

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6660933号
(P6660933)

(45) 発行日 令和2年3月11日(2020.3.11)

(24) 登録日 令和2年2月13日(2020.2.13)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	Z N A B
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 J
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
C O 7 K 16/18	(2006.01)	C O 7 K 16/18	
C O 7 K 14/245	(2006.01)	C O 7 K 14/245	

請求項の数 13 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2017-502492 (P2017-502492)	(73) 特許権者	390037327
(86) (22) 出願日	平成28年2月25日 (2016.2.25)		積水メディカル株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/055728		東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(87) 国際公開番号	W02016/136917	(74) 代理人	110000774
(87) 国際公開日	平成28年9月1日 (2016.9.1)		特許業務法人 もえぎ特許事務所
審査請求日	平成30年10月18日 (2018.10.18)	(72) 発明者	小林 幸司
(31) 優先権主張番号	特願2015-35903 (P2015-35903)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水
(32) 優先日	平成27年2月25日 (2015.2.25)		メディカル株式会社内
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(72) 発明者	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

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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

粒子免疫凝集測定法を利用して、試料中の L - F A B P (肝臓型脂肪酸結合蛋白質) を、抗 L - F A B P 抗体により検出する方法であって、

L - F A B P の存在が疑われる試料、

不溶性担体粒子に固定化された抗 L - F A B P 抗体、

分子内に NH₂ - C = N - の部分構造を有する化合物、及び

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 (以下、D n a K 4 1 9 - 6 0 7 と略称する。) 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 (以下、D n a K 4 1 9 - 6 0 7 ホモログと略称する。)

10

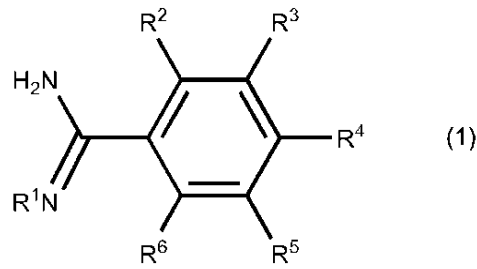
を接触させる工程を含む前記方法；

ここで、D n a K 4 1 9 - 6 0 7 及び D n a K 4 1 9 - 6 0 7 ホモログの濃度は、0.01 ~ 5% (w / v %) であり、

分子内に NH₂ - C = N - の部分構造を有する化合物は、下記式 (1) で表される化合物もしくはその塩又はエステル、下記式 (2) で表される化合物又はその塩から選ばれる、一種又は二種以上である；

式 (1)

【化1】

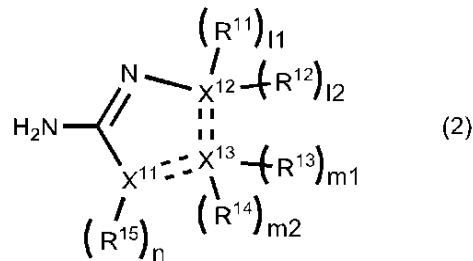


10

[式(1)中、 R^1 は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基であり、 $R^2 \sim R^6$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基、水酸基、カルボキシ基、アミノ基又は $-SR^7$ (R^7 は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^7 が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)を示す];

式(2)

【化2】



20

[式(2)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基、アミノ基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基又は $-SR^{16}$ (R^{16} は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^{16} が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)であり、ここで、 R^{11} と R^{12} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{13} と R^{14} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{15} は、水素原子、ハロゲン原子又は分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基であり、

30

X^{11} は、窒素原子又は硫黄原子であり、

X^{12} 及び X^{13} は、それぞれ独立して、炭素原子又は窒素原子であり、

l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n は、それぞれ独立して、0又は1であり、

X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は、それぞれ独立して、単結合又は二重結合であり、ここで、

40

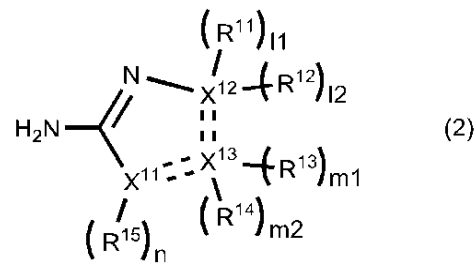
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価と整合して定まる値及び結合を示す]。

【請求項2】

式(2)で表される化合物又はその塩が、以下の化合物又はその塩から選ばれる、一種又は二種以上である請求項2に記載の方法。

式(2)

【化3】



10

[式(2)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基、アミノ基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基又は $-SR^{16}$ (R^{16} は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^{16} が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)であり、ここで、 R^{11} と R^{12} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{13} と R^{14} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、

R^{15} は、水素原子、ハロゲン原子又は分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基を示す]において、

$X^{11} \sim X^{13}$ 、 l_1+l_2 、 m_1+m_2 、 n (l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n は、それぞれ独立して、0又は1を表す)及び二重破線の組み合わせは、

20

(a) X^{11} は硫黄原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は2、 m_1+m_2 は2、 n は0であり、 X^{11} と X^{13} との間及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、

(b) X^{11} は硫黄原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は1、 m_1+m_2 は1、 n は0であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合であるか、

(c) X^{11} は窒素原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は2、 m_1+m_2 は2、 n は1であり、 X^{11} と X^{13} との間及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、

30

(d) X^{11} は窒素原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は1、 m_1+m_2 は1、 n は1であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合であるか、

(e) X^{11} 及び X^{12} は窒素原子、 X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は1、 m_1+m_2 は1、 n は0であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は二重結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、又は、

(f) X^{11} 及び X^{12} 及び X^{13} は窒素原子であり、 l_1+l_2 は0、 m_1+m_2 は0、 n は1であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合、である。

【請求項3】

40

分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物が、ベンズアミジン、2-アミノ-2-チアゾリンのいずれかであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

L-FABPの存在が疑われる試料、不溶性担体粒子に固定化された抗L-FABP抗体、分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物、及びDnaK419-607又はDnaK419-607ホモログ(以下、DnaK419-607及びDnaK419-607ホモログを併せて、「前記ポリペプチド」と総称する。)とを接触させる工程が、

L-FABPの存在が疑われる試料と前記化合物と前記ポリペプチドを接触させる工程の後、不溶性担体粒子に固定化された抗L-FABP抗体と接触させる工程の順で行われ

50

る請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

L - F A B P の存在が疑われる試料と前記化合物と前記ポリペプチドを接触させる工程における、前記ポリペプチドの濃度が、 $0.04 \text{ mmol/L} \sim 1.36 \text{ mmol/L}$ である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

抗 L - F A B P 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。

【請求項 7】

粒子が、ラテックス粒子である、請求項 1 ~ 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

互いに認識部位が異なる二種以上の抗 L - F A B P 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 L - F A B P を検出する、請求項 6 又は 7 に記載の方法

【請求項 9】

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の、一方のモノクローナル抗体は標識物質で標識されており、他方のモノクローナル抗体は固相に固定化されており、イムノクロマトグラフィーにより L - F A B P を検出する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

試料が、尿、全血、血清又は血漿である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 11】

試料中の L - F A B P を、抗 L - F A B P 抗体により検出するための粒子免疫凝集測定法用試薬であって、不溶性担体粒子に固定化された抗 L - F A B P 抗体、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物、及び配列番号 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 (以下、DnaK 419 - 607 と略称する。) 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 (以下、DnaK 419 - 607 ホモログと略称する。) を含む前記試薬：

ここで、DnaK 419 - 607 及び DnaK 419 - 607 ホモログの濃度は、 $0.01 \sim 5\%$ (w/v%) である。

30

【請求項 12】

試料中の L - F A B P を粒子免疫凝集測定法により検出する方法において、L - F A B P を含むことが疑われる試料と測定用試薬との混合液中に、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物及び配列番号 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 (以下、DnaK 419 - 607 と略称する。) 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 (以下、DnaK 419 - 607 ホモログと略称する。) が含まれていることを特徴とする、L - F A B P 健常値付近における非特異反応の回避方法：

ここで、DnaK 419 - 607 及び DnaK 419 - 607 ホモログの濃度は、 $0.01 \sim 5\%$ (w/v%) である。

40

【請求項 13】

試料中の L - F A B P を粒子免疫凝集測定法により検出する方法において、L - F A B P を含むことが疑われる試料と測定用試薬との混合液中に、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物及び配列番号 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 (以下、DnaK 419 - 607 と略称する。) 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 (以下、DnaK 419 - 607 ホモログと略称する。) が含まれていることを特徴とする、L - F A B P 健常値付近における測定値を安定化させる方法：

50

ここで、D n a K 4 1 9 - 6 0 7 及び D n a K 4 1 9 - 6 0 7 ホモログの濃度は、0 . 0 1 ~ 5 % (w / v %) である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 L - F A B P 抗体を用いた、L - F A B P の免疫学的測定方法及び該方法に用いられる測定試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

脂肪酸結合蛋白質 (F A B P : fatty acid binding protein) は、サイトゾルに存在し、脂肪酸と結合する能力を有する分子量約 1 4 キロダルトンの蛋白質群で、肝臓型 (L - F A B P) 、腸型 (I - F A B P) 、心筋型 (H - F A B P) 、脳型 (B - F A B P) 、皮膚型 (C - F A B P / E - F A B P) 、脂肪細胞型 (a P 2) 、末梢神経細胞型 (ミエリン P 2) 等、少なくとも 7 つの分子種が知られており、これらは共通の祖先遺伝子から進化したファミリーであると考えられている。各型の F A B P は特異的な組織分布を示す一方で、その名称は、最初に見出された組織を意味しており、その組織にしか存在しないことを必ずしも意味していない。例えば、ヒトの腎臓組織中では、肝臓型 (L - F A B P) と心筋型 (H - F A B P) の少なくとも二種類の F A B P が発現しており、これらのうち L - F A B P は近位尿細管に分布し、H - F A B P は主として遠位尿細管に分布している (Maatman ら、Biochemical Journal、第 288 巻、第 285-290 頁、1992 年 ; Maatman ら、Biochemical Journal、第 273 巻、第 759-766 頁、1991 年) 。

【0003】

L - F A B P は、組織障害が進行する前の尿細管の虚血 (血流不全) や尿細管への酸化ストレスにより、尿中に排泄される。尿中 L - F A B P は、ヒト腎生検組織の間質尿細管障害の程度と相関し、尿細管障害を反映するマーカーである (Kamijo ら、Am J Pathol、第 165 巻、第 4 号、第 1243-1255 頁、2004 年) 。腎疾患の進行及び予後は、糸球体病変の程度より間質尿細管障害の程度と相関することが、古くから知られており (Risdon ら、Lancet、第 2 巻、第 363-366 頁、1968 年) 、尿細管障害のマーカーである尿中 L - F A B P は、腎疾患の予後を推測するのに有用である。

【0004】

特許文献 1 には、腎組織中における L - F A B P の発現と腎疾患の予後との関連性に着目し、被検試料中に存在する、腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質を検出することを特徴とする、腎疾患の検査方法が開示されている。より具体的には、抗マウス L - F A B P ポリクローナル抗体を用い、腎疾患患者から採取した尿をサンプルとして、尿中に漏出している L - F A B P 量を免疫学的測定法であるサンドイッチ E L I S A により測定した例が記載されている。免疫学的測定法においては、反応系の微量化や測定時間の短縮、測定感度を向上させることなどが重要な課題であり、L - F A B P の測定においても測定感度の向上が望まれる。しかし、特許文献 1 には、詳細な測定条件 (試料の処理や抗原抗体反応の条件) や検出感度、測定値等については記載されていない。

【0005】

免疫測定法の測定感度を向上させる方法としては、測定領域の検出上限を上げる方法と、検出下限を下げる方法がある。免疫測定法は、特異性の高さと感度の良さを特徴としているが、一方で抗原と抗体の特異的な反応の検出を妨害する種々の干渉が存在することも知られている。これらの干渉による非特異反応は測定値の正確性を損ね、真値とは異なる測定値を示すという問題がある。検出下限を下げて高感度化する (低濃度域まで正確に測定する) には、上記のような非特異反応を抑える必要がある。

【0006】

特許文献 2 には、非特異反応を抑制し、特に低濃度領域にて既存試薬を用いた場合の測定結果との相関を向上させることを目的として、ポリカルボン酸型界面活性剤の存在下で

10

20

30

40

50

抗原抗体反応及び / 又は測定を行う免疫学的測定法が示されている。

【 0 0 0 7 】

また、特許文献 3 には、ブランクの測定値のばらつきを抑え且つブランク測定値を低下させ、被検物質の低濃度域における測定精度を高める目的で、反応系内にポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩及びポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルを共存させる免疫学的測定法が示されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 特開平 1 1 - 2 4 2 0 2 6 号公報

10

【 特許文献 2 】 特開 2 0 1 3 - 2 0 5 4 0 8 号公報

【 特許文献 3 】 国際公開 W O 2 0 1 0 / 1 1 3 9 4 3 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 】

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、L - F A B P の免疫学的測定において非特異反応が発生する可能性を低下させ、より正確で感度の良い測定法を提供することにある。さらに詳しくは、測定対象物が低濃度（例えば、L - F A B P 濃度が健常値付近）の場合であっても、正確で感度のよい測定方法を提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

20

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、鋭意検討の結果、抗 L - F A B P 抗体を用いた L - F A B P の免疫学的測定方法において、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 4 1 9 番目から 6 0 7 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 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを存在させることによって、高感度な測定であっても容易に非特異反応を抑制できることを見出した。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は以下の構成からなる。

[1]

30

試料中の L - F A B P（肝臓型脂肪酸結合蛋白質）を抗 L - F A B P 抗体により検出する方法、又は、試料中の L - F A B P（肝臓型脂肪酸結合蛋白質）を抗 L - F A B P 抗体により検出する方法において測定値を安定化させる方法であって、

L - F A B P の存在が疑われる試料、

抗 L - F A B P 抗体が固定化された粒子、

分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物、及び

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 4 1 9 番目から 6 0 7 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 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチド、

を接触させる工程を含む前記方法。

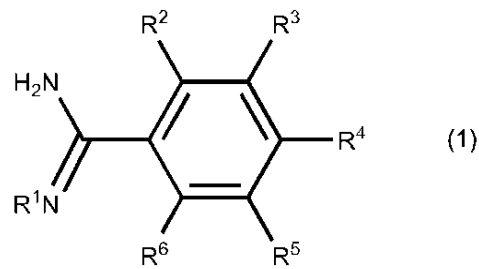
40

[2]

分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物が、下記式（1）で表される化合物もしくはその塩又はエステル、下記式（2）で表される化合物又はその塩から選ばれる、一種又は二種以上である [1] に記載の方法。

式（1）

【化1】

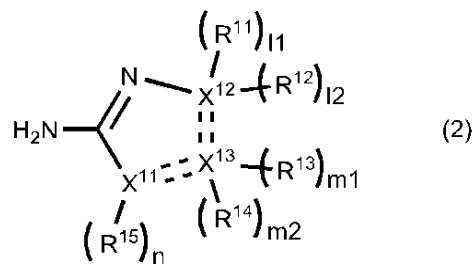


10

〔式(1)中、 R^1 は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基であり、 $R^2 \sim R^6$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基、水酸基、カルボキシ基、アミノ基又は $-SR^7$ (R^7 は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^7 が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)を示す]の化合物もしくはその塩又はエステル。

式(2)

【化2】



20

〔式(2)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基、アミノ基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基又は $-SR^{16}$ (R^{16} は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^{16} が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)であり、ここで、 R^{11} と R^{12} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{13} と R^{14} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、

30

R^{15} は、水素原子、ハロゲン原子又は分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基であり、

X^{11} は、窒素原子又は硫黄原子であり、

X^{12} 及び X^{13} は、それぞれ独立して、炭素原子又は窒素原子であり、

l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n は、それぞれ独立して、0又は1であり、

X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は、それぞれ独立して、単結合又は二重結合であり、ここで、

40

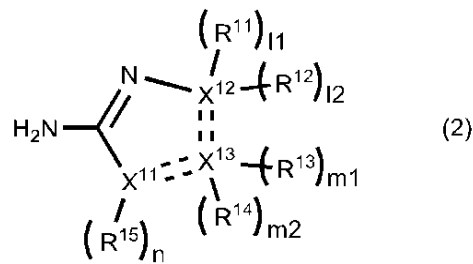
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価と整合して定まる値及び結合を示す]化合物又はその塩。

〔3〕

式(2)で表される化合物又はその塩が、以下の化合物又はその塩から選ばれる、一種又は二種以上である〔2〕に記載の方法。

式(2)

【化3】



10

[式(2)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基、アミノ基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基又は $-SR^{16}$ (R^{16} は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^{16} が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)であり、ここで、 R^{11} と R^{12} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{13} と R^{14} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、

R^{15} は、水素原子、ハロゲン原子又は分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基を示す]において、

$X^{11} \sim X^{13}$ 、 l_1+l_2 、 m_1+m_2 、 n (l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n は、それぞれ独立して、0又は1を表す)及び二重破線の組み合わせは、

20

(a) X^{11} は硫黄原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は2、 m_1+m_2 は2、 n は0であり、 X^{11} と X^{13} との間及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、

(b) X^{11} は硫黄原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は1、 m_1+m_2 は1、 n は0であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合であるか、

(c) X^{11} は窒素原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は2、 m_1+m_2 は2、 n は1であり、 X^{11} と X^{13} との間及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、

30

(d) X^{11} は窒素原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は1、 m_1+m_2 は1、 n は1であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合であるか、

(e) X^{11} 及び X^{12} は窒素原子、 X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は1、 m_1+m_2 は1、 n は0であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は二重結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、又は、

(f) X^{11} 及び X^{12} 及び X^{13} は窒素原子であり、 l_1+l_2 は0、 m_1+m_2 は0、 n は1であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合、である化合物又はその塩。

[4]

40

分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物が、ベンズアミジン、2-アミノ-2-チアゾリンのいずれかであることを特徴とする、[1]に記載の方法。

[5]

L-FABPの存在が疑われる試料、抗L-FABP抗体、分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物、及び配列番号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とを接触させる工程が、

L-FABPの存在が疑われる試料と前記化合物と前記ポリペプチド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で行われる[1]~[4]のいずれかに

50

記載の方法。

[6]

L - F A B P の存在が疑われる試料と前記化合物と前記ポリペプチドを接触させる工程における、前記ポリペプチドの濃度が、 $0.04 \text{ mmol/L} \sim 1.36 \text{ mmol/L}$ である [5] に記載の方法。

[7]

抗 L - F A B P 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] ~ [6] に記載の方法。

[8]

粒子が、ラテックス粒子である、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法。

10

[9]

互いに認識部位が異なる二種以上の抗 L - F A B P 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 L - F A B P を検出する、[7] 又は [8] に記載の方法

[10]

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の、一方のモノクローナル抗体は標識物質で標識されており、他方のモノクローナル抗体は固相に固定化されており、イムノクロマトグラフィーにより L - F A B P を検出する、[7] に記載の方法。

[11]

試料が、尿、全血、血清又は血漿である、[1] ~ [10] のいずれかに記載の方法。

20

[12]

試料中の L - F A B P を、抗 L - F A B P 抗体により検出するための粒子免疫測定法用試薬であって、抗 L - F A B P 抗体、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物、及び配列番号 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 4 1 9 番目から 6 0 7 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 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む前記試薬。

[13]

試料中の L - F A B P を粒子免疫測定法により検出する方法において、L - F A B P を含むことが疑われる試料と測定用試薬との混合液中に、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物及び配列番号 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 4 1 9 番目から 6 0 7 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 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドが含まれていることを特徴とする、L - F A B P 健常値付近における非特異反応の回避方法。

30

[14]

試料中の L - F A B P を粒子免疫測定法により検出する方法において、L - F A B P を含むことが疑われる試料と測定用試薬との混合液中に、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物及び配列番号 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 4 1 9 番目から 6 0 7 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 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドが含まれていることを特徴とする、L - F A B P 健常値付近における測定値を安定化させる方法。

40

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、高感度な免疫学的測定法においても反応系由来の非特異反応を抑制することができるため、より正確で感度の良い免疫学的測定法を提供することができる。例えば、尿中 L - F A B P 測定における健常値 (例えば、 $2.2 \pm 2.3 \mu\text{g/g CR}$ 。レナプロ (登録商標) L - F A B P テスト T M B 添付文書より) 付近の検体をより正確に測定することができる。

50

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明を詳述する。

【0014】

(試料)

本発明に用いる試料としては、尿、血液(全血、血漿又は血清)、腎組織、腎組織からの抽出液等が挙げられる。これらのうち、特に尿が好適な試料である。L-FABP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。

【0015】

(抗L-FABP抗体)

本発明に用いる抗L-FABP抗体は、臓器、細胞、体液等から精製した天然のL-FABPを免疫原(抗原)として調製することができる。L-FABP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-FABP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90%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-FABPと結合する抗体を得るために、例えばマウスL-FABPを抗原として用いることもできる。

【0016】

天然のL-FABP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-FABPを含有する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。

【0017】

抗原として用いるL-FABP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-FABP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cDNAライブラリ等からcDNA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-FABPを調製することができる。また、抗原として、L-FABP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(BSA、ヘモシアニン等)と結合させて用いることもできる。

【0018】

L-FABP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。

【0019】

抗体は、高い特異性を有するものが好ましく、例えば、抗L-FABP抗体であれば、H-FABP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100 μ g~1mg程度を約1mL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7~12日後に産生された抗体を使用する。マウスの

10

20

30

40

50

場合、1回あたり10～30 µg/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。

【0020】

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Ig画分を回収して調製できる。例えば、抗血清からProtein 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IgG画分を回収してポリクローナルIgGを得ることができる。

【0021】

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10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10⁶個/mLの細胞密度で好適に実施できる。

【0022】

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、HAT（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ELISA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する。モノクローナル抗体のクラスとしては一般にIgGが好ましい。

【0023】

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。

【0024】

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（

10

20

30

40

50

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。これらの抗体は、ヒト由来L-FABP蛋白質の内部領域やN末端領域等のポリペプチドと結合するが、本発明の分子内にNH₂-C=N-の部分構造及び環状構造を有する化合物を用いれば、抗体がL-FABP分子の内部領域と結合する場合であっても、より高感度、より特異的にL-FABPを検出することが可能である。

【0025】

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、Fab'₂、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。

【0026】

(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、免疫学的測定法である。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、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学的測定法(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

10

20

【0027】

(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)等、採用する測定法に応じた任意の形状を選択できる。

【0028】

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。

30

担体粒子の粒子径としては、0.15~0.45µm程度が好ましく、より好ましくは、0.2~0.4µm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。

【0029】

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。

40

【0030】

(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

50

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。

また、抗 L - F A B P 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。

【 0 0 3 1 】

なお、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。

10

【 0 0 3 2 】

(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、ピリジリジスルフィド法、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。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。

20

【 0 0 3 3 】

(分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造及び環状構造を有する化合物)

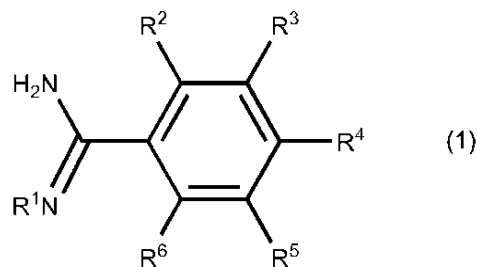
本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物は、さらに環状構造を有することができ、式 (1) 及び式 (2) で表される (本明細書において、「式 (1) の化合物」、「式 (2) の化合物」ということがある) 。

【 0 0 3 4 】

式 (1) の化合物は、

30

【 化 4 】



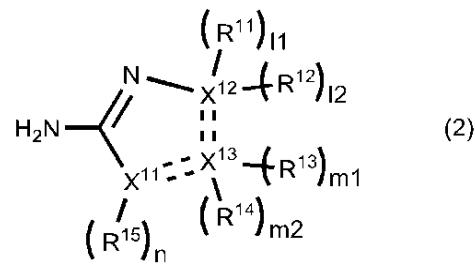
40

[式 (1) 中、 R^1 は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数 1 ~ 3 のアルキル基であり、 $\text{R}^2 \sim \text{R}^6$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数 1、2 又は 3 のアルキル基、水酸基、カルボキシ基、アミノ基又は $-\text{SR}^7$ (R^7 は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数 1、2 又は 3 のアルキル基を表す。 R^7 が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。) を示す] の化合物もしくはその塩又はエステルである。

【 0 0 3 5 】

式 (2) の化合物は、

【化5】



10

〔式(2)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基、アミノ基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基又は $-SR^{16}$ (R^{16} は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^{16} が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)であり、ここで、 R^{11} と R^{12} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{13} と R^{14} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、

R^{15} は、水素原子、ハロゲン原子又は分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基であり、

X^{11} は、窒素原子又は硫黄原子であり、

20

X^{12} 及び X^{13} は、それぞれ独立して、炭素原子又は窒素原子であり、

l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n は、それぞれ独立して、0又は1であり、

X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は、それぞれ独立して、単結合又は二重結合であり、ここで、

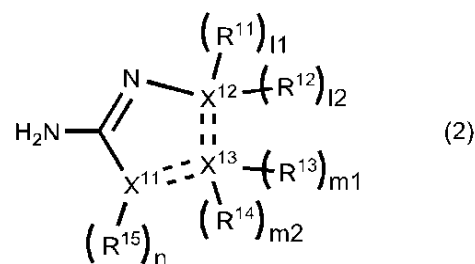
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価と整合して定まる値及び結合を示す]化合物又はその塩である。

【0036】

さらに式(2)の化合物は、

【化6】

30



40

〔式(2)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基、アミノ基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基又は $-SR^{16}$ (R^{16} は、水素原子、水酸基又は分岐していてもよい炭素数1、2又は3のアルキル基を表す。 R^{16} が複数存在するときは、それぞれ同じ基であっても異なる基であってもよい。)であり、ここで、 R^{11} と R^{12} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、 R^{13} と R^{14} の両方が存在する場合はそれぞれ一緒になってカルボニル基を形成していてもよく、

R^{15} は、水素原子、ハロゲン原子又は分岐していてもよい炭素数が1、2又は3のアルキル基を示す]において、

$X^{11} \sim X^{13}$ 、 l_1+l_2 、 m_1+m_2 、 n (l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n は、それぞれ独立して、0又は1を表す)及び二重破線の組み合わせは、

50

(a) X^{11} は硫黄原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は 2、 m_1+m_2 は 2、 n は 0 であり、 X^{11} と X^{13} との間及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、

(b) X^{11} は硫黄原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は 1、 m_1+m_2 は 1、 n は 0 であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合であるか、

(c) X^{11} は窒素原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は 2、 m_1+m_2 は 2、 n は 1 であり、 X^{11} と X^{13} との間及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、

(d) X^{11} は窒素原子、 X^{12} 及び X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は 1、 m_1+m_2 は 1、 n は 1 であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合であるか、

(e) X^{11} 及び X^{12} は窒素原子、 X^{13} は炭素原子であり、 l_1+l_2 は 1、 m_1+m_2 は 1、 n は 0 であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は二重結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は単結合であるか、又は、

(f) X^{11} 及び X^{12} 及び X^{13} は窒素原子であり、 l_1+l_2 は 0、 m_1+m_2 は 0、 n は 1 であり、 X^{11} と X^{13} との間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} との間の二重破線は二重結合、である化合物又はその塩である。

【0037】

式(1)で表される化合物の例としては、ベンズアミジン誘導体が挙げられ、また、式(2)で表される化合物の例としては、アミノチアゾール誘導体、アミノトリアゾール誘導体、アミノテトラゾール誘導体、アミノイミダゾール誘導体が挙げられる。各分子内に $NH_2-C=N-$ の部分構造を有する化合物の塩としては、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、臭化水素塩、ふっ化水素酸塩、ほうふっ化水素酸塩、しゅう酸塩、乳酸塩、アジピン酸塩、酒石酸塩、よう化水素酸塩、トルエンスルホン酸塩、マロン酸塩、重炭酸塩等特に制限は無く、本発明の効果以外に試薬としての取扱い易さや入手のしやすさ等を勘案して適宜選ぶことができる。

さらに詳しい式(1)の化合物としては、ベンズアミジン塩酸塩(CAS番号:1670-14-0)、ベンズアミジン塩酸塩水和物(CAS番号:206752-36-5)、4-フルオロベンズアミドオキシム(CAS番号:69113-32-2)、4-クロロベンズアミジン塩酸塩(CAS番号:14401-51-5)が挙げられる。さらに詳しい式(2)の化合物としては、アミノチアゾリン(CAS番号:1779-81-3)、2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩(CAS番号:3882-98-2)、プソイドチオヒダントイン(CAS番号:556-90-1)、2-アミノ-5-プロモチアゾール臭化水素酸塩(CAS番号:61296-22-8)、2-アミノ-4,5-ジメチルチアゾール臭化水素酸塩(CAS番号:7170-76-5)、2,4-ジアミノ-5-フェニルチアゾール臭化水素酸塩(CAS番号:6020-54-8)が挙げられる。これらの中でも、ベンズアミジン塩酸塩、2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩が特に好ましい。

【0038】

さらに、本発明の分子内に $NH_2-C=N-$ の部分構造を有する化合物としては、グアニジノ基($H_2N-(C=NH)-NH-R$)を有する化合物が挙げられる。Rは、水素原子、アミノ基、フェニル基、アルキル基、カルボキシアルキル基、置換もしくは非置換アミノアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボキシアルキル基、置換もしくは非置換アミノカルボニルアルキル基、スルホニル基等である化合物又はその塩である。前記アルキル基としては、直鎖又は分枝上の炭素数が1, 2, 3, 4, 5又は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, 2, 3, 4, 5又は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。

【0039】

前記グアニジノ基を持つ化合物の例としては、グアニジン塩又はその誘導体が挙げられる。さらに具体的な例としては、グアニジン(CAS番号:113-00-8)、グアニジンスルフ

10

20

30

40

50

アミン酸塩 (CAS番号: 50979-18-5)、アミノグアニジン (CAS番号: 79-17-4) が挙げられる。

【0040】

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いることもできる。

【0041】

(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 と呼称される。以下「BPF」ということがある。) は、分子量約 22000 のペプチドで、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 WO 2005 / 003 155 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、WO 2005 / 003 155 号パンフレットの記載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。

【0042】

(L-FABP の存在が疑われる試料、抗 L-FABP 抗体、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物、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、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物、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前記化合物と 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前記化合物及び / 又は BPF とを接触させる方法としては、例えば前記化合物及び / 又は 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、前記化合物及び / 又は BPF を浸潤させた多孔性メンブレン等の不溶性担体に、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。なお、前記化合物と BPF は、必ずしも同時に L-FABP の存在が疑われる試料と接触しなくてもよい。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。

さらに試料中の L-FABP は、前記化合物及び / 又は 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。

また、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物を試料と接触させる方法としては、試料の希釈液、試料の抽出液、あるいは試料の保存液、展開液などとして接触させる方法も含まれる。

【0043】

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物の濃度の好ましい範囲としては、 $50 \text{ mmol} / \text{L} \sim 1000 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $50 \text{ mmol} / \text{L} \sim 500 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $50 \text{ mmol} / \text{L} \sim 600 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $100 \text{ mmol} / \text{L} \sim 900 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $200 \text{ mmol} / \text{L} \sim 800 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $300 \text{ mmol} / \text{L} \sim 600 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $300 \text{ mmol} / \text{L} \sim 550 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $300 \text{ mmol} / \text{L} \sim 500 \text{ mmol} / \text{L}$ 、 $350 \text{ mmol} / \text{L} \sim 450 \text{ mmol} / \text{L}$ が挙げられ、好ましくは $50 \text{ mmol} / \text{L} \sim 500 \text{ mmol} / \text{L}$ である。使用する分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物毎の最適な濃度は、本明細書の記載に従って実験的に求めることができる。

【0044】

BPF の濃度好ましい範囲としては、 $0.01 \sim 5\%$ 、 $0.02 \sim 5\%$ 、 $0.03 \sim 5\%$ 、 $0.04 \sim 5\%$ 、 $0.05 \sim 5\%$ 、 $0.1 \sim 5\%$ 、 $0.2 \sim 5\%$ 、 $0.3 \sim 5\%$ 、 $0.4 \sim 5\%$ 、 $0.75 \sim 5\%$ 、 $1 \sim 5\%$ 、 $1 \sim 4\%$ 、 $1 \sim 3\%$ が挙げられ、好適には、 0

10

20

30

40

50

． 05 ~ 5 %、より好適には 0.075 ~ 5 %、さらに好適には 0.1 ~ 3 % (いずれも w/v %) を例示することができる。当業者であれば、実験的に最適な B P F の濃度を決定することができる。

また、例えば、分子量約 22000 の B P F - 301 を用いた場合、0.0045 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.0090 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.013 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.018 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.022 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.045 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.090 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.13 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.18 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.22 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.45 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、0.45 mmol/L ~ 1.81 mmol/L、0.45 mmol/L ~ 1.36 mmol/L が挙げられ、好適には、0.022 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、より好適には、0.034 mmol/L ~ 2.27 mmol/L、さらに好適には 0.045 mmol/L ~ 1.36 mmol/L となる。

【0045】

(測定キット)

本発明により提供される、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物以外の、測定キットの構成物は、L - F A B P 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、イムノクロマトグラフィー及び L T I A を例にそれぞれを説明する。

【0046】

(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 - F A B P 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。

【0047】

具体的には、L - F A B P 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 - F A B P 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 - F A B P - 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 - F A B P の存在を検出することができる。

【0048】

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物及び / 又は 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。

【0049】

(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。

【0050】

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

10

20

30

40

50

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ラテックス粒子に代えて使用することもできる。

【 0 0 5 1 】

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。上記の抗体を固定化した二種類のラテックス粒子は、その両方又は一方を、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の両方を第二試薬に含有させることが好適であるが、一方を第一試薬、他方を第二試薬に含有させることも可能である。

【 0 0 5 2 】

本発明の分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物及び / 又は B P F は、第一試薬に含まれていることが好ましい。本発明の分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物及び / 又は B P F を含む第一試薬と試料とを混合することにより、試料中の L - F A B P と本発明の分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造を有する化合物及び / 又は B P F が接触する。

【 0 0 5 3 】

本発明のキットは、それぞれ上記の他に、適宜緩衝成分 (緩衝液) を含む。本発明に用いることが出来る緩衝液としては、一般的に使用されるものであればよく、例えばトリス塩酸、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸、フタル酸、グルタル酸、マレイン酸、グリシン及びそれらの塩等や、M E S、B i s - T r i s、A D A、P I P E S、A C E S、M O P S O、B E S、M O P S、T E S、H E P E S 等のグット緩衝液等が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

また、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、P r o C l i n 3 0 0 等) が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

さらに、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リ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、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、リコンビナント 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ビナント蛋白質を用いることがより好ましい。

【 実施例 】

【 0 0 5 6 】

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 7 】

(抗L-FABP抗体固定化ラテックス粒子懸濁液)

(1) Clone L抗体固定化ラテックス粒子懸濁液の調製

抗L-FABP抗体 Clone L (シミックホールディングス社製) を0.64 mg/mL含む20 mmol/L Tris緩衝液(pH 8.5) 13 mLに、平均粒径0.212 μmの1%ラテックス粒子(積水化学工業社製)懸濁液13 mLを加え、4℃にて2時間攪拌した。これに、0.5% BSAを含む20 mmol/L Tris緩衝液(pH 8.5) 13 mLを加え、4℃で1時間攪拌した。その後、5 mmol/L MOPS緩衝液(pH 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-FABP抗体 Clone 1 (シミックホールディングス社製) を0.64 mg/mL含む5 mmol/L Tris緩衝液(pH 7.5) 8 mLに、平均粒径0.315 μmの1%ラテックス粒子(積水化学工業社製)懸濁液8 mLを加え、4℃にて2時間攪拌した。これに、0.5% BSAを含む5 mmol/L Tris緩衝液(pH 7.5) 8 mLを加え、4℃で1時間攪拌した。その後、5 mmol/L MOPS緩衝液(pH 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。

【0058】

(L-FABP標準物質)

L-FABP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。

【0059】

(L-FABP基準測定方法：基準方法)

ELISAによる体外診断用医薬品(レナプロ(登録商標)L-FABPテストTM B)を基準方法とした。

【0060】

(対照第一試薬：標準物質希釈液を兼ねる)

300 mmol/L Bis-Tris緩衝液(pH 6.9)

100 mmol/L NaCl

0.47~0.57% Lipidure-BL403SE

(第二試薬)

5 mmol/L MOPS緩衝液(pH 7.0)

3.75 Abs/mL Clone L抗体固定化ラテックス粒子懸濁液(注)

3.75 Abs/mL Clone 1抗体固定化ラテックス粒子懸濁液(注)

(注) Absは280 nmにおける吸光度を示す。

(標準液)

L-FABP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、-30℃で凍結保存されていた部分尿(n=32、基準法での測定値0.3~4.6 ng/mL)を、一度だけ融解して測定に使用した。

【0061】

(LTI Aの測定条件)

(1) 分析装置：日立7170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 μL、第一試薬150 μL、第二試薬50 μL

(3) 反応時間(反応温度)：第一試薬5分(37℃)、第二試薬5分(37℃)

(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

【0062】

[実施例1] BPFによるL-FABP濃度が健常値付近の検体における非特異反応抑制効果の確認1

第一試薬に添加する蛋白質が、添加なし(対照例1)、BSA(比較例1)、0.1% BPF(実施例1)の場合の、健常値付近のL-FABP濃度域における非特異反応抑制効果を比較した。

10

20

30

40

50

1. 操作

(1) 実施例 1

凍結融解尿を試料として、390 mmol/L 式(1)の化合物(ベンズアミジン塩酸塩)及び0.1% BPFを含有する対照第一試薬、及び第二試薬を用いて試料中のL-FABPの測定を行った。

(2) 対照例 1

凍結融解尿を試料として、390 mmol/L 式(1)の化合物(ベンズアミジン塩酸塩)を含有する対照第一試薬、及び第二試薬を用いて試料中のL-FABPの測定を行った。

(3) 比較例 1

凍結融解尿を試料として、390 mmol/L 式(1)の化合物(ベンズアミジン塩酸塩)及び0.1% BSAを含有する対照第一試薬、及び第二試薬を用いて試料中のL-FABPの測定を行った。

【0063】

2. 結果

実施例1、対照例A、及び比較例1、それぞれの試験において測定された各試料の正味吸光度を、標準液を試料として作成した検量線を用いてL-FABP濃度に換算した。基準方法を用いて求めた各試料のL-FABP濃度(基準測定値)をx軸、それぞれの試験より求められたL-FABP濃度(試験測定値)をy軸として、L-FABP濃度が健常値付近における、基準測定値に対する各試験測定値の相関関係を最少二乗法により検討し、表1に示した。

【0064】

【表1】

	添加蛋白質	R ²	回帰式
実施例 1	0.1% BPF	0.891	y=1.512x-1.232
対象例 1	なし	0.024	y=0.500x+5.193
比較例 1	0.1% BSA	0.007	y=0.437x+9.774

【0065】

対照例1における測定値と基準測定値とのR²は0.024と低く、対照例1の条件が臨床検査の検体として使用される尿を試料とする測定には適用できないことが確認された。また、比較例1における測定値と基準測定値とのR²は0.007と蛋白質を添加しない対照例より悪い結果であった。一方、実施例1における測定値と基準測定値とのR²は0.891であり、相関関係は良好であった。これより、ラテックス免疫凝集測定法を用いたL-FABPの測定において、BPFを添加することにより、L-FABP濃度が健常値付近の検体を正確に測定することが可能であることが確認された。

【0066】

[実施例2~5] BPFによるL-FABP濃度が健常値付近の検体における非特異反応抑制効果の確認2

第一試薬に、390 mmol/L 式(1)の化合物(ベンズアミジン塩酸塩)及び0.01~1% BPF(実施例2~5)を添加した場合の、健常値付近のL-FABP濃度域における非特異反応抑制効果を比較した。

1. 操作

検体として、採取後、-30℃で凍結保存されていた部分尿(n=10、基準法での測定値0.6~4.9 ng/mL)を、一度だけ融解して測定に使用した。また、第一試薬には、表2に記載の量のBPFが添加された。それら以外、実施例2は、実施例1と同様の方法で行われた。

【0067】

10

20

30

40

50

2. 結果

実施例 2 ~ 5 の試験において測定された各試料の正味吸光度を、標準液を試料として作成した検量線を用いて L - F A B P 濃度に換算した。基準方法を用いて求めた各試料の L - F A B P 濃度 (基準測定値) を x 軸、それぞれの試験より求められた L - F A B P 濃度 (試験測定値) を y 軸として、L - F A B P 濃度が健常値付近における、基準測定値に対する各試験測定値の相関関係を最少二乗法により検討し、表 2 に示した。

【 0 0 6 8 】

【表 2】

	BPF(%)	R ²
実施例2	0.01	0.924
実施例3	0.05	0.896
実施例4	0.5	0.926
実施例5	1	0.939

10

【 0 0 6 9 】

実施例 2 ~ 5 における測定値と基準測定値との R² は 0 . 8 9 6 ~ 0 . 9 3 9 であり、相関関係は良好であった。

【 0 0 7 0 】

[実施例 6 ~ 9] B P F による L - F A B P 濃度が健常値付近の検体における非特異反応抑制効果の確認 3

20

第一試薬に、390 mmol / L 式 (2) の化合物 (2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩) 及び 0 . 0 1 ~ 1 % B P F (実施例 6 ~ 9) を添加した場合の、健常値付近の L - F A B P 濃度域における非特異反応抑制効果を比較した。

1. 操作

検体として、採取後、- 3 0 で凍結保存されていた部分尿 (n = 1 0 、基準法での測定値 0 . 6 ~ 4 . 9 ng / mL) を、一度だけ融解して測定に使用した。また、第一試薬には、式 (2) の化合物 (2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩) 及び表 3 に記載の量の B P F が添加された。それら以外、実施例 3 は、実施例 1 と同様の方法で行われた。

【 0 0 7 1 】

2. 結果

30

実施例 6 ~ 9 の試験において測定された各試料の正味吸光度を、標準液を試料として作成した検量線を用いて L - F A B P 濃度に換算した。基準方法を用いて求めた各試料の L - F A B P 濃度 (基準測定値) を x 軸、それぞれの試験より求められた L - F A B P 濃度 (試験測定値) を y 軸として、L - F A B P 濃度が健常値付近における、基準測定値に対する各試験測定値の相関関係を最少二乗法により検討し、表 3 に示した。

【 0 0 7 2 】

【表 3】

	BPF(%)	R ²
実施例6	0.01	0.665
実施例7	0.05	0.606
実施例8	0.5	0.579
実施例9	1	0.673

40

【 0 0 7 3 】

実施例 6 ~ 9 における測定値と基準測定値との R² は 0 . 5 7 9 ~ 0 . 6 7 3 であった。B P F の添加なし (対照例 1) あるいは 0 . 1 % B S A 添加 (比較例 1) と比較し、相関関係は良好であった。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 4 】

本発明によれば、高感度な免疫学的測定法においても反応系由来の非特異反応を抑制す

50

ることができるため、より正確で感度の良い免疫学的測定法を提供することができる。例えば、尿中L - F A B P測定における健常値（例えば、 $2.2 \pm 2.3 \mu\text{g} / \text{g CR}$ 。レナプロ（登録商標）L - F A B PテストT M B添付文書より）付近の検体をより正確に測定することができる。

【配列表】

0006660933000001.app

フロントページの続き

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第2007/074860(WO, A1)
特開平08-211056(JP, A)
国際公開第2005/003155(WO, A1)
特開平05-322891(JP, A)
特開平11-242026(JP, A)
米国特許出願公開第2009/0123377(US, A1)
国際公開第2013/034264(WO, A1)
米国特許出願公開第2013/0122530(US, A1)
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誌, 2014年, Vol.39 No.4, Page.433
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誌, 2015年 9月 1日, Vol.40 No.4, Page.523
269

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/531

G01N 33/53

G01N 33/543

C07K 14/245

C07K 16/18

C Aplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	免疫测定方法及该方法中使用的测定试剂		
公开(公告)号	JP6660933B2	公开(公告)日	2020-03-11
申请号	JP2017502492	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		
当前申请(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	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/53 C07K16/18 C07K14/245		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/6893 G01N33/53 G01N2333/47		
FI分类号	G01N33/531.ZNA.B G01N33/543.581J G01N33/53.D C07K16/18 C07K14/245		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2015035903 2015-02-25 JP		
其他公开文献	JPWO2016136917A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种更准确和灵敏的测量方法，该方法降低了在L-FABP的免疫学测量中发生非特异性反应的可能性。更具体地，目的是提供一种即使在分析物的浓度低（例如，L-FABP浓度在正常值附近）时也准确且灵敏的测量方法。在使用抗L-FABP抗体的L-FABP的免疫学测定方法中，通过由热休克蛋白DnaK的氨基酸序列的第419位至第607位氨基酸组成的多肽可以容易地抑制非特异性反应。（HSP），其衍生自如SEQ ID NO：1所示的大肠杆菌或即使在高灵敏度测量中也具有与该多肽至少90%序列同一性的多肽。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6660933号 (P6660933)
(45) 発行日 令和2年3月11日(2020.3.11)	(24) 登録日 令和2年2月13日(2020.2.13)	
(5) Int. Cl. F I		
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 Z N A B	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 J	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	
CO 7 K 14/245 (2006.01)	CO 7 K 14/245	
請求項の数 13 (全 23 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-502492(P2017-502492)	(73) 特許権者 390037327	
(86) (22) 出願日 平成28年2月25日(2016.2.25)	积水メディカル株式会社	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2016/055728	東京都中央区日本橋二丁目1番3号	
(87) 国際公開番号 W02016/136917	110000774	
(87) 国際公開日 平成28年9月1日(2016.9.1)	特許業務法人 もえぎ特許事務所	
審査請求日 平成30年10月18日(2018.10.18)	小林 幸司	
(31) 優先権主張番号 特願2015-35903(P2015-35903)	東京都中央区日本橋二丁目1番3号 积水	
(32) 優先日 平成27年2月25日(2015.2.25)	メディカル株式会社内	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72) 発明者 松本 拓二	
	東京都中央区日本橋二丁目1番3号 积水	
	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 积水	
	メディカル株式会社内	
	(72) 発明者 小林 幸司	
	東京都中央区日本橋二丁目1番3号 积水	
	メディカル株式会社内	
	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		