

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2006/121064**

発行日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(43) 国際公開日 **平成18年11月16日(2006.11.16)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531	B
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	W

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

出願番号	特願2007-528298 (P2007-528298)	(71) 出願人	000006770 ヤマサ醤油株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/309374		千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
(22) 国際出願日	平成18年5月10日(2006.5.10)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2005-138113 (P2005-138113)	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成17年5月11日(2005.5.11)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺サーファクタント蛋白質の安定化法

**(57) 【要約】**

肺サーファクタント蛋白質の長期的な安定化法、安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液、及び安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を構成試薬として含有する肺サーファクタント蛋白質測定用キットに関する。

カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを共存させ、肺サーファクタント蛋白質を安定化する方法を提供する。

また、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を提供する。

さらに、抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットであって、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として含有することを特徴とする、肺サーファクタント蛋白質測定用キットを提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを共存させ、肺サーファクタント蛋白質を安定化する方法。

**【請求項 2】**

肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させる、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質 D (rSP-D) である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2 価あるいは 3 価の鉄、2 価のマンガン及び 1 価の銅から選ばれた 1 又は 2 以上のものである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 5】**

カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液。

**【請求項 6】**

肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、請求項 5 記載の水溶液。

**【請求項 7】**

肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質 D (rSP-D) である、請求項 5 記載の水溶液。

**【請求項 8】**

酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2 価あるいは 3 価の鉄、2 価のマンガン及び 1 価の銅から選ばれた 1 又は 2 以上のものである、請求項 5 記載の水溶液。

**【請求項 9】**

抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットであって、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として含有することを特徴とする、肺サーファクタント蛋白質測定用キット。

**【請求項 10】**

肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、請求項 9 記載のキット。

**【請求項 11】**

肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質 D (rSP-D) である、請求項 9 記載のキット。

**【請求項 12】**

酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2 価あるいは 3 価の鉄、2 価のマンガン及び 1 価の銅から選ばれた 1 又は 2 以上のものである、請求項 9 記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、肺サーファクタント蛋白質の安定化法、安定化された肺サーファクタント蛋白質含有溶液、及び安定化された肺サーファクタント蛋白質含有溶液を構成試薬として含有する肺サーファクタント蛋白質測定用キットに関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

肺サーファクタント蛋白質は、肺サーファクタントに特異的なアポタンパク質 (SP) であり、現在までに親水性の SP-A と SP-D 及び疎水性の SP-B と SP-C の 4 種類が報告されている。その中でも、SP-D は気道-肺胞系における生体防御機構において重要な役割を果たしていると考えられており、抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル (血清など) 中の SP-D を測定し、特発性間質性肺炎などの肺疾患を診断できることが報告されている (非特許文献 1)。

10

20

30

40

50

## 【0003】

上記報告書で報告されている方法は、組換えDNA手法により取得されるリコンビナントSP-D (rSP-D) を標準物質として使用しており、このrSP-Dが不安定であるために、カルシウム、バリウム、マグネシウムなどの周期表2族a亜族に属する金属イオンを共存させることによってrSP-D等の肺サーファクタント蛋白質の安定性が向上することが報告されている(特許文献1)。

【非特許文献1】医学と薬学、36(4)、803-808(1996)

【特許文献1】特許第3573330号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

## 【0004】

しかしながら、確かにカルシウムイオンを共存させることで、肺サーファクタント蛋白質の抗原活性は安定化するものの、長期間の安定性には今なお問題を有していた。すなわち、特許文献1の実施例1~3に示されているように、カルシウムイオンは6時間程度の比較的短時間の肺サーファクタント蛋白質の安定性に関しては非常に効果を示すものの、10時間以上、あるいは数日間の中長期的な肺サーファクタント蛋白質の安定性に関しては、カルシウムイオン単独では必ずしも十分でなく、更なる温度に対する安定性の向上が切望されていた。

【課題を解決するための手段】

## 【0005】

20

本発明者らは、上記問題点を解決すべくランダムスクリーニングを行った結果、肺サーファクタント蛋白質に、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を共存させるだけで、37℃の条件下でも48時間以上抗原活性が失活せずに安定化されることを見出し、本発明を完成させた。したがって、本発明は以下の通りである。

## 【0006】

[1] カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを共存させ、肺サーファクタント蛋白質を安定化する方法。

[2] 肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させる、上記[1]記載の方法。

[3] 肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質D (rSP-D) である、上記[1]記載の方法。

30

[4] 酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上のものである、上記[1]記載の方法。

## 【0007】

[5] カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液。

[6] 肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、上記[5]記載の水溶液。

[7] 肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質D (rSP-D) である、上記[5]記載の水溶液。

[8] 酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上のものである、上記[5]記載の水溶液。

40

## 【0008】

[9] 抗原抗体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットであって、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを併用した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液を肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として含有することを特徴とする、肺サーファクタント蛋白質測定用キット。

## 【0009】

[10] 肺サーファクタント蛋白質の抗原活性を安定化させた、上記[9]記載のキット。

[11] 肺サーファクタント蛋白質が、組換え肺サーファクタント蛋白質D (rSP-D) である、上記[9]記載のキット。

50

[12] 酸化還元に関わる物質が、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上のものである、上記[9]記載のキット。

【発明の効果】

【0010】

肺サーファクタント蛋白質（たとえば、rSP-D）を安定化する際、カルシウムイオンと酸化還元に関する物質、具体的には過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び／又は1価の銅を共存させるだけで、後述実施例に示すように、肺サーファクタント蛋白質の抗原活性をカルシウムイオン単独の時よりもさらに安定化することができる。

【0011】

このことにより、短期間はもとより、中長期間の常温（25℃）保管であっても肺サーファクタント蛋白質を失活させることなく保存流通が可能になるとともに、測定時の反応も常温から37℃で行うことができ、肺サーファクタント蛋白質の免疫学的測定の操作性、汎用性をこれまで以上に向上させることが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明における肺サーファクタント蛋白質には、SP-A、SP-B、SP-C及びSP-Dのいずれも含まれるが、診断項目として有用性が確認されているSP-A又はSP-Dが好ましい。また、本発明においては、肺サーファクタント蛋白質は、生体組織から単離精製されたネイティブの蛋白質であっても、組換えDNA技術を用いて調製したりコンビナント蛋白質のいずれであっても使用可能である。

【0013】

本発明においては、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質とを共存させることにより、肺サーファクタント蛋白質を安定化することができる。

共存させる酸化還元に関わる物質としては、酸化作用を有する物質及び還元作用を有する物質のいずれでもよいが、過酸化水素、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン及び1価の銅から選ばれた1又は2以上の物質を例示することができ、特に過酸化水素又は2価のマンガニオンが好適である。

【0014】

酸化還元に関わる物質の使用濃度は、特に制限されるものではないが、肺サーファクタント蛋白質含有水溶液中、過酸化水素等の物質の場合、0.001～5%（w/v）、さらに0.01～1%（w/v）が好ましい。また、2価あるいは3価の鉄、2価のマンガン、1価の銅などの金属イオンの場合には、0.001～1000mM、さらに0.01～100mMが好ましい。併用されるカルシウムイオンの使用濃度は、肺サーファクタント蛋白質含有水溶液中、0.001～100mM、さらに0.01～100mMが好ましい。

【0015】

酸化還元に関わる物質が金属イオンの場合、塩化物、酢酸塩、硝酸塩等の水溶性金属塩を用いるのが好ましい。またカルシウムイオンも、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム等の水溶性カルシウム塩を用いるのが好ましい。

【0016】

カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質を併用し安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液の調製は、水又はHEPESなどの緩衝液にカルシウム塩（例えば、塩化カルシウムなど）と酸化還元に関わる物質（過酸化水素、又はマンガン、鉄もしくは銅の塩（例えば、塩化マンガン、塩化鉄など）を上記濃度になるように溶解後、肺サーファクタント蛋白質を所定量（例えば、1～200ng/mL）溶解することで実施することができる。なお、溶解する順番は、特に制限されるものではなく、肺サーファクタント蛋白質を先に溶解してもよく、あるいは同時であってもかまわない。

【0017】

このようにして調製した安定化された肺サーファクタント蛋白質含有水溶液は、抗原抗

10

20

30

40

50

体反応を利用した免疫学的手法によりサンプル中の肺サーファクタント蛋白質を測定するためのキットの肺サーファクタント蛋白質の標準溶液として有用である。このようなキットは、免疫比濁法 (turbidimetric immunoassay: TIA)、免疫比濁法 (nephelometric immunoassay: NIA)、酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA)、蛍光免疫測定法 (fluoro immunoassay: FIA)、ラテックス光学測定法 (latex photometric immunoassay: LPIA)、化学発光測定法 (chemiluminescent immunoassay: CLIA)、電気化学発光測定法 (electrochemiluminescent immunoassay: ECLIA)、ラジオイムノアッセイ (radio immunoassay: RIA) など採用したアッセイに適する試薬を適宜含有し、必須の試薬としては、抗肺サーファクタント蛋白質抗体が含まれ、さらに必要に応じて標識抗肺サーファクタント蛋白質抗体、標識第2抗体等が含まれる。そのようなキットとして、ELISA法によるSP-D測定キットを例に挙げ、具体的に説明すれば、たとえば以下のキットを例示することができる。

【0018】

(本発明のキット)

固相化抗SP-D抗体試薬

酵素標識化抗SP-D抗体試薬

SP-D標準抗原溶液 (カルシウムイオンとマンガンイオン含有)

【0019】

さらに、上記診断用キットに通常添付されている酵素反応基質液、酵素反応停止液、洗浄液などを添付してもよい。このようなキットの使用法は、例えば、医学と薬学、36(4)、804-808(1996)などに記載の公知の測定方法に準じて行えばよい。

【実施例】

【0020】

以下、実施例に基づき、詳細に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。

【0021】

実施例1: 37℃での安定化の検討

緩衝液 (10mM HEPES、150mM塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、1.0% (w/v) ウシ血清アルブミン、0.5% (w/v) トライトンX-100、pH7.4) に、最終濃度で0.1% (w/v) となるように過酸化水素、10mMとなるように塩化マンガン、5mMとなるように塩化鉄(II)、1mMとなるように塩化鉄(III)、あるいは1mMとなるように塩化第一銅を添加し、この緩衝液を希釈用緩衝液とした。

【0022】

次に、この希釈用緩衝液にrSP-Dを一定量添加し、37℃で24~48時間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお、対照として過酸化水素、塩化マンガン、塩化鉄(II)、塩化鉄(III)、又は塩化第一銅を添加しない無添加の緩衝液についても同様の処理を行った。

【0023】

インキュベーション後、これらのサンプル液及び対照液をヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、医学と薬学、36(4)、804-808(1996)に記載の測定法 (以下、標準操作法という) に従ってSP-Dを測定した。その結果を表1に記す。表1から明らかなように、カルシウムイオンと酸化還元に関わる物質、特に鉄イオンやマンガンイオンを併用することで、SP-Dの抗原活性の安定に有効であることが明らかとなった。

【0024】

10

20

30

40

【表1】

0時間における測定値を100とした場合の 24時間後あるいは48時間後の測定値の割合 (%)		
添加物	24時間後	48時間後
対照 (無添加)	61	44
塩化マンガン	98	91
塩化鉄 (II)	96	94
塩化鉄 (III)	96	96
塩化第一銅	80	71
過酸化水素	83	79

10

## 【0025】

実施例2：25℃での安定化の検討

緩衝液 (10 mM HEPES、150 mM塩化ナトリウム、10 mM塩化カルシウム、1.0% (w/v) ウシ血清アルブミン、0.5% (w/v) トライトンX-100、pH 7.4) に、最終濃度で0.1% (w/v) となるように過酸化水素、あるいは10 mMとなるように塩化マンガンを添加し、この緩衝液を希釈用緩衝液とした。

## 【0026】

次に、この希釈用緩衝液に rSP-D を一定量添加し、25℃で3日から5日間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお、過酸化水素又は塩化マンガンを添加しない無添加の緩衝液についても同様の処理を行った。

20

## 【0027】

インキュベーション後、標準操作法に従って、サンプル液又は対照液中のSP-Dを測定した。その結果を表2に記す。表2に示されているように、過酸化水素や塩化マンガン添加サンプルは25℃、5日間処理後も同等の抗原性を保持することが認められた。一方、無添加のカルシウムイオン単独の場合には、25℃、5日間処理で20%以上抗原性の失活が確認された。

## 【0028】

このように、カルシウムイオンと過酸化水素もしくは塩化マンガンを用いることにより大幅に熱安定性が向上し、25℃ならば5日間処理しても90%以上抗原活性が保持できることが明らかとなった。

30

## 【0029】

## 【表2】

0時間における測定値を100とした場合の 24時間後あるいは48時間後の測定値の割合 (%)		
添加剤	3日後	5日後
対照 (無添加)	85	78
塩化マンガン	95	96
過酸化水素	98	98

40

## 【0030】

実施例3：塩化カルシウム無しでの添加効果

緩衝液 (10 mM HEPES、150 mM塩化ナトリウム、1.0%ウシ血清アルブミン、0.5% トライトンX-100、pH 7.4) に、最終濃度で10 mMになるように塩化カルシウム、50 mM、10 mM、1 mMとなるように塩化マンガン、あるいは1%、0.1%、0.01% (W/V) となるように過酸化水素を添加した。この緩衝液を

50

希釈用緩衝液とする。

【0031】

また、当該希釈用緩衝液にリコンビナントSP-Dを一定量添加し、25℃又は37℃で表3又は表4に記載の時間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお対照として、緩衝液に上記のものを添加しない無添加のものについても同様の処理を行った。

【0032】

このような希釈用緩衝液、サンプル液を用い、ヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、標準操作法に従ってサンプル液中のSP-Dを測定した。

【0033】

その結果、25℃(表3)の場合には、マンガンイオン単独でも安定に保持できるもの、37℃(表4)では、マンガンイオンあるいはカルシウムイオン単独ではSP-Dの抗原活性を安定に保持できないことが明らかとなった。

【0034】

【表3】

添加剤	0日における測定値に対する割合(%)		
	3日後	5日後	7日後
無添加	33	31	26
50mM 塩化マンガン	95	104	98
10mM 塩化マンガン	93	105	97
1mM 塩化マンガン	98	101	89
1% 過酸化水素	—	80	67
0.1% 過酸化水素	—	<25	<25
0.01% 過酸化水素	—	<25	<25
1mM 塩化鉄(II)	95	85	44
10mM 塩化カルシウム	84	81	76

—は未測定

【0035】

【表4】

添加剤	0時間における測定値に対する割合(%)		
	24時間後	48時間後	120時間後
無添加	25	<25	<25
50mM 塩化マンガン	97	90	89
10mM 塩化マンガン	91	92	79
1mM 塩化マンガン	48	51	<25
1% 過酸化水素	<25	<25	<25
0.1% 過酸化水素	<25	<25	<25
0.01% 過酸化水素	<25	<25	<25
1mM 塩化鉄(II)	<25	<25	<25
10mM 塩化カルシウム	72	63	35

【0036】

実施例4：塩化カルシウムを含む状態での添加効果

緩衝液(10mM HEPES、150mM塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、1.0%ウシ血清アルブミン、0.5%トライトンX-100、pH7.4)に、最終濃度で10mMになるように塩化カルシウム、50mM、10mM、1mM、0.1mMとなるように塩化マンガン、5mM、1mMとなるように塩化鉄(II)、1mMとなる

ように塩化鉄(III)、1mMとなるように塩化第一銅、1%、0.1%、0.01% (W/V)となるように過酸化水素、10mM塩化マンガンかつ0.1%過酸化水素となるように添加した。この緩衝液を希釈用緩衝液とする。

## 【0037】

また、当該希釈用緩衝液にリコンビナントSP-Dを一定量添加し、25℃又は37℃で表5及び6に記載の時間インキュベートし、これをサンプル液とした。なお対照として、緩衝液に上記のものを添加しない無添加のもの(塩化カルシウムを含む)についても同様の処理を行った。

## 【0038】

このような希釈用緩衝液、サンプル液を用い、ヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、標準操作法に従ってサンプル液中のSP-Dを測定した。

## 【0039】

その結果、25℃(表5)の場合、37℃(表6)の場合、いずれにおいても、カルシウムイオンと併用することで、SP-Dの抗原活性を安定に保持できることが明らかとなった。

## 【0040】

## 【表5】

添加剤1	添加剤2	0時間における測定値に対する割合(%)			
		3日後	5日後	7日後	14日後
10mM 塩化カルシウム	無添加	76	75	56	51
	50mM 塩化マンガン	92	106	101	88
	10mM 塩化マンガン	89	99	89	76
	1mM 塩化マンガン	84	91	81	62
	1% 過酸化水素	84	95	88	—
	0.1% 過酸化水素	95	95	96	91
	0.01% 過酸化水素	83	90	103	68
	1mM 塩化鉄(II)	—	102	86	88
	1mM 塩化鉄(III)	—	104	93	99

—は未測定

## 【0041】

## 【表6】

添加剤1	添加剤2	0時間における測定値に対する割合(%)		
		24時間後	48時間後	120時間後
10mM 塩化カルシウム	無添加	61	44	31
	50mM 塩化マンガン	95	95	97
	10mM 塩化マンガン	98	91	78
	1mM 塩化マンガン	80	76	36
	1% 過酸化水素	93	76	—
	0.1% 過酸化水素	94	93	102
	0.01% 過酸化水素	86	55	—
	5mM 塩化鉄(II)	96	94	—
	1mM 塩化鉄(II)	93	85	67
	1mM 塩化鉄(III)	99	94	87
	1mM 塩化第一銅	80	71	—

—は未測定

## 【手続補正書】

【提出日】平成19年8月7日(2007.8.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

【表2】

0日における測定値を100とした場合の 3日後および5日後の測定値の割合(%)		
添加剤	3日後	5日後
対照(無添加)	85	78
塩化マンガン	95	96
過酸化水素	98	98

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

実施例3：塩化カルシウム無しでの添加効果

緩衝液(10mM HEPES、150mM塩化ナトリウム、1.0%ウシ血清アルブミン、0.5%トライトンX-100、pH7.4)に、最終濃度で10mMになるように塩化カルシウム、50mM、10mM、1mMとなるように塩化マンガン、1%、0.1%、0.01%(W/V)となるように過酸化水素、あるいは1mMとなるように塩化鉄(II)を添加した。この緩衝液を希釈用緩衝液とする。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

このような対照液、サンプル液を用い、ヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、標準操作法に従ってサンプル液中のSP-Dを測定した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

実施例4：塩化カルシウムを含む状態での添加効果

緩衝液(10mM HEPES、150mM塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、1.0%ウシ血清アルブミン、0.5%トライトンX-100、pH7.4)に、最終濃度で50mM、10mM、1mMとなるように塩化マンガン、5mM、1mMとなるように塩化鉄(II)、1mMとなるように塩化鉄(III)、1mMとなるように塩化第一銅、あるいは1%、0.1%、0.01%(W/V)となるように過酸化水素を添加した。この緩衝液を希釈用緩衝液とする。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

このような対照液、サンプル液を用い、ヤマサ醤油株式会社製のSP-D測定キットを使用して、標準操作法に従ってサンプル液中のSP-Dを測定した。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/309374
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/531 (2006.01), G01N33/53 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/531, G01N33/53		
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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 3573330 B2 (Yamasa Corp.), 09 July, 2004 (09.07.04), Claims (Family: none)	1-12
A	BI, X. et al., "Thermal stability and DPPC/Ca <sup>2+</sup> interactions of pulmonary surfactant SP-A from bulk-phase and monolayer IR spectroscopy", Biochemistry, 2001, Vol.40, pages 13659 to 13669, (Abstract)	1-12
A	JP 03-044332 A (Dr. Karl Thomae GmbH.), 26 February, 1991 (26.02.91), & US 5552161 A1 & EP 0406732 A2 & DE 3921954 A	1-12
<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 25 July, 2006 (25.07.06)		Date of mailing of the international search report 01 August, 2006 (01.08.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/309374

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARK, I. & INGENITO, E.P., "Surfactant function and composition after free radical exposure generated by transition metals", 1999, Am.J. Physiol., Vol.276(3 Pt 1), p.L491-500	1-12
A	ALCORN, J.F. & WRIGHT, J.R., "Degradation of pulmonary surfactant protein D by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> elastase abrogates innate immune function", J.Biol.Chem., 2004, Vol.279, No.29, pages 30871 to 30879	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/309374	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531 (2006.01), G01N33/53 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531, G01N33/53			
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN)、JMEDPlus (JDream2)			
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 請求の範囲の番号	
A	JP 3573330 B2 (ヤマサ醤油株式会社) 2004.07.09, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-12	
A	BI, X., et al., "Thermal stability and DPPC/Ca <sup>2+</sup> interactions of pulmonary surfactant SP-A from bulk-phase and monolayer IR spectroscopy", Biochemistry, 2001, Vol. 40, p. 13659-13669, (Abstract)	1-12	
<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 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 25.07.2006		国際調査報告の発送日 01.08.2006	
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) 白形 由美子	2J 3496
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/309374

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 請求の範囲の番号
A	JP 03-044332 A (ドクトル カルル トーマエ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング) 1991.02.26 & US 5552161 A1 & EP 0406732 A2 & DE 3921954 A	1 - 1 2
A	MARK, L. & INGENITO, E.P., "Surfactant function and composition after free radical exposure generated by transition metals" , 1999, Am. J. Physiol., Vol. 276(3 Pt 1), p. L491-500	1 - 1 2
A	ALCORN, J.F. & WRIGHT, J.R." , Degradation of pulmonary surfactant protein D by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> elastase abrogates innate immune function" , J. Biol. Chem., 2004, Vol. 279, No. 29, p. 30871-30879	1 - 1 2

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 田中 誠仁

千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 ヤマサ醤油株式会社内

(72)発明者 濱沖 勝

千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 ヤマサ醤油株式会社内

(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)	肺表面活性蛋白的稳定化方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2006121064A1</a>	公开(公告)日	2008-12-18
申请号	JP2007528298	申请日	2006-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	山佐株式会社		
申请(专利权)人(译)	山佐公司		
[标]发明人	田中誠仁 濱沖勝		
发明人	田中 誠仁 濱沖 勝		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6884 C07K14/785 G01N2333/785		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.W		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2005138113 2005-05-11 JP		
其他公开文献	JP4734328B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

肺表面活性剂蛋白的长期稳定化方法，稳定化的含肺表面活性剂蛋白的水溶液，以及将稳定化的含肺表面活性剂蛋白的水溶液作为构成试剂的肺表面活性剂蛋白测定试剂盒涉及本发明。提供了一种通过使钙离子与氧化还原相关的物质共存来稳定肺表面活性剂蛋白质的方法。还提供了稳定化的含肺表面活性剂蛋白质的水溶液，其中钙离子和与氧化还原有关的物质组合使用。此外，一种用于通过利用抗原-抗体反应的免疫学方法测量样品中的肺表面活性剂蛋白的试剂盒，该试剂盒是稳定的含肺表面活性剂蛋白的水溶液，其中钙离子和参与氧化还原的物质组合使用。本发明提供了一种用于测量肺表面活性剂蛋白的试剂盒，其包括：作为肺表面活性剂蛋白的标准溶液。

添加剤	0日における測定値に対する割合(%)		
	3日後	5日後	7日後
無添加	33	31	26
50mM 塩化マンガン	95	104	98
10mM 塩化マンガン	93	105	97
1mM 塩化マンガン	98	101	89
1% 過酸化水素	—	80	67
0.1% 過酸化水素	—	<25	<25
0.01% 過酸化水素	—	<25	<25
1mM 塩化鉄(II)	95	85	44
10mM 塩化カルシウム	84	81	76

—は未測定