

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/136918

発行日 平成29年11月30日(2017.11.30)

(43) 国際公開日 平成28年9月1日(2016.9.1)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 8 1 J | 4 B 0 6 3 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 D | |
| GO 1 N 33/545 (2006.01) | GO 1 N 33/545 B | |
| C 1 2 Q 1/04 (2006.01) | C 1 2 Q 1/04 Z N A | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) | | |

| | |
|---|---|
| 出願番号 特願2017-502493 (P2017-502493) | (71) 出願人 390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2016/055729 | |
| (22) 国際出願日 平成28年2月25日(2016.2.25) | |
| (31) 優先権主張番号 特願2015-35926 (P2015-35926) | (74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所 |
| (32) 優先日 平成27年2月25日(2015.2.25) | |
| (33) 優先権主張国 日本国(JP) | (72) 発明者 小林 幸司 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 メディカル株式会社内 |
| | (72) 発明者 松本 拓二 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 メディカル株式会社内 |
| | (72) 発明者 山本 光章 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 メディカル株式会社内 |
| | Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ79 QS33 QX02 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法及び該方法に用いられる測定試薬

(57) 【要約】

【課題】生体試料中の測定対象物質の免疫学的測定法における、ヘモグロビンの影響を回避する方法を提供すること。

【解決手段】測定対象成分の存在が疑われる試料と該測定対象成分に結合する抗体とを配列番号1に記載される大腸菌由来の熱ショックタンパク質(HSP)であるDnaKのアミノ酸配列の419番目から607番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は当該ポリペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドの存在下に反応させることにより、上記課題を解決する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘモグロビンを含有する試料中に存在することが疑われる、試料中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する抗体とを、配列番号 1 に記載される大腸菌由来の熱ショックタンパク質 (HSP) である DnaK のアミノ酸配列の 419 番目から 607 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は当該ポリペプチドと少なくとも 90% の配列同一性を有するポリペプチドの存在下に反応させることを特徴とする、ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分の免疫測定法。

【請求項 2】

ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、更に、HEPES、Bis-Tris、TES および Tris から選択される 1 以上の緩衝成分の存在下に反応させる請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

抗体が、不溶性担体に固定化されていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

不溶性担体が、ラテックス粒子、金属コロイド粒子である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

粒子凝集測定法を利用する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

抗体が、互いに認識部位が異なる二種以上のモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

互いに認識部位が異なる二種以上のモノクローナル抗体が、ラテックス粒子にそれぞれ固定化されており、ラテックス免疫比濁法により試料中の測定対象成分を検出する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

試料が、尿、全血、血清又は血漿である請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

測定対象成分が、L-FABP (肝臓型脂肪酸結合蛋白質) である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 10】

ヘモグロビンを含有する試料中の測定対象成分を該測定対象成分に結合する抗体により検出する方法におけるヘモグロビンの影響回避方法であって、

測定対象成分の存在が疑われる試料と該測定対象成分に結合する抗体とを

配列番号 1 に記載される大腸菌由来の熱ショックタンパク質 (HSP) である DnaK のアミノ酸配列の 419 番目から 607 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は当該ポリペプチドと少なくとも 90% の配列同一性を有するポリペプチドの存在下に反応させることを特徴とする

前記ヘモグロビンの影響回避方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫学的測定におけるヘモグロビンの影響回避方法及びそのための試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

50

近年、生体試料中の微量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、RIA法、EIA法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、金属コロイド凝集法、イムノクロマト法等多くの方法がある。全血を試料とする場合、溶血により試料に混入するヘモグロビン等の血球成分や血球の膜成分が、光学的な検出系に影響したり、免疫反応を阻害したり、測定対象物質を吸着したりすることにより、測定に影響がでるとい問題がある。例えば、ヘモグロビンは、酸化還元酵素、色素発色系を用いた免疫学的測定において、測定試薬中の成分等によって酸化されることにより、ヘモグロビン自体の吸収波長の変化が起こり、生体試料中の測定対象物質の測定値に誤差を与えてしまうことが広く知られている。各種界面活性剤等を用いたヘモグロビンの影響の回避方法は、多くの場合、酸化還元酵素、色素発色系を用いた免疫学的測定に適用するものである。

10

【0003】

一方、ラテックス免疫比濁法は、測定波長が長波長であり、ヘモグロビンの吸収波長と重ならないことから、ヘモグロビンの吸収波長の変化の影響を受けないと考えられる。しかし、実際はヘモグロビンを含む試料の測定において、測定値が真値と異なる場合があることが知られている。

【0004】

特許文献1には、正味の正電荷性のために陰電荷ラテックス粒子に非特異的に吸引される、天然の未変性ヘモグロビン(ヘモグロビンAo)の存在によるものであると考えられている非特異的凝集を排除する方法が記載されている。反応混合物のpHを約8.5以上に保持することによって、ヘモグロビンAoの正味の電荷を中性化して、ラテックス粒子に対する静電的吸引力による凝集を抑制することで、全血試料に関して行なわれるラテックス凝集イムノアッセイにおける非特異的凝集を排除する。

20

【0005】

また、特許文献2には、血漿等の生体由来試料中の測定対象物質の免疫学的測定法において、ヘモグロビンの影響を回避する目的で、カリックスアレーン類等の大環状化合物の存在下に反応を行うことが記載されている。特に、実施例においては、カリックスアレーン類の存在下でラテックス凝集法を行うことにより、ヘモグロビンの影響を回避できることが記されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平1-150857号公報

【特許文献2】国際公開W02010/001619号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、生体試料中の測定対象物質の免疫学的測定法における、ヘモグロビンの影響を回避する方法を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

[1]

ヘモグロビンを含む試料中に存在することが疑われる、試料中の測定対象成分と、該測定対象成分に結合する抗体とを、配列番号1に記載される大腸菌由来の熱ショックタンパク質(HSP)であるDnaKのアミノ酸配列の419番目から607番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は当該ポリペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドの存在下に反応させることを特徴とする、ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分の免疫測定法。

[2]

ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、

50

更に、H E P E S、B i s - T r i s、T E SおよびT r i sから選択される1以上の緩衝成分の存在下に反応させる[1]に記載の方法。

[3]

抗体が、不溶性担体に固定化されていることを特徴とする[1]または[2]に記載の方法。

[4]

不溶性担体が、ラテックス粒子、金属コロイド粒子である[3]に記載の方法。

[5]

粒子凝集測定法を利用する、[4]に記載の方法。

[6]

抗体が、互いに認識部位が異なる二種以上のモノクローナル抗体である、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7]

互いに認識部位が異なる二種以上のモノクローナル抗体が、ラテックス粒子にそれぞれ固定化されており、ラテックス免疫比濁法により試料中の測定対象成分を検出する、[6]に記載の方法。

[8]

試料が、尿、全血、血清又は血漿である[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9]

測定対象成分が、L - F A B P (肝臓型脂肪酸結合蛋白質)である[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[10]

ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分を該測定対象成分に結合する抗体により検出する方法におけるヘモグロビンの影響回避方法であって、

測定対象成分の存在が疑われる試料と該測定対象成分に結合する抗体とを

配列番号1に記載される大腸菌由来の熱ショックタンパク質(H S P)であるD n a Kのアミノ酸配列の419番目から607番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は当該ポリペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドの存在下に反応させることを特徴とする

前記ヘモグロビンの影響回避方法。

[11]

ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分と該測定対象成分に結合する抗体とを、更に、H E P E S、B i s - T r i s、T E SおよびT r i sから選択される1以上の緩衝成分の存在下に反応させる[10]に記載の方法。

[12]

抗体が、不溶性担体に固定化されていることを特徴とする[10]または[11]に記載の方法。

[13]

不溶性担体が、ラテックス粒子、金属コロイド粒子である[12]に記載の方法。

[14]

粒子凝集測定法を利用する、[13]に記載の方法。

[15]

抗体が、互いに認識部位が異なる二種以上のモノクローナル抗体である、[10]～[14]に記載の方法。

[16]

互いに認識部位が異なる二種以上のモノクローナル抗体が、ラテックス粒子にそれぞれ固定化されており、ラテックス免疫比濁法により試料中の測定対象成分を検出する、[15]に記載の方法。

[17]

試料が、尿、全血、血清又は血漿である[10]～[16]のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

[1 8]

測定対象成分が、L - F A B P (肝臓型脂肪酸結合蛋白質) である [1 0] ~ [1 7] のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、生体試料中のヘモグロビンの影響が回避できるので、該試料がヘモグロビンを含む場合であっても正確な測定が可能となる。本発明により、ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分の正確な測定を可能とする免疫測定法および免疫測定用試薬、ならびに、ヘモグロビンを含む試料中の測定対象成分の免疫測定法におけるヘモグロビンの影響回避方法が提供される。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

(試料)

本発明に用いる生体試料としては、尿、血液 (全血、血漿又は血清)、腎臓、心臓、肝臓などの組織、及び該組織からの抽出液等が挙げられる。測定対象物質の存在が疑われる試料であれば、健常者由来の試料、患者由来の試料、罹病を疑われる者由来の試料等、いずれの試料も用いることができる。

【 0 0 1 1 】

(測定対象物質)

本発明により測定される測定対象物質には特に制限はない。

20

【 0 0 1 2 】

以下、試料として尿、測定対象物質として肝臓型脂肪酸結合蛋白質 (L - F A B P) を例として本発明を説明する。

【 0 0 1 3 】

(抗 L - F A B P 抗体)

本発明に用いる抗 L - F A B P 抗体は、臓器、細胞、体液等から精製した天然の L - F A B P を免疫原 (抗原) として調製することができる。L - F A B P は、主に肝臓又は腎臓に分布しているので、それらの臓器等から精製、単離することができる。また、L - F A B P は、ヒト、マウス、ブタ、ウシ、ラット間でホモロジーが高く、アミノ酸レベルで 9 0 % 以上のホモロジーがあることが知られているので、ヒトの L - F A B P と結合する抗体を得るために、例えばマウス L - F A B P を抗原として用いることもできる。

30

【 0 0 1 4 】

天然の L - F A B P の精製は、Kelvinらの文献 (J. Biol. Chem.、第263巻、第15762-15768頁、1988年) 記載の方法等に準じて実施できる。すなわち、摘出した臓器をホモジナイズした後、超遠心して得られる細胞質画分を、ゲルろ過及び陰イオン交換クロマトグラフィー等により分画し、分子量や脂肪酸結合活性を指標として L - F A B P を含む画分を選択して単離、精製する。前記選択された画分を SDS - ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、精製蛋白質が単一のバンドとなっていること確認し、必要であればさらに精製を行う。精製蛋白質について、アミノ酸組成や N 末端側アミノ酸配列を決定し、報告された組成や配列と比較することにより、目的とする分子種であることを確認できる。

40

【 0 0 1 5 】

抗原として用いる L - F A B P は、遺伝子工学的手法によって製造されたりコンビナント蛋白質であってもよい。L - F A B P のアミノ酸配列や遺伝子配列は既に報告されている (Veerkamp and Maatman、Prog. Lipid Res.、第34巻、第17-52頁、1995年) ので、例えば、それらをもとにプライマーを設計し、PCR (polymerase chain reaction) 法により適当な c D N A ライブラリ等から c D N A をクローニングすることができる。これを用いて遺伝子組換えを行うことにより、リコンビナント L - F A B P を調製することができる。また、抗原として、L - F A B P の断片、又はその部分配列を有する合成ペプチド等を、必要に応じてキャリア高分子物質 (B S A、ヘモシアニン等) と結合させて用いることもできる。

50

【 0 0 1 6 】

L - F A B P と特異的に結合する抗体は、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等のいずれであってもよい。

【 0 0 1 7 】

抗体は、高い特異性を有するものが好ましく、例えば、抗 L - F A B P 抗体であれば、H - F A B P とは実質的に交差反応しないことが望ましい。より特異性の高い抗体を取得するためには、より高度に精製され純度の高い抗原を用いることが望ましい。抗体の調製に際しては、ヒト以外の温血動物に、前記のごとく調製した精製抗原を接種して免疫する。免疫するヒト以外の温血動物としては、哺乳動物（ウサギ、ヒツジ、ラット、マウス、モルモット、ウマ、ブタ等）、鳥類（ニワトリ、アヒル、ガチョウ等）が挙げられる。ウサギの場合、例えば、抗原 1 0 0 μ g ~ 1 m g 程度を約 1 m L の生理食塩水及びフロイントの完全アジュバント中に乳化したものを、背部又は後肢掌皮下に接種し、2 回目以降はアジュバントをフロイントの不完全アジュバントにかえて、これを 2 ~ 4 週間おきに 3 ~ 8 回接種して免疫し、最終接種の約 7 ~ 1 2 日後に産生された抗体を使用する。マウスの場合、1 回あたり 1 0 ~ 3 0 μ g / 匹の抗原を、通常、皮下、腹腔内、静脈内に、約 2 週間隔で 3 ~ 8 回接種して免疫し、最終接種の約 2 ~ 4 日後に産生された抗体を使用する。

10

【 0 0 1 8 】

ポリクローナル抗体は、前記のように免疫した動物から採血し、血清（抗血清）を分取して、得られた抗血清から I g 画分を回収して調製できる。例えば、抗血清から P r o t e i n G カラムを用いるアフィニティークロマトグラフィー等により I g G 画分を回収してポリクローナル I g G を得ることができる。

20

【 0 0 1 9 】

モノクローナル抗体は、免疫動物から採取した抗体産生細胞を、不死化細胞と融合させて得られるハイブリドーマにより産生される。モノクローナル抗体のための免疫動物としてはマウス及びラットが好適に用いられる。ハイブリドーマの作製は、ケーラー及びミルシュタインの方法（Kohler & Milstein、Nature、第256巻、第495~897頁、1975年）に準じて以下のように実施できる。前記のように免疫した動物から抗体産生細胞（例えば脾細胞又はリンパ節細胞等）を採取し、これを適当な不死化細胞と細胞融合させる。不死化細胞としては、例えば骨髄腫細胞の細胞株（NSI - Ag4/1、Sp2/O-Ag14等）が好適に用いられる。骨髄腫細胞は、それ自身が抗体又は免疫グロブリンの H 鎖又は L 鎖を産生しない非分泌型であることが好ましい。また、未融合の骨髄腫細胞と融合したハイブリドーマとを選択培地中で選別し得るような選択マーカーを有していることが好ましい。例えば選択マーカーとして、8-アザグアニン耐性（ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損）、チミジンキナーゼ欠損等を有する細胞株がよく使用される。細胞融合は、ポリエチレングリコール等、適当な融合促進剤を添加して行う。細胞融合は、不死化細胞当たり約 1 0 の抗体産生細胞となる比率で行うことが好ましく、またおよそ抗体産生細胞 1 0⁶ 個 / m L の細胞密度で好適に実施できる。

30

【 0 0 2 0 】

融合処理した細胞を、適当に希釈した後、選択培地中で 1 ~ 2 週間培養する。例えば、8-アザグアニンに耐性の骨髄腫細胞を用いる場合、H A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）培地中で培養すると、未融合骨髄腫細胞は死滅し、また未融合の抗体産生細胞も分裂サイクルが限られているため死滅するが、融合細胞だけは選択培地中で分裂を続け生存できる。選択培地中での培養後、その上清について例えば抗原を固相に固定化した E L I S A 等を行って目的とする抗体の有無を検出し、限界希釈法によってクローニングすることにより、目的抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択できる。選択に際しては、抗体価、抗体のクラス、サブクラス、抗原との親和性、特異性、エピトープ等、所望の性質を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択できる。モノクローナル抗体のクラスとしては一般に I g G が好ましい。

40

【 0 0 2 1 】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、免疫に使用した動物と同種の動物の腹腔内

50

に移植し、一定期間経過後、当該動物から腹水を採取し、目的のモノクローナル抗体を単離することができる。あるいは、ハイブリドーマを適当な動物細胞培養用の培地中で培養し、その培養液からモノクローナル抗体を単離することもできる。また、一旦目的のハイブリドーマを得たら、該ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を取得し、通常の遺伝子組換え技術により適当な宿主（例えばカイコ等）において目的のモノクローナル抗体を発現させ産生させることができる。抗体の分離・精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を必要に応じて組合せた通常の精製法に従って行うことができる。

【0022】

本発明に使用される抗L-FABP抗体は、公知の抗体であってもよく、今後開発される抗体であってもよい。特に限定されないが、市販の抗L-FABP抗体である、Santa Cruz Biotechnology社のC-4（カタログNo. sc-374537）、F-9（カタログNo. sc-271591）、R&D systems社の328607（カタログNo. MAB2964）、Hycult biotech社のL2B10（カタログNo. HA2049-1A）、Lifespan Biosciences社の2G4（カタログNo. LS-B3001）等が利用可能である。

【0023】

本発明における「抗体」には、完全な免疫グロブリン分子だけでなく、Fab、Fab₂、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体（ScFv）等、本技術分野において公知の抗原結合能を有する抗体断片又は抗体誘導体が含まれる。

【0024】

（検出）

本発明の抗L-FABP抗体を用いたL-FABPを検出する方法は、免疫測定法である。より具体的には、ラテックス免疫比濁法（LTIA）等の粒子免疫凝集測定法、ELISA、化学発光検出法、イムノクロマトグラフィー（ラテラルフロー式、フロースルー式）が挙げられるが、これらの例に限定されない。なかでも、B/F分離のための工程を含まない免疫測定法（ホモジニアス免疫測定法）がより好ましい。

なお、本明細書において測定方法としてLTIAを記述する場合、その検出方法は、透過光（吸光度）の変化の測定、散乱光の変化の測定、粒子径の変化の測定等、公知の検出方法のいずれを用いても差し支えないものとして記述している。

さらに、「検出」又は「測定」という用語は、L-FABPの存在の証明及び/又は定量等を含めて最も広義に解釈する必要があり、限定的に解釈してはならない。

【0025】

（不溶性担体）

本発明で使用する不溶性担体としては、ポリスチレン樹脂等の高分子基材、ガラス等の無機基材、セルロースやアガロース等の多糖類基材等からなる不溶性担体を用いることができ、その形状は特に限定されず、ビーズあるいは粒子状（例えば、ラテックス粒子、金属コロイド粒子）、板あるいはシート状（例えば、多孔性メンブレン、イムノプレート）、筒状（例えば、試験管）等、採用する測定法に応じた任意の形状を選択できる。

【0026】

粒子の例としては、粒子免疫凝集測定法で一般的に用いられるポリスチレンを主成分とするラテックス粒子の他に、スチレン-ブタジエン共重合体、（メタ）アクリル酸エステル類ポリマー等を基材とする粒子が挙げられる。また、金属コロイド、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することもできる。本発明で用いる担体粒子は同一種類の材質、あるいは二種類以上の材質を用いることができる。

担体粒子の粒子径としては、0.15～0.45 μm程度が好ましく、より好ましくは、0.2～0.4 μmである。また、平均粒子径の異なる二種類以上の担体粒子を組み合わせ用いることもできる。

【0027】

10

20

30

40

50

多孔性メンブレンとしては、公知のものが使用でき、また、任意の材質のものが使用できる。多孔性メンブレンの材質としては、例えば、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ナイロン類、ガラス、セルロースやセルロース誘導体等の多糖類あるいはセラミックス等が挙げられるがこれらに限定されない。具体的には、ミリポア社、東洋濾紙社、ワットマン社等より販売されているガラス繊維ろ紙やセルロースろ紙等がある。

【0028】

プレート（イムノプレート）としては、公知のものが使用でき、また、任意の材質のものが使用できる。プレートの材質としては、例えば、塩化ビニル、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィンエラストマー等の合成高分子化合物のほか、ガラス等も利用することができるが、これらに限定されない。

10

【0029】

（不溶性担体への抗体の固定化）

抗L-FABP抗体を不溶性担体上に固定化する方法としては特に制限はなく、公知の方法を使用することができる

抗L-FABP抗体を粒子上に固定化する場合、例えば、粒子と抗体を混合することによりおこる物理的な吸着を用いる物理吸着法、カルボジイミド等のカップリング剤により、粒子表面のカルボキシ基やアミノ基と抗体分子を化学的に結合させる化学結合法が用いられる。また、抗体分子はスペーサー分子を介して粒子に固定化させてもよい。さらに、アルブミン等の他のタンパク質に化学結合法を用いて抗体を結合させた後に、そのタンパク質を粒子に物理的あるいは化学的に固定化してもよい。

20

また、抗L-FABP抗体を多孔性メンブレン上に固定化する場合、例えば、抗体を含む溶液を一定量、ライン状、点あるいは、+等の特定のシンボル状に、多孔性メンブレンに塗布することで固定化できる。

【0030】

本明細書において、「不溶性担体」を「固相」、抗原や抗体を不溶性担体に物理的あるいは化学的に担持させることあるいは担持させた状態を「固定」、「固定化」、「固相化」、「感作」、「吸着」と表現することがある。

【0031】

（標識抗体）

抗体を標識するための標識物質としては、例えば酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、又は放射性同位体、金コロイド粒子、着色ラテックス粒子等が挙げられる。また標識物質と抗体との結合方法としては、当業者に利用可能なグルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、又は過ヨウ素酸法等の方法を用いることができる。標識物質、結合方法のいずれも、上記に限定されることなく公知の方法を用いることができる。

30

標識の検出は、例えば、パーオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等の酵素を標識物質として用いる場合には、その酵素の特異的基質（酵素が西洋ワサビパーオキシダーゼの場合には、例えば1,2-フェニレンジアミンあるいは3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、アルカリホスファターゼの場合には、p-ニトロフェニルホスフェート等）を用いて酵素活性を測定することができ、ビオチンを標識物質として用いる場合には少なくともビオチン以外の標識物質で標識されたアビジンを反応させるのが一般的である。

40

【0032】

（BPF）

大腸菌由来の熱ショックタンパク質（HSP）であるDnaKのアミノ酸配列419番目から607番目のポリペプチド（Blocking Peptide Fragmentとも呼称される。以下「BPF」ということがある。）は、免疫学的測定方法における新規なブロッキング用物質としてW02005/003155号パンフレットおよび高分子学会予稿集:55巻2 Disk1号5211-5212頁(2006年), Polymer Preprints, Japan Vol. 55, No. 2, 5211-5212 (2006)に開示され、市販もされている。

本発明方法等に使用するBPFは、W02005/003155号パンフレットの記載

50

に従い調製することができる。また、市販品（東洋紡社製、カタログ番号BPF-301）を使用してもよい。

【0033】

本発明の方法等におけるBPFの使用濃度としては、測定用試薬あるいは検体希釈液中の濃度として、0.05～5%（w/v%）が好適であり、より好適には0.075～5%、さらに好適には0.1～3%を例示することができる。当業者であれば、保存対象タンパク質の性状や濃度（量）などを考慮し、実験的に最適なBPFの濃度を決定することができる。

例えば、分子量約22000のBPF-301を用いた場合、0.022mmol/L～2.27mmol/Lが好適であり、より好適には0.034mmol/L～2.27mmol/L、さらに好適には0.045mmol/L～1.36mmol/Lを例示することができる。

10

【0034】

（L-FABPの存在が疑われる試料、抗L-FABP抗体、及びBPFを接触させる方法）

L-FABPの存在が疑われる試料、抗L-FABP抗体、及びBPFを接触させる工程は、L-FABPの存在が疑われる試料とBPFを接触させる工程の後、抗L-FABP抗体と接触させる工程の順に行われることを限度として、いずれの方法を用いてもよい。

例えば、L-FABPの存在が疑われる試料と抗L-FABP抗体、及びBPFとを接触させる方法としては、例えば抗L-FABP抗体が固定化された粒子及びBPFを含有する液状の試薬と試料とを混合する方法を挙げることができる。また、別の方法としては、BPFを浸潤させた多孔性メンブレン等の不溶性担体に、L-FABPの存在が疑われる試料を供給することによって接触させる方法を挙げることができる。当業者であれば、測定用試薬の構成等を考慮して適宜設定することができる。

20

さらに試料中のL-FABPは、BPFと接触した後、又は接触と同時に、不溶性担体に固定化された抗L-FABP抗体と公知の適宜な方法により接触される。

【0035】

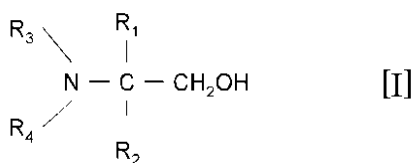
（緩衝剤）

本発明の分子内に下記〔化学式1〕で表される基をもつ化合物又はその塩からなる緩衝剤としては、下記一般式〔I〕で表される化合物を例示することができる。

30

一般式〔I〕

〔化1〕



一般式〔I〕中の R_1 、 R_2 は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基等をあげることができる。上記アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基としては、直鎖又は分枝上の炭素数が1～6のアルキル基をあげることができ、該直鎖又は分枝上の炭素数が1～6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等を具体的に例示することができる。

40

一般式〔I〕中の R_3 、 R_4 としては、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アル

50

キル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホ - ヒドロキシ - アルキル基、ジ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基、トリ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基等を挙げることができる。

上記アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホ - ヒドロキシ - アルキル基、ジ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基、及びトリ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基におけるアルキル基としては、直鎖又は分枝状の炭素数が 1 ~ 6 のアルキル基を挙げることができ、該直鎖又は分枝状の炭素数が 1 ~ 6 のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等を具体的に例示することができる。

10

また、一般式 [I] 中の R_3 、 R_4 としては、 R_3 、 R_4 が窒素原子と共に環状構造を形成し、置換もしくは無置換のピペラジニル基、置換もしくは無置換のモルホリノ基、又は置換もしくは無置換のピペリジノ基を形成する基を挙げることができ、該置換ピペラジニル基、置換モルホリノ基、及び置換ピペリジノ基における置換基としては、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホ - ヒドロキシ - アルキル基、ジ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基、トリ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基等を挙げることができる。

20

上記アルキル基、ヒドロキシアルキル基、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基、カルボキシアルキル基、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基、スルホアルキル基、ジ（スルホアルキル）アルキル基、トリ（スルホアルキル）アルキル基、スルホ - ヒドロキシ - アルキル基、ジ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基、及びトリ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基におけるアルキル基としては、前記の直鎖又は分枝状の炭素数が 1 ~ 6 のアルキル基を挙げることができる。

30

前記ヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2 - ヒドロキシエチル基、2 - ヒドロキシプロピル基、2 - ヒドロキシブチル基、2 - ヒドロキシペンチル基、2 - ヒドロキシヘキシル基等を、ジ（ヒドロキシアルキル）アルキル基としては、ジ（ヒドロキシメチル）メチル基、ジ（2 - ヒドロキシエチル）メチル基等を、トリ（ヒドロキシアルキル）アルキル基としては、トリ（ヒドロキシメチル）メチル基、トリ（2 - ヒドロキシエチル）メチル基等を、カルボキシアルキル基としては、カルボキシメチル基、2 - カルボキシエチル基等を、ジ（カルボキシアルキル）アルキル基としては、ジ（カルボキシメチル）メチル基、ジ（2 - カルボキシエチル）メチル基等を、トリ（カルボキシアルキル）アルキル基としては、トリ（カルボキシメチル）メチル基、トリ（2 - カルボキシエチル）メチル基等を、それぞれ具体的に例示することができる。

40

また、前記スルホアルキル基としては、スルホメチル基、2 - スルホエチル基等を、ジ（スルホアルキル）アルキル基としては、ジ（スルホメチル）メチル基、ジ（2 - スルホエチル）メチル基等を、トリ（スルホアルキル）アルキル基としては、トリ（スルホメチル）メチル基、トリ（2 - スルホエチル）メチル基等を、スルホ - ヒドロキシ - アルキル基としては、2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル基、3 - ヒドロキシ - 4 - スルホプロピル基等を、ジ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基としては、ジ（2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル）メチル基、ジ（3 - ヒドロキシ - 4 - スルホプロピル）メチル基等を、トリ（スルホ - ヒドロキシ - アルキル）アルキル基としては、トリ（2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル）メチル基、トリ（3 - ヒドロキシ - 4 - スルホプロピル）メチル基等を、それぞれ具体的に例示することができる。

50

【0036】

本発明で用いられる緩衝剤として、具体的には、Bicine (CAS番号：150-25-4)、BES (CAS番号：10191-18-1)、BisTris (CAS番号：6976-37-0)、DIPSO (CAS番号：68399-80-4)、HEPES (CAS番号：7365-45-9)、HEPPS (CAS番号：16052-06-5)、HEPPSO Hydrate (CAS番号：68399-78-0)、Tricine (CAS番号：5704-04-1)、TES (CAS番号：7365-44-8)、TAP (CAS番号：29915-38-6)、TAPSO (CAS番号：68399-81-5)、BisTris プロパン (CAS番号：64431-96-5)、トリス塩酸塩 (CAS番号：1185-53-1)、トリス塩基 (CAS番号：77-86-1)、TESナトリウム水和物 (CAS番号：70331-82-7)等が挙げられる。特に、BisTris、HEPES、TES、トリスが好ましい。

10

【0037】

(測定キット)

本発明により提供される測定キットの構成物は、L-FABPを免疫学的に測定できることを限度として、特に限定されるものではない。以下、サンドイッチELISA、イムノクロマトグラフィー及びLTI Aを例にそれぞれを説明する。

【0038】

<サンドイッチELISA>

サンドイッチELISAの場合、測定用キットは少なくとも、(a)本発明の抗L-FABP抗体を固定化した不溶性担体及び(b)標識物質で標識され、L-FABPと反応する性質を有する抗体、を含む。この場合、不溶性担体はプレート(イムノプレート)が好ましく、標識物質は、適宜選択して使用できる。

20

【0039】

不溶性担体に固定化された抗体は、試料中のL-FABPを捕捉し、不溶性担体上で複合体を形成する。標識物質で標識された抗体は、前記捕捉されたL-FABPに結合して前述の複合体とサンドイッチを形成する。標識物質に応じた方法により標識物質の量を測定することにより、試料中のL-FABPを測定することができる。抗体の不溶性担体への固定化の方法、抗体と標識物質との結合方法等、具体的な方法は、当業者に周知の方法を特に制限なく使用することができる。この構成の場合、ホモジニアスな測定方法、ヘテロジニアスな測定方法のいずれも構成することが可能であるが、ホモジニアスな測定方法がより好適である。

30

【0040】

BPFは、例えば、試料希釈液や抗原抗体反応を行う溶液に添加することで、試料中のL-FABPと接触させることができる。

【0041】

<イムノクロマトグラフィー>

一般的なイムノクロマトグラフィーでは、多孔性メンブレン等のシート状の不溶性担体上に、試料を含む溶液の展開方向に順に「1. 試料供給部位」、「2. 標識抗体を保持する部位(標識抗体保持部位)」、「3. 標識抗体とL-FABP抗体により形成された複合体を捕捉するための抗体を固定化する部位(捕捉抗体部位)」を具備した試験片が使用され、試料溶液が毛細管現象により連続的に移動するように構成されている。イムノクロマトグラフィーでは、測定用キットは、上記のような試験片を少なくとも含む。

40

【0042】

具体的には、L-FABPを含む試料を試料供給部位に所定量添加すると、試料は毛細管現象により標識保持部位に侵入し、L-FABPと標識抗体とが結合して複合体を形成する。該複合体は、メンブレンを展開し、捕捉抗体部位に侵入すると、メンブレンに固定化された抗体(捕捉抗体)に捕捉され、捕捉抗体-L-FABP-標識抗体の三元複合体が形成される。そして標識を任意の方法(例えば、金コロイド粒子等の可視化可能な標識の場合にはその凝集像、酵素の場合には、基質を添加することによる発色反応)で検出することで、L-FABPの存在を検出することができる。

【0043】

50

B P F は、例えば、試料希釈液等に添加しておいたり、試料供給部位や標識保持部位に含有させておいたりすることで、試料中の L - F A B P と接触させることができる。

【 0 0 4 4 】

< ラテックス免疫凝集測定法 >

ラテックス免疫凝集測定法では、測定用キットは少なくとも抗体が固定化されたラテックス粒子を含む。ラテックス免疫凝集測定法に使用される抗体としては、「抗原に対する認識部位が異なる二種類のモノクローナル抗体」、「ポリクローナル抗体」、又は「モノクローナル抗体とポリクローナル抗体」のいずれの組合せも用いることができる。この場合、ラテックス粒子は、抗体を固定化する不溶性担体であると同時に、標識物質である。

【 0 0 4 5 】

これらの測定用試薬に使用されるラテックス粒子は、感度向上等の所望の性能を得るため、粒子径や材質を適宜選択することができる。ラテックス粒子としては、抗体の担持に適したものであれば良い。例えば、ポリスチレン、スチレン - スルホン酸 (塩) 共重合体、スチレン - メタクリル酸共重合体、アクリロニトリル - ブタジエン - スチレン共重合体、塩化ビニル - アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル - アクリル酸エステル共重合体等を基材とする粒子が挙げられる。ラテックス粒子の形状は特に限定されないが、その平均粒子径は、ラテックス粒子表面の抗体と L - F A B P との凝集反応の結果生じる凝集体が、肉眼又は光学的に検出できるに十分な大きさを有することが好ましい。なお、金属コロイド、ゼラチン、リボソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子をラテックス粒子に代えて使用することもできる。

【 0 0 4 6 】

臨床検査で使用される一般的な L T I A 用の測定キットは、通常、第一試薬、第二試薬の形態で提供される。B P F 及び抗体を固定化したラテックス粒子は、第一試薬あるいは第二試薬に含有させることができる。一般には抗体を固定化したラテックス粒子を第二試薬に含有させることが好適であるが、第一試薬に含ませることもできる。また、ラテックス粒子は、第一試薬、第二試薬の両方に含有させることも可能である。

【 0 0 4 7 】

本発明のキットは、測定感度向上や非特異的反応抑制の目的で、必要に応じて糖類やタンパク質等を含む。例えば、抗原抗体反応を促進する成分 (ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、リン脂質ポリマー等の高分子化合物等)、タンパク質やペプチド (アルブミン、カゼイン等)、アミノ酸、糖類 (ショ糖、シクロデキストリン等)、防腐剤 (アジ化ナトリウム、ProClin 300 等) が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

また、試料測定における標準物質 (L - F A B P 標準物質) として、肝臓、腎臓等の各組織由来の天然の L - F A B P が使用できるが、遺伝子工学的手法によって製造されたりコンピナント蛋白質であってもよい。L - F A B P のアミノ酸配列や遺伝子配列は既に報告されている (Veerkamp and Maatman, Prog. Lipid Res., 第34巻、第17-52頁、1995年) ので、例えば、それらをもとにプライマーを設計し、P C R (polymerase chain reaction) 法により適当な c D N A ライブラリ等から c D N A をクローニングすることができる。これを用いて遺伝子組換え技術より、リコンピナント L - F A B P を調製することができる。標準物質として、構造が安定したリコンピナント蛋白質を用いることがより好ましい。

【 実施例 】

【 0 0 4 9 】

以下に本発明の実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

【 0 0 5 0 】

(抗 L - F A B P 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液)

10

20

30

40

50

(1) Clone L 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液の調製

抗 L - F A B P 抗体 Clone L (シミックホールディングス社製) を 0 . 3 6 m g / m L 含む 2 0 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 8 . 5) 1 3 m L に、平均粒径 0 . 2 1 μ m の 1 % ラテックス粒子 (積水化学工業社製) 懸濁液 1 3 m L を加え、4 にて 2 時間攪拌した。これに、0 . 5 % B S A を含む 2 0 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 8 . 5) 1 3 m L を加え、4 で 1 時間攪拌した。その後、5 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 0) に透析して、Clone L 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液を得た。

(2) Clone 1 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液の調製

抗 L - F A B P 抗体 Clone 1 (シミックホールディングス社製) を 0 . 5 4 m g / m L 含む 5 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 7 . 5) 8 m L に、平均粒径 0 . 3 2 μ m の 1 % ラテックス粒子 (積水化学工業社製) 懸濁液 8 m L を加え、4 にて 2 時間攪拌した。これに、0 . 5 % B S A を含む 5 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 7 . 5) 8 m L を加え、4 で 1 時間攪拌した。その後、5 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 0) に透析して Clone 1 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0051】

(L - F A B P 標準物質)

L - F A B P 標準物質は、特開平 1 1 - 2 4 2 0 2 6 号公報の記載に従い、遺伝子組換えにより得た。

【0052】

(L - F A B P 基準測定方法 : 基準方法)

E L I S A による体外診断用医薬品 (レナプロ (登録商標) L - F A B P テスト T M B) を基準方法とした。

【0053】

(第一試薬 : 標準物質希釈液を兼ねる)

3 0 0 m m o l / L H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 0)

各濃度 B P F (東洋紡社製、BPF-103)

1 0 0 m m o l / L N a C l

3 9 0 m m o l / L ベンズアミジン塩酸塩

0 . 4 % L i p i d u r e - B L 1 0 3

(第二試薬)

5 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 0)

3 . 7 5 A b s / m L C l o n e L 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液 (注)

1 . 2 5 A b s / m L C l o n e 1 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液 (注)

(注) A b s は 2 8 0 n m における吸光度を示す。

(標準液)

L - F A B P 標準物質を、標準物質希釈液を用いて所望濃度に調整し、標準液とした。

(凍結融解尿)

採取後、- 3 0 で凍結保存されていた部分尿を、一度だけ融解して測定に使用した。予め基準方法にて凍結融解尿中の L - F A B P を測定したところ、1 0 n g / m L であった。

(検体)

ヘモグロビンの濃度が 0 ~ 1 0 0 0 m g / d L となるよう干渉チェック A プラス (シスメックス社製) を調整した。前記調整済み干渉チェック A プラスと上記凍結融解尿とを等量混和して、各濃度のヘモグロビンが共存する検体とした。

【0054】

(L T I A の測定条件)

(1) 分析装置 : 日立 7 1 7 0 型自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ社製)

(2) 試料量及び試薬量 : 試料 3 μ L、第一試薬 1 5 0 μ L、第二試薬 5 0 μ L

(3) 反応時間 (反応温度) : 第一試薬 5 分 (3 7)、第二試薬 5 分 (3 7)

(4) 測光ポイント及び測光対象 : 第二試薬添加直後と添加 5 分後の間の吸光度変化量

10

20

30

40

50

【0055】

[実施例 1 ~ 4] B P F によるヘモグロビンの影響回避
B P F による、ヘモグロビンの影響回避効果を確認した。

1. 操作

(1) 検量線の作成

標準液を試料として、上記第一試薬、及び第二試薬を用いて試料中の L - F A B P の測定を行った。測定された吸光度から、L - F A B P 0 n g / m L 試料の吸光度 (ブランク吸光度) を差し引いて正味吸光度を算出した。L - F A B P 濃度を x 軸、正味吸光度を y 軸として、検量線を作成した。

(2) 実施例 1 ~ 4

表 1 の濃度の B P F を含む上記の第一試薬と第二試薬を用いて、検体中の L - F A B P の測定を行った。

【表 1】

| | B P F 濃度 |
|-------|----------|
| 実施例 1 | 0. 1 % |
| 実施例 2 | 0. 5 % |
| 実施例 3 | 1. 0 % |
| 実施例 4 | 2. 0 % |

(3) 対照例

B P F を含まない第一試薬と、第二試薬を用いて試料中の L - F A B P の測定を行った。

【0056】

2. 結果

実施例 1 ~ 4 及び対照例において測定された吸光度から、(1) の検量線を用いて L - F A B P 濃度を算出した。各ヘモグロビン濃度において算出された測定値を、ヘモグロビンが 0 m g / d L の測定値で除して比率 (%) を求め表 2 に示した。

【表 2】

| | | B P F (%) | | | | |
|---------------|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|
| | | 0.0 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| Hb (mg/dL) | 0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| | 100 | 146.0 | 112.5 | 109.0 | 103.6 | 96.6 |
| | 200 | 179.1 | 122.7 | 119.9 | 109.4 | 100.7 |
| | 300 | 178.6 | 137.4 | 135.3 | 117.0 | 101.1 |
| | 400 | 257.1 | 153.8 | 145.3 | 120.5 | 103.2 |
| | 500 | 301.0 | 178.8 | 164.1 | 135.2 | 113.7 |

判定基準: 正確性が 100±15% 以内を網掛けで表示

【0057】

B P F を添加しない場合 1 0 0 m g / d L のヘモグロビン共存で既に 1 5 0 % 付近の比率であった。一方、B P F を添加した場合には、B P F の濃度依存的に比率が低下し、表 2 に示すように、網掛け部では 1 5 % 以内の変動であった。すなわち、1 0 0 m g / d L のヘモグロビン濃度では、± 1 5 % 以内の変動となり、ヘモグロビンの影響を回避できることを確認した。同様に、2 0 0 ~ 5 0 0 m g / d L のヘモグロビン濃度においても、B P F の濃度依存的に比率が低下することが確認できた。

【0058】

実施例 5 ~ 9 については、以下の材料を用い、以下の条件にて測定を行った。

【0059】

(抗 L - F A B P 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液)

(1) C l o n e L 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液の調製

抗 L - F A B P 抗体 C l o n e L (シミックホールディングス社製) を 0 . 3 6 m g / m L 含む 2 0 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 8 . 5) 1 3 m L に、平均粒径 0 . 2 7 μ m の 1 % ラテックス粒子 (積水化学工業社製) 懸濁液 1 3 m L を加え、4 にて 2 時間攪拌した。これに、0 . 5 % B S A を含む 2 0 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 8 . 5) 1 3 m L を加え、4 で 1 時間攪拌した。その後、5 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 0) に透析して、C l o n e L 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液を得た。

(2) C l o n e 1 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液の調製

抗 L - F A B P 抗体 C l o n e 1 (シミックホールディングス社製) を 0 . 5 4 m g / m L 含む 5 m m o l / L トリス緩衝液 (p H 7 . 5) 8 m L に、平均粒径 0 . 2 5 μ m の 1 % ラテックス粒子 (積水化学工業社製) 懸濁液 8 m L を加え、4 にて 2 時間攪拌した。これに、0 . 5 % B S A を含む 5 m m o l / L トリス緩衝液 (p H 7 . 5) 8 m L を加え、4 で 1 時間攪拌した。その後、5 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 0) に透析して C l o n e 1 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液を得た。

【 0 0 6 0 】

(L - F A B P 標準物質)

L - F A B P 標準物質は、特許文献 1 の記載に従い、遺伝子組換えにより得た。

【 0 0 6 1 】

(L - F A B P 基準測定方法 : 基準方法)

E L I S A による体外診断用医薬品 (レナプロ (登録商標) L - F A B P テスト T M B) を基準方法とした。

【 0 0 6 2 】

(第一試薬)

3 0 0 m m o l / L 緩衝液

0 . 1 % B P F (東洋紡社製、BPF-103)

3 0 0 m m o l / L N a C l

3 9 0 m m o l / L ベンズアミジン塩酸塩

0 . 7 2 0 % ~ 1 . 0 2 0 % L i p i d u r e - B L 1 0 3

(第二試薬)

5 m m o l / L M O P S 緩衝液 (p H 7 . 0)

3 . 7 5 A b s / m L C l o n e L 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液 (注)

1 . 2 5 A b s / m L C l o n e 1 抗体固定化ラテックス粒子懸濁液 (注)

(注) A b s は 2 8 0 n m における吸光度を示す。

(標準物質希釈液)

リン酸緩衝液 (p H 7 . 0)

0 . 1 % B P F (東洋紡社製、BPF-103)

(標準液)

L - F A B P 標準物質を、標準物質希釈液を用いて所望濃度に調整し、標準液とした。

(凍結融解尿)

採取後、- 3 0 で凍結保存されていた部分尿を、一度だけ融解して測定に使用した。

【 0 0 6 3 】

(L T I A の測定条件)

(1) 分析装置 : 日立 7 1 7 0 型自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ社製)

(2) 試料量及び試薬量 : 試料 3 μ L 、第一試薬 1 5 0 μ L 、第二試薬 5 0 μ L

(3) 反応時間 (反応温度) : 第一試薬 5 分 (3 7) 、第二試薬 5 分 (3 7)

(4) 測光ポイント及び測光対象 : 第二試薬添加直後と添加 5 分後の間の吸光度変化量

(5) 測定波長 5 7 0 n m / 8 0 0 n m

【 0 0 6 4 】

[実施例 5 ~ 9] ヘモグロビンの影響回避

第一試薬に表 3 に記載の各緩衝液を用い、ヘモグロビンの影響回避効果を確認した。

1 . 操作

10

20

30

40

50

(1) 検体の調整

ヘモグロビンの濃度が200 mg/dLとなるよう干渉チェックAプラス(シスメックス社製)を調整した。前記調整済み干渉チェックAプラスと上記凍結融解尿とを等量混和して、100 mg/dLヘモグロビンが共存する検体とした。また、ヘモグロビンの濃度が0 mg/dLの検体は、上記凍結融解尿をそのまま用いた。

(2) 検量線の作成

標準液を試料として、上記第一試薬、及び第二試薬を用いて試料中のL-FABPの測定を行った。測定された吸光度から、L-FABP 0 ng/mL試料の吸光度(ブランク吸光度)を差し引いて正味吸光度を算出した。L-FABP濃度をx軸、正味吸光度をy軸として、検量線を作成した。

10

(3) 実施例5~9

表3の緩衝液を含む上記の第一試薬と、第二試薬を用いて、検体中のL-FABPの測定を行った。

【0065】

2. 結果

実施例5~9において測定された吸光度から、(2)の検量線を用いてL-FABP濃度を算出した。算出された測定値を、ヘモグロビンが0 mg/dLの測定値で除して比率(%)を求め表3に示した。

【0066】

【表3】

20

| | 緩衝液 | 正確性(%) |
|------|----------------|--------|
| 実施例5 | BisTris pH6.85 | 110.9 |
| 実施例6 | HEPES pH7.0 | 102.1 |
| 実施例7 | HEPES pH7.5 | 112.5 |
| 実施例8 | TES pH7.0 | 109.1 |
| 実施例9 | TES pH7.5 | 106.9 |

【0067】

表3に記載のBPFを含むいずれの緩衝液においても正確性は±15%以内の変動となり、ヘモグロビンの影響を回避できることを確認した。なお、BPF濃度2.0%を含む上記緩衝液についても同様の試験を行ったところ、いずれの緩衝液を用いた場合でも500 mg/dLヘモグロビンの影響を回避することができた(結果示さず)。

30

【0068】

[実施例10]ヘモグロビンの影響回避

第一試薬に、表4に記載の緩衝液、第二試薬に、2.5 Abs/mL Clone L抗体固定化ラテックス粒子懸濁液及び2.5 Abs/mL Clone 1抗体固定化ラテックス粒子懸濁液(Absは280 nmにおける吸光度を示す)を用いて、ヘモグロビンの影響回避効果を確認した。それら以外、条件は実施例2~9と同じである。

【0069】

1. 操作

40

(1) 検体の調整

ヘモグロビンの濃度が200 mg/dLとなるよう干渉チェックAプラス(シスメックス社製)を調整した。前記調整済み干渉チェックAプラスと上記凍結融解尿とを等量混和して、100 mg/dLヘモグロビンが共存する検体とした。また、ヘモグロビンの濃度が0 mg/dLの検体は、上記凍結融解尿をそのまま用いた。

(2) 検量線の作成

標準液を試料として、上記第一試薬、及び第二試薬を用いて試料中のL-FABPの測定を行った。測定された吸光度から、L-FABP 0 ng/mL試料の吸光度(ブランク吸光度)を差し引いて正味吸光度を算出した。L-FABP濃度をx軸、正味吸光度をy軸として、検量線を作成した。

50

(3) 実施例10

表4の緩衝液を含む上記の第一試薬と、第二試薬を用いて、検体中のL-FABPの測定を行った。

【0070】

2. 結果

実施例10において測定された吸光度から、(2)の検量線を用いてL-FABP濃度を算出した。算出された測定値を、ヘモグロビンが0mg/dLの測定値で除して比率(%)を求め表4に示した。

【表4】

| | 緩衝液 | 正確性(%) |
|-------|------------|--------|
| 実施例10 | Tris pH7.0 | 114.3 |

10

【0071】

正確性は±15%以内の変動となり、ヘモグロビンの影響を回避できることを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明によれば、BPFを用いることでLTI Aに与えるヘモグロビンの影響を回避することができる。

【配列表】

20

2016136918000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2016/055729 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/531(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(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) G01N33/531, G01N33/53, G01N33/543 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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 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. |
| Y | JP 2012-112042 A (Tanaka Kikinzoku Kogyo Kabushiki Kaisha), 14 June 2012 (14.06.2012), paragraph [0056] & US 2013/0224885 A1 paragraph [0117] & WO 2012/060456 A1 & EP 2636469 A1 | 1-10 |
| Y | JP 2002-202312 A (Tokuyama Corp.), 19 July 2002 (19.07.2002), paragraphs [0047], [0048] (Family: none) | 1-10 |
| Y | JP 5-322891 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 07 December 1993 (07.12.1993), abstract; paragraph [0009] (Family: none) | 1-10 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 15 June 2016 (15.06.16) | | Date of mailing of the international search report 28 June 2016 (28.06.16) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055729

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2005/003155 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 13 January 2005 (13.01.2005), Background Art; example 5; fig. 10 & US 2006/0183173 A1 fig. 10; Background Art; example 5 & EP 1642904 A1 & CN 1816562 A | 1-10 |
| Y | JP 8-211056 A (Konica Corp.), 20 August 1996 (20.08.1996), paragraphs [0002], [0043] (Family: none) | 1-10 |
| Y | JP 11-242026 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 07 September 1999 (07.09.1999), example 5 & US 2007/0243560 A1 examples 5A, 5B & US 7592148 B1 & WO 1999/027363 A1 & EP 1043587 A1 | 9 |
| Y | Kenjiro KIMURA, "L-FABP no Rinshoteki Igi to Kongo no Tenbo", Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation, 01 September 2014 (01. 09.2014), vol.39, no.4, page 433 | 9 |
| A | JP 2001-33442 A (A&T Corp.), 09 February 2001 (09.02.2001), abstract; paragraph [0004] (Family: none) | 1-10 |
| A | JP 6-289025 A (Cosmo Research Institute), 18 October 1994 (18.10.1994), paragraph [0003] (Family: none) | 1-10 |
| A | JP 2014-52390 A (Sekisui Medical Co., Ltd.), 20 March 2014 (20.03.2014), paragraphs [0004], [0005] & JP 5443355 B2 & US 2011/0104825 A1 paragraphs [0004] to [0006] & US 8722342 B2 & WO 2010/001619 A1 & EP 2295969 A1 | 1-10 |
| A | WO 2011/125912 A1 (Sekisui Medical Co., Ltd.), 13 October 2011 (13.10.2011), abstract & JP 5823377 B2 & US 2013/0052658 A1 abstract & EP 2554991 A1 | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055729

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 2013/002403 A1 (Sekisui Medical Co., Ltd.), 03 January 2013 (03.01.2013), claims & US 2015/0301038 A1 claims & EP 2728356 A1 | 1-10 |
| P,A | Nobuhiro SATO, "Nyo-chu L-FABP no Sokuji Sokutei o Kano ni suru Shinki Latex-ho Shiyaku Norudia L-FABP no Kisoteki Seino Hyoka", Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation, 01 September 2015 (01.09.2015), vol.40, no.4, page 523 269 | 1-10 |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 5 7 2 9 | | | | | | | | | |
|---|--|--|----------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(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. G01N33/531, G01N33/53, G01N33/543 | | | | | | | | | | | |
| 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2016年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2016年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2016年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2016年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2016年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2016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 請求項の番号 | | | | | | | | | |
| Y | JP 2012-112042 A (田中貴金属工業株式会社) 2012.06.14, [0056] & US 2013/0224885 A1[0117] & WO 2012/060456 A1 & EP 2636469 A1 | 1-10 | | | | | | | | | |
| Y | JP 2002-202312 A (株式会社トクヤマ) 2002.07.19, [0047][0048] (ファミリーなし) | 1-10 | | | | | | | | | |
| Y | JP 5-322891 A (株式会社京都第一科学) 1993.12.07, [要約][0009] (ファミリーなし) | 1-10 | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 | | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | | 「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 | | | | | | | | | |
| 「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 | | 「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 | | | | | | | | | |
| 「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) | | 「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 | | | | | | | | | |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 15.06.2016 | | 国際調査報告の発送日 28.06.2016 | | | | | | | | | |
| 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) 三木 隆 | 2 J 3312 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 3252 | | | | | | | | | |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 5 7 2 9 |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| C (続き) . 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 請求項の番号 |
| Y | WO 2005/003155 A1 (東洋紡績株式会社) 2005.01.13, [背景技術]、 実施例5、図10 & US 2006/0183173 A1 Fig.10, BACKGROUND ART, EXAMPLE5 & EP 1642904 A1 & CN 1816562 A | 1-10 |
| Y | JP 8-211056 A (コニカ株式会社) 1996.08.20, [0002][004 3] (ファミリーなし) | 1-10 |
| Y | JP 11-242026 A (田辺製薬株式会社) 1999.09.07, 実施例5 & US 2007/0243560 A1 Example5A, Example5B & US 7592148 B1 & WO 1999/027363 A1 & EP 1043587 A1 | 9 |
| Y | 木村健二郎, L - FABP の臨床的意義と今後の展望, 日本臨床検査自 動化学会会誌, 2014.09.01, Vol. 39 No. 4, Page. 433 | 9 |
| A | JP 2001-33442 A (株式会社エイアンドティー) 2001.02.09, [要 約][0004] (ファミリーなし) | 1-10 |
| A | JP 6-289025 A (株式会社コスモ総合研究所) 1994.10.18, [000 3] (ファミリーなし) | 1-10 |
| A | JP 2014-52390 A (積水メディカル株式会社) 2014.03.20, [000 4][0005] & JP 5443355 B2 & US 2011/0104825 A1[0004]-[0006] & US 8722342 B2 & WO 2010/001619 A1 & EP 2295969 A1 | 1-10 |
| A | WO 2011/125912 A1 (積水メディカル株式会社) 2011.10.13, [要約] & JP 5823377 B2 & US 2013/0052658 A1 Abstract & EP 2554991 A1 | 1-10 |
| A | WO 2013/002403 A1 (積水メディカル株式会社) 2013.01.03, [特許 請求の範囲] & US 2015/0301038 A1 Claims & EP 2728356 A1 | 1-10 |
| PA | 佐藤信博, 尿中 L - FABP の即時測定を可能にする新規ラテックス法 試薬ノルディア L - FABP の基礎的性能評価, 日本臨床検査自動化学 会会誌, 2015.09.01, Vol. 40 No. 4, Page. 523 269 | 1-10 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于该方法的免疫学测量方法和测量试剂 | | |
| 公开(公告)号 | JPWO2016136918A1 | 公开(公告)日 | 2017-11-30 |
| 申请号 | JP2017502493 | 申请日 | 2016-02-25 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 积水医疗株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 积水医疗有限公司 | | |
| [标]发明人 | 小林幸司 松本拓二 山本光章 | | |
| 发明人 | 小林 幸司 松本 拓二 山本 光章 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 C12Q1/04 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/542 G01N33/545 | | |
| FI分类号 | G01N33/543.581.J G01N33/53.D G01N33/545.B C12Q1/04.ZNA C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QS33 4B063/QX02 | | |
| 优先权 | 2015035926 2015-02-25 JP | | |
| 其他公开文献 | JP6660934B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明要解决的问题是提供一种避免血红蛋白在免疫学测量方法中对生物样品中的分析物的影响的方法。该问题通过使怀疑含有分析物的样品与结合分析物的抗体在存在由DnaK的氨基酸序列号419至607组成的多肽(一种热休克蛋白)反应来解决。HSP), 衍生自SEQ ID NO: 1所示的大肠杆菌或与多肽具有至少90%序列同一性的多肽。

| (19) 日本国特許庁 (JP) | 再公表特許 (A1) | (11) 国際公開番号 |
|---|---|---------------|
| 発行日 平成29年11月30日 (2017.11.30) | | WO2016/136918 |
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| GO1N 33/543 (2006.01) | GO1N 33/543 | 4B063 |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 | D |
| GO1N 33/545 (2006.01) | GO1N 33/545 | B |
| C12Q 1/04 (2006.01) | C12Q 1/04 | ZNA |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/09 | A |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) | |
| 出願番号 特願2017-502493 (P2017-502493) | (71) 出願人 390037327 | |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2016/055729 | 積水メディカル株式会社 | |
| (22) 国際出願日 平成28年2月25日 (2016.2.25) | 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 | |
| (31) 優先権主張番号 特願2015-35926 (P2015-35926) | (74) 代理人 110000774 | |
| (32) 優先日 平成27年2月25日 (2015.2.25) | 特許業務法人 もえぎ特許事務所 | |
| (33) 優先権主張国 日本国 (JP) | (72) 発明者 小林 幸司 | |
| | 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 | |
| | メディカル株式会社内 | |
| | (72) 発明者 松本 拓二 | |
| | 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 | |
| | メディカル株式会社内 | |
| | (72) 発明者 山本 光章 | |
| | 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 | |
| | メディカル株式会社内 | |
| | Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ79 QS33 QX02 | |
| | 最終頁に続く | |
| (54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法及び該方法に用いられる測定試薬 | | |