

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02012/029837**

発行日 平成25年10月31日 (2013.10.31)

(43) 国際公開日 **平成24年3月8日 (2012.3.8)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 S	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 7 5	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	
	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号 特願2012-531910 (P2012-531910)	(71) 出願人 000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区晴海一丁目8番10号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/069734	
(22) 国際出願日 平成23年8月31日 (2011.8.31)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-193213 (P2010-193213)	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
(32) 優先日 平成22年8月31日 (2010.8.31)	(74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝
	(74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
	(74) 代理人 100142929 弁理士 井上 隆一
	(74) 代理人 100148699 弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子-23の測定方法及び測定試薬

(57) 【要約】

以下の工程を含むことを特徴とする、試料中の線維芽細胞増殖因子-23 (FGF-23) の測定方法。

(1) 試料中の FGF-23 を、水性媒体中で、磁性粒子、FGF-23 に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF-23 に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントと反応させ、磁性粒子上に、FGF-23 に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23、及び、FGF-23 に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)後の反応混合物中の磁性粒子を磁力により集めて、磁力により集められた磁性粒子とそれ以外の成分とを分離する工程；及び、

(3) 工程(2)で分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定する工程。

本発明により、高感度で、測定範囲の広い、試料中の FGF-23 の測定方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の工程を含むことを特徴とする、試料中の線維芽細胞増殖因子 - 23 (以下、FGF - 23 と記す) の測定方法。

(1) 試料中の FGF - 23 を、水性媒体中で、磁性粒子、FGF - 23 に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF - 23 に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントと反応させ、磁性粒子上に、FGF - 23 に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、FGF - 23、及び、FGF - 23 に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)後の反応混合物中の磁性粒子を磁力により集めて、磁力により集められた磁性粒子とそれ以外の成分とを分離する工程；及び、

(3) 工程(2)で分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定する工程。

## 【請求項2】

第2抗体が、標識化された抗体である請求項1記載の測定方法。

## 【請求項3】

標識化された抗体が、アルカリホスファターゼ標識抗体である請求項2記載の測定方法。

## 【請求項4】

工程(3)の磁性粒子上の免疫複合体の測定が、化学発光の測定により行われる、請求項1～3のいずれかに記載の測定方法。

## 【請求項5】

試料が、血清又は血漿である請求項1～4のいずれかに記載の測定方法。

## 【請求項6】

磁性粒子、FGF - 23 に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF - 23 に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントを含有することを特徴とする、試料中の FGF - 23 測定試薬。

## 【請求項7】

第2抗体が、標識化された抗体である請求項6記載の測定試薬。

## 【請求項8】

標識化された抗体が、アルカリホスファターゼ標識抗体である請求項7記載の測定試薬。

## 【請求項9】

さらに、化学発光測定試薬を含む請求項6～8のいずれかに記載の測定試薬。

## 【請求項10】

試料が、血清又は血漿である請求項6～9のいずれかに記載の測定試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、試料中の線維芽細胞増殖因子 - 23 (以下、FGF - 23 と記す) の測定方法、及び、FGF - 23 の測定試薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

FGF - 23 は、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリーの一員であり、主として骨組織で産生される251アミノ酸からなるポリペプチドであり、腎臓に作用し、腎尿細管でのリンの再吸収を阻害する。近年、低リン血症性くる病、腫瘍性骨軟化症、腎不全等の疾患における FGF - 23 の関与が示唆されている (非特許文献1 参照)。

## 【0003】

FGF - 23 は、N末端の24アミノ酸が脱離した227アミノ酸からなるポリペプチドが修飾を受け、糖鎖が付加した構造として、約32.5kDaの成熟したタンパクとして細胞外に

10

20

30

40

50

放出される。また、FGF-23は、トロンピンによりN末端より197番目と198番目の間の結合が切断され、198-251番目のフラグメントがC末フラグメントとして血中に存在する。

【0004】

これまでに、FGF-23に対する抗体が取得され（特許文献1及び2；非特許文献2参照）、当該抗体を用いた、血清又は血漿中のFGF-23の免疫測定法が報告されており（特許文献1；非特許文献2参照）、本測定法に基づく測定キットも市販されている〔Human Intact FGF-23 ELISA Kit(Immutopics社)、Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit(Immutopics社)、FGF-23測定試薬(カイノス社)〕。

【0005】

しかしながら、これまでの免疫測定法は、プレート法による測定方法であり、この方法は、測定感度が低く、測定範囲が狭い等の問題があった。特に慢性腎臓病(CKD)患者、及び、透析患者においては数pg/mL～数万pg/mLの濃度域の検体が存在し、低濃度検体においては、精度不良により正しい測定値が得られず、また、高濃度検体においては測定範囲をオーバーしてしまう等の課題があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2003/057733パンフレット

【特許文献2】特表2004-504063号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】腎と骨代謝, vol.15, No.4, p.351～356 (2002).

【非特許文献2】N ENGL J MED, vol.348, No.17, p.1656～1663 (2003).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、高感度で、測定範囲の広い、試料中のFGF-23の測定方法及び測定試薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、磁性粒子を担体として用いる免疫測定法により、高感度で、測定範囲の広い、FGF-23の測定が可能となる、という知見を見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔10〕に関する。

【0010】

〔1〕 以下の工程を含むことを特徴とする、試料中のFGF-23の測定方法。

(1) 試料中のFGF-23を、水性媒体中で、磁性粒子、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントと反応させ、磁性粒子上に、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)後の反応混合物中の磁性粒子を磁力により集めて、磁力により集められた磁性粒子とそれ以外の成分とを分離する工程；及び、

(3) 工程(2)で分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定する工程。

〔2〕 第2抗体が、標識化された抗体である〔1〕記載の測定方法。

〔3〕 標識化された抗体が、アルカリホスファターゼ標識抗体である〔2〕記載の測定方法。

〔4〕 工程(3)の磁性粒子上の免疫複合体の測定が、化学発光の測定により行われる、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の測定方法。

10

20

30

40

50

[ 5 ] 試料が、血清又は血漿である [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の測定方法。

【 0 0 1 1 】

[ 6 ] 磁性粒子、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントを含有することを特徴とする、試料中の F G F - 2 3 測定試薬。

[ 7 ] 第 2 抗体が、標識化された抗体である [ 6 ] 記載の測定試薬。

[ 8 ] 標識化された抗体が、アルカリホスファターゼ標識抗体である [ 7 ] 記載の測定試薬。

[ 9 ] さらに、化学発光測定試薬を含む [ 6 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載の測定試薬。

[ 1 0 ] 試料が、血清又は血漿である [ 6 ] ~ [ 9 ] のいずれかに記載の測定試薬。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明により、高感度で、測定範囲の広い、試料中の F G F - 2 3 の測定方法及び測定試薬が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】実施例 1 の F G F - 2 3 の測定方法の最小測定濃度を示すグラフであり、試料中の F G F - 2 3 濃度と発光量との関係を表すグラフである。横軸は F G F - 2 3 濃度 (pg/mL) を、縦軸は発光量 (RLU) を表す。I は平均値  $\pm$  2SD の範囲を示す。また、破線は、ブランク + 2SD の発光量を表す。

【図 2】実施例 2 の F G F - 2 3 の測定方法の測定範囲を示すグラフであり、試料中の F G F - 2 3 濃度と発光量との関係を表すグラフである。横軸は F G F - 2 3 濃度 (pg/mL) を、縦軸は発光量 (RLU) を表す。

【図 3】透析患者由来の血清 (患者血清 D) を用いた、実施例 3 の測定方法における希釈直線性を示すグラフであり、希釈率と F G F - 2 3 濃度との関係を表すグラフである。横軸は当該血清の希釈率を、縦軸は決定された F G F - 2 3 濃度 (pg/mL) を表す。

【図 4】透析患者由来の血清 (患者血清 E) を用いた、実施例 3 の測定方法における希釈直線性を示すグラフであり、希釈率と F G F - 2 3 濃度との関係を表すグラフである。横軸は当該血清の希釈率を、縦軸は決定された F G F - 2 3 濃度 (pg/mL) を表す。

【図 5】プレートを使用する比較例 1 の F G F - 2 3 の測定方法の最小測定濃度を示すグラフであり、試料中の F G F - 2 3 濃度と吸光度との関係を表すグラフである。横軸は F G F - 2 3 濃度 (pg/mL) を、縦軸は吸光度 (Abs) を表す。I は平均値  $\pm$  2SD の範囲を示す。また、破線は、ブランク + 2SD の発光量を表す。

【図 6】プレートを使用する比較例 2 の F G F - 2 3 の測定方法の測定範囲を示すグラフであり、試料中の F G F - 2 3 濃度と吸光度との関係を表すグラフである。横軸は F G F - 2 3 濃度 (pg/mL) を、縦軸は吸光度 (Abs) を表す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

(測定方法)

本発明の試料中の F G F - 2 3 の測定方法は、磁性粒子を担体として用いる、サンドイッチ法による試料中の F G F - 2 3 の免疫測定法であり、以下の工程を含む測定方法である。

( 1 ) 試料中の F G F - 2 3 を、水性媒体中で、磁性粒子、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントと反応させ、磁性粒子上に、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、F G F - 2 3、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を生成させる工程；

( 2 ) 工程 ( 1 ) 後の反応混合物中の磁性粒子を磁力により集めて、磁力により集められた磁性粒子とそれ以外の成分とを分離する工程；及び、

( 3 ) 工程 ( 2 ) で分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定する工程。

## 【 0 0 1 5 】

## &lt; 工程 ( 1 ) &gt;

工程 ( 1 ) において、試料中の F G F - 2 3 は、水性媒体中で、磁性粒子、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントと反応し、磁性粒子上に、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、F G F - 2 3、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体が生成する。

## 【 0 0 1 6 】

ここで、試料中の F G F - 2 3 と、磁性粒子、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントとの反応は、磁性粒子上に、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、F G F - 2 3、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体が生成する限りは、いかなる反応でもよく、例えば試料中の F G F - 2 3 と、磁性粒子、及び、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメントとを反応させて、磁性粒子上に、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体もしくはそのフラグメントと F G F - 2 3 との免疫複合体を生成させた後に、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントを反応させても、試料中の F G F - 2 3 と、磁性粒子、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、及び、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントとを、同時に反応させてもよい。磁性粒子上に、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体もしくはそのフラグメントと F G F - 2 3 との免疫複合体を生成させた後に、F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントを反応させる場合には、当該免疫複合体を生成させた後に洗浄工程を設けることもできる。

## 【 0 0 1 7 】

工程 ( 1 ) において F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメントと磁性粒子とは試料中の F G F - 2 3 と反応させる前に予め、結合させておいてもよい。F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメントの磁性粒子への結合は、物理吸着による結合、リンカーを介する結合、抗体の Fc 領域 - Fc 領域と結合する抗体、アビジン類 ( アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等 ) - ビオチン等の 2 つの親和性物質間の相互作用を利用した結合等が挙げられる。抗体の Fc 領域と、Fc 領域と結合する抗体との相互作用を利用する場合、例えば磁性粒子上に固定化した Fc 領域と結合する抗体と、第 1 抗体若しくはそのフラグメントとの相互作用により、第 1 抗体若しくはそのフラグメントを磁性粒子上に結合させることができる。アビジン類とビオチンとの相互作用を利用する場合、例えば磁性粒子上に固定化したアビジン類と、ビオチン結合第 1 抗体若しくはそのフラグメント中のビオチンとの相互作用により、第 1 抗体若しくはそのフラグメントを磁性粒子上に結合させることができる。

## 【 0 0 1 8 】

反応溶液中の磁性粒子の濃度は、本発明の F G F - 2 3 の測定を可能とする濃度であれば特に限定はなく、通常、0.1 ~ 10 mg/mL である。反応温度は、本発明の F G F - 2 3 の測定を可能とする温度であれば特に限定はなく、通常、0 ~ 50 であり、4 ~ 45 が好ましく、20 ~ 40 が特に好ましい。反応時間は、本発明の F G F - 2 3 の測定を可能とする時間であれば特に限定はなく、通常、5 分間 ~ 1 時間であり、5 ~ 20 分間が好ましい。

## 【 0 0 1 9 】

F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメントが予め、結合した磁性粒子を用いる場合、F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメントが結合した磁性粒子は、本発明の F G F - 2 3 の測定方法を可能とする限り、いかなる方法によって製造することができる。例えば 0.1 ~ 10 mg/mL の磁性粒子の懸濁液に、0.1 ~ 10 µg/mL の第 1 抗体若しくはそのフラグメント溶液を添加し、37 で 5 分間 ~ 1 時間反応させることにより、第 1 抗体若しくはそのフラグメントが結合した磁性粒子を製造することができる。

## 【 0 0 2 0 】

また、工程 ( 1 ) において、試料中の F G F - 2 3 と F G F - 2 3 に結合する第 1 抗体

10

20

30

40

50

若しくはそのフラグメント、及び、磁性粒子とからなる免疫複合体を生成させた後に、当該免疫複合体に FGF-23 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントを結合させる場合、当該第 2 抗体を結合させる前に免疫複合体が結合した磁性粒子の洗浄工程を設けることができる。磁性粒子の洗浄は、磁性粒子上に FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23、及び、FGF-23 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を生成させることができる限りは、いかなる洗浄であってよく、例えば磁性粒子上に FGF-23 と FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメントとの免疫複合体を生成させる反応後の反応混合物の中から磁性粒子以外の成分を除去し、磁性粒子が残った反応容器に洗浄液を添加し、磁性粒子を洗浄する方法や、反応後の反応混合物に洗浄液を添加すると同時に、磁性粒子以外の成分を除去し、磁性粒子を洗浄する方法等が挙げられる。磁性粒子以外の成分の除去は、例えば磁力により磁性粒子を集めて、残った成分を吸引することにより行うことができる。洗浄液としては、本発明の FGF-23 の測定を可能とする洗浄液であれば特に制限はなく、例えば後述の水性媒体、後述の水性媒体に界面活性剤が添加された水性媒体等が挙げられる。界面活性剤としては、例えばツイーン (Tween) 20 等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

尚、工程 (1) において、塩類を共存させてもよい。塩類としては、本発明の FGF-23 の測定方法を可能とする塩類であれば特に制限はなく、例えば塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化アンモニウム、臭化リチウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化マグネシウム、臭化アンモニウム等が挙げられ、塩化ナトリウムが好ましい。塩類の反応中の濃度は、本発明の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はなく、例えば 40 ~ 400 mmol/L であり、70 ~ 250 mmol/L が好ましい。

#### 【0022】

また、工程 (1) においては、金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質、界面活性剤、蛋白質安定化剤等を共存させることができる。金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質 (ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、バイオエース、プロクリン 300 等が挙げられる。蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン (BSA)、ウシ胎児血清 (FBS)、カゼイン、ブロックエース (大日本製薬社製) 等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等が挙げられる。蛋白質安定化剤としては、例えばペルオキシダーゼ安定化緩衝液、アルカリホスファターゼ安定化緩衝液等が挙げられる。

#### 【0023】

##### < 工程 (2) >

工程 (2) において、工程 (1) 後の磁性粒子、すなわち、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23、及び、FGF-23 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体が結合した磁性粒子は磁力によって集められ、磁力により集められた磁性粒子は、それ以外の成分と分離される。磁性粒子を集めるための磁力は、本発明の FGF-23 の測定を可能とする磁力であれば特に制限はない。磁力により集められた磁性粒子と、それ以外の成分との分離は、本発明の FGF-23 の測定を可能とする分離であれば特に制限はない。

#### 【0024】

また、工程 (2) の後に、又は、工程 (2) と同時に、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23、及び、FGF-23 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を結合した磁性粒子を洗浄する工程を含んでもよい。磁性粒子の洗浄は、例えば前述の方法等によって行うことができる。

#### 【0025】

## &lt; 工程 ( 3 ) &gt;

次いで、工程 ( 3 ) において、工程 ( 2 ) により分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定することにより、試料中の F G F - 2 3 を測定することができる。免疫複合体の測定方法としては、例えば、以下の方法等が挙げられる。

## 【 0 0 2 6 】

(1) F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントが標識化されていない場合

第 2 抗体若しくはそのフラグメントに結合する第 3 抗体若しくはそのフラグメントに標識が結合した標識化第 3 抗体若しくはそのフラグメントを、第 1 抗体若しくはそのフラグメント、F G F - 2 3、及び、第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体が結合している磁性粒子と反応させて、磁性粒子上に、第 1 抗体若しくはそのフラグメント、F G F - 2 3、第 2 抗体若しくはそのフラグメント、及び、第 3 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体を形成させ、該免疫複合体中の標識を測定することにより、分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定することができる。第 2 抗体若しくはそのフラグメントに結合する第 3 抗体若しくはそのフラグメントとしては、例えば第 2 抗体の F c 領域に結合する抗体若しくはそのフラグメント等が挙げられる。標識の測定は、分離された磁性粒子上の免疫複合体の測定を可能とする方法であれば、特に制限はなく、例えば化学発光の測定、蛍光の測定、吸光度の測定等が挙げられるが、化学発光の測定が好ましい。

## 【 0 0 2 7 】

(2) F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントが標識化されている場合

磁性粒子上に形成された、第 1 抗体若しくはそのフラグメント、F G F - 2 3、及び、標識化された F G F - 2 3 に結合する第 2 抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体中の標識を測定することにより、分離された磁性粒子上の免疫複合体を測定することができる。標識の測定は、分離された磁性粒子上の免疫複合体の測定を可能とする方法であれば、特に制限はなく、例えば化学発光の測定、蛍光の測定、吸光度の測定等が挙げられるが、化学発光の測定が好ましい。

## 【 0 0 2 8 】

(A) 化学発光の測定

化学発光の測定は、以下の方法等によって行うことができる。

(A-1) 標識が酵素である場合

標識が酵素である場合には、例えばその酵素と反応して光を生成する基質を標識化抗体若しくはフラグメントに作用させ、生成した光 ( h ) の強度を発光強度計等で測定することにより行うことができる。酵素としては、その酵素の基質と反応し、光を生成し得るものであれば特に制限はなく、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、D - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

## 【 0 0 2 9 】

酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合、アルカリホスファターゼと反応して光を生成するアルカリホスファターゼの基質としては、例えば 3 - ( 2' - スピロアダマンタン ) - 4 - メトキシ - 4 - ( 3' - ホスホリルオキシ ) フェニル - 1 , 2 - ジオキセタン・二ナトリウム塩 ( A M P P D )、2 - クロロ - 5 - { 4 - メトキシスピロ [ 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2' - ( 5' - クロロ ) トリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1 3 , 7 ] カン ] - 4 - イル } フェニルホスフェート・二ナトリウム塩 ( C D P - S t a r <sup>T M</sup> )、3 - { 4 - メトキシスピロ [ 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2' - ( 5' - クロロ ) トリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1 3 , 7 ] デカン ] - 4 - イル } フェニルホスフェート・二ナトリウム塩 ( C S P D <sup>T M</sup> )、[ 1 0 - メチル - 9 ( 1 0 H ) - アクリジニルイデン ] フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩 ( L u m i g e n <sup>T M</sup> A P S - 5 )、9 - ( 4 - クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン ) - 1 0 - メチルアクリダン・二ナトリウム塩等が挙げられる。

## 【 0 0 3 0 】

10

20

30

40

50

酵素として、ペルオキシダーゼを用いる場合、ペルオキシダーゼと反応して光を生成するペルオキシダーゼの基質としては、例えば過酸化水素と発光化合物との組み合わせ等が挙げられる。発光化合物としては、例えば、ルミノール化合物、ルシゲニン化合物等が挙げられる。

【0031】

酵素として、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼと反応して光を生成する $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン-プラス [Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製] 等が挙げられる。

【0032】

酵素として、ルシフェラーゼを用いる場合、ルシフェラーゼと反応して光を生成するルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等が挙げられる。

【0033】

(A-2) 標識が発光物質である場合

標識が発光物質である場合には、例えば生成した免疫複合体中の発光物質に起因する光の強度を、発光強度計等で測定することにより行うことができる。発光物質としては、本発明の測定を可能とする発光物質であれば特に制限はなく、例えばアクリジニウムおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。

【0034】

(B) 蛍光の測定

蛍光の測定は、以下の方法等によって行うことができる。

(B-1) 標識が酵素である場合

標識が酵素である場合には、例えばその酵素と反応して蛍光を生成する基質を標識化抗体若しくはフラグメントに作用させ、生成した蛍光の強度を蛍光強度計等で測定することにより行うことができる。酵素としては、その酵素の基質と反応し、蛍光を生成し得るものであれば特に制限はなく、例えばペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ等が挙げられる。

【0035】

酵素として、ペルオキシダーゼを用いる場合、ペルオキシダーゼと反応して蛍光を生成するペルオキシダーゼの基質としては、例えば過酸化水素と蛍光化合物との組み合わせ等が挙げられる。蛍光化合物としては、例えば、4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。

【0036】

酵素として、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼと反応して蛍光を生成する $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド又はその類似化合物等が挙げられる。

【0037】

酵素として、 $\beta$ -グルクロニダーゼを用いる場合、 $\beta$ -グルクロニダーゼと反応して蛍光を生成する $\beta$ -グルクロニダーゼの基質としては、例えばTokyo Green<sup>TM</sup>-GluU (積水メディカル社製) 等が挙げられる。

【0038】

(B-2) 標識が蛍光物質である場合

標識が蛍光物質である場合には、例えば生成した免疫複合体中の蛍光物質に起因する蛍光の強度を、蛍光強度計等で測定することにより行うことができる。蛍光物質としては、本発明の測定を可能とする蛍光物質であれば特に制限はなく、例えばFITC (フルオレッセイン イソチオシアナート)、RITC (ローダミンB-イソチオシアナート)、quantum dot (Science, 281, 2016-2018, 1998)、フィコエリスリン等のフィコビリ蛋白質、GFP (Green fluorescent Protein)、RFP (Red fluorescent Protein)、YFP (Yellow fluorescent Protein)、BFP (Blue fluorescent Protein) 等が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

## (C) 吸光度の測定

吸光度の測定は、以下の方法等によって行うことができる。

## (C-1) 標識が酵素である場合

標識が酵素である場合には、例えばその酵素と反応して色素を生成する基質を標識化抗体若しくはフラグメントに作用させ、生成した色素の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定することにより行うことができる。酵素としては、その酵素の基質と反応し、色素を生成し得るものであれば特に制限はなく、例えばペルオキシダーゼ等が挙げられる。

## 【 0 0 4 0 】

酵素として、ペルオキシダーゼを用いる場合、ペルオキシダーゼと反応して色素を生成するペルオキシダーゼの基質としては、例えば過酸化水素と酸化発色型色原体との組み合わせ等が挙げられる。酸化発色型色原体としては、例えば、ロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。

## 【 0 0 4 1 】

ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジジン、*o*-フェニレンジアミン、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン ナトリウム塩(DA-64)、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。

## 【 0 0 4 2 】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カブラーとアニリン類(トリンダー試薬)との組み合わせ、カブラーとフェノール類との組み合わせ等があげられる。カブラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等があげられる。アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、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(TOOS)、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)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、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,N-ジメチル-3-メチルアニリン、N,N-ビス(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、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、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、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(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、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-DAOS)等があげられる。フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等があげられる。

## 【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

磁性粒子上に生成した免疫複合体の測定における測定値に基づいた、試料中の F G F - 2 3 濃度の決定は、例えば、以下の方法で行うことができる。

既知濃度の F G F - 2 3 を用いて上記工程 ( 1 ) から工程 ( 3 ) を行い、 F G F - 2 3 の濃度と測定値 ( 標識由来の情報量 ) との関係を表す検量線を作成し、次いで、測定すべき試料を用いて測定を行い、得られた測定値を予め作成した検量線に照らし合わせて、測定すべき試料中の F G F - 2 3 濃度を決定する。

【 0 0 4 4 】

( 試料 )

本発明における試料としては、本発明の F G F - 2 3 の測定を可能とする試料であれば特に制限はなく、例えば全血、血漿、血清、髄液、唾液、羊水、尿、汗、腓液等が挙げられるが、血漿、血清等が好ましい。

10

【 0 0 4 5 】

( 水性媒体 )

本発明において使用される水性媒体としては、本発明の F G F - 2 3 の測定を可能とする水性媒体であれば特に制限はなく、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられ、緩衝液が好ましい。緩衝液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH1~11の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルピツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、グッド緩衝剤等があげられる。

20

【 0 0 4 6 】

グッド緩衝剤としては、例えば 2 - モルホリノエタンスルホン酸 ( M E S ) 緩衝剤、ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミノトリス ( ヒドロキシメチル ) メタン ( B i s - T r i s ) 緩衝剤、トリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタン ( T r i s ) 緩衝剤、N - ( 2 - アセトアミド ) イミノ二酢酸 ( A D A ) 緩衝剤、ピペラジン - N , N ' - ビス ( 2 - エタンスルホン酸 ) ( P I P E S ) 緩衝剤、2 - [ N - ( 2 - アセトアミド ) アミノ ] エタンスルホン酸 ( A C E S ) 緩衝剤、3 - モルホリノ - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 ( M O P S O ) 緩衝剤、2 - [ N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) アミノ ] エタンスルホン酸 ( B E S ) 緩衝剤、3 - モルホリノプロパンスルホン酸 ( M O P S ) 緩衝剤、2 - { N - [ トリス ( ヒドロキシメチル ) メチル ] アミノ } エタンスルホン酸 ( T E S ) 緩衝剤、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N ' - ( 2 - スルホエチル ) ピペラジン ( H E P E S ) 緩衝剤、3 - [ N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) アミノ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 ( D I P S O ) 緩衝剤、2 - ヒドロキシ - 3 - { [ N - トリス ( ヒドロキシメチル ) メチル ] アミノ } プロパンスルホン酸 ( T A P S O ) 緩衝剤、ピペラジン - N , N ' - ビス ( 2 - ヒドロキシプロパン - 3 - スルホン酸 ) ( P O P S O ) 緩衝剤、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N ' - ( 2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル ) ピペラジン ( H E P P S O ) 緩衝剤、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N ' - ( 3 - スルホプロピル ) ピペラジン ( E P P S ) 緩衝剤、[ N - トリス ( ヒドロキシメチル ) メチルグリシン ] ( T r i c i n e ) 緩衝剤、[ N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) グリシン ] ( B i c i n e ) 緩衝剤、3 - [ N - トリス ( ヒドロキシメチル ) メチル ] アミノプロパンスルホン酸 ( T A P S ) 緩衝剤、2 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) エタンスルホン酸 ( C H E S ) 緩衝剤、3 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 ( C A P S O ) 緩衝剤、3 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) プロパンスルホン酸 ( C A P S ) 緩衝剤等が挙げられる。

30

40

【 0 0 4 7 】

( 磁性粒子 )

本発明における磁性粒子としては、本発明の F G F - 2 3 の測定を可能とする磁性粒子であれば特に限定はなく、例えばフェライトで被覆したラテックス、フェライトで被覆したポリマー粒子等が挙げられる。また、抗体の結合を容易にするために、ビオチンと結合

50

する性質を有するアビジン、ニュートラアビジン又はストレプトアビジンを表面に固定化した磁性粒子も使用することができる。磁性粒子の粒径は、特に限定されないが、例えば1 $\mu\text{m}$ ~6 $\mu\text{m}$ であり、好ましくは1 $\mu\text{m}$ ~3 $\mu\text{m}$ である。本発明における磁性粒子としては、市販の磁性粒子を用いることができる。市販の磁性粒子としては、例えばDynabeads M-280 Streptavidin (ダイナル社製)、Dynabeads M-280 Tosylactivated (ダイナル社製)、Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (ダイナル社製)、Dynabeads MyOne Tosylactivated (ダイナル社製)、Estopor (メルク社製)、Sera-Mag Magnetic Streptavidin Particles (サーモサイエンティフィック社製)、MAGNOTEX-SA (J S R 社製) 等が挙げられる。

【0048】

(抗体)

本発明におけるFGF-23に結合する抗体(第1抗体及び第2抗体)は、本発明のFGF-23の測定を可能とする抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用できるが、モノクローナル抗体が好ましい。また、本発明においては、全長の抗体のみならず、抗体フラグメントを用いることもできる。抗体フラグメントとしては、例えば、抗体をパイン処理により得られるFab、ペプシン処理により得られるF(ab')<sub>2</sub>、ペプシン処理-還元処理により得られるFab'等のFc部分を除去した抗体フラグメント等が挙げられる。磁性粒子として、アビジン、ニュートラアビジン又はストレプトアビジンがその表面に固定化された磁性粒子を用いる場合には、第1抗体にビオチンが結合したビオチン結合第1抗体を用いることができる。

【0049】

本発明において使用されるFGF-23に結合する第1抗体と第2抗体において、それぞれの抗体が結合するFGF-23の部位は同じであっても、異なってもよいが、異なっていることが好ましい。

【0050】

本発明において使用される抗体は、FGF-23そのもの、又は、FGF-23中のエピトープに相当するペプチドを抗原として用いて通常の抗体の作製方法により取得することができるが、市販品としても入手可能である。FGF-23に結合する抗体としては、例えばFERM BP-7838、FERM BP-7839、FERM BP-7840、FERM BP-8268としてそれぞれ寄託されたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体等が挙げられる。

【0051】

また、本発明のFGF-23の測定方法及び測定試薬において、FGF-23に結合する抗体の代わりに、FGF-23に結合するアプタマー等の、抗体以外の物質を用いることもできる。

【0052】

(測定試薬)

本発明の試料中のFGF-23測定試薬は、本発明の試料中のFGF-23の測定方法に使用することができる。本発明の測定試薬は、磁性粒子、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントを含有する。FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメントは、磁性粒子に結合されたものを用いてもよい。

【0053】

FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメントが磁性粒子に結合している場合、本発明の測定試薬は、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメントが結合した磁性粒子、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントを含有する。

【0054】

FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメントが磁性粒子に結合していない場合、本発明の測定試薬は、2つの親和性物質のうちの片方が固定化された磁性粒子、2つの親和性物質のうちのもう一方が結合した第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントを含有する。2つの親和性

10

20

30

40

50

物質の組み合わせとしては、例えばアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等のアビジン類と、ビオチンとの組み合わせ等が挙げられる。本発明の測定試薬の1態様としては、例えばアビジン類が固定化された磁性粒子、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメントにビオチンが結合したビオチン結合第1抗体若しくはそのフラグメント、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントを含有する測定試薬が挙げられる。

【0055】

第2抗体若しくはそのフラグメントが標識化されている場合には、本発明の測定試薬は、さらに、第1抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23、及び、標識化第2抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体中の標識化第2抗体若しくはそのフラグメントの測定を可能とする標識測定試薬を含む。標識測定試薬は、生成した当該免疫複合体中の標識化第2抗体若しくはそのフラグメントを測定することができる試薬であれば特に制限はなく、例えば化学発光測定試薬、蛍光測定試薬等が挙げられるが、化学発光測定試薬が好ましい。

10

【0056】

FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントが標識化されていない場合には、本発明の測定試薬は、さらに、当該第2抗体若しくはそのフラグメントに結合する第3抗体若しくはそのフラグメントに標識が結合した標識化第3抗体若しくはそのフラグメントと、第1抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23、第2抗体若しくはそのフラグメント、及び、標識化第3抗体若しくはそのフラグメントからなる免疫複合体中の標識化第3抗体若しくはそのフラグメントの測定を可能とする標識測定試薬とを含む。第2抗体若しくはそのフラグメントに結合する第3抗体若しくはそのフラグメントとしては、例えば第2抗体のFc領域に結合する抗体若しくはそのフラグメント等が挙げられる。また、当該免疫複合体中の標識化第3抗体若しくはそのフラグメントの測定を可能とする標識測定試薬は、生成した当該免疫複合体中の標識化第3抗体若しくはそのフラグメントを測定することができる試薬であれば特に制限はなく、例えば化学発光測定試薬、蛍光測定試薬、吸光度測定試薬等が挙げられるが、化学発光測定試薬が好ましい。

20

【0057】

化学発光測定試薬は、特に、標識が酵素である場合に用いられる試薬であり、その酵素と反応して光を生成する酵素の基質を含む試薬等が挙げられる。酵素と、その酵素と反応して光を生成する酵素の基質との組み合わせについては、前述の組み合わせ等が挙げられる。

30

【0058】

蛍光測定試薬は、特に、標識が酵素である場合に用いられる試薬であり、その酵素と反応して蛍光を生成する酵素の基質を含む試薬等が挙げられる。酵素と、その酵素と反応して蛍光を生成する酵素の基質との組み合わせについては、前述の組み合わせ等が挙げられる。

【0059】

吸光度測定試薬は、特に、標識が酵素である場合に用いられる試薬であり、その酵素と反応して色素を生成する酵素の基質を含む試薬等が挙げられる。酵素と、その酵素と反応して色素を生成する酵素の基質との組み合わせについては、前述の組み合わせ等が挙げられる。

40

【0060】

本発明の測定試薬において使用される磁性粒子、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメントとしては、例えばそれぞれ前述の磁性粒子、FGF-23に結合する第1抗体若しくはそのフラグメント、FGF-23に結合する第2抗体若しくはそのフラグメント等が挙げられる。また、本発明の測定試薬には、必要に応じて、それぞれ前述の水性媒体、標識酵素の基質、金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質、界面活性剤、蛋白質安定化剤等を含有させてもよい。

50

## 【 0 0 6 1 】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

## 【 実施例 1 】

## 【 0 0 6 2 】

## ( 1 ) 材料及び測定方法

## &lt; 測定用試料 &gt;

健常人より得た血清 ( F G F - 2 3 濃度が10 pg/mLの血清 ; アリエス社より購入 ) を、0.2%BSA ( Bovogen Biologicals社製 ) を含むリン酸緩衝化生理食塩水 ( 0.15 mol/L 塩化ナトリウムを含有する10 mmol/L リン酸緩衝液、pH7.2 ) にてF G F - 2 3 濃度が9 pg/mL、8 pg/mL、7 pg/mL、6 pg/mL、5 pg/mL、4 pg/mL、3 pg/mL、2 pg/mL、1 pg/mL、になるように希釈したもの、及び0.2%BSAを含むリン酸緩衝化生理食塩水 ( F G F - 2 3 濃度0 pg/mL ) を測定用試料に用いた。 10

## 【 0 0 6 3 】

## &lt; 磁性粒子懸濁液 &gt;

磁性粒子として、ストレプトアビジンが結合した市販の磁性粒子 ( Dynabeads MyOne Streptavidin T1 ; ダイナル社製 ) を用いて、以下の組成からなる磁性粒子懸濁液を調製した。

M E S ( p H 6 . 5 )	5 0 m m o l / L	
ストレプトアビジン結合磁性粒子	0 . 7 5 m g / m L	20
B S A	0 . 1 %	
塩化ナトリウム	0 . 1 m o l / L	

## 【 0 0 6 4 】

## &lt; ビオチン結合抗 F G F - 2 3 抗体とビオチン結合抗 F G F - 2 3 抗体溶液 &gt;

第1抗体として、FERM BP-7838として寄託されたハイブリドーマが生産する抗 F G F - 2 3 モノクローナル抗体 2 C 3 B を用いて、当該抗体とNHS - ビオチンとを混合し、37で1時間反応させ、反応後の混合物をセファデックスG-25カラム ( G E ヘルスサイエンス・ジャパン社製 ) に供して未反応のNHS - ビオチンを除去し、ビオチン結合抗 F G F - 2 3 モノクローナル抗体を調製した。得られたビオチン結合抗 F G F - 2 3 モノクローナル抗体を用いて、以下の組成からなるビオチン結合抗 F G F - 2 3 抗体溶液を調製した。 30

M E S ( p H 6 . 5 )	5 0 m m o l / L
抗 F G F - 2 3 モノクローナル抗体 2 C 3 B	5 μ g / m L
B S A	0 . 1 %
塩化ナトリウム	0 . 1 m o l / L

## 【 0 0 6 5 】

## &lt; アルカリホスファターゼ標識抗 F G F - 2 3 抗体フラグメントとアルカリホスファターゼ標識抗 F G F - 2 3 抗体フラグメント溶液 &gt;

第2抗体フラグメントとして、FERM BP-7839として寄託されたハイブリドーマが生産する抗 F G F - 2 3 モノクローナル抗体 3 C 1 E をペプシンで消化した後、G3000SWカラム ( 東ソー社製 ; 口径 : 21.5 mm ; 長さ : 60 cm ) を用いたHPLCシステム ( 日立製作所社製 ) でF(ab')<sub>2</sub>を分離した。得られたF(ab')<sub>2</sub>を2 - メルカプトエチルアミン塩酸塩 ( ナカライテスク社製 ) で還元した後、G3000SWカラム ( 東ソー社製 ; 口径 : 21.5 mm ; 長さ : 60 cm ) を用いたHPLCシステム ( 日立製作所社製 ) でFab'を分離した。得られたFab'とアルカリホスファターゼとを以下の手順により、マレイミド法によって結合させた。 40

## 【 0 0 6 6 】

マレイミド化試薬Sulfo-HMCS ( 同仁化学研究所社製 ) を用いて、アルカリホスファターゼをマレイミド化し、反応混合物をセファデックスG-25カラム ( G E ヘルスサイエンス・ジャパン社製 ) に供して未反応のSulfo-HMCSを除去し、マレイミド化アルカリホスファターゼを得た。

## 【 0 0 6 7 】

調製したマレイミド化アルカリホスファターゼとFab'とを混合し、アルカリホスファターゼ標識Fab'抗体を作製した。得られたアルカリホスファターゼ標識Fab'抗体を用いて、以下の組成からなるアルカリホスファターゼ標識抗FGF-23抗体フラグメント溶液を調製した。

MES (pH 6.5)	50 mmol / L
アルカリホスファターゼ標識抗FGF-23抗体フラグメント	5 µg / mL
BSA	0.1 %
塩化ナトリウム	0.1 mol / L

#### 【0068】

##### (2) 試料中のFGF-23の測定

上記(1)で調製した測定用試料10 µLに、(1)で調製した磁性粒子懸濁液、ビオチン結合抗FGF-23抗体溶液、及び、アルカリホスファターゼ標識抗FGF-23抗体フラグメント溶液を各30 µL加えて攪拌し、37 °Cで20分間反応させた。磁性粒子を磁力で集めて、磁性粒子以外の反応溶液を除去すると共に、洗浄液[0.1%ツイーン20を含有する50 mmol/L MOPS緩衝液(pH7.35)]で磁性粒子を5回洗浄した。その後、9-(4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン)-10-メチルアクリダン・二ナトリウム塩を主成分とする発光基質液を100 µL加えて攪拌し、生じた発光量(RLU)を測定した。測定結果を図1に示す。

#### 【0069】

測定系として測定可能な最小濃度を規定する方法として、平均値と標準偏差を用いて統計学的に評価する方法がある。具体的には、0 pg/mL試料を5重測定した際の平均値+2倍の標準偏差(+2SD)よりも、(1)で調製した試料を5重測定した際の平均値-2倍の標準偏差(-2SD)が高いRLUとなれば、その試料を検出できる濃度として規定できる。

#### 【0070】

FGF-23濃度が0 pg/mLである試料を測定した際の発光量の平均+2SDは173 RLU(図1の破線)であった。一方、FGF-23濃度が1 pg/mLである試料を測定した際の発光量の平均-2SDは186 RLUであり、0 pg/mL試料を測定した際の発光量の平均+2SDよりも高い値であったことから、1 pg/mLのFGF-23を測定できることを確認した。よって、この測定法において、FGF-23を検出できる最小濃度は1 pg/mLであると規定できる。また、図1に示したように、FGF-23が1 pg/mL以上の濃度では濃度依存的な発光量の増加が見られた。

#### 【実施例2】

#### 【0071】

##### (1) 材料及び測定方法

###### <測定用試料>

W02003/057733に記載された方法によって製造したFGF-23を、0.2%BSA(Bovogen Biologicals社製)を含むリン酸緩衝化生理食塩水(0.15 mol/L 塩化ナトリウムを含有する10 mmol/L リン酸緩衝液、pH7.2)にてFGF-23濃度が10,000 pg/mL、3,000 pg/mL、1,000 pg/mL、300 pg/mL、100 pg/mL、50 pg/mL、10 pg/mL、5 pg/mL、になるように希釈したもの、及び0.2%BSAを含むリン酸緩衝化生理食塩水(FGF-23濃度 0 pg/mL)を測定用試料に用いた。

#### 【0072】

##### (2) 試料中のFGF-23の測定

上記(1)の測定用試料を用いる以外は、実施例1と同様の方法により測定を行った。その結果を図2に示す。

図2から明らかな様に、5~10,000 pg/mLの濃度範囲において、FGF-23濃度依存的、かつ、直線的に発光量が増加することが判明した。従って、本発明の測定方法により、5~10,000 pg/mLの範囲でFGF-23濃度を測定できることが判明した。

#### 【実施例3】

## 【 0 0 7 3 】

人工透析とは、外的な手段で血液の老廃物除去、電解質維持、水分量維持を行うことであるが、体外で循環する血液の凝固を防ぐために抗凝固剤（ヘパリン）を使用している。そのため、透析患者検体では、血清分離後にフィブリンが析出することが多く見られる。血清中に析出したフィブリンが存在すると、F G F - 2 3 の測定系に影響を及ぼし正確な結果を得ることができない可能性がある。

## 【 0 0 7 4 】

正確な測定値が得られているかどうかを判定する方法として、同時再現性試験、添加回収試験、希釈直線性試験がしばしば実施される。そこで、透析患者由来の血清（ディスカバリー・ライフサイエンス社より購入）を用いて、実施例 1 の測定方法について、以下の同時再現性試験、添加回収試験、希釈直線性試験を実施した。

10

## 【 0 0 7 5 】

## ( 1 ) 同時再現性試験

同時再現性試験とは、同一試料（血清、血漿等）を用いて複数回、連続測定し、測定値のばらつきを評価することで、測定法の正確性を判断する方法である。

## 【 0 0 7 6 】

透析患者由来の 3 種類の血清を用いて、実施例 1 に記載された方法により、それぞれの血清中の F G F - 2 3 を 10 重測定した。測定により得られた F G F - 2 3 濃度と平均、変動係数 (CV%) を第 1 表に示した。各血清に対する変動係数は 1.2 ~ 3.1% と良好であった。従って、本発明の方法を用いることにより、透析患者由来の血清中の F G F - 2 3 を再現性良く測定できることが判明した。

20

## 【 0 0 7 7 】

【表 1】

## 第1表

	FGF-23濃度 (pg/mL)		
	患者A	患者B	患者C
	<b>370.4</b>	<b>173.7</b>	<b>1904.6</b>
	<b>366.3</b>	<b>165.6</b>	<b>1895.4</b>
	<b>374.0</b>	<b>170.6</b>	<b>1868.0</b>
	<b>367.1</b>	<b>172.0</b>	<b>1906.8</b>
	<b>372.5</b>	<b>173.5</b>	<b>1946.6</b>
	<b>346.9</b>	<b>164.8</b>	<b>1914.0</b>
	<b>361.7</b>	<b>170.9</b>	<b>1914.3</b>
	<b>345.8</b>	<b>166.4</b>	<b>1899.4</b>
	<b>347.4</b>	<b>172.2</b>	<b>1875.8</b>
	<b>351.4</b>	<b>163.8</b>	<b>1915.3</b>
平均	<b>360.4</b>	<b>169.3</b>	<b>1904.0</b>
CV%	<b>3.1</b>	<b>2.2</b>	<b>1.2</b>

10

20

30

40

【0078】

(2) 添加回収試験

添加回収試験とは、試料（血清、血漿等）に既知濃度の抗原（FGF-23）を添加したものを測定し、実際の添加量と一致するか否かを評価することで、測定法の正確さを判断する方法である。

【0079】

透析患者由来の3種類の血清に、W02003/057733に記載された方法によって製造したFGF-23を様々な濃度で添加したものを測定用試料として用いて、実施例1に記載された方法により測定を行い、添加回収試験を行った。添加回収率を第2表に示した。各血清に対する添加回収率は、96.7~101.6%と良好であった。従って、本発明の測定法を用いることで、透析患者由来の血清中のFGF-23を正確に測定できることが判明した。

【0080】

【表 2】

第2表

	血清中FGF-23 pg/mL	添加FGF-23 pg/mL	添加回収率 %
患者血清1	151.2	27.8	98.1
		87.0	97.7
		260.8	96.7
患者血清2	1583.7	260.8	99.6
		877.4	97.3
		2204.4	100.0
患者血清3	2178.2	260.8	101.6
		877.4	98.0
		2204.4	98.3

10

20

## 【0081】

## (3) 希釈直線性試験

希釈直線性試験とは、試料（血清、血漿等）を適当な希釈液で段階的に希釈し、希釈倍率に応じて測定値が直線的に減少していくか否かを評価することで、測定法の正確さを判断する方法である。

## 【0082】

透析患者由来の2種類の血清（患者血清D，患者血清E）を、0.2%BSA（Bovogen Biologicals社製）を含むリン酸緩衝化生理食塩水で、10段階希釈したもの、及び0.2%BSAを含むリン酸緩衝化生理食塩水（FGF-23濃度 0 pg/mL）を測定用試料に用いて、実施例1に記載された方法により測定を行い、希釈直線性試験を行った。

30

## 【0083】

その際の希釈率（x軸）と測定により決定されたFGF-23濃度（y軸）をプロットしたものを図3及び図4に示した。どちらの透析患者由来の血清においても良好な直線性が得られたことから、本発明の測定法を用いることで、透析患者由来の血清中のFGF-23を正確に測定できることが判明した。

## 【0084】

## [比較例1]

## (1) 材料及び測定方法

## &lt;測定用試料&gt;

健常人より得た血清（FGF-23濃度が20 pg/mLの血清；アリエス社より購入）を、0.2%BSA（Bovogen Biologicals社製）を含むリン酸緩衝化生理食塩水（0.15 mol/L 塩化ナトリウムを含有する10 mmol/L リン酸緩衝液、pH7.2）にてFGF-23濃度が16 pg/mL、14 pg/mL、12 pg/mL、10 pg/mL、8 pg/mL、6 pg/mL、4 pg/mL、2 pg/mLになるように希釈したもの、及び0.2%BSAを含むリン酸緩衝化生理食塩水（FGF-23濃度 0 pg/mL）を測定用試料に用いた。

40

## 【0085】

## (2) 試料中のFGF-23の測定

測定キットとして、プレート法によるFGF-23測定試薬（カイノス社製）を用い、試料として、(1)で調製した測定用試料を用いて、実施例1と同様の方法により、5重

50

測定した。その結果を図5に示す。

【0086】

F G F - 2 3 濃度が0 pg/mLである試料を測定した際の吸光度の平均 + 2SDは0.111 ( 図5の破線 ) であった。F G F - 2 3 濃度が6 pg/mLである試料を測定した際の吸光度の平均 - 2SDは0.104であり、0 pg/mL試料を測定した際の吸光度の平均 + 2SDよりも低い値であったことから、6 pg/mLのF G F - 2 3 濃度は測定できないことを確認した。一方、F G F - 2 3 濃度が8 pg/mLである試料を測定した際の吸光度の平均 - 2SDは0.115であり、0 pg/mL試料を測定した際の吸光度の平均 + 2SDよりも高い値であったことから、8 pg/mLのF G F - 2 3 を測定できることを確認した。よって、この測定法において、F G F - 2 3 を検出できる最小濃度は8 pg/mLであると規定できる。

10

【0087】

[ 比較例 2 ]

F G F - 2 3 測定試薬 ( カイノス社製 ; プレート法 ) を用いて、同試薬に付属した標準溶液 ( F G F - 2 3 濃度 0 pg/mL、10 pg/mL、50 pg/mL、100 pg/mL、250 pg/mL、500 pg/mL、800 pg/mL ) を測定した時の吸光度を図6に示した。10 ~ 800 pg/mLまで、F G F - 2 3 濃度依存的に吸光度が増加していた。F G F - 2 3 測定試薬の測定範囲上限は800 pg/mLと規定されており、これより高濃度のF G F - 2 3 を定量することは出来ない。

【0088】

一方、本発明の方法においては、実施例2に示した通り、5 ~ 10,000 pg/mLまで測定可能であることから、本発明の測定方法は、プレート法よりも、高感度で、測定範囲が広い方法であることが判明した。

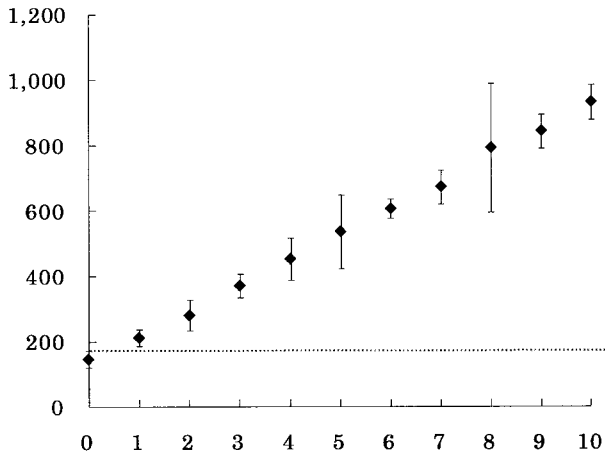
20

【産業上の利用可能性】

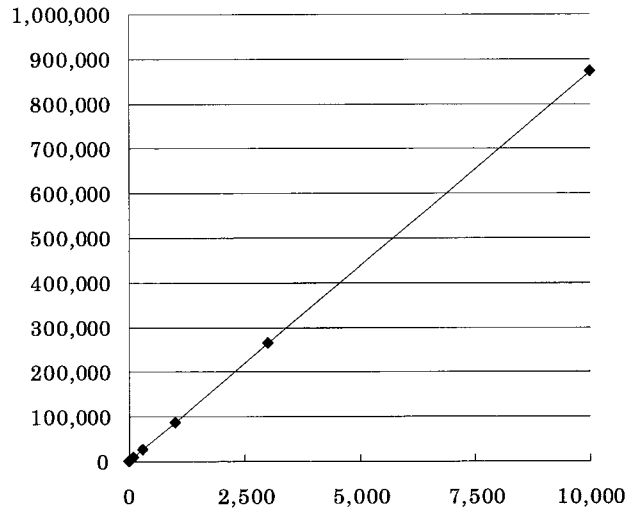
【0089】

本発明により、低リン血症性くる病、腫瘍性骨軟化症、腎不全等の疾患の診断に有効な、高感度で、測定範囲の広い、試料中のF G F - 2 3 の測定方法及び測定試薬が提供される。

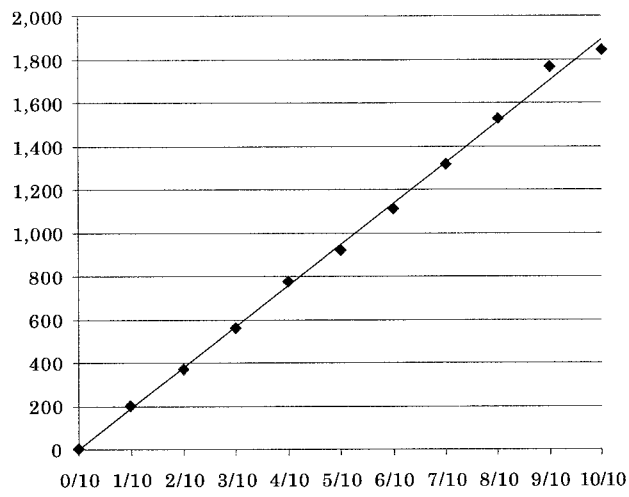
【 図 1 】



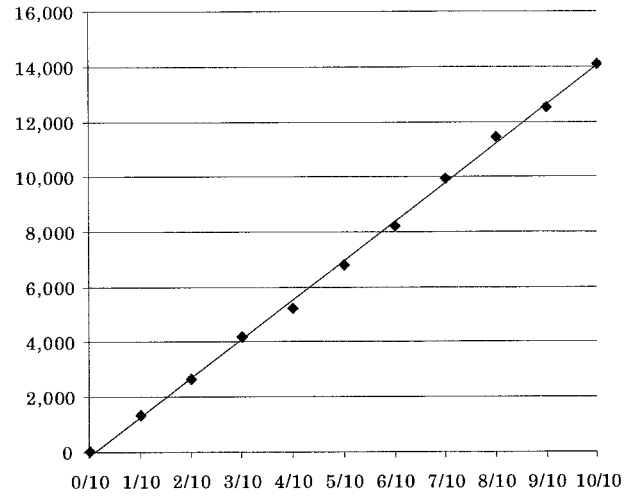
【 図 2 】



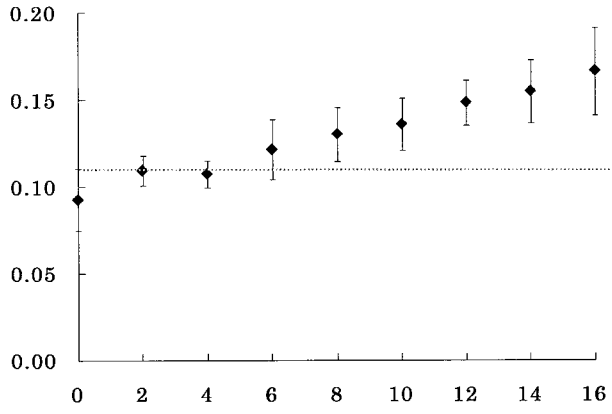
【 図 3 】



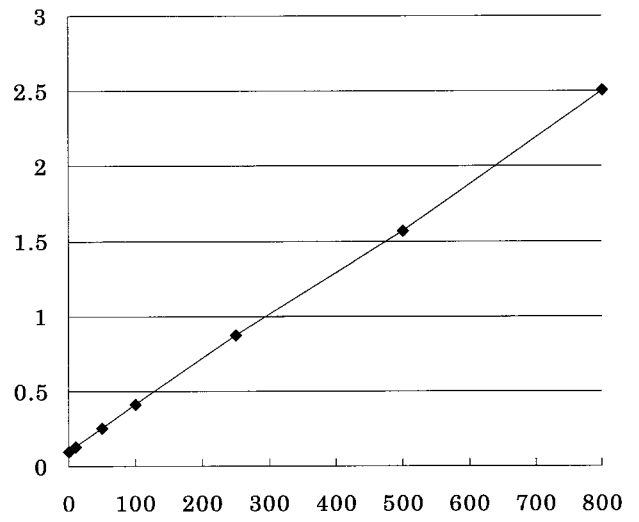
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/069734
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-062087 A (JSR Corp.), 10 March 2005 (10.03.2005), claims; paragraphs [0044] to [0050] (Family: none)	1-10
Y	JP 08-501390 A (Fodstad, Oystein), 13 February 1996 (13.02.1996), entire text; particularly, page 9, line 14 to page 10, line 3 & US 6893881 B1 & US 6184043 B1 & EP 660930 A & WO 1994/007139 A1 & WO 1994/007138 A1 & NO 950918 A & PL 308109 A & FI 951161 A & HU 73741 A & AU 4836393 A & CA 2144328 A & SK 32995 A & AU 2593192 A & CZ 9500659 A & AU 686569 B	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 28 October, 2011 (28.10.11)		Date of mailing of the international search report 08 November, 2011 (08.11.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer  Telephone No.
Facsimile No.		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069734

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-178356 A (Japan Health Sciences Foundation), 12 July 2007 (12.07.2007), entire text; particularly, paragraph [0053] (Family: none)	1-10
Y	JP 2008-017790 A (Hiroshima University, Kabushiki Kaisha Raffinee International), 31 January 2008 (31.01.2008), entire text; particularly, paragraph [0028] (Family: none)	1-10
Y	WO 03/057733 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 17 July 2003 (17.07.2003), entire text & JP 4527982 B                      & US 2005/0048058 A1 & EP 1466925 A1                      & DE 60329070 D & CA 2471656 A                      & HK 1078093 A & AU 2003202472 A                      & CN 1639193 A & AT 441666 T                      & ES 2331414 T	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/069734									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 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. G01N33/53, 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>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011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	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
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 2005-062087 A (JSR株式会社) 2005.03.10, 【特許請求の範囲】、段落【0044】-【0050】等参照 (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 28.10.2011		国際調査報告の発送日 08.11.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 草川 貴史	2J 4075								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/069734
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	JP 08-501390 A (フーツタ, オイスタイン) 1996.02.13, 全文、特に第9頁第14行-第10頁第3行等参照 & US 6893881 B1 & US 6184043 B1 & EP 660930 A & WO 1994/007139 A1 & WO 1994/007138 A1 & NO 950918 A & PL 308109 A & FI 951161 A & HU 73741 A & AU 4836393 A & CA 2144328 A & SK 32995 A & AU 2593192 A & CZ 9500659 A & AU 686569 B	1-10
Y	JP 2007-178356 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2007.07.12, 全文、特に段落【0053】 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2008-017790 A (国立大学法人広島大学、株式会社ラフィーネインター ナショナル) 2008.01.31, 全文、特に段落【0028】等参照 (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 03/057733 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2003.07.17, 全文等参照 & JP 4527982 B & US 2005/0048058 A1 & EP 1466925 A1 & DE 60329070 D & CA 2471656 A & HK 1078093 A & AU 2003202472 A & CN 1639193 A & AT 441666 T & ES 2331414 T	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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 鷓澤 耕治

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

(72) 発明者 鈴木 恵美子

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

(72) 発明者 池田 和幸

東京都中央区晴海一丁目 8 番 1 0 号 協和メデックス株式会社 本社内

(72) 発明者 守田 和樹

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QR90 QS33

(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)	成纤维细胞生长因子-23的测量方法和测量试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2012029837A1</a>	公开(公告)日	2013-10-31
申请号	JP2012531910	申请日	2011-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和メテックス株式会社		
[标]发明人	鷗澤 耕治 鈴木 恵美子 池田 和幸 守田 和樹		
发明人	鷗澤 耕治 鈴木 恵美子 池田 和幸 守田 和樹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/74 G01N2333/50 G01N33/538 G01N33/54333		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/543.545.S G01N33/543.575 G01N33/553 C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR90 4B063/QS33		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2010193213 2010-08-31 JP		
其他公开文献	JP5865838B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种测量样品中成纤维细胞生长因子-23 ( FGF-23 ) 的方法，该方法包括以下步骤。( 1 ) 使样品中的FGF-23与磁性颗粒，与FGF-23结合的第一抗体或其片段和与FGF-23结合的第二抗体或其片段在水性介质中反应，产生免疫复合物的步骤，所述免疫复合物由结合至FGF-23，FGF-23的第一抗体或其片段和结合于磁性颗粒上的FGF-23的第二抗体或其片段组成；( 2 ) 在步骤( 1 ) 之后的反应混合物中通过磁力收集磁性颗粒的步骤，以将通过磁力收集的磁性颗粒与其他组分分离；和( 3 ) 测量在步骤( 2 ) 中分离的磁性颗粒上的免疫复合物的步骤。工业上的可利用性本发明提供灵敏度高，测定范围广的样品中的FGF-23的测定方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	<b>再公表特許 (A1)</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO2012/029837</b>
発行日 平成25年10月31日 (2013.10.31)	(43) 国際公開日 平成24年3月8日 (2012.3.8)	
(51) Int. Cl. <b>G 0 1 N 3 3 / 5 3</b> (2006.01) <b>G 0 1 N 3 3 / 5 4 3</b> (2006.01) <b>G 0 1 N 3 3 / 5 5 3</b> (2006.01) <b>C 1 2 Q 1 / 0 2</b> (2006.01)	F I G O 1 N 3 3 / 5 3 Y G O 1 N 3 3 / 5 4 3 5 4 5 S G O 1 N 3 3 / 5 4 3 5 7 5 G O 1 N 3 3 / 5 5 3 C 1 2 Q 1 / 0 2	テーマコード (参考) 4 B 0 6 3
出願番号 特願2012-531910 (P2012-531910)	(71) 出願人 000162478	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/069734	協和メテックス株式会社	
(22) 国際出願日 平成23年8月31日 (2011.8.31)	東京都中央区晴海一丁目8番10号	
(31) 優先権主張番号 特願2010-193213 (P2010-193213)	(74) 代理人 弁理士 清水 初志	
(32) 優先日 平成22年8月31日 (2010.8.31)	弁理士 春名 雅夫	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	弁理士 山本 裕孝	
	弁理士 刑部 俊	
	弁理士 井上 隆一	
	弁理士 佐藤 利光	