやV L D L、L L D Lなどに含まれるコレステロールがs d L D L - Cの定量に影響を及ぼさないように、H D L、V L D L、L L D Lなどに含まれるコレステロールを消去、凝集させたり、後の工程で反応しないよう阻害したりすることをいう。

以下、第1試薬組成物に含まれる成分をさらに具体的に説明する。

#### 【0020】

(ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテル)

50

第1試薬組成物は、ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテル（POEモノスチレン化フェニルエーテル）を含む。

POEモノスチレン化フェニルエーテルは、POE部分の重合度の異なる複数の化合物で構成されてもよい。このとき、POEモノスチレン化フェニルエーテルにおけるポリオキシエチレンの重合度 $n$ は、sdLDL-Cの定量における正確性向上の観点から、好ましくは5以上であり、また、80以下である。また、オキシエチレンの平均重合度は、sdLDL-Cの定量における正確性向上の観点から、たとえば1超であり、好ましくは5以上、より好ましくは10以上であり、また、たとえば100以下であり、好ましくは80以下、より好ましくは50以下、さらに好ましくは40以下であり、また、たとえば30以下であってもよい。

10

ここで、平均重合度は、NMRにより測定されるPOEモノスチレン化フェニルエーテルのオキシエチレンシグナルの強度から求められる。たとえば、POEモノスチレン化フェニルエーテルのTMS誘導体のNMRスペクトルにおいて、0.08 ppmのTMS基のプロトン（9個）の強度を基準にして3.5 ppmのPOE部分のメチレンプロトン（4個）のシグナル強度の比により計算できる。

#### 【0021】

また、sdLDL-Cの定量における正確性をより安定的に向上する観点から、POEモノスチレン化フェニルエーテルにおけるオキシエチレンの平均重合度 $n$ が $n = 10 \sim 20$ である化合物からなる群から選択される1種以上を含むことが好ましい。

ここで、POEモノスチレン化フェニルエーテルを構成する成分のオキシエチレンの重合度は、液体クロマトグラフ質量分析による構造解析によって求められる。たとえば、液体クロマトグラフ（LC）により、第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルを分離したのちに、四重極飛行時間型質量分析計（QTOF mass spectrometer）に導入すると、成分ごとのオキシエチレンの重合度の違いにより44 amu間隔のピークからなるマススペクトルが得られる。それぞれのピークの $m/z$ から推定される分子量からモノスチレン化フェノールの質量数（MW198）を減算し、44で除することにより各成分のオキシエチレンの重合度を計算できる。さらに、ピークごとに精密質量より得られた組成式からモノスチレン化フェノールの化学組成（ $C_{14}H_{14}O$ ）を減算すること、あるいはプロダクトイオンスキャンを行い詳細な構造解析を行うことで各成分のオキシエチレンの重合度を解析できる。

20

30

#### 【0022】

第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルの含有量は、sdLDL-Cの定量における正確性向上の観点から、第1試薬組成物全体に対して好ましくは0.01%（w/v）以上であり、より好ましくは0.03%（w/v）以上、さらに好ましくは0.05%（w/v）以上、さらにより好ましくは0.1%（w/v）以上である。

また、同様の観点から、第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルの含有量は、第1試薬組成物全体に対して好ましくは0.6%（w/v）以下であり、より好ましくは0.4%（w/v）以下、さらに好ましくは0.35%（w/v）以下、さらにより好ましくは0.3%（w/v）以下である。

#### 【0023】

ここで、POEモノスチレン化フェニルエーテルは、工業用原料または研究用試薬として入手可能であり、たとえば市販品を用いることができる。

また、たとえばPOEモノスチレン化フェニルエーテルを製造し、これを用いてもよい。具体的には、下記の方法、条件により製造できる。

40

すなわち、POEモノスチレン化フェニルエーテルは、モノスチレン化フェノールに、塩基性触媒存在下で所定量のエチレンオキシドを付加することにより得られる。塩基性触媒としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アルカリ金属のアルコール等が挙げられる。付加反応温度は120～200が好ましい。

一方、スチレン化フェノールは、フェノールとスチレンを、酸触媒下で70～200の温度でアルキル化反応させることにより得られる。酸触媒としては、硫酸やリン酸な

50

どの無機酸、p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸などの有機酸、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体などのルイス酸等を使うことができる。この反応において、フェノールとスチレンの当量比、酸触媒の種類、反応温度などの条件を制御することにより、フェノールとベンゼン環にスチレンが1個結合されたモノスチレン化フェノールを得ることができる。

モノスチレン化フェノールは、たとえば、リン酸触媒下でフェノールにスチレンを滴下し加えてアルキル反応を行った後、未反応のフェノールとスチレンを除去するために、硫酸または硫酸マグネシウム触媒を添加してアルキル反応を完結させることによって合成することができる。このときリン酸触媒の使用量はフェノールに対して0.001~0.01当量が好ましい。硫酸または硫酸マグネシウム触媒の使用量は、リン酸触媒の質量を基準にして2質量%~10質量%が好ましい。またフェノールとスチレンの当量比は、フェノールに対するスチレンの当量比として0.9~1.3が好ましい。

続いてアルキル化反応が終了した後に、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの水溶液を添加してアルキル化反応の生成物を中和し、濾過により生成した中和塩を除去することによって、モノスチレン化フェノールを回収できる。

#### 【0024】

そして、オートクレーブ等耐圧容器中で、得られたモノスチレン化フェノールおよびエチレンオキシドを、水酸化カリウムを触媒とし、加熱加圧下で付加反応させることにより、POEモノスチレン化フェニルエーテルを得ることができる。加熱加圧条件は、たとえば圧力1.5kg/cm<sup>3</sup>程度、温度130程度とする。また、モノスチレン化フェノール1モルに対するエチレンオキシドのモル比を調整することにより、オキシエチレンユニットの繰り返し単位数すなわちオキシエチレンの重合度を調整することができる。

#### 【0025】

また、以上の方法において、スチレン化フェノールとしてモノスチレン化フェノール、スチレンが2個結合されたジスチレン化フェノールおよびスチレンが3個結合されたトリスチレン化フェノールの混合物を得、混合物からモノスチレン化フェノールを分離精製して用いることもできる。

#### 【0026】

第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルは、たとえば、IR、NMR、LC-MS等を組み合わせて解析する方法によって確認できる。第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルの構造を決定する方法としてはLC/MS/MS、NMRを用いて解析する方法が挙げられる。

また、第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルの濃度は、たとえばHPLCまたはLC/MS測定により算出することができる。また、NMR測定により第1試薬組成物中のPOEモノスチレン化フェニルエーテルの濃度を得ることもできる。

#### 【0027】

(酵素)

第1試薬組成物は、コレステロールエステラーゼ(CHE)活性、コレステロールオキシダーゼ(COO)活性およびスフィンゴミエリナーゼ活性からなる群から選択される1または2以上の活性を有する。

第1試薬組成物をsdLDL以外のリポタンパク質により安定的に作用させそのコレステロールを反応形外に導く観点から、第1試薬組成物は、好ましくは、ペルオキシダーゼ活性(POD)およびカタラーゼ活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性をさらに有する。

#### 【0028】

ここで、「コレステロールエステラーゼ活性を有する」とは、具体的には、基質であるコレステロールエステルを加水分解する能力を有する酵素(たとえばコレステロールエステラーゼ)が存在し、コレステロールエステラーゼが触媒する反応が起こり得ることをいう。コレステロールオキシダーゼ活性等の他の酵素活性についても同様である。

「スフィンゴミエリナーゼ活性を有する」とは基質であるスフィンゴミエリンを分解す

10

20

30

40

50

る能力を有する酵素が存在し、酵素が触媒する反応が起こりえるこという。スフィンゴミエリナーゼ活性を有する酵素としてはスフィンゴミエリナーゼC、スフィンゴミエリナーゼDの他、スフィンゴミエリンを分解する能力を有するホスホリパーゼC、ホスホリパーゼDも含まれる。

【0029】

また、第1試薬組成物は、具体的には、コレステロールエステラーゼ活性を有する酵素、コレステロールオキシダーゼ活性を有する酵素、および、スフィンゴミエリナーゼ活性を有する酵素からなる群から選択される少なくとも1つの酵素を含み、さらに具体的には、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およびスフィンゴミエリナーゼからなる群から選択される少なくとも1つを含む。

10

第1試薬組成物をsdLDL以外のリポタンパク質により安定的に作用させそのコレステロールを反応形外に導く観点から、第1試薬組成物は、好ましくは、ペルオキシダーゼ活性を有する酵素およびカタラーゼ活性を有する酵素からなる群から選択される少なくとも1つの酵素をさらに含み、さらに具体的には、ペルオキシダーゼおよびカタラーゼの少なくとも1つを含むことが好ましい。

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、スフィンゴミエリナーゼ、ペルオキシダーゼおよびカタラーゼとして、それぞれ、たとえば細菌や菌類由来のものや、植物由来のものを用いることができる。

【0030】

第1試薬組成物のコレステロールエステラーゼ活性は、sdLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールをより安定的に反応系外に導く観点から、好ましくは50U/L以上であり、より好ましくは100U/L以上であり、また、好ましくは3000U/L以下であり、より好ましくは2500U/L以下、さらに好ましくは2000U/L以下、さらにより好ましくは1000U/L以下であり、また、たとえば1800U/L以下、または、たとえば1500U/L以下であってもよい。

20

【0031】

第1試薬組成物のコレステロールオキシダーゼ活性は、sdLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールをより安定的に反応系外に導く観点から、好ましくは100U/L以上であり、より好ましくは150U/L以上であり、また、好ましくは800U/L以下であり、より好ましくは750U/L以下、さらにより好ましくは700U/L以下、よりいっそう好ましくは650U/L以下、さらにまた好ましくは600U/L以下である。

30

【0032】

第1試薬組成物のスフィンゴミエリナーゼ活性は、sdLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールをより安定的に反応系外に導く観点から、好ましくは100U/L以上であり、より好ましくは200U/L以上であり、また、好ましくは3000U/L以下であり、より好ましくは2800U/L以下である。

【0033】

第1試薬組成物のペルオキシダーゼ活性は、sdLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールをより安定的に反応系外に導く観点から、好ましくは200U/L以上であり、より好ましくは300U/L以上であり、また、好ましくは3000U/L以下であり、より好ましくは2500U/L以下であり、また、たとえば2000U/L以下であることも好ましい。また、第1試薬組成物のペルオキシダーゼ活性は、たとえば5000U/L以下、または、たとえば4000U/L以下であってもよい。

40

【0034】

第1試薬組成物のカタラーゼ活性は、試料に第1試薬組成物を適用した際に生じる過酸化水素を安定的に除去する観点、および、試料中のsdLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールをより安定的に反応系外に導く観点から、好ましくは100KU/L以上であり、より好ましくは200KU/L以上であり、また、好ましくは2000KU/L以下であり、より好ましくは1500KU/L以下である。

50

## 【0035】

第1試薬組成物のコレステロールオキシダーゼ活性、コレステロールエステラーゼ活性、スフィンゴミエリナーゼ活性、ペルオキシダーゼ活性およびカラターゼ活性は、それぞれ、たとえば、以下の方法にて測定できる。

## 【0036】

コレステロールオキシダーゼ活性の測定では、基質液として6mMコレステロール溶液（イソプロパノールに溶解）を用いる。測定対象を2~4U/mLとなるように希釈液（0.1Mリン酸緩衝液、Triton X100、pH7.0）を加え、希釈後の溶液3mLを37℃5分加温後に基質液0.05mLを加える。その後、混合液を37℃で反応させ波長240nm吸光度変化量を測定する。37℃にて反応後、2分から7分までの吸光度変化量を測定し、コレステロールオキシダーゼ活性を算出する。たとえば、吸光度変化量が3U/L以上あれば、測定対象はコレステロールオキシダーゼ活性が存在するといえ、さらに具体的には、コレステロールオキシダーゼが含まれているといえる。

10

## 【0037】

コレステロールエステラーゼ活性の測定では、基質（0.04%リノレン酸コレステロール、1%Triton X100、0.6%コール酸ナトリウム溶液）、300U/mLコレステロールオキシダーゼ溶液、酵素希釈液（20mMリン酸緩衝液、0.5mMEDTA・2Na、2mMMgCl<sub>2</sub>、0.2%牛血清アルブミン（BSA）、pH7.5）、反応液（0.06%4-アミノアンチピリン、0.4%フェノール、7.5KU/Lペルオキシダーゼ（POD））を用いる。反応液1.75mLと基質液1.0mLを混合後、37℃で5分加温し、0.1mLコレステロールオキシダーゼ溶液を加える。37℃、2分加温後に希釈液で希釈した測定対象0.1mLを加え、混合液を37℃で反応させ、波長500nmの吸光度変化量を測定する。37℃反応後、0分から3.5分までの吸光度変化量を測定し、コレステロールエステラーゼ活性を算出する。たとえば、吸光度変化量が8U/L以上あれば、測定対象はコレステロールエステラーゼ活性が存在するといえ、さらに具体的には、コレステロールエステラーゼが含まれているといえる。

20

## 【0038】

第1試薬組成物のスフィンゴミエリナーゼ活性は、たとえば以下の方法で測定される。すなわち、反応液（0.008%スフィンゴミエリン、0.05%Triton X100溶液、10U/mLアルカリ性フォスファターゼ、10U/mLコレステロールオキシダーゼ、2U/mLペルオキシダーゼ、0.02%4-アミノアンチピリン、0.02%TODB混合液）、反応停止液（1%ドデシル硫酸ナトリウム溶液）、希釈液（10mMトリス緩衝液、0.1%Triton X100、pH8.0）を用いる。反応液0.08mLと希釈液で希釈した測定対象0.003mLを混合し37℃で5分加温後に反応停止液0.16mLを加える。反応停止後に主波長546nm、副波長700nmの吸光度変化量を測定し、スフィンゴミエリナーゼ活性を算出する。たとえば、吸光度変化量が2U/L以上あれば、測定対象はスフィンゴミエリナーゼ活性が存在するといえ、さらに具体的には、スフィンゴミエリナーゼが含まれているといえる。

30

## 【0039】

第1試薬組成物のペルオキシダーゼ活性は、たとえば以下の方法で測定される。すなわち、反応液1（1.5mMHDAOS、0.05%Triton X100、50mMリン酸緩衝液、pH7.0）、および、反応液2（5mM4-アミノアンチピリン、0.05%Triton X100、1%過酸化水素、50mMリン酸緩衝液、pH7.0）、希釈液（50mMリン酸緩衝液、pH7.0）を用いる。0.3mLの反応液1と希釈液で希釈した測定対象0.08mLを混合し、37℃で5分加温する。その後0.1mLの反応液2を加え、37℃で反応させ、主波長600nm、副波長700nmの吸光度変化量を測定する。37℃反応後、2分から5分までの吸光度変化量を測定しペルオキシダーゼ活性を算出する。たとえば、吸光度変化量が10U/L以上あれば、測定対象はペルオキシダーゼ活性が存在するといえ、さらに具体的には、ペルオキシダーゼが含まれているといえる。

40

50

## 【 0 0 4 0 】

第1試薬組成物のカタラーゼ活性は、たとえば以下の方法で測定される。すなわち、カタラーゼ活性測定では基質（0.06%過酸化水素、50mMリン酸緩衝液、pH7.0）を用いる。基質溶液2.0mLを25℃で予備加温後、測定対象0.1mLと混合し、240nmにおける吸光度変化量を測定する。たとえば25℃反応後、0分から3分までの吸光度変化量を測定しカタラーゼ活性を算出する。たとえば、吸光度変化量が50U/L以上あれば、測定対象はカタラーゼ活性が存在するといえ、さらに具体的には、カタラーゼが含まれているといえる。

## 【 0 0 4 1 】

第1試薬組成物は、他の酵素活性をさらに有してもよく、具体的には、アスコルビン酸オキシダーゼ活性およびリポプロテインリパーゼ（LPL）活性からなる群から選択される1または2以上の酵素活性をさらに有してもよい。

10

また、第1試薬組成物は、たとえばアスコルビン酸オキシダーゼ活性を有する酵素およびリポプロテインリパーゼ活性を有する酵素からなる群から選択される1または2以上の酵素活性を有する酵素を含んでもよく、さらに具体的には、アスコルビン酸オキシダーゼおよびリポプロテインリパーゼからなる群から選択される1または2以上の酵素を含む。

## 【 0 0 4 2 】

第1試薬組成物は、検体中に共存するアスコルビン酸が測定の正確性に与える影響を回避するという観点から、好ましくはアスコルビン酸オキシダーゼ活性をさらに有し、好ましくはアスコルビン酸オキシダーゼ活性を有する酵素を含み、より好ましくはアスコルビン酸オキシダーゼを含む。

20

## 【 0 0 4 3 】

第1試薬組成物のアスコルビン酸オキシダーゼ活性は、検体中に共存するアスコルビン酸が測定の正確性に与える影響を回避するという観点から、好ましくは0.1U/mL以上であり、より好ましくは0.2U/mL以上であり、また、好ましくは15U/mL以下であり、より好ましくは10U/mL以下である。

## 【 0 0 4 4 】

第1試薬組成物のアスコルビン酸オキシダーゼ活性は、たとえば以下の方法で測定される。すなわち、アスコルビン酸オキシダーゼ活性測定では基質（10mMアスコルビン酸溶液 - 0.13mM EDTAを90mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5mM NaHPO<sub>4</sub>で20倍に希釈）を用いる。基質1mLを30℃で予備加温し、5分経過後に0.05%BSAを含む90mM NaHPO<sub>4</sub>溶液で希釈した測定対象0.1mLを加えて混和し、反応を開始する。5分経過後、反応停止液（0.2N HCl）3.0mLを加え反応を停止後、245nmにおける吸光度を測定しアスコルビン酸オキシダーゼ活性を算出する。たとえば活性量が10U/L以上あれば、測定対象はアスコルビン酸オキシダーゼ活性が存在するといえ、さらに具体的には、「アスコルビン酸オキシダーゼ」が含まれているといえる。

30

## 【 0 0 4 5 】

また、第1試薬組成物は、各種リポタンパク質に対する作用を好ましく調整する観点から、リポプロテインリパーゼ活性をさらに有し、好ましくはリポプロテインリパーゼ活性を有する酵素を含み、より好ましくはリポプロテインリパーゼを含む。

40

## 【 0 0 4 6 】

また、本実施形態において、第1試薬組成物および後述する第2試薬組成物中の酵素は以下の方法でも同定できる。すなわち、まず、標的酵素を含む試料をトリプシンで分解することにより得られた断片ペプチドをハイブリッド型質量分析計で検出する。質量分析計により得られたペプチドの質量、および質量分析計内でアルゴンガスと衝突させることにより得られたフラグメントイオンのスペクトル（MS/MSデータ）をデータベース検索（たとえば、Mascotサーチ）することによりタンパク質を同定することができる。試薬組成物中のアミノ酸配列由来の断片ペプチドの配列がデータベースに登録されているアミノ酸配列とユニークな配列として一致する場合、対象酵素を含んでいるとみなせる。

## 【 0 0 4 7 】

50

また、第1試薬組成物および後述する第2試薬組成物中の酵素はたとえば以下の定量でも同定できる。すなわち、標的酵素をトリプシンで分解することにより得られる断片ペプチドのうち標的酵素に特異的で、かつ質量分析において強いシグナルが得られるペプチドを定量対象ペプチドとして選択する。定量対象ペプチドについて、非標識のペプチドおよび内部標準としての安定同位体で標識したペプチドを化学合成によって作製する。標的酵素を含む試料をトリプシンによって完全に消化し、既知量の安定同位体標識ペプチドを添加して、HPLCに接続した三連四重極型質量分析計(LC-MS/MS)によりMRMモード(多重反応モニタリングモード)で測定する。定量対象ペプチドの非標識ペプチドと既知量の安定同位体標識ペプチドの混合液を同様に測定して内部標準の濃度比とピーク面積比の検量線を作成し、試料中の定量対象ペプチドの絶対量を計算することにより標的酵素を定量することができる。

10

## 【0048】

(その他の成分)

第1試薬組成物は、上述の成分以外の成分を含んでもよい。他の成分として、たとえば、緩衝液、塩、酵素作用を有しないタンパク質、防腐剤、水素供与体、カップラー、ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテル以外の界面活性剤が挙げられる。

## 【0049】

緩衝液の種類は、たとえば適宜選択することができる。緩衝液の具体例として、MOPS(3-モルホリノプロパンスルホン酸)緩衝液、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、PIPES(ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸))緩衝液、HEPES(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジエタンスルホン酸)緩衝液が挙げられる。

20

緩衝液の濃度は、組成物中の酵素活性を保持する観点、および、試薬の保存安定性向上の観点から、好ましくは1mM以上であり、より好ましくは5mM以上、さらに好ましくは10mM以上であり、また、好ましくは300mM以下であり、好ましくは200mM以下、さらに好ましくは150mM以下、さらにより好ましくは100mM以下である。

## 【0050】

塩は、具体的には、pH調整剤、または、イオン強度調整剤として配合される。塩の具体例として、水酸化ナトリウム、硫酸ナトリウム等のナトリウム塩；水酸化カリウム等のカリウム塩；塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム等のマグネシウム塩；硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等のアンモニウム塩等の塩基性物質が挙げられる。また、第1試薬組成物が1価の陽イオンおよび2価の陽イオンの少なくとも1つまたはそれらの塩を含むことにより、sDLLとLDLの分別がさらに容易となる。

30

第1試薬組成物中の塩濃度は、pH調整剤、または、イオン強度調整剤としてより安定的に作用させる観点から、第1試薬組成物の全組成に対して、好ましくは2mmol/L以上であり、より好ましくは5mmol/L以上であり、また、好ましくは50mmol/L以下であり、より好ましくは30mmol/L以下である。

## 【0051】

第1試薬組成物のpHは、組成物中の酵素活性を保持する観点、および、試薬の保存安定性向上の観点から、好ましくは6.0以上であり、より好ましくは6.5以上であり、また、好ましくは8.0以下であり、より好ましくは7.5以下である。

40

## 【0052】

酵素作用を有しないタンパク質の具体例として、ウシ血清アルブミン(BSA)等のアルブミンが挙げられる。

第1試薬組成物中のBSA等のアルブミン濃度は、第1試薬組成物中の酵素を安定化させる観点から、またsDLL以外のリポタンパク質中コレステロールを反応系外に導く第1工程を安定化させる観点から、第1試薬組成物の全組成に対して、好ましくは1g/L以上であり、より好ましくは2g/L以上であり、また、好ましくは20g/L以下であり、より好ましくは10g/L以下である。

## 【0053】

第1試薬組成物は、好ましくは水素供与体およびカップラー少なくとも一方を含み、よ

50

り好ましくは水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含む。このとき、水素供与体およびカップラーのいずれか一方は、第1工程でs d L D L以外のリポタンパク質中コレステロールを反応系外に導くために使用される。さらに具体的には、s d L D L以外のリポタンパク質中コレステロールにコレステロールエステラーゼやコレステロールオキシダーゼを作用させ、発生した過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下で無色キノンに転化させるために水素供与体およびカップラーのいずれか一方が用いられる。

また、第1試薬組成物の保存性を向上する観点では、第1試薬組成物は、好ましくは水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含み、より好ましくは水素供与体を含みカップラーを含まず、さらに好ましくは水素供与体およびペルオキシダーゼを含みカップラーを含まない。

10

一方、後述の第1工程における第1試薬組成物の反応性を簡便に確認する観点では、第1試薬組成物は、好ましくは水素供与体およびカップラーを含み、さらに好ましくは水素供与体、カップラーおよびペルオキシダーゼを含む。同様の観点から、第1試薬組成物がカップラーおよびペルオキシダーゼを含むことも好ましい。

#### 【0054】

水素供与体の具体例として、N - エチル - N - ( 2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル ) - 3 - メチルアニリン ( T O O S )、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 ( M A O S )、N - エチル - N - ( 3 - スルホプロピル ) - 3 - メチルアニリン ( T O P S )、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 ( H D A O S )、N - ( 3 - スルホプロピル ) アニリン ( H A L P S )、N - ( 3 - スルホプロピル ) - 3 - メトキシ - 5 - アニリン ( H M M P S )、N - エチル - N - ( 2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル ) - 4 - フルオロ - 3 , 5 - ジメトキシアニリン ( F D A O S )、N - エチル - N - ( 3 - メチルフェニル ) - N' - サクシニルエチレンジアミン ( E M S E ) 等のアニリン誘導体が挙げられる。

20

第1試薬組成物中の水素供与体の濃度は、s d L D L以外のリポタンパク質中コレステロールを反応系外に導く観点から、好ましくは1 mM以上であり、より好ましくは1 . 5 mM以上であり、また、好ましくは5 mM以下であり、より好ましくは3 mM以下である。

#### 【0055】

また、水素供与体が後述の第2試薬組成物に含まれる場合、好ましくはカップリング反応に用いるカップラーが第1試薬組成物に含まれる。カップラーとしては、たとえば、4 - アミノアンチピリン ( 4 A A )、アミノアンチピリン誘導体、パニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン等を用いることができるが、これらに限定されない。

30

第1試薬組成物中のカップラーの濃度は、第1試薬組成物添加後の反応液全組成に対して、s d L D Lに安定的に作用させる観点から、好ましくは0 . 2 mM以上であり、より好ましくは0 . 3 mM以上であり、また、好ましくは5 . 0 mM以下であり、より好ましくは3 . 3 mM以下である。

#### 【0056】

本実施形態において、第1試薬組成物は、コレステロールエステラーゼ活性、コレステロールオキシダーゼ活性およびスフィンゴミエリナーゼ活性からなる群から選択される1または2以上の活性を有し、ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルを含むため、s d L D L以外のL D Lに効果的に作用するとともにs d L D Lへの作用が抑制されて、s d L D L以外のL D Lに対する選択性に優れており、s d L D L - Cの定量に好適に用いることができる。このため、本実施形態における第1試薬組成物を用いることによりs d L D L - Cの測定の正確性を優れたものとすることができる。

40

本実施形態において、第1試薬組成物は、たとえば後述する第2試薬組成物と組み合わせてs d L D L - Cの定量に用いられる。

#### 【0057】

(キット)

本実施形態において、キットは、試料中のs d L D L - Cの定量に用いられるものであ

50

り、上述の第1試薬組成物と、s d L D L - Cを定量するための第2試薬組成物を含む。

また、キットは、具体的には2以上の工程を含むs d L D L - Cの定量方法に用いられる。このとき、第1および第2試薬組成物は、それぞれ異なる工程に用いられ、好ましくは第1および第2試薬組成物の順に用いられる。

以下、第2試薬組成物の構成をさらに具体的に説明する。

【0058】

(第2試薬組成物)

第2試薬組成物は、具体的には、s d L D L - Cを定量するための試薬組成物である。第2試薬組成物の成分は、第1試薬組成物の構成によって異なるが、s d L D L - Cを定量できる配合組成であればよく、公知の物質を用いることができる。

10

【0059】

第2試薬組成物に含まれる成分の具体例として、酵素、緩衝液、塩、界面活性剤、酵素作用を有しないタンパク質、防腐剤、ならびに、水素受供与体およびカップラーのいずれか一方が挙げられる。

また、キットの好ましい構成においては、第1試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含み他方を含まず、第2試薬組成物が、水素供与体およびカップラーの一方を含まず他方を含む。

【0060】

酵素として、たとえば、ペルオキシダーゼが挙げられる。また、第2試薬組成物は、たとえばペルオキシダーゼ活性を有する。第2試薬組成物のペルオキシダーゼ活性は、第2工程でs d L D L - Cを正確に測定する観点から、好ましくは500 U / L以上であり、より好ましくは1000 U / L以上であり、また、好ましくは10000 U / L以下である。ただし、第1試薬組成物中にペルオキシダーゼ活性が含まれる場合は、第2工程にもペルオキシダーゼ活性が持ち越されるため、第2試薬中の濃度を減量する、あるいは含まなくすることもできる。

20

【0061】

緩衝液および塩の種類は、たとえば第2試薬組成物に含まれる酵素の種類によって適宜選択することができる。緩衝液の具体例として、第1試薬組成物について前述したものが挙げられる。

【0062】

第2試薬組成物のpHは、組成物中の酵素活性を保持する観点、および、試薬の保存安定性向上の観点から、好ましくは6.0以上であり、より好ましくは6.5以上であり、また、好ましくは8.0以下であり、より好ましくは7.5以下である。

30

【0063】

界面活性剤として、たとえばs d L D Lに作用する界面活性剤が挙げられる。また、第2試薬組成物は、s d L D L - Cを安定的に定量する観点から、好ましくはs d L D Lに作用する界面活性剤を含む。

s d L D Lに作用する界面活性剤は、s d L D Lのみに作用する界面活性剤等のs d L D Lに選択的に作用する界面活性剤であってもよいし、s d L D L以外のリポタンパク質にも作用する界面活性剤またはすべてのリポタンパク質に作用する界面活性剤であってもよい。

40

【0064】

第2試薬組成物中の界面活性剤としては、たとえば、ポリオキシエチレン誘導体をあげることができ、また、市販の総コレステロール測定用試薬等に用いられている界面活性剤を使用することができる。かかる界面活性剤として、たとえば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル(たとえば、エマルゲン909(花王社製)、T r i t o n X - 100)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル(たとえばエマルゲン707、エマルゲン709(以上、花王社製))が挙げられる。

【0065】

50

第2試薬組成物中の界面活性剤の濃度は、第2試薬組成物添加後の混合溶液に対して、s d L D Lに安定的に作用させる観点から、好ましくは0.05% (w/v)以上であり、より好ましくは0.1% (w/v)以上、さらに好ましくは0.5% (w/v)以上である。

また、同様の観点から、第2試薬組成物中の界面活性剤の濃度は、好ましくは8.0% (w/v)以下であり、より好ましくは5.0% (w/v)以下である。

【0066】

第2試薬組成物がカップラーを含むとき、カップラーは、好ましくは4-アミノアンチピリン(4AA)、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルペンズチアゾリノンヒドラゾン、スルホン化メチルペンズチアゾリノンヒドラゾンからなる群から選択される1または2以上の化合物である。

10

第2試薬組成物中のカップラーの濃度は、第2試薬組成物添加後の反応液全組成に対して、s d L D Lに安定的に作用させる観点から、好ましくは0.5mM以上であり、より好ましくは1.0mM以上であり、また、好ましくは15mM以下であり、より好ましくは10mM以下である。

【0067】

一方、カップラーが第1試薬組成物に含まれる場合、水素供与体は好ましくは第2試薬組成物に含まれる。この場合の水素供与体の試薬中濃度は、第2試薬組成物添加後の反応液全組成に対して、s d L D Lに安定的に作用させる観点から、好ましくは3mM以上であり、より好ましくは4.5mM以上であり、また、好ましくは15mM以下であり、より好ましくは12mM以下である。

20

【0068】

酵素作用を有しないタンパク質の具体例としては、それぞれ、第1試薬組成物について前述したものが挙げられる。

【0069】

(方法)

本実施形態における方法は、前述の第1および第2試薬組成物を用いて試料中のs d L D L - Cを定量する方法である。本実施形態における定量方法は、以下の第1工程および第2工程を含む。

(第1工程) 前述の第1試薬組成物を試料に作用させる工程

30

(第2工程) 第1工程の後、前述の第2試薬組成物を作用させることにより、残存するリポタンパク質中のコレステロールを定量する工程

第1および第2試薬組成物の構成は前述のとおりである。かかる方法において、本実施形態における第1試薬組成物を用いることにより、第1工程において反応液中にs d L D L - Cを高い選択性で残存させることができるため、正確性に優れたs d L D L - Cの測定をおこなうことができる。このため、たとえば、s d L D L - Cを高い正確性で安定的に定量することも可能となる。

【0070】

また、s d L D L - Cの定量方法は、たとえば試料(被検体試料)に第1試薬組成物を添加し反応させ、次いで第2試薬組成物を添加し反応させ、吸光度を測定することによりおこなえばよい。

40

被検体試料は、たとえば血清、血漿等の血液由来試料であり、好ましくは血清である。

第1および第2工程は、通常、自動分析装置内でおこなわれる。

試料の量、各試薬組成物の量は、たとえば各試薬組成物中の試薬の濃度等を考慮して適宜決定できるが、自動分析装置に適用可能な範囲でおこなう。たとえば、被検体試料1~10 $\mu$ L、第1試薬50~300 $\mu$ L、第2試薬25~200 $\mu$ Lを用いればよい。

以下、各工程をさらに具体的に説明する。

【0071】

(第1工程)

第1工程では、試料に第1試薬組成物を作用させる。これにより、s d L D L以外のリ

50

ポタンパク質を消去し、s d L D L 以外のリポタンパク質中のコレステロールを遊離させて反応系外に導く。

さらに具体的には、第1工程では、好ましくはs d L D L 以外のリポタンパク質に作用する界面活性剤を、コレステロールエステラーゼの存在下で試料に作用させる。そして、リポタンパク質からの遊離により生じたコレステロールをたとえばコレステロールオキシダーゼ等のコレステロールと反応する酵素と反応させて反応系外へ導く。第1工程においては、たとえば、s d L D L 以外のリポタンパク質中のコレステロールを消去し反応系外に導く、s d L D L 以外のリポタンパク質のコレステロールを凝集させたり、後の工程で反応しないよう阻害したりする等の公知の技術を用いることができる。

#### 【0072】

第1試薬組成物が電子供与体を有するとき、第1工程において、s d L D L 以外のリポタンパク質から生じたコレステロールを消去し反応系外に導く工程は、たとえば、第1試薬組成物におけるコレステロールエステラーゼ活性およびコレステロールオキシダーゼ活性により生じた過酸化水素、ならびに、電子供与体の存在下で無色キノンを形成させることを含んでもよい。

#### 【0073】

また、第1工程においては、イオン強度調整剤として1価の陽イオンおよび2価の陽イオンの少なくとも1つまたはそれらの塩をさらに反応液に添加して用いることができる。イオン強度調整剤を添加することにより、s d L D L とL L D L を差別化しやすくなる。

#### 【0074】

##### (第2工程)

第2工程では、第1工程を経て残存したs d L D L - Cを定量する。第2工程には、従来から用いられているL D L の定量方法を用いることができる。たとえば、L D L 凝集剤を添加して形成されたL D L 特異的凝集物の含有量を比濁測定によって定量する方法、L D L 特異的な抗体による抗原抗体反応を用いる方法、酵素を用い分解生成物を定量する方法等がある。定量方法は、たとえば第2試薬組成物に含まれる成分や組成に応じて選択される。

#### 【0075】

第2試薬組成物が酵素を含むとき、酵素を用い分解生成物を定量する方法とすることができる。具体的には、第1工程後の反応液に、たとえば、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、コレステロールデヒドロゲナーゼおよびペルオキシダーゼからなる群から選択される1または2以上のコレステロール測定用酵素を含む第2試薬組成物を加えてs d L D L - Cを遊離、分解し、その反応生成物を定量する。

このとき、第2試薬組成物は好ましくは前述の界面活性剤を含む。

#### 【0076】

本実施形態において、各工程における、反応温度は25 ~ 45 °C でおこなうことが好ましく、25 ~ 40 °C でおこなうことがより好ましい。

反応時間は各工程とも1 ~ 10分間でおこなうことが好ましく、3 ~ 7分でおこなうことがさらに好ましい。

#### 【0077】

s d L D L - Cの定量に用いる自動分析装置として、たとえば、T B A - 1 2 0 F R、T B A - 2 0 0 F R (以上、東芝社製)、J C A - B M 1 2 5 0、J C A - B M 1 6 5 0、J C A - B M 2 2 5 0 (以上、日本電子社製)、H I T A C H I 7 1 8 0、H I T A C H I 7 1 7 0 (以上、日立社製)、A U 2 7 0 0、A U 5 8 0 0、A U 6 8 0 (以上、O L Y M P U S社製)、c o b a s c 5 0 1、c o b a s c 7 0 1 (以上、R o c h e社製)等が挙げられる。

#### 【0078】

s d L D L - Cの定量は、たとえば580 ~ 720 nmの波長域、好ましくは600 ~ 700 nmの波長域の吸光度測定によりおこなう。

#### 【0079】

10

20

30

40

50

以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

以下、参考形態の例を付記する。

1. 第1試薬組成物を試料に作用させる工程と、

第1試薬組成物を前記試料に作用させる前記工程の後、small dense LDL コレステロール(s d L D L - C)を定量するための第2試薬組成物を作用させることにより、残存するリポタンパク質中のコレステロールを定量する工程と、

を含む、前記試料中の前記s d L D L - Cを定量する方法の前記第1試薬組成物として用いられる試薬組成物であって、

コレステロールエステラーゼ活性、コレステロールオキシダーゼ活性およびスフィンゴミエリナーゼ活性からなる群から選択される1または2以上の活性を有し、ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルを含む、試薬組成物。

10

2. 前記ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルにおけるポリオキシエチレンの重合度nが5以上80以下である、1.に記載の試薬組成物。

3. 当該試薬組成物中の前記ポリオキシエチレンモノスチレン化フェニルエーテルの含有量が当該試薬組成物全体に対して0.05%(w/v)以上0.6%(w/v)以下である、1.または2.に記載の試薬組成物。

4. 当該試薬組成物が、ペルオキシダーゼ活性およびカタラーゼ活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性をさらに有する、1.乃至3.いずれか1つに記載の試薬組成物。

20

5. 当該試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含む、1.乃至4.いずれか1つに記載の試薬組成物。

6. 1.乃至5.いずれか1つに記載の試薬組成物からなる第1試薬組成物と、

前記s d L D L - Cを定量するための第2試薬組成物と、

を含む、前記試料中の前記s d L D L - Cの定量に用いられるキット。

7. 前記第2試薬組成物が、ペルオキシダーゼ活性を有する、6.に記載のキット。

8. 前記第1試薬組成物が、水素供与体およびカップラーのいずれか一方を含み他方を含まず、

前記第2試薬組成物が、前記水素供与体および前記カップラーの前記一方を含まず前記他方を含む、6.または7.に記載のキット。

30

【実施例】

【0080】

以下において、P O Eモノスチレン化フェニルエーテル濃度の「%」は、具体的には「%(w/v)」である。

【0081】

(実験例1)

(実施例1~3および比較例1)

各例の界面活性剤のs d L D L - C試薬における反応性を評価するために、下記の試薬を調製し、測定をおこなった。

【0082】

(試薬組成物の調製)

以下に示す各成分を以下の濃度で配合し、界面活性剤の種類を変えて、各例の第1試薬組成物を調製した。第1試薬組成物の配合組成を以下に示す。

(第1試薬組成物)

PI P E S緩衝液、p H 7 . 0	5 0 m M
コレステロールエステラーゼ	9 0 0 U / L
コレステロールオキシダーゼ	4 5 0 U / L
スフィンゴミエリナーゼ	5 2 5 U / L
ペルオキシダーゼ	1 2 5 0 U / L
牛血清アルブミン	0 . 7 5 % ( w / v )

40

50

T O O S 1 . 5 m M  
4 A A 1 m M

界面活性剤 \* 1

【 0 0 8 3 】

\* 1 界面活性剤

実施例 1 : P O E モノスチレン化フェニルエーテル、 P O E の重合度 1 1 ~ 3 3

実施例 2 : P O E モノスチレン化フェニルエーテル、 P O E の重合度 1 3 ~ 3 7

実施例 3 : P O E モノスチレン化フェニルエーテル、 P O E の重合度 5 0 ~ 8 0

比較例 1 : P O E ジスチレン化フェニルエーテル、 P O E の重合度 2 ~ 3 2 と P O E トリスチレン化フェニルエーテル、 P O E の重合度 5 ~ 3 0 との混合物

【 0 0 8 4 】

( リポタンパク質選択性の評価 )

第 1 試薬組成物での反応におけるリポタンパク質選択性を評価するため、 s d L D L および l b L D L と上記試薬組成物との反応性をそれぞれ測定した。

具体的には、検体として、超遠心により人血清より分離した s d L D L および l b L D L を用いた。界面活性剤の検体に対する反応性を確認するため、発色反応に關与する成分である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、ならびに、ペルオキシダーゼ、水素供与体、カップラーを含む上記第 1 試薬組成物を調製した。検体 3 μ L と、上記第 1 試薬組成物 1 5 0 μ L を混合し、 3 7 ° C、 5 分後の 6 0 0 n m ( 主波長 ) および 7 0 0 n m ( 副波長 ) の吸光度の差分 ( 表 1 および後述の表 2 中、「吸光度 波長 6 0 0 n m / 7 0 0 n m 」と記載。 ) [ m A b s ] を測定し、 s d L D L の吸光度に対する l b L D L の吸光度の比を求めた。測定結果を表 1 に示す。

【 0 0 8 5 】

【表 1】

表1

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1
POEモノスチレン化フェニルエーテル (%)	0.17	0.17	0.34	0
l b L D L 吸光度 (波長600/700nm) [mAbs]	256.3	235.2	177.7	157.2
s d L D L 吸光度 (波長600/700nm) [mAbs]	176.1	168.3	99.1	149.8
l b / s d 吸光度比	1.46	1.4	1.79	1.05

【 0 0 8 6 】

表 1 より、 P O E モノスチレン化フェニルエーテルを含む各実施例においては、 P O E ジスチレン化フェニルエーテルや P O E トリスチレン化フェニルエーテルを含み P O E モノスチレン化フェニルエーテルを含まない比較例に比べて、 l b L D L / s d L D L の吸光度比が大きく、第 1 試薬組成物の l b L D L への選択性に優れていることが示されている。

このため、界面活性剤として P O E モノスチレン化フェニルエーテルを含む各実施例の第 1 試薬組成物を用いることにより、試料中の s d L D L をより高い正確性で定量することができる。

【 0 0 8 7 】

( 実験例 2 )

実施例 1 の P O E モノスチレン化フェニルエーテル濃度を変動させた他は、実験例 1 と同様に l b L D L / s d L D L の吸光度比を求めた。 l b L D L / s d L D L 比が 1 . 2 以上となる濃度を許容濃度とした。

測定結果を表 2 に示す。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表2

POEモノスチレン化フェニルエーテル (%)	0.04	0.08	0.17	0.34	0.5	0.63
lbLDL 吸光度 (波長600/700nm) [mAbs]	347.9	318.3	256.3	188	135.2	122.3
sdLDL 吸光度 (波長600/700nm) [mAbs]	278.5	235.2	176.1	125.5	93	83
lb/sd 吸光度比	1.25	1.35	1.46	1.5	1.45	1.47

## 【0089】

表 2 より、各濃度において、第 1 試薬組成物の lbLDL への選択性に優れていた。

10

## 【0090】

( 実験例 3 )

界面活性剤として実施例 1 で用いた POEモノスチレン化フェニルエーテルを用い、その濃度を変動させた第 1 試薬組成物を調製した。これを第 2 試薬組成物と併せて濃度既知検体の sdLDL - C の測定をおこなった際の正確性を、比較対照法により評価した。具体的には、実施例 1 で用いた界面活性剤の濃度が異なる以下の第 1 試薬組成物、および、以下の第 2 試薬組成物を調製した。血清試料 2  $\mu$ L に第 1 試薬組成物 75  $\mu$ L を加え、37 で 5 分間反応させた後に、第 2 試薬組成物 75  $\mu$ L を加え 5 分間反応させ主波長 600 nm、副波長 700 nm での吸光度を測定し、別途作成した検量線から sdLDL - C 濃度を算出した。第 1 試薬組成物および第 2 試薬組成物の配合組成を以下に示す。

20

( 第 1 試薬組成物 )

PIPES 緩衝液、pH 7.0	50 mM
コレステロールエステラーゼ	300 U / L
コレステロールオキシダーゼ	600 U / L
スフィンゴミエリナーゼ	2700 U / L
カタラーゼ	1200 KU / L
アスコルビン酸オキシダーゼ	3000 U / L
牛血清アルブミン	10 g / L
TOOS	2.0 mM

界面活性剤 \* 1

0.05%、0.07%、0.09%、0.11%、0.13%、  
0.16%、0.18%、0.20% または 0.30%

30

## 【0091】

( 第 2 試薬組成物 )

PIPES 緩衝液、pH 7.0	50 mM
4 - アミノアンチピリン	4.0 mM
ペルオキシダーゼ	5000 U / L
アジ化ナトリウム	0.05% ( w / v )
ポリオキシエチレンアルキルエーテル	1% ( w / v )

## 【0092】

比較対照法として、超遠心法、具体的には、超遠心分離により sdLDL を分画しコレステロールを測定する方法により以下の条件で得られた sdLDL - C 値を用い、前述の検量線から算出した sdLDL - C 濃度との相関係数を算出した。

超遠心法では、sdLDL に相当する密度 1.044 ~ 1.063 g / cm<sup>3</sup> の分画を *Clinical Chemistry*, 57, p.57-65, 2011 に記載の方法で分離し、sdLDL - C の濃度を測定した。

評価結果を図 1 ( a ) ~ 図 1 ( c )、図 2 ( d ) ~ 図 2 ( f ) および図 3 ( g ) ~ 図 3 ( i ) に示す。これらは、sdLDL - C の濃度の測定値の正確性の評価結果を示す図であり、横軸は超遠心法 ( Ultracentrifugation : UCF ) で求めた測定値であり、縦軸は前述の検量線から算出した測定値である。

40

50

また、図1(a)～図1(c)、図2(d)～図2(f)および図3(g)～図3(i)におけるPOEモノスチレン化フェニルエーテル濃度と相関係数を以下に示す。

	濃度	相関係数 r
図1(a)	0.05%	0.9085
図1(b)	0.07%	0.9152
図1(c)	0.09%	0.9198
図2(d)	0.11%	0.9263
図2(e)	0.13%	0.9304
図2(f)	0.16%	0.9295
図3(g)	0.18%	0.9296
図3(h)	0.20%	0.9252
図3(i)	0.30%	0.9240

10

【0093】

図1(c)、図2(d)～図2(f)および図3(g)～図3(i)および上記相関係数より、図1(c)、図2(d)～図2(f)および図3(g)～図3(i)におけるPOEモノスチレン化フェニルエーテル濃度0.05～0.30%では、いずれも $r > 0.90$ となり正確にsdLDL-Cを定量することができる。

中でも、POEモノスチレン化フェニルエーテル濃度0.11～0.30%では $r > 0.92$ となり、より正確にsdLDL-Cを定量することができる。

【0094】

20

この出願は、2021年4月19日に出願された日本出願特願2021-070615号を基礎とする優先権を主張し、その開示のすべてをここに取り込む。

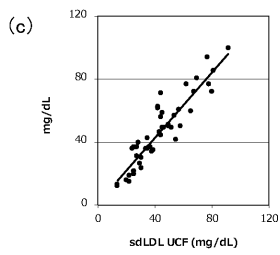
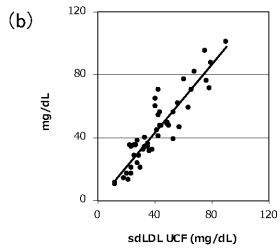
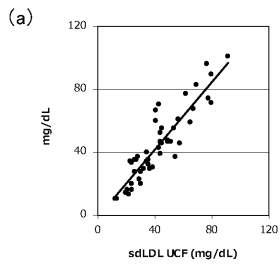
30

40

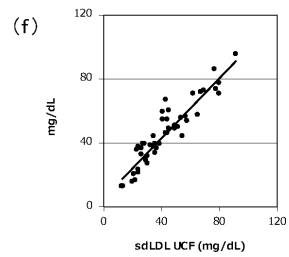
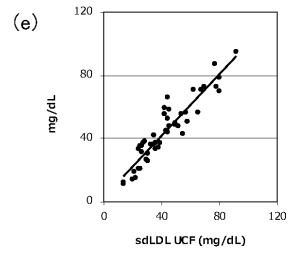
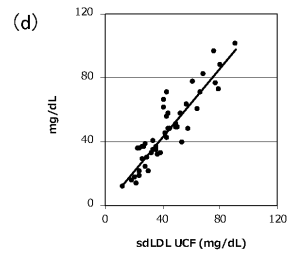
50

【 図面 】

【 図 1 】



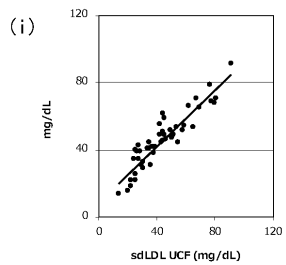
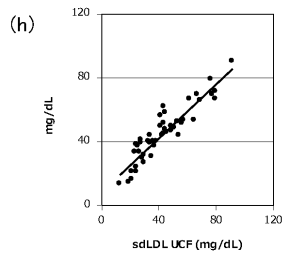
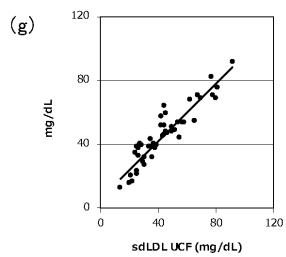
【 図 2 】



10

20

【 図 3 】



30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q	1/28 (2006.01)	C 1 2 Q	1/28
C 1 2 Q	1/30 (2006.01)	C 1 2 Q	1/30

(56)参考文献 特開 2 0 2 1 - 0 4 0 5 2 0 ( J P , A )

特開 2 0 0 7 - 3 2 5 5 8 7 ( J P , A )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

P u b M e d