

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6012108号  
(P6012108)

(45) 発行日 平成28年10月25日(2016.10.25)

(24) 登録日 平成28年9月30日(2016.9.30)

(51) Int.Cl. F 1  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)**  
 GO 1 N 33/53 D  
 GO 1 N 33/53 H

請求項の数 6 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-512339 (P2013-512339)	(73) 特許権者	000162478
(86) (22) 出願日	平成24年4月23日 (2012.4.23)		協和メデックス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/060818		東京都中央区晴海一丁目8番10号
(87) 国際公開番号	W02012/147670	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成24年11月1日 (2012.11.1)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成27年4月1日 (2015.4.1)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	特願2011-96718 (P2011-96718)		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成23年4月25日 (2011.4.25)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎不全の予後判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料中の線維芽細胞増殖因子 - 23 および 25 水酸化ビタミン D を測定することを特徴とする、腎不全の予後を判定するためのデータを収集する方法。

【請求項 2】

線維芽細胞増殖因子 - 23 の測定が、免疫学的測定方法により行われる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

25 水酸化ビタミン D の測定が、免疫学的測定方法により行われる請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

線維芽細胞増殖因子 - 23 測定試薬および 25 水酸化ビタミン D 測定試薬を含むことを特徴とする、腎不全の予後判定用キット。

【請求項 5】

線維芽細胞増殖因子 - 23 測定試薬が、線維芽細胞増殖因子 - 23 に結合する抗体を含む試薬である請求項 4 記載のキット。

【請求項 6】

25 水酸化ビタミン D 測定試薬が、25 水酸化ビタミン D に結合する抗体を含む試薬である請求項 4 または 5 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、腎不全の予後判定方法、および、腎不全の予後判定用キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

線維芽細胞増殖因子 - 23 (以下、FGF-23という) は、線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーの一員であり、主として骨組織で産生される251アミノ酸からなるポリペプチドであり、腎臓に作用し、腎尿細管でのリンの再吸収を阻害する。近年、低リン血症性くる病、腫瘍性骨軟化症、腎不全等の疾患におけるFGF-23の関与が示唆されている(非特許文献1参照)。血中のFGF-23を測定することでこれらの病態のモニタリングに有用であるとされ近年注目を浴びているマーカーである(特許文献1)。

10

## 【0003】

25水酸化ビタミンD [以下、25(OH)Dという] は、体内に吸収されたビタミンDが肝臓において側鎖の25位が水酸化されたものである。体内ではさらに腎で1位または24位が水酸化されて1,25-ジヒドロキシビタミンD [1,25(OH)<sub>2</sub>D] や24,25-ジヒドロキシビタミンD [24,25(OH)<sub>2</sub>D] に代謝される。

## 【0004】

ビタミンDは、それ自体は生理活性をほとんど持たず、代謝や脂肪組織への移行等により血中濃度が大きく変動するため、一般にはあまり測定されない。ビタミンDは、まず肝臓で25-ヒドロキシラーゼにより体内で急速に代謝を受け25(OH)Dに変換され、さらに腎臓で1-ヒドロキシラーゼにより1位が水酸化を受けて活性型の1,25-ジヒドロキシビタミンDに代謝される。

20

## 【0005】

活性型の1,25-ジヒドロキシビタミンDは、小腸からのカルシウムとリンの吸収を促進するとともに、骨からの骨塩の溶出を促す。また、腎臓ではカルシウムとリンの再吸収を促進し、生体のカルシウムとリンの恒常性の維持に寄与している。

## 【0006】

ビタミンD不足により、小児ではクル病、成人では骨軟化症や骨粗鬆症をきたす。25(OH)Dの測定はビタミンD欠乏症および不足症の病態のモニタリングに有用であるとされている(非特許文献2)

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】W02003/057733パンフレット

## 【非特許文献】

## 【0008】

【非特許文献1】腎と骨代謝、第15巻、第4号、第351-356頁(2002)。

【非特許文献2】Kidney Int. Vol. 55(6), p.2169-2177 (1999)。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

40

## 【0009】

本発明の目的は、腎不全患者の治療方針決定に有効な腎不全の予後判定方法および予後判定用キットを提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、試料中のFGF-23および25(OH)Dを測定し、その測定値を組み合わせて評価することにより、腎不全の予後を判定することが可能となる、という知見を見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下の[1]～[6]に関する。

[1] 生体試料中のFGF-23および25(OH)Dを測定することを特徴とする、腎不全の予後

50

判定方法。

[ 2 ] FGF-23の測定が、免疫学的測定方法により行われる [ 1 ] 記載の方法。

[ 3 ] 25(OH)Dの測定が、免疫学的測定方法により行われる [ 1 ] または [ 2 ] 記載の方法。

【 0 0 1 1 】

[ 4 ] FGF-23測定試薬および25(OH)D測定試薬を含むことを特徴とする、腎不全の予後判定用キット。

[ 5 ] FGF-23測定試薬が、FGF-23に結合する抗体を含む試薬である [ 4 ] 記載のキット。

[ 6 ] 25(OH)D測定試薬が、25(OH)Dに結合する抗体を含む試薬である [ 4 ] または [ 5 ] 記載のキット。 10

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明により、腎不全患者における予後不良群の選定が可能となり、投薬の選定やより厳密な食事療法、早期透析導入等の治療方針決定に有用な、腎不全の予後判定方法および予後判定用キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】患者基本情報ならびに各種測定値を用いた腎イベント（血清クレアチニン倍増または透析導入）発症に関するリスクについての多変量解析の解析図である。 20

【図 2】25(OH)D濃度に基づく患者群（4つの群）、および、FGF-23濃度に基づく患者群（Q1～Q5の5つの群）の各群における、腎イベント（血清クレアチニン倍増または透析導入）発症に関するリスクについての多変量解析の解析図である。

【図 3】25(OH)D低値かつFGF-23低値群（df群）、25(OH)D高値かつFGF-23低値群（Df群）、25(OH)D低値かつFGF-23高値群（dF群）、25(OH)D高値かつFGF-23高値群（DF群）の4群における、約5年間の腎イベント（血清クレアチニン倍増または透析導入）なしで生存する確率を示す Kaplan-Meier 生存曲線である。

【図 4】図 3 の検討でさらに年齢、性別、糖尿病、心血管病罹病、高血圧、ヘモグロビン、血清アルブミン、尿たんぱく、推定糸球体濾過量（eGFR）、血清カルシウム、血清リン、カルシトリオール [ 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> ]、全長1-84副甲状腺ホルモン（whole PTH）、採血の季節、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤 / アンギオテンシン受容体拮抗薬（ARB）の投与、活性型ビタミン D 投与、カルシウム投与に関して補正した後の Kaplan-Meier 生存曲線である。 30

【図 5】25(OH)D濃度とFGF-23濃度の組み合わせによる4群における、腎イベント発症（血清クレアチニン倍増または透析導入）に関するリスクについての多変量解析の解析図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

< 腎不全の予後判定方法 >

本発明の腎不全の予後判定方法は、生体試料中のFGF-23および25(OH)Dを測定すること 40  
を特徴とする方法である。本発明の腎不全の予後判定方法は、例えば以下の工程を含む方法である。

[ 1 ] 生体試料中のFGF-23を測定する工程；

[ 2 ] 工程 [ 1 ] で得られた測定値を、予め作成した、FGF-23濃度と測定値との間の関係を示す検量線に照らし合わせて、生体試料中のFGF-23濃度を決定する工程；

[ 3 ] 生体試料中の25(OH)Dを測定する工程；

[ 4 ] 工程 [ 3 ] で得られた測定値を、予め作成した、25(OH)D濃度と測定値との間の関係を示す検量線に照らし合わせて、生体試料中の25(OH)D濃度を決定する工程；

[ 5 ] 工程 [ 2 ] で決定されたFGF-23濃度と工程 [ 4 ] で決定された25(OH)D濃度とから、FGF-23濃度が、測定に供される全ての生体試料に対するFGF-23濃度を基に決定した中央 50

値以上であり、かつ、25(OH)D濃度が、測定に供される全ての生体試料に対する25(OH)D濃度を基に決定した中央値未満である場合、腎不全の予後不良と判定し、FGF-23濃度がFGF-23中央値未満であり、かつ、25(OH)D濃度が25(OH)D中央値以上である場合、腎不全の予後良好と判定する工程。

【 0 0 1 5 】

工程 [ 5 ] において、測定に供される全ての生体試料に対するFGF-23濃度及び25(OH)D濃度を基に決定されたFGF-23濃度の中央値、25(OH)D濃度の中央値が、例えば、それぞれ、49.4 pg/mL、23.0 ng/mLである場合、FGF-23濃度が49.4 pg/mL以上で、かつ、25(OH)D濃度が23.0 ng/mL未満の被検者を腎不全の予後不良と判定し、FGF-23濃度が49.4 pg/mL未満で、かつ、25(OH)D濃度が23.0 ng/mL以上の被検者を腎不全の予後良好と判定することができる。

10

【 0 0 1 6 】

ここで、FGF-23濃度の中央値とは、全ての生体試料に対して決定されたFGF-23濃度を値が低い方から順番に並べたとき、ちょうど真ん中に位置するFGF-23の濃度を意味する。同様に、25(OH)D濃度の中央値とは、全ての生体試料に対して決定された25(OH)D濃度を値が低い方から順番に並べたとき、ちょうど真ん中に位置する25(OH)Dの濃度を意味する。

【 0 0 1 7 】

本発明における生体試料は、FGF-23と25(OH)Dの測定を可能とする試料であれば特に制限はなく、例えば全血、血清、血漿等が挙げられ、血清または血漿が好ましい。

【 0 0 1 8 】

FGF-23の測定方法としては、FGF-23を測定し得る方法であれば特に制限はなく、例えばFGF-23に結合する抗体を用いて測定する免疫学的測定方法等が挙げられる。免疫学的測定方法としては、イムノアッセイ法、イムノプロットティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法等の抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法が挙げられる。

20

【 0 0 1 9 】

イムノアッセイ法は、各種標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体または抗原を検出或いは定量する方法であり、抗原または抗体の標識方法に応じて、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)、化学発光酵素免疫測定法(CLEIAまたはCLIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法(luminescent immunoassay)、物理化学的測定法(TIA、LAPIA、PCIA)、フローサイトメトリー等が挙げられ、化学発光酵素免疫測定法等が好ましい。イムノアッセイ法はまた、サンドイッチ法でも競合法でもよい。

30

【 0 0 2 0 】

イムノアッセイ法を用いる生体試料中のFGF-23の測定は、例えば以下の方法により行うことができる。

[ 1 ] 生体試料中のFGF-23を、担体上に固定化され、かつ、FGF-23に結合する第1抗体もしくはそのフラグメント、および、FGF-23に結合する第2抗体もしくはそのフラグメントに標識が結合した標識化第2抗体と反応させて、担体上に第1抗体、FGF-23、および、標識化第2抗体からなる免疫複合体を形成させる工程；

40

[ 2 ] 形成した免疫複合体中の標識を測定する工程；および、

[ 3 ] 工程 [ 2 ] で得られた測定値を、予め作成したFGF-23濃度と測定値との間の関係を示す検量線に照らし合わせることにより、生体試料中のFGF-23濃度を決定する工程。

【 0 0 2 1 】

上記工程 [ 1 ] と工程 [ 2 ] との間に洗浄工程を挿入することもできる。

標識は、抗FGF-23抗体に結合し、FGF-23の測定を可能とする標識であれば特に制限はなく、例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

標識としてペルオキシダーゼを用いる場合、後述の標識測定用試薬を用いてFGF-23を測

50

定することができる。すなわち、免疫複合体中の標識(=ペルオキシダーゼ)と標識測定用試薬との反応により生成する蛍光、発光等を測定することにより、FGF-23を測定することができる。

【0023】

標識としてアルカリホスファターゼを用いる場合、後述の標識測定用試薬を用いてFGF-23を測定することができる。すなわち、免疫複合体中の標識(=アルカリホスファターゼ)と標識測定用試薬との反応により生成する蛍光、発光等を測定することにより、FGF-23を測定することができる。

【0024】

標識として -ガラクトシダーゼを用いる場合、後述の標識測定用試薬を用いてFGF-23を測定することができる。すなわち、免疫複合体中の標識(= -ガラクトシダーゼ)と標識測定用試薬との反応により生成する蛍光、発光等を測定することにより、FGF-23を測定することができる。

【0025】

標識として蛍光物質を用いる場合、免疫複合体中の標識(=蛍光物質)由来の蛍光を測定することにより、FGF-23を測定することができる。蛍光物質としては、例えばFITC(フルオレッセイン イソチオシアナート)、RITC(ローダミンB-イソチオシアナート)、quantum dot(Science, 281, 2016-2018, 1998)、フィコエリスリン等のフィコビリ蛋白質、GFP(Green fluorescent Protein)、RFP(Red fluorescent Protein)、YFP(Yellow fluorescent Protein)、BFP(Blue fluorescent Protein)等が挙げられる。

【0026】

標識として発光物質を用いる場合、免疫複合体中の標識(=発光物質)由来の発光を測定することにより、FGF-23を測定することができる。発光物質としては、例えばアクリジニウムおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。

【0027】

また、FGF-23の測定は市販のFGF-23測定キットを用いて行うこともできる。市販のFGF-23測定キットとしては、例えば「FGF-23測定試薬」(カイノス社製)等が挙げられる。

【0028】

25(OH)Dの測定方法としては、25(OH)Dを測定し得る方法であれば特に制限はなく、例えば25(OH)Dに対する抗体を用いて測定する免疫学的測定方法等が挙げられる。免疫学的測定方法としては、イムノアッセイ法、イムノプロットティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法等の抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含される。25(OH)D測定方法としては、好ましくはイムノアッセイ法が挙げられる。

イムノアッセイ法としては、例えば前述の測定方法等が挙げられる。

【0029】

イムノアッセイ法を用いる生体試料中の25(OH)Dの測定は、例えば以下の方法により行うことができる。

[1] 生体試料中の25(OH)Dを、担体上に固定化され、かつ、25(OH)Dに結合する第1抗体もしくはそのフラグメント、および、25(OH)Dに結合する第2抗体もしくはそのフラグメントに標識が結合した標識化第2抗体と反応させて、担体上に第1抗体、25(OH)D、および、標識化第2抗体からなる免疫複合体を形成させる工程；

[2] 形成した免疫複合体中の標識を測定する工程；および、

[3] 工程[2]で得られた測定値を、予め作成した25(OH)D濃度と測定値との間の関係を示す検量線に照らし合わせることにより、生体試料中の25(OH)D濃度を決定する工程。

上記工程[1]と工程[2]との間に洗浄工程を挿入することもできる。

【0030】

標識は、抗25(OH)D抗体に結合し、25(OH)Dの測定を可能とする標識であれば特に制限はなく、例えば前述の標識等が挙げられる。また、25(OH)Dの測定は市販の25(OH)D測定キットを用いて行うこともできる。市販の25(OH)D測定キットとしては、例えば「LIAISON 25

10

20

30

40

50

OH Vitamin D TOTAL Assay」[ディアソリン(DiaSorin)社製]、「25-OH Vitamin D, Direct ELISA Kit」[イミュンダイアグノスティック(Immundiagnostik)社製]等が挙げられる。

【0031】

<腎不全の予後判定用キット>

本発明の腎不全の予後判定用キットは、本発明の腎不全の予後判定方法に使用されるキットであり、FGF-23測定試薬および25(OH)D測定試薬を含む。本発明のキットには、さらに、生体試料の希釈液、反応緩衝液、洗浄液、標識体の検出用試薬等が含まれていてもよい。また本発明のキットに、測定に適した機器を組み合わせて、キットとしてもよい。

【0032】

(1) FGF-23測定試薬

FGF-23測定試薬としては、生体試料中のFGF-23を測定し得る試薬であれば特に制限はなく、例えば(1)担体に固定化され、かつ、FGF-23に結合する第1抗体、および、FGF-23に結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を含む試薬、(2)担体に固定化され、かつ、FGF-23に結合する抗体、および、FGF-23に競合する競合物質に標識が結合した標識化競合物質を含む試薬、(3)担体に固定化され、かつ、FGF-23に競合する競合物質、および、FGF-23に結合する抗体に標識が結合した標識化抗体を含む試薬等が挙げられる。さらに、FGF-23測定試薬には、必要に応じて、生体試料の希釈液、反応緩衝液、洗浄液、標識検出用試薬、FGF-23の標準物質等が含まれていてもよい。

【0033】

FGF-23に結合する抗体(抗FGF-23抗体)としては、FGF-23に結合する抗体であれば特に制限がなく、例えばヤギ、ウサギ、ラット、マウス等の抗FGF-23抗体等が挙げられる。抗FGF-23抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。また、抗FGF-23抗体のフラグメントも使用することができる。抗体フラグメントとしては、例えば抗体をパパイン処理により得られるFab、ペプシン処理により得られるF(ab')<sub>2</sub>、ペプシン処理-還元処理により得られるFab'等のFc部分を除去した抗体フラグメント等が挙げられる。第1抗体および第2抗体を用いる場合、第1抗体の抗原認識部位と第2抗体の抗原認識部位とは同じでも異なってもよく、異なっていることが好ましい。

【0034】

FGF-23に競合する競合物質としては、FGF-23に競合し得る物質であれば特に制限はなく、例えばFGF-23そのもの、抗FGF-23抗体の抗原認識部位に相当するペプチドを含む物質等が挙げられる。

【0035】

担体としては、FGF-23の測定を可能とする担体であれば特に制限はなく、プレート、ラテックス、磁性粒子等が挙げられる。抗FGF-23抗体および競合物質の担体への固定化としては、例えば物理的方法、化学的方法等が挙げられる。物理的方法としては、例えば物理吸着による方法等が挙げられる。化学的方法としては、例えばアビジン-ビオチンの相互作用を用いる方法、リンカーを用いる方法等が挙げられる。

【0036】

生体試料の希釈液としては、FGF-23の測定を可能とする希釈液であれば特に制限はなく、例えば界面活性剤、蛋白質等が水性媒体中に含まれる水溶液等が挙げられる。水性媒体としては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。グッド緩衝液としては、例えば例えば2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝液、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)緩衝液、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝液、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝液、ピペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝液、2-[N-(2-アセトアミド)アミノ]エタンスルホン酸(ACES)緩衝液、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)緩衝液、2-[N, N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エタンスルホン酸(BES)緩衝液、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝液、2-{N-

10

20

30

40

50

[ トリス(ヒドロキシメチル)メチル ] アミノ } エタンスルホン酸 (TES) 緩衝液、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N ' - ( 2 - スルホエチル ) ピペラジン (HEPES) 緩衝液、3 - [ N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) アミノ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (DIPSO) 緩衝液、2 - ヒドロキシ - 3 - { [ N - トリス(ヒドロキシメチル)メチル ] アミノ } プロパンスルホン酸 (TAPSO) 緩衝液、ピペラジン - N , N ' - ビス ( 2 - ヒドロキシプロパン - 3 - スルホン酸 ) (POPSO) 緩衝液、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N ' - ( 2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル ) ピペラジン (HEPPSO) 緩衝液、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N ' - ( 3 - スルホプロピル ) ピペラジン (EPPS) 緩衝液、[ N - トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン ] (Tricine) 緩衝液、[ N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) グリシン ] (Bicine) 緩衝液、3 - [ N - トリス(ヒドロキシメチル)メチル ] アミノプロパンスルホン酸 (TAPS) 緩衝液、2 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) エタンスルホン酸 (CHES) 緩衝液、3 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (CAPSO) 緩衝液、3 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) プロパンスルホン酸 (CAPS) 緩衝液等が挙げられる。

10

## 【 0 0 3 7 】

界面活性剤としては、FGF-23の測定を可能とする界面活性剤であれば特に制限はなく、例えば非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等が挙げられる。蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン (BSA)、ウシ胎児血清 (FBS)、カゼイン、ブロッケーヌ (大日本製薬社製) 等が挙げられる。

## 【 0 0 3 8 】

反応緩衝液としては、FGF-23の測定を可能とする緩衝液であれば特に制限はなく、例えば前述の緩衝液等が挙げられる。反応緩衝液には、必要に応じて、界面活性剤、蛋白質、金属イオン、糖類、防腐剤等が含まれていてもよい。界面活性剤としては、例えば前述の界面活性剤等が挙げられる。蛋白質としては、例えば前述の蛋白質等が挙げられる。金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質 (ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、バイオエース等が挙げられる。

20

## 【 0 0 3 9 】

洗浄液としては、FGF-23の測定を可能とする洗浄液であれば特に制限はなく、例えばリン酸緩衝化生理食塩水 (0.15 mol/L塩化ナトリウムを含有する10 mmol/Lリン酸緩衝液、pH7.2) (PBS) 等が挙げられる。洗浄液には、必要に応じて、前述の界面活性剤、蛋白質、防腐剤等が含まれていてもよい。

30

## 【 0 0 4 0 】

標識測定用試薬は、抗原抗体反応で生成した免疫複合体中の標識を測定するための試薬であり、FGF-23の測定を可能とする標識測定用試薬であれば特に制限はない。標識は、抗FGF-23抗体に結合し、FGF-23の測定を可能とする標識であれば特に制限はなく、例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ等が挙げられる。標識測定用試薬には、必要に応じて、前述の界面活性剤、蛋白質、金属イオン、糖類、防腐剤等が含まれていてもよい。

40

## 【 0 0 4 1 】

標識としてペルオキシダーゼを用いる場合、標識測定用試薬としては、例えば過酸化水素および蛍光基質を含む試薬、過酸化水素および発光基質を含む試薬等が挙げられる。標識 (= ペルオキシダーゼ) と標識測定用試薬との反応により生成する蛍光、発光等を測定することにより、FGF-23を測定することができる。蛍光基質としては、例えば4 - ヒドロキシフェニル酢酸、3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。発光基質としては、例えばルミノール化合物、ルシゲニン化合物等が挙げられる。

## 【 0 0 4 2 】

標識としてアルカリホスファターゼを用いる場合、標識測定用試薬としては、例えばアルカリホスファターゼの基質を含む試薬等が挙げられる。標識 (= アルカリホスファター

50

ゼ)と標識測定用試薬との反応により生成する発光等を測定することにより、FGF-23を測定することができる。アルカリホスファターゼの基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム塩(AMPPD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]カン]-4-イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CDP-Star<sup>TM</sup>)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CSPD<sup>TM</sup>)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩(Lumigen<sup>TM</sup> APS-5)、9-(4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン)-10-メチルアクリダン・二ナトリウム塩等が挙げられる。

10

## 【0043】

標識として - ガラクトシダーゼを用いる場合、標識測定用試薬としては、例えば - ガラクトシダーゼの基質を含む試薬等が挙げられる。標識 (= - ガラクトシダーゼ)と標識測定用試薬との反応により生成する蛍光、発光等を測定することにより、FGF-23を測定することができる。 - ガラクトシダーゼの基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリル - - D-ガラクトピラノシド、ガラクトン - プラス [Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製] 又はその類似化合物等が挙げられる。

## 【0044】

標準物質としては、遺伝子組換え技術により取得された、あるいは生体試料から取得されたFGF-23や、FGF-23が発現している細胞等が挙げられる。

20

## 【0045】

## (2) 25(OH)D測定試薬

25(OH)D測定試薬としては、生体試料中の25(OH)Dを測定し得る試薬であれば特に制限はなく、例えば(1)担体に固定化され、かつ、25(OH)Dに結合する第1抗体、および、25(OH)Dに結合する第2抗体に標識が結合した標識化第2抗体を含む試薬、(2)担体に固定化され、かつ、25(OH)Dに結合する抗体、および、25(OH)Dに競合する競合物質に標識が結合した標識化競合物質を含む試薬、(3)担体に固定化され、かつ、25(OH)Dに競合する競合物質、および、25(OH)Dに結合する抗体に標識が結合した標識化抗体を含む試薬等が挙げられる。さらに、25(OH)D測定試薬には、必要に応じて、生体試料の希釈液、反応緩衝液、洗浄液、標識検出用試薬、25(OH)Dの標準物質等が含まれていてもよい。

30

## 【0046】

25(OH)Dに結合する抗体(抗25(OH)D抗体)としては、25(OH)Dに結合する抗体であれば特に制限がなく、例えばヤギ、ウサギ、ラット、マウス等の抗25(OH)D抗体等が挙げられる。抗25(OH)D抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。また、抗25(OH)D抗体のフラグメントも使用することができる。抗体フラグメントとしては、例えば前述のフラグメント等が挙げられる。第1抗体および第2抗体を用いる場合、第1抗体の抗原認識部位と第2抗体の抗原認識部位とは同じでも異なってもよく、異なっていることが好ましい。

40

## 【0047】

25(OH)Dに競合する競合物質としては、25(OH)Dに競合し得る物質であれば特に制限はなく、例えば25(OH)Dそのもの、抗25(OH)D抗体の抗原認識部位に相当する25(OH)D分子中の部分構造を含む物質等が挙げられる。

## 【0048】

担体としては、25(OH)Dの測定を可能とする担体であれば特に制限はなく、例えば前述の担体等が挙げられる。抗25(OH)D抗体および競合物質の担体への固定化としては、例えば前述の固定化方法等が挙げられる。

## 【0049】

生体試料の希釈液としては、25(OH)Dの測定を可能とする希釈液であれば特に制限はな

50

く、例えば前述の希釈液等が挙げられる。

【0050】

反応緩衝液としては、25(OH)Dの測定を可能とする緩衝液であれば特に制限はなく、例えば前述の緩衝液等が挙げられる。反応緩衝液には、必要に応じて、前述の界面活性剤、蛋白質、金属イオン、糖類、防腐剤等が含まれていてもよい。

【0051】

洗浄液としては、25(OH)Dの測定を可能とする洗浄液であれば特に制限はなく、例えば前述の洗浄液等が挙げられる。

【0052】

標識測定用試薬としては、25(OH)Dの測定を可能とする標識測定用試薬であれば特に制限はない。標識は、抗25(OH)D抗体に結合し、25(OH)Dの測定を可能とする標識であれば特に制限はなく、例えば前述の標識等が挙げられる。標識測定用試薬としては、例えば前述の標識測定用試薬等が挙げられる。標識測定用試薬には、必要に応じて、前述の界面活性剤、蛋白質、金属イオン、糖類、防腐剤等が含まれていてもよい。

10

【0053】

標準物質としては、生体試料より調製された25(OH)Dや化学合成された25(OH)D等が挙げられる。市販の25(OH)Dを標準物質として用いることもできる。

【0054】

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

20

【実施例1】

【0055】

<患者背景>

慢性腎臓病を有する大阪ビタミンDスタディーに登録されている患者から保存期の慢性腎臓病患者738名を選定し、本検討におけるインフォームドコンセントを得た。大阪大学医学部附属病院の倫理委員会にて本検討が承認された。2005年5月から2007年7月まで患者登録し2010年7月まで経過観察を実施した。

【0056】

<検体測定>

全血、血清または血漿からなる血液サンプルおよび尿サンプルは患者登録時点で採取し、30分以内に血液サンプルは遠心分離し、得られた血清は測定まで-80℃で凍結保存した。各種サンプルにおけるクレアチニン、アルブミン、カルシウム及び無機リンの測定およびeGFRを算出した。eGFRはイヌリンクレアランスに基づいた日本における標準法に従い算定した。

30

【0057】

全長1-84PTH測定はスキャンティボディズ(Scantibodies)社製のWhole PTHアッセイキットを用いた。FGF-23の測定はカイノス社製のキットを用いた。カルシトリオール測定はイムノダイアグノスティックシステムズ(Immunodiagnostic Systems)社製のTFB 1,25-hydroxyvitamin D RIA kitを用いた。また25(OH)Dの測定はディアソリン(DiaSorin)社製の<sup>125</sup>I RIA kitを用いた。各測定は各社の添付文書に記載された条件及び方法で実施した。

40

【0058】

(1) 多変量解析における腎イベント(血清クレアチニン倍増または透析導入)のハザード比(Hazard ratios)および95%信頼区域の検討

患者基本情報ならびに各種測定値を用い腎イベント発症に関するリスクについて多変量解析を実施した。その結果を図1に示す。図1は各種危険因子とハザード比との関係を示す図であり、各種危険因子に係る3つの数値は、左からハザード比、95%信頼区域の下限、95%信頼区域の上限を意味する。ここで、ハザード比とは、尿蛋白がない群[Proteinuria (-)]を対照群とした場合の、特定の危険因子の群の腎イベント発生が何倍高いかを示す値である。また、95%信頼区域とは、95%の確率で母平均が含まれる範囲である。

50

## 【 0 0 5 9 】

図 1 より明らかな様に、25(OH)D [25D]が10 ng/mL高濃度になるに伴い[25D (10ng/mL)]、年齢が10歳上がるに伴い[Age (10 years)]、女性[Gender (female)]、ヘモグロビン高値(Hemoglobin)、eGFRが高値[eGFR (10mL/min/1.73m<sup>2</sup>)]の場合に、腎症進展が遅い傾向が、また、FGF-23が高値(Log FGF-23)、心血管病罹患(Prior CVD)、高血圧(Systolic BP)および尿蛋白3+以上[Proteinuria (3+)]の場合に早期に腎症進展する傾向が確認された。

## 【 0 0 6 0 】

( 2 ) 25(OH)DおよびFGF-23における各群における腎イベントのハザード比および95%信頼区域の検討

25(OH)D [25D]濃度に関して、10 ng/mL未満、10 ng/mL以上20 ng/mL未満、20 ng/mL以上30 ng/mL未満、30 ng/mL以上の4群に分けた。またFGF-23 [FGF23]濃度に関して、31.7~80.5 pg/mLの濃度範囲を基に、FGF-23が低濃度から高濃度の順にQ1~Q5の5群に分けそれぞれハザード比(HR)および95%信頼区域(95%C.I.)を検討した。その結果を図2に示す。図2は各種危険因子とハザード比との関係を示す図であり、各種危険因子に係る括弧内の3つの数値は、左からハザード比、95%信頼区域の下限、95%信頼区域の上限を意味する。

10

## 【 0 0 6 1 】

25(OH)D [25D]濃度に関しては、高濃度から低濃度に移行するほど腎イベントのハザード比が上昇する傾向を示し、最も低い群(10 ng/mL未満)において最も高いハザード比(HR, 11.5)であった。

20

## 【 0 0 6 2 】

FGF-23 [FGF23]濃度に関しては、高濃度群の方が腎イベントのハザード比が増加する傾向が認められ、Q2グループ、Q3グループ、Q4グループ、Q5グループとFGF-23濃度が高いグループほど、ハザード比が高いことが示された。

## 【 0 0 6 3 】

( 3 ) 25(OH)DおよびFGF-23の組み合わせ各群における腎イベントのカプランマイヤー生存曲線の検討

全対象における25(OH)D濃度の中央値が23.0 ng/mL、FGF-23濃度の中央値が49.4 pg/mLであったため25(OH)D濃度に関して23.0 ng/mL未満を低値群、23.0 ng/mL以上を高値群とした。またFGF-23濃度に関して49.4 pg/mL未満を低値群、49.4 pg/mL以上を高値群とし、それぞれの組み合わせで25(OH)D濃度低値かつFGF-23濃度低値群(df群)、25(OH)D濃度高値かつFGF-23濃度低値群(Df群)、25(OH)D濃度低値かつFGF-23濃度高値群(dF群)、25(OH)D濃度高値かつFGF-23濃度高値群(DF群)の4群に分類し、約5年間における腎イベント(血清クレアチニン倍増もしくは透析導入)のカプランマイヤー生存曲線を作成した。ここでのカプランマイヤー生存曲線とは、4群のそれぞれの群について、腎イベントを発症せずに生存する確率を日数との関係で示したものである。

30

## 【 0 0 6 4 】

年齢、性別、糖尿病、心血管病罹患、高血圧、ヘモグロビン、血清アルブミン、尿たんぱく、eGFR、血清カルシウム、血清リン、カルシトリオール、whole PTH、採血の季節、ACE阻害剤/ARBの投与、活性型ビタミンD投与、カルシウム投与に関して補正する前のデータに基づくカプランマイヤー生存曲線を図3に、補正した後のデータに基づくカプランマイヤー生存曲線を図4に示す。

40

## 【 0 0 6 5 】

図3および図4から明らかな様に、補正前および補正後のどちらのデータにおいても25(OH)D低値かつFGF-23高値群(dF群)で有意に腎イベント発症が多いことが確認された。

## 【 0 0 6 6 】

( 4 ) 25(OH)DとFGF-23の組み合わせ各群における腎イベントのハザード比および95%信頼区域の検討

前項の25(OH)D [25D]とFGF-23 [FGF23]の組み合わせ4群における腎イベントのハザード比および95%信頼区域を検討した。その結果を図5に示す。

50

【 0 0 6 7 】

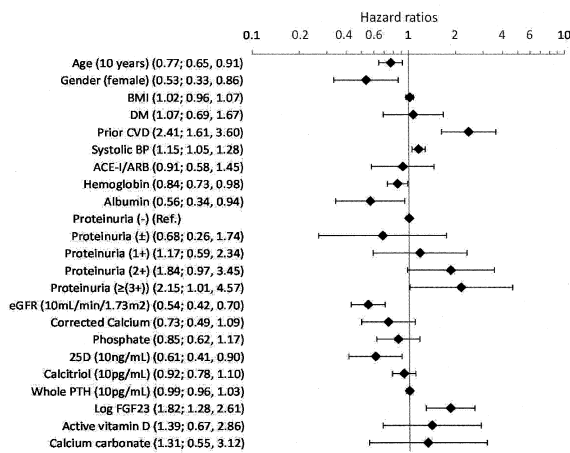
図5に示す様に、25(OH)D濃度高値かつFGF-23濃度低値群(Df群)を基準とし、25(OH)D濃度低値かつFGF-23濃度低値群(df群)ではハザード比(HR)と95%信頼区域(95%C.I.)がそれぞれ、1.47、0.63-3.43、25(OH)D濃度高値かつFGF-23濃度高値群(DF群)では、ハザード比(HR)と95%信頼区域(95%C.I.)がそれぞれ、1.96、0.88-4.36であり、25(OH)D濃度低値かつFGF-23濃度高値群(dF群)ではハザード比(HR)と95%信頼区域(95%C.I.)がそれぞれ、2.53、1.14-5.64であった。従って、25(OH)D濃度低値かつFGF-23濃度高値群(dF群)が最も腎イベントのリスクが高いことが確認された。

【 産業上の利用可能性 】

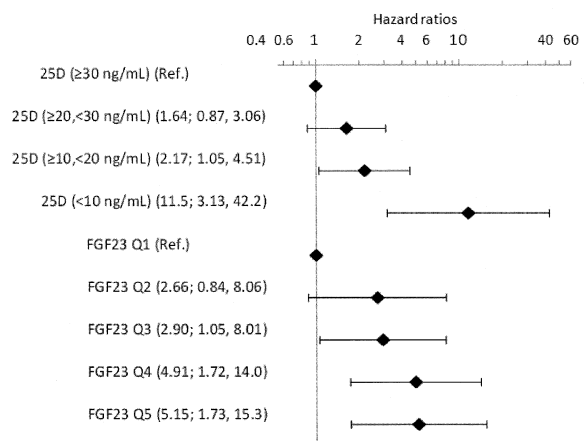
【 0 0 6 8 】

本発明により、腎不全患者の治療方針決定に有用な、腎不全の予後判定方法および腎不全の予後判定用キットが提供される。

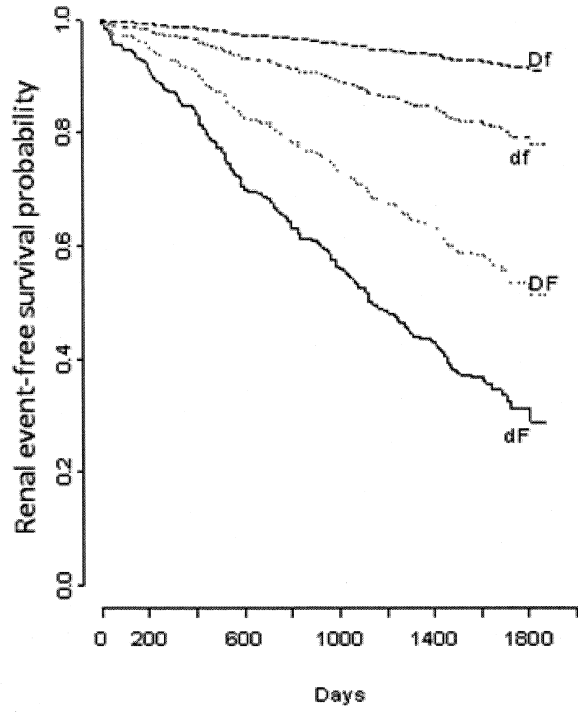
【 図 1 】



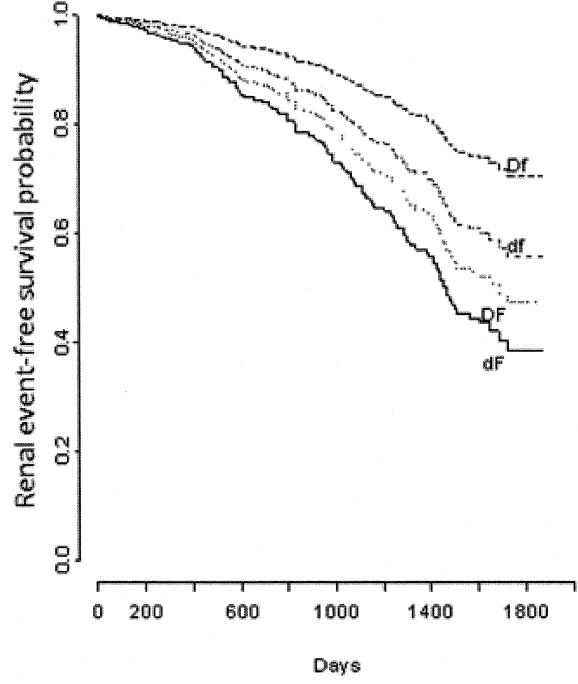
【 図 2 】



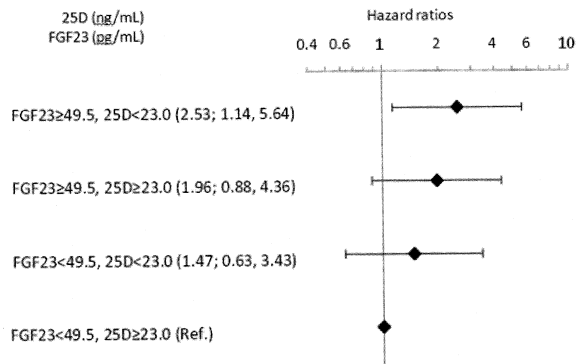
【 3 】



【 4 】



【 5 】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 濱野 高行  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 猪阪 善隆  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 松井 功  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

審査官 渡邊 吉喜

- (56)参考文献 PRIE Dominique et al. , Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23/Klotho System , Clinical Journal of the American Society of Nephrology , 米国 , 2010年 8月 , Vol.5, No.9 , 第1717-1722頁 , URL , <http://cjasn.asnjournals.org/content/5/9/1717.full.pdf+html>
- PILZ Stefan et al. , Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease , Nephrology Dialysis Transplantation , 英国 , 2011年 3月 4日 , Vol.26 Issue 3 , 第3603-3609頁 , URL , <http://ndt.oxfordjournals.org/content/26/11/3603.full.pdf+html>
- GUTIERREZ Orlando et al. , Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease , Journal of the American Society of Nephrology , 米国 , 2005年 6月 1日 , Vol.16, No.7 , 第2205-2215頁 , URL , <http://jasn.asnjournals.org/content/16/7/2205.full.pdf+html>
- SHIGEMATSU Takashi et al. , Possible Involvement of Circulating Fibroblast Growth Factor 23 in the Development of Secondary Hypo , American Journal of Kidney Diseases , 米国 , 2004年 8月 , Vol.44 No.2 , 第250-256頁
- WAGNER Dennis et al. , An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D , Clinical Biochemistry , カナダ , 2009年10月 , Vol.42, Issue 15 , 第1549-1556頁 , URL , <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912009003063>

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	肾功能衰竭的预后方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6012108B2</a>	公开(公告)日	2016-10-25
申请号	JP2013512339	申请日	2012-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
[标]发明人	濱野高行 猪阪善隆 松井功		
发明人	濱野 高行 猪阪 善隆 松井 功		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/82 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/50 G01N2800/347 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.H		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2011096718 2011-04-25 JP		
其他公开文献	JPWO2012147670A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种预测肾衰竭的方法，其特征在于测量生物样品中的成纤维细胞生长因子-23和25羟基化维生素D，以及测量成纤维细胞生长因子-23和25的试剂。本发明涉及用于预测肾衰竭的预测试剂盒，其包含用于测量羟基化维生素D的试剂。本发明提供了一种用于确定肾衰竭预后的方法和一种用于确定肾衰竭预后的试剂盒，其可用于选择药物和用于决定治疗计划，例如更严格的饮食或引入早期透析。

【图 2】

