

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6660932号
(P6660932)

(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 1

GO 1 N 33/531 (2006.01)

GO 1 N 33/531 B

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 8 1 J

請求項の数 8 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2017-502460 (P2017-502460)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月25日 (2016.2.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/055576
 (87) 国際公開番号 W02016/136863
 (87) 国際公開日 平成28年9月1日 (2016.9.1)
 審査請求日 平成30年10月18日 (2018.10.18)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-34951 (P2015-34951)
 (32) 優先日 平成27年2月25日 (2015.2.25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 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
 (74) 代理人 110000774
 特許業務法人 もえぎ特許事務所
 (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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

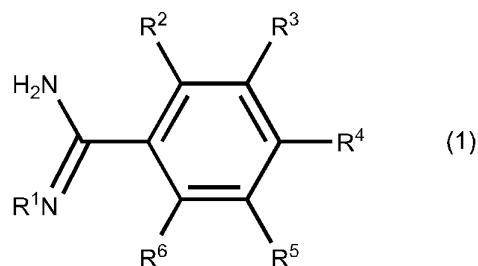
以下の工程を含む、粒子凝集測定法を利用して、試料中の L - F A B P (肝臓型脂肪酸結合蛋白質) を抗 L - F A B P 抗体により検出する方法：

L - F A B P の存在が疑われる試料に、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を含む第一試薬を接触させ、その後、当該試料に、不溶性担体粒子に固定化されている抗 L - F A B P 抗体を含む第二試薬を接触させる工程；

ここで、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、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；

式 (1)

【化 1】

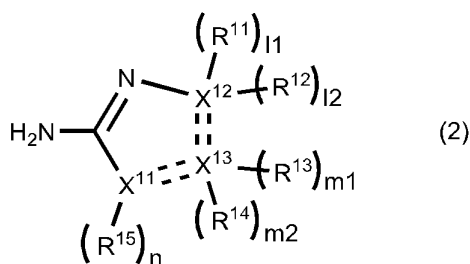


10

〔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

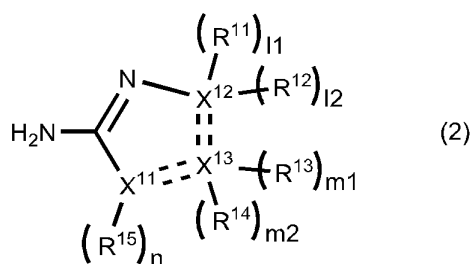
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価に応じて適宜定まる値及び結合を示す〕。

【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1に記載の方法；

式(2)

【化 3】



〔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、

(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。

【請求項 3】

抗L-FABP抗体、及び分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L-FABPの存在が疑われる試料と接触させる工程における、前記化合物の濃度が、 $300 \text{ mmol/L} \sim 500 \text{ mmol/L}$ である請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

不溶性担体粒子が、ラテックス粒子又は金属コロイド粒子である請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

抗L-FABP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1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

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 L - F A B P を検出する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

試料が、尿、全血、血清又は血漿である、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

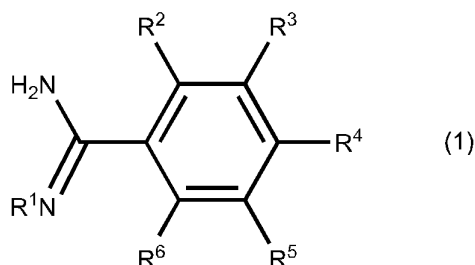
【請求項 8】

粒子凝集測定法を利用して、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試薬であって、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を含む第一試薬と、不溶性担体粒子に固定化されている抗 L - F A B P 抗体を含む第二試薬とを含む、前記試薬；

ここで、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、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；

式 (1)

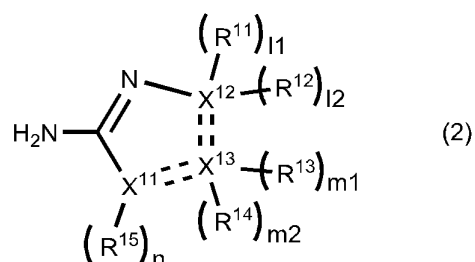
【化 4】



[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、 $\text{R}^2 \sim \text{R}^6$ 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] ；

式 (2)

【化 5】



「式 (2) 中、 $\text{R}^{11} \sim \text{R}^{14}$ 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 $-\text{SR}^{16}$ (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、

$X^{1\ 1}$ は、窒素原子又は硫黄原子であり、

$X^{1\ 2}$ 及び $X^{1\ 3}$ 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、

$X^{1\ 1}$ と $X^{1\ 3}$ との間の二重破線及び $X^{1\ 2}$ と $X^{1\ 3}$ 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 $X^{1\ 1}$ と $X^{1\ 3}$ との間の二重破線及び $X^{1\ 2}$ と $X^{1\ 3}$ との間の二重破線の結合は、 $X^{1\ 1} \sim X^{1\ 3}$ の原子価に応じて適宜定まる値及び結合を示す」。

10

【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 14 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)。

20

【0003】

特許文献 1 には、腎臓組織における 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。しかし、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。

30

【0004】

また、特許文献 2 では、採取した尿をヘミン (chloro[3,7,12,17-tetramethyl-8,13-divinylporphyrin-2,18-dipropionate(2-)]iron(III)、クロロ (ポルフィリナト) 鉄 (III) 錯体とも呼ばれる) 等の酸化還元試薬で処理することにより、尿中 L - F A B P の免疫反応性が増強されること、そして、その増強程度 (誘導倍率) が大きいほど、敗血症又は多臓器不全の患者の予後が不良であるという知見に基づき、酸化還元試薬による処理前後の尿に含まれる L - F A B P を特異的抗体を用いた E L I S A で検出し、検出値を処理前後で比較する敗血症又は多臓器不全の予後診断方法が開示されている。

40

【0005】

さらに、特許文献 3 には、尿試料に変性剤として、還元剤 (グルタチオン、システイン、ペニシラミン等)、カオトロピック試薬 (尿素、グアニジン等) 及び界面活性剤 (n - ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等) からなる化合物の一種又は二種を添加し、尿試料をこれらの化合物を用いて前処理することで免疫測定の感度、すなわち測定対象物で

50

ある尿中の蛋白質の測定感度を向上させる方法が開示されており、尿中の蛋白質の一例として、L - F A B P があげられている。しかし、尿中の蛋白質の測定方法の具体的な例としては、メガリンを変性剤処理し、異なる 2 つのエピトープを認識する抗ヒトメガリン L B D 1 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A で検出したことが記載されているのみで、L - F A B P の検出についての具体的記載はない。

【 0 0 0 6 】

一方、特許文献 4 には、被検試料中に存在する腎臓組織由来の L - F A B P を、量子ドットにより標識されたプローブを用いて検出することを特徴とする、腎症の検査方法及びその検査キットが開示されている。当該文献に具体的な例として記載されているのは、量子ドットにより標識されたプローブを用いたイムノクロマトグラフィーであり、希釈等の操作をしていない尿試料を滴下してイムノクロマト展開し、L - F A B P と量子ドット標識モノクローナル抗体との複合体の捕捉量を、励起光（波長：350 nm）を照射したときの赤色蛍光により肉眼で観察している。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】特開平 1 1 - 2 4 2 0 2 6 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 1 1 - 2 2 0 0 0 号公報

【特許文献 3】特開 2 0 1 4 - 8 5 2 0 8 号公報

【特許文献 4】国際公開 W O 2 0 0 9 / 0 8 1 6 8 0 号パンフレット

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、より迅速で簡便な L - F A B P の測定方法を開発すべく、ラテックス免疫比濁法（以下、L T I A ということがある）による L - F A B P の検出を試みた。そして、第一試薬として緩衝液、第二試薬として抗 L - F A B P 抗体固定化ラテックス粒子を含む緩衝液からなる一般的構成の L T I A 用試薬により、L - F A B P を測定したところ、所望の感度が得られず、また尿中の L - F A B P の測定において、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（シミックホールディングス社製））との相関性についても所望の成績を得ることができなかった。

30

本発明の課題は、既存の体外診断用医薬品と同等以上の検出感度を持ち、かつ良好な相関性を有する、抗 L - F A B P 抗体を用いた試料中の L - F A B P の免疫学的測定方法を提供することである。また、別の本発明の課題は、抗 L - F A B P 抗体を用いた試料中の L - F A B P の免疫学的測定方法に用いる試薬、キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

[1]

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、抗 L - F A B P 抗体、及び分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L - F A B P の存在が疑われる試料と接触させる工程を含む前記方法。

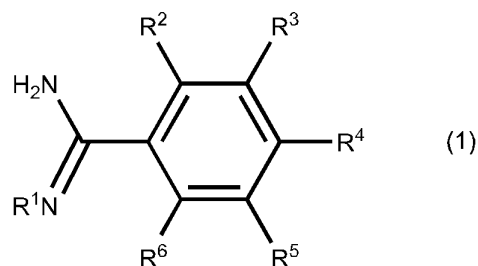
40

[2]

分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物が、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】

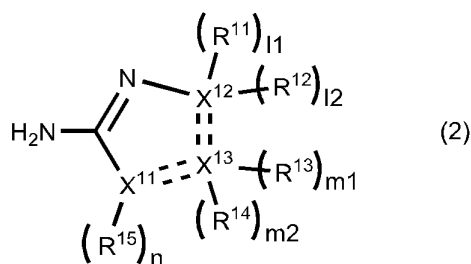


10

〔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

〔上記式(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、

40

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、

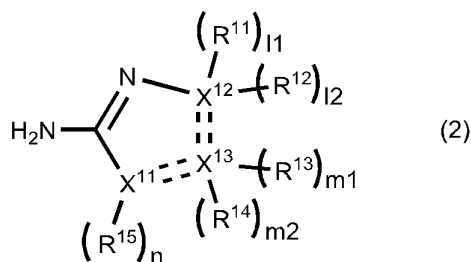
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価に応じて適宜定まる値及び結合を示す〕の化合物又はその塩。

〔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】



〔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、

(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。

〔4〕

抗L-FABP抗体、及び分子内に $NH_2-C=N-$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L-FABPの存在が疑われる試料と接触させる工程が、前記化合物とL-FABPの存在が疑われる試料と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〕に記載の方法。

〔5〕

抗L-FABP抗体、及び分子内に $NH_2-C=N-$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L-FABPの存在が疑われる試料と接触させる工程における、前記化合物の濃度が、 $300\text{ mmol/L} \sim 500\text{ mmol/L}$ である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

[6]

抗 L - F A B P 抗体が、不溶性担体に固定化されている、[1] ~ [5] のいずれかに記載の方法。

[7]

不溶性担体が、ラテックス粒子、金属コロイド粒子、多孔性メンブレン又は合成高分子化合物よりなるイムノプレートである[6]に記載の方法。

[8]

粒子免疫凝集測定法を利用する、[7]に記載の方法。

[9]

ラテラルフロー式又はフロースルー式のイムノクロマトグラフィーを利用する、[7]に記載の方法。

10

[1 0]

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] ~ [9] のいずれかに記載の方法。

[1 1]

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 L - F A B P を検出する、[1 0]に記載の方法。

[1 2]

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、E L I S A 又は化学発光検出法により L - F A B P を検出する、[1 0]に記載の方法。

20

[1 3]

試料が、尿、全血、血清又は血漿である、[1] ~ [1 2] のいずれかに記載の方法。

[1 4]

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試薬であって、抗 L - F A B P 抗体、及び分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を含む前記試薬。

[1 5]

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前処理方法であって、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L - F A B P の存在が疑われる試料と接触させる工程を含む前記前処理方法。

30

[1 6]

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前処理試薬であって、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を含む前記前処理試薬。

[1 7]

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ける、測定感度を向上させる方法であって、抗 L - F A B P 抗体、及び分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L - F A B P の存在が疑われる試料と接触させる工程を含む前記方法。

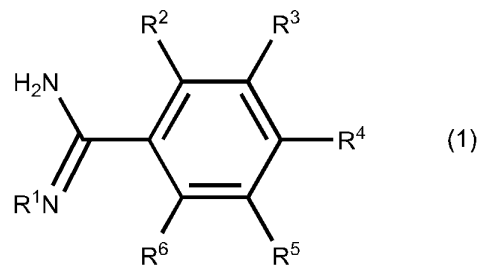
40

[1 8]

分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物が、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 7]に記載の方法。

式 (1)

【化 4】

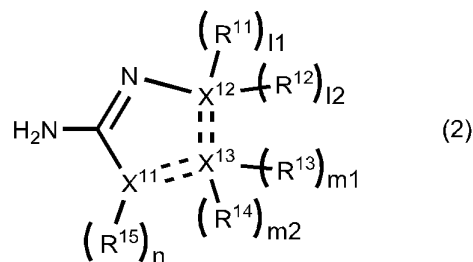


10

〔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 5】



20

〔上記式(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、

40

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、

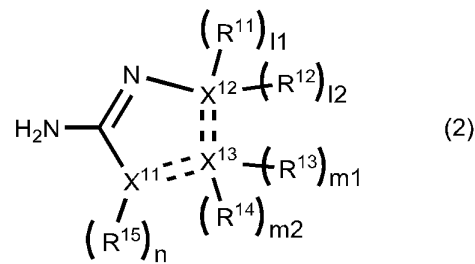
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価に応じて適宜定まる値及び結合を示す〕の化合物又はその塩。

〔19〕

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〔18〕に記載の方法。

式(2)

【化 6】



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。

[20]

40

抗L-FABP抗体、及び分子内に $NH_2-C=N$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L-FABPの存在が疑われる試料と接触させる工程が、前記化合物とL-FABPの存在が疑われる試料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[17]に記載の方法。

[21]

抗L-FABP抗体、及び分子内に $NH_2-C=N$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L-FABPの存在が疑われる試料と接触させる工程における、前記化合物の濃度が、 $300\text{ mmol/L} \sim 500\text{ mmol/L}$ である[17]～[20]のいずれかに記載の方法。

[22]

50

抗 L - F A B P 抗体が、不溶性担体に固定化されている、[1 7] ~ [2 1] のいずれかに記載の方法。

[2 3]

不溶性担体が、ラテックス粒子、金属コロイド粒子、多孔性メンブレン又は合成高分子化合物よりなるイムノプレートである[2 2]に記載の方法。

[2 4]

粒子免疫凝集測定法を利用する、[2 3]に記載の方法。

[2 5]

ラテラルフロー式又はフロースルー式のイムノクロマトグラフィーを利用する、[2 3]に記載の方法。

10

[2 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、[1 7] ~ [2 5] のいずれかに記載の方法。

[2 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 L - F A B P を検出する、[2 6]に記載の方法。

[2 8]

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、E L I S A 又は化学発光検出法により L - F A B P を検出する、[2 6]に記載の方法。

20

[2 9]

試料が、尿、全血、血清又は血漿である、[1 7] ~ [2 8] のいずれかに記載の方法。

[3 0]

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試薬における、測定感度を向上させるための試薬であって、抗 L - F A B P 抗体、及び分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を含む前記試薬。

[3 1]

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方法における、測定感度を向上させるための前処理方法であって、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、L - F A B P の存在が疑われる試料と接触させる工程を含む前記前処理方法。

30

[3 2]

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試薬における、測定感度を向上させるための前処理試薬であって、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を含む前記前処理試薬。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を試料中の L - F A B P と接触させることにより、試料中の L - F A B P を迅速、簡便に免疫学的測定方法で検出することを可能にする。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】 L T I A における、式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩) 及び基準方法の前処理液成分の効果を比較した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

(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

50

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 - F A B P 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 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。

10

【 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 S D S - 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。

20

【 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、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。

30

【 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。

40

【 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

50

てポリクローナル I g G を得ることができる。

【 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、例えば骨髓腫細胞の細胞株 (NSI-Ag4/1、Sp2/O-Ag14等) が好適に用いられる。骨髓腫細胞は、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、未融合の骨髓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。

10

【 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髓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、未融合骨髓腫細胞は死滅し、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。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I g Gが好ましい。

20

【 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。

30

【 0 0 2 2 】

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。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-の部分構造と環状構造と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。

40

【 0 0 2 3 】

50

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、F a b、F a b' 2、C D R、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体（S c F v）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 - F A B P 抗体を用いた L - F A B P 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（L T I A）等の粒子免疫凝集測定法、E L I S A、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。

10

なお、本明細書において測定方法として L T I A 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。

また、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物と接触した試料を用いて抗 L - F A B P 抗体を用いた免疫学的測定を行う限り、免疫組織染色法、電気泳動法（ウエスタンブロット等）、ドット・プロットティング法等においても本発明が適用可能であることは、当業者には容易に理解されうる。

さらに、「検出」又は「測定」という用語は、L - F A B P 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】

20

（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 ~ 0.45 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】

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

【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。

【0029】

（不溶性担体への抗体の固定化）

抗 L - F A B P 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

50

方法を使用することができる。

抗 L - F A B P 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。

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。

10

【 0 0 3 0 】

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。

【 0 0 3 1 】

(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、放射性同位体、金コロイド粒子、又は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。

20

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。

【 0 0 3 2 】

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

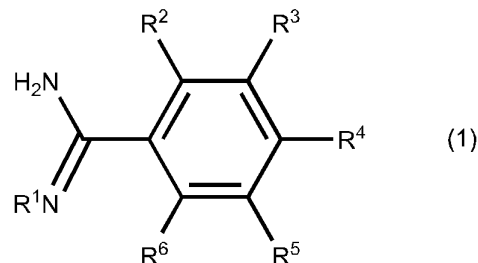
30

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、式 (1) 及び式 (2) で表される化合物である（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 3 】

式 (1) の化合物は、

【化 7】



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、2、又は 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

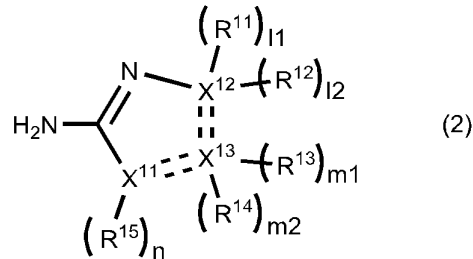
50

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。

【0034】

式(2)の化合物は、

【化8】



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、

20

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、

$l1$ 、 $l2$ 、 $m1$ 、 $m2$ 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、

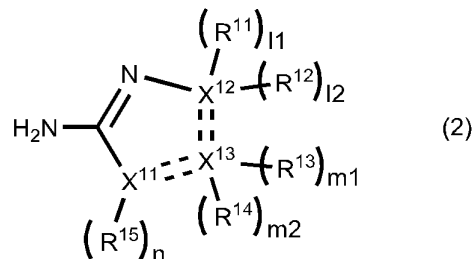
上記 $l1$ 、 $l2$ 、 $m1$ 、 $m2$ 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価に応じて適宜定まる値及び結合を示す]の化合物又はその塩である。

30

【0035】

さらに式(2)の化合物は、

【化9】



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

50

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、

(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。

【0036】

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 $NH_2 - C = N -$ の部分構造と環状構造と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)、クレアチニン(CAS番号:60-27-5)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、クレアチニンが特に好ましい。また、これらの分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、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。

【0037】

本発明の分子内に $NH_2 - C = N -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物の添加濃度の好ましい範囲としては、 $50 \text{ mmol/L} \sim 1000 \text{ mmol/L}$ 、 $50 \text{ mmol/L} \sim 500 \text{ mmol/L}$ 、 $50 \text{ mmol/L} \sim 600 \text{ mmol/L}$ 、 $100 \text{ mmol/L} \sim 900 \text{ mmol/L}$ 、 $200 \text{ mmol/L} \sim 800 \text{ mmol/L}$ 、 $300 \text{ mmol/L} \sim 600 \text{ mmol/L}$ 、 $300 \text{ mmol/L} \sim 550 \text{ mmol/L}$ 、 $300 \text{ mmol/L} \sim 500 \text{ mmol/L}$ 、 $350 \text{ mmol/L} \sim 450 \text{ mmol/L}$ が挙げられ、好ましくは $50 \text{ mmol/L} \sim 500 \text{ mmol/L}$ 、より好ましくは $300 \text{ mmol/L} \sim 500 \text{ mmol/L}$

mol/Lである。使用する分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造と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。

【0038】

(本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を試料中のL-FABPと接触させる方法、並びに抗L-FABP抗体と試料中のL-FABPを接触させる方法)

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物を、試料中のL-FABPと接触させる方法としては、例えば本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物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、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物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。

さらに試料中のL-FABPは、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物と接触した後、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せる。

また、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造と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。さらに、採尿、採血など試料の収集時に、採尿カップ、採血管などの試料収集の容器中で、必要により酵素活性阻害剤や高凝固剤などと一緒に試料と接触させる方法も含まれる。

【0039】

(測定キット)

本発明により提供される、本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物以外の、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。

【0040】

<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。

【0041】

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、ホモジーニアスな測定方法、ヘテロジー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、ホモジーニアスな測定方法がより好適である。

【0042】

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、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。

【0043】

<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。

【0044】

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。

10

【0045】

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、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。例えば、特許文献4に記載のイムノクロマトグラフィーは、本発明を採用することが可能な方法である。

【0046】

<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出来る。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。

20

【0047】

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。

30

【0048】

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、第一試薬に含有させたり、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。

40

【0049】

本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物は、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 $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物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 $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造と環状構造とを有する化合物が接触する。

【0050】

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

50

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、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES等のグット緩衝液等が挙げられる。

【0051】

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、ProClin300等）が挙げられる。

10

【0052】

また、試料測定における標準物質（L-FABP標準物質）として、肝臓、腎臓等の各組織由来の天然のL-FABP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-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技術より、リコンピナントL-FABP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。

20

【実施例】

【0053】

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。

【0054】

実施例1～4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。

【0055】

（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

30

抗L-FABP抗体 Clone L（シミックホールディングス社製）を0.36mg/mL含む20mmol/L Tris緩衝液（pH 8.5）13mLに、平均粒径0.27μmの1%ラテックス粒子（積水化学工業社製）懸濁液13mLを加え、4 にて2時間撹拌した。これに、0.5%BSAを含む20mmol/L Tris緩衝液（pH 8.5）13mLを加え、4 で1時間撹拌した。その後、5mmol/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 2抗体固定化ラテックス粒子懸濁液の調製

抗L-FABP抗体 Clone 2（シミックホールディングス社製）を0.54mg/mL含む20mmol/L グリシン緩衝液（pH 9.5）8mLに、平均粒径0.25μmの1%ラテックス粒子（積水化学工業社製）懸濁液8mLを加え、4 にて2時間撹拌した。これに、0.5%BSAを含む20mmol/L グリシン緩衝液（pH 9.5）8mLを加え、4 で1時間撹拌した。その後、5mmol/L MOPS緩衝液（pH 7.0）に透析してClone 2抗体固定化ラテックス粒子懸濁液を得た。

40

【0056】

（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。

【0057】

（L-FABP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-FABPテスト TMB）を基準方法とした。

50

【 0 0 5 8 】

(対照第一試薬：標準物質希釈液を兼ねる)

1 0 0 m m o l / L リン酸緩衝液 (p H 7 . 0)

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

0 . 2 % B S A

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)

2 . 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)

2 . 5 A b s / m L C l o n e 2 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。

(健常血清)

体内での L - F A B P の変動を懸念される既往歴がなく、現に尿中 L - F A B P 濃度が基準範囲内であるボランティア 5 0 人より採血して得た血清をプールし健常血清とした。当該健常血清は、採血及びプール当日に使用した。参考までに基準方法を用いて測定した健常血清中 L - F A B P の濃度は 3 n g / m L 未満であった。

【 0 0 5 9 】

(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

【 0 0 6 0 】

[実施例 1] 基準方法の前処理液と、本発明の化合物の L T I A に及ぼす効果の確認
従来技術による L T I A (対照例 A)、基準方法の前処理液を用いた L T I A (比較例 1) 及び式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩) を用いた L T I A (実施例 1) を比較した。

1 . 操作

(1) 実施例 1

標準液を試料として、5 0 0 m m o l / 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 - F A B P の測定を行った。

(2) 対照例 A

標準液を試料として、対照第一試薬、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。

(3) 比較例 1

基準方法の前処理液と 2 倍濃厚標準物質希釈液を、1 容量対 1 容量の割合で混合して得た溶液を使用して、標準物質を所望濃度に希釈調整し、比較例 1 用試料とした。比較例 1 用試料を試料として、対照第一試薬、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。

【 0 0 6 1 】

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吸光度から、各試験において測定された 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 軸とする検量線を図 1 に示した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

基準方法の前処理液成分を含有する比較例 1 用試料を測定した場合 (- ■ -)、いずれの L - F A B P 濃度においても、対照例 A (- -) の正味吸光度を下回っただけでなく、L - F A B P 濃度依存的な吸光度増加が全く観察されなかった。これより、基準方法の前処理液中の成分による L T I A への測定妨害効果が確認された。基準方法の添付文書には、前処理液に界面活性剤を含有することが記載されており、当該界面活性剤が L T I A への測定妨害に関与している可能性が考えられた。

一方、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を用いた実施例 1 の条件で測定した場合 (- -)、いずれの L - F A B P 濃度においても、対照例 A (- -) の正味吸光度を上回り、かつ濃度依存的な正味吸光度の増加が観察された。これより、式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩) の L T I A における増感効果が確認された。

10

【 0 0 6 3 】

[実施例 2] 凍結融解尿を測定した場合の本発明の化合物の L T I A に及ぼす効果の確認

式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩) 及び式 (2) の化合物 (2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩) と共通の部分構造 ($\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$) を有するが環状構造を有さない化合物を参考例の化合物として用い、L T I A に及ぼす効果を確認した。

1 . 操作

(1) 実施例 2 a、実施例 2 b

20

凍結融解尿 2 1 例 (L - F A B P 濃度 : $6 \text{ ng} / \text{mL} \sim 365 \text{ ng} / \text{mL}$) を試料として、 $500 \text{ mmol} / \text{L}$ ベンズアミジン塩酸塩を含有する対照第一試薬 (実施例 2 a) 又は $500 \text{ mmol} / \text{L}$ 2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩を含有する対照第一試薬 (実施例 2 b)、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。

(2) 対照例 B

上記凍結融解尿を試料として、対照第一試薬、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。

(3) 参考例 2 a

上記凍結融解尿を試料として、 $500 \text{ mmol} / \text{L}$ グアニ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 - F A B P の測定を行った。

30

(4) 参考例 2 b

上記凍結融解尿を試料として、 $500 \text{ mmol} / \text{L}$ グアニジンスルファミン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 - F A B P の測定を行った。

(5) 参考例 2 c

上記凍結融解尿を試料として、 $500 \text{ mmol} / \text{L}$ アミノグアニ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 - F A B P の測定を行った。

【 0 0 6 4 】

2 . 結果

実施例 2 a、2 b、対照例 B、参考例 2 a ~ 2 c、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 - 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、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。

40

【 0 0 6 5 】

【表 1】

	R^2	回帰式
実施例 2 a	0.968	$y=1.516x+1.44$
実施例 2 b	0.917	$y=0.972x-17.49$
対照例 B	0.458	$y=0.128x-0.03$
参考例 2 a	0.837	$y=0.665x+4.59$
参考例 2 b	0.772	$y=0.582x-3.25$
参考例 2 c	0.787	$y=0.566x-1.10$

10

【0066】

対照例 B における測定値と基準測定値との R^2 は 0.458 と低く、対照例 B 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。一方、実施例 2 a、実施例 2 b における測定値と基準測定値との相関関係は、いずれも良好であった。これより、式 (1) の化合物及び式 (2) の化合物は、基準測定値との相関関係を損なうことなく増感効果を発揮することができ、さらに尿中の L - F A B P と標準物質との免疫反応性を同質にできることが確認された。

また、参考例 2 a ~ 2 c における測定値と基準測定値との相関関係は、対照例 B を上回ったものの実施例 2 a、実施例 2 b を下回った。これより、式 (1) の化合物及び式 (2) の化合物の効果は、参考例の化合物と共通の部分構造 ($\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$) に加え、式 (1) 及び式 (2) の化合物が有する環状構造が関与している可能性が示唆された。

20

【0067】

[実施例 3] L T I A における本発明の化合物の好適な濃度の確認 1

式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩 : B A) の好適な濃度を検討した。

1. 操作

(1) 実施例 3

凍結融解尿 12 例 (L - F A B P 濃度 : $6 \text{ ng/mL} \sim 130 \text{ ng/mL}$) を試料として、表 2 記載の濃度で式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩 : B A H) 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 - F A B P の測定を行った。

30

【0068】

2. 結果

実施例 3 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、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。

【0069】

【表 2】

化合物	濃度 (mmol/L)	R^2	回帰式
式 (1) : BAH	400	0.911	$y=1.106x+0.02$
	500	0.855	$y=1.403x+4.95$
	600	0.829	$y=1.602x+8.87$

40

【0070】

式 (1) の化合物を用いた場合、いずれの濃度でも良好な相関性が確認された。また回帰式の変動より、式 (1) の化合物の使用濃度をコントロールすることで相関性を維持したまま、感度を調整できると考えられる。

50

【 0 0 7 1 】

[実施例 4] 血清における L - F A B P の添加回収試験

1 . 操作

添加 L - F A B P 濃度が表 3 に示す濃度となるよう、2 倍濃厚標準物質希釈液と健常血清を用いて L - F A B P 標準物質を希釈して、添加回収試験試料を調製した。なお、前記試料中の健常血清の最終濃度は当初濃度の 1 / 2 である。

5 0 0 m m o l / L ベンズアミジン塩酸塩を含有する対照第一試薬、第二試薬を用いて、上記試料の L - F A B P の測定を行った。得られた測定値より回収率を求めた。

【 0 0 7 2 】

2 . 結果

各 L - F A B P 濃度における回収率を表 3 に示した。

【 0 0 7 3 】

【 表 3 】

添加 L - F A B P 濃度	回収率
5ng/mL	89.0%
10ng/mL	86.0%
50ng/mL	93.9%
100ng/mL	97.9%
200ng/mL	96.0%

【 0 0 7 4 】

試験した添加 L - F A B P の濃度範囲において、良好な回収率が得られた。本発明の方法は、試料が尿であることに限定されず、血清を試料とした場合においても、所望の効果を得ることができることを確認した。尿と比較して共存するタンパクが多種、多量である血清においても尿を試料とした場合と同様の効果が得られたことより、本発明の化合物の効果は共存タンパクへの作用に比して L - F A B P に対して選択的であると考えられる。

【 0 0 7 5 】

実施例 5 及び 6 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。

【 0 0 7 6 】

(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 7 7 】

(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 7 8 】

(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 7 9 】

(対照第一試薬)

3 0 0 m m o l / L K C l

0 . 2 % B P F (東洋紡社製、カタログ番号 B P F - 3 0 1)

0 . 3 2 ~ 0 . 6 8 % L i p i d u r e - B L 4 0 3 S E

10

(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、カタログ番号 B P F - 3 0 1)

(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。

20

(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 8 0 】

(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 8 1 】

30

[実施例 5] L T I A における本発明の化合物の好適な濃度の確認 2

式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩) 及び式 (2) の化合物 (2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩及びクレアチニン) を用い、L T I A に及ぼす効果を確認した。

1 . 操作

(1) 実施例 5 a、5 b、5 c

凍結融解尿 3 4 例 (L - F A B P 濃度：0 . 6 n g / m L ~ 1 2 3 . 0 n g / m L) を試料として、表 4 記載の濃度のベンズアミジン塩酸塩 (構造式：表 5 中の 5 a、実施例 5 a)、2-アミノ-2-チアゾリン塩酸塩 (構造式：表 5 中の 5 b、実施例 5 b) 又はクレアチニン (構造式：表 5 中の 5 c、実施例 5 c) 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 - F A B P の測定を行った。

40

【 0 0 8 2 】

2 . 結果

実施例 5 a、5 b、5 c 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 - 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、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 4 に示した。

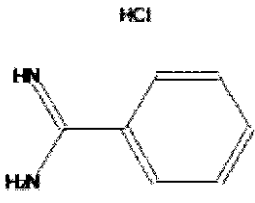
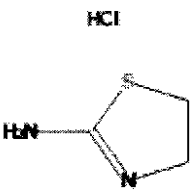
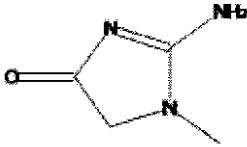
【 0 0 8 3 】

【表 4】

	mmol/L	R ²
ベンズアミジン塩酸塩 (5a)	300	0.9763
	400	0.9727
	450	0.9697
	500	0.9715
	600	0.9711
2-アミノ-2-チアゾリン 塩酸塩 (5b)	300	0.9050
	400	0.9394
	450	0.9474
	500	0.9609
	600	0.9810
クレアチニン (5c)	300	0.8551
	400	0.8613
	450	0.8636
	500	0.8536
	600	0.8883

【 0 0 8 4 】

【表 5】

	構造式	
5a		10
5b		20
5c		30

【 0 0 8 5 】

実施例 5 a、5 b、5 c における測定値と基準測定値との相関関係は、いずれの濃度においても良好であった。また、尿中の L - F A B P と標準物質との免疫反応性を同質にすることが確認された。

【 0 0 8 6 】

[実施例 6] 試料保存条件に対する本発明の化合物の効果の確認

基準方法であるレナプロ（登録商標）L - F A B P テスト T M B の添付文書には、試料である尿を採取後、試料を保存する場合には、冷蔵又は凍結（ - 2 0 ~ - 8 0 ）とする旨が記載されている。

臨床の場においては、試料を採取後、直ちに測定をできないことがある。適切ではない試料の保存は、予期せぬ測定値の変動を招くことがある。本発明の試薬を用いて、室温にて 2 4 時間保存された試料（尿）の測定を行った。

1 . 操作

(1) 実施例 6、比較例 2

凍結融解尿 2 3 例（ L - F A B P 濃度： 0 . 3 n g / m L ~ 1 1 1 . 9 n g / m L ）を

10

20

30

40

50

試料として、表 6 記載の濃度の式 (1) の化合物 (ベンズアミジン塩酸塩: BAH) を含有する対照第一試薬 (実施例 6、比較例 2)、及び第二試薬を用いて試料中の L-FABP の測定を行った。参考例として基準方法の添付文書に記載された条件 (冷蔵保存 24 時間) で保存した試料についても同様の試薬を用いて L-FABP の測定を行った。

2、結果

実施例 6、比較例 2、参考例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。保存 0 時間の試料を用いて求めた各試料の L-FABP 濃度 (0 時間測定値) 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、0 時間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 6 に示した。

10

【0087】

【表 6】

	試料の保存状態	式 (1) の化合物	R ²	回帰式
実施例 6	室温 24 時間	500mmol/L BAH	0.9723	y=1.1236 x -0.2944
比較例 2		250 mmol/L BAH	0.9631	y=1.8641 x -1.1744
参考例	冷蔵 24 時間	500 mmol/L BAH	0.9977	y=1.0486 x -0.3752
		250 mmol/L BAH	0.9979	y=1.0987 x +0.2619

20

【0088】

室温で 24 時間保存した試料について、ベンズアミジン塩酸塩 250 mmol/L を添加した試薬で測定した場合、保存 0 時間との相関は良好だが、回帰式の傾きが大きくなっていた。これは、室温にて 24 時間保存した試料の測定値が保存 0 時間の測定値よりも高くなっていることを示す。一方、ベンズアミジン塩酸塩 500 mmol/L を添加した試薬で測定した場合、保存 0 時間との相関は良好で、回帰式の傾きの変動は 15 % 以内であった。基準方法の添付文書に記載されていない条件である室温 24 時間で保存した試料であっても、本発明の試薬を用いることにより、新鮮な試料や保存状態のよい試料と同様に試料中の L-FABP を測定することができる。

30

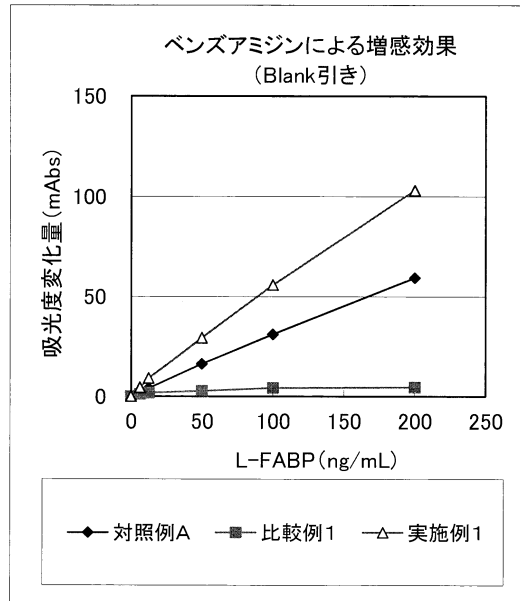
また、本発明の化合物は試料の保存液として使用することが可能であることも示された。

【産業上の利用可能性】

【0089】

本発明によれば、分子内に NH₂-C=N- の部分構造と環状構造とを有する化合物を試料中の L-FABP と接触させることにより、試料中の L-FABP を迅速、簡便に免疫学的測定方法で検出することを可能にする。

【図 1】



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)
国際公開第2005/010528(WO,A1)
特開平11-281646(JP,A)
特開平11-242026(JP,A)
欧州特許出願公開第02568291(EP,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
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	l-fabp免疫测定方法及该方法中使用的测定试剂		
公开(公告)号	JP6660932B2	公开(公告)日	2020-03-11
申请号	JP2017502460	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 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/92 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 C07C15/02 G01N33/577 G01N33/6893		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.D G01N33/543.581J		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2015034951 2015-02-25 JP		
其他公开文献	JPWO2016136863A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明要解决的问题是提供使用检测灵敏度等于或大于现有用于体外诊断的药物的抗L-FABP抗体的样品中L-FABP的免疫学测量方法 并具有良好的相关性。 通过使用抗L-FABP抗体检测样品中的L-FABP (肝型脂肪酸结合蛋白) 的方法解决了该问题，该方法包括以下步骤：使抗L-FABP抗体和具有抗L-FABP抗体的化合物。 NH₂-C = N-的部分结构和分子中的环状结构与怀疑含有L-FABP的样品接触。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6660932号 (P6660932)
(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	
G O I N 33/531 (2006. 01)	G O I N 33/531	B
G O I N 33/53 (2006. 01)	G O I N 33/53	D
G O I N 33/543 (2006. 01)	G O I N 33/543	5 8 1 J
請求項の数 8 (全 31 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-502460 (P2017-502460)	(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/JP2016/055576	東京都中央区日本橋二丁目1番3号	
(87) 国際公開番号 W02016/136963	(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)	小林 幸司	
(31) 優先権主張番号 特願2015-34951 (P2015-34951)	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】 L-FABPの免疫学的測定方法及び該方法に用いられる測定試薬