

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/136917

発行日 平成30年2月1日(2018.2.1)

(43) 国際公開日 平成28年9月1日(2016.9.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 Z N A B	4 H O 4 5
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 33/543 5 8 3	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
CO 7 K 14/245 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2017-502492 (P2017-502492)	(71) 出願人	390037327
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/055728		積水メディカル株式会社
(22) 国際出願日	平成28年2月25日 (2016.2.25)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(31) 優先権主張番号	特願2015-35903 (P2015-35903)	(74) 代理人	110000774
(32) 優先日	平成27年2月25日 (2015.2.25)		特許業務法人 もえぎ特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(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】 免疫学的測定方法及び該方法に用いられる測定試薬

(57) 【要約】

【課題】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。

【解決手段】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。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 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、

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 $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ 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、

を接触させる工程を含む前記方法。

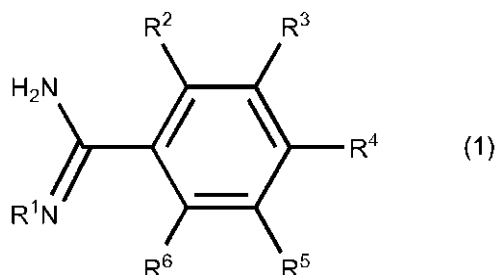
10

【請求項 2】

分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ 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請求項 1 に記載の方法。

式 (1)

【化 1】



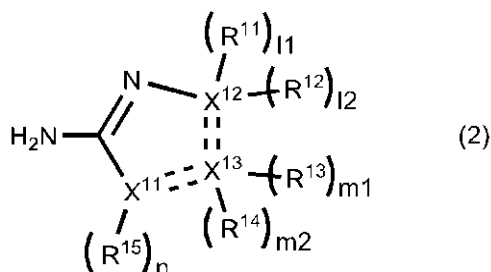
20

[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] の化合物もしくはその塩又はエステル。

30

式 (2)

【化 2】



40

[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

50

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、

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。

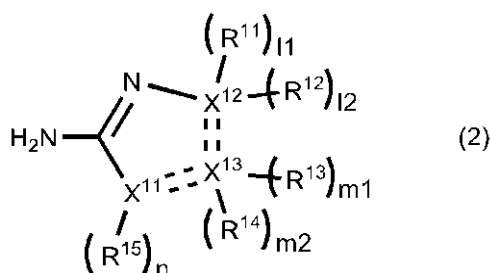
10

【請求項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請求項2に記載の方法。

式(2)

【化3】



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} の間及び X^{12} と X^{13} の間の二重破線は単結合であるか、

40

(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} の間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} 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} の間及び X^{12} と X^{13} 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} の間の二重破線は単結合、 X^{12} と X^{13} の間の二重破線は二重結合であるか、

50

(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。

【請求項 4】

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 5】

L - F A B P の存在が疑われる試料、抗 L - F A B P 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 (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 - 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の後、抗 L - F A B P 抗体と接触させる工程の順で行われる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 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、 $0.04 \text{ mmol/L} \sim 1.36 \text{ mmol/L}$ である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

粒子が、ラテックス粒子である、請求項 1 ~ 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 7 又は 8 に記載の方法

【請求項 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、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

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

【請求項 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 $NH_2 - C = N -$ 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 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を含む前記試薬。

【請求項 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 $NH_2 - C = N -$ 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 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

10

20

30

40

50

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。

【請求項 1 4】

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。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

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】

【0 0 0 2】

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)。

20

30

【0 0 0 3】

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。

【0 0 0 4】

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。

40

【0 0 0 5】

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

50

、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。

【 0 0 0 6 】

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

【 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 】

【 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]

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 $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ 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、

を接触させる工程を含む前記方法。

[2]

分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物が、下記式（1）で表される化合

10

20

30

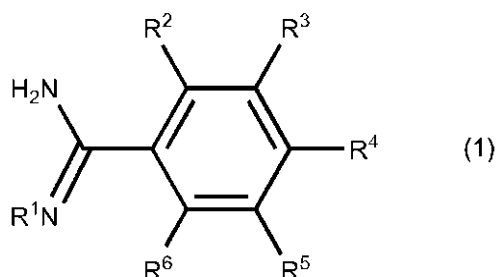
40

50

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】



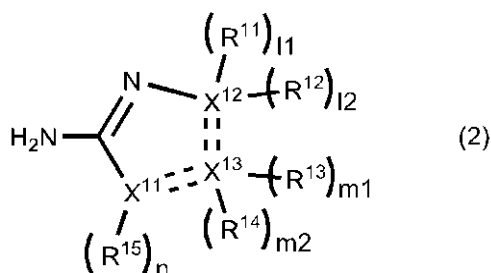
10

[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。

20

式(2)

【化2】



30

[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、

40

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、

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。

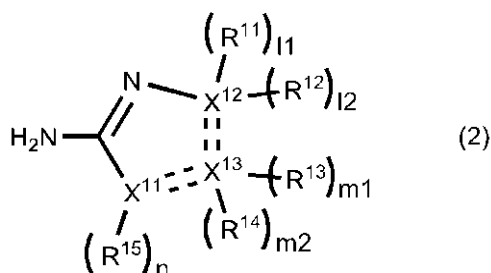
[3]

50

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】



(2)

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、

20

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、

30

(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、

40

(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]

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

50

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 - 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の後、抗L - F A B P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。

[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。

[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(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(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。

[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(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。

【発明の効果】

【0012】

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

10

20

30

40

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。

【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 - 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。

10

【0015】

（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 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 - 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。

20

【0016】

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 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。

30

【0017】

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、PCR（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（BSA、ヘモシアニン等）と結合させて用いることもできる。

40

【0018】

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。

【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 - 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

50

サギの場合、例えば、抗原 100 μg ~ 1 mg 程度を約 1 mL 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 Ig G 画分を回収してポリクローナル Ig G を得ることができる。

10

【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 10^6 個/mLの細胞密度で好適に実施できる。

20

【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。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。

30

【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。

40

【0024】

50

本発明に使用される抗 L - F A B P 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 - F A B P 抗体である、Santa Cruz Biotechnology社のC-4 (カタログ N o . sc-374537)、F-9 (カタログ N o . sc-271591)、R&D systems社の328607 (カタログ N o . MAB2964)、Hycult biotech社のL2B10 (カタログ N o . HA2049-1A)、Lifespan Biosciences社の2G4 (カタログ N o . LS-B3001) 等が利用可能である。これらの抗体は、ヒト由来 L - F A B P 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 $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造及び環状構造を有する化合物を用いれば、抗体が L - F A B P 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 - F A B P を検出することが可能である。

【 0 0 2 5 】

10

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。

【 0 0 2 6 】

(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、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 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。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。

20

【 0 0 2 7 】

(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。

30

【 0 0 2 8 】

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。

担体粒子の粒子径としては、0 . 1 5 ~ 0 . 4 5 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。

40

【 0 0 2 9 】

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。

【 0 0 3 0 】

(不溶性担体への抗体の固定化)

50

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、抗体分子はスパ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 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。

【 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)

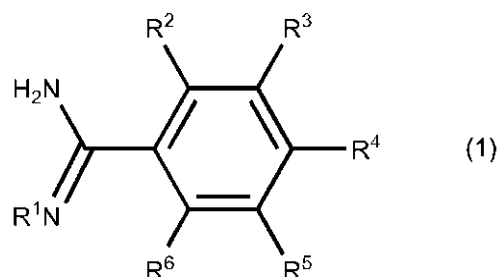
本発明の分子内に $\text{NH}_2 - \text{C} = \text{N} -$ の部分構造を有する化合物は、さらに環状構造を有することができ、式 (1) 及び式 (2) で表される（本明細書において、「式 (1) の化合物」、「式 (2) の化合物」ということがある）。

30

【 0 0 3 4 】

式 (1) の化合物は、

【 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

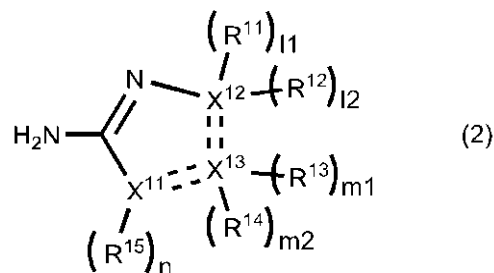
50

。) 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、

20

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、

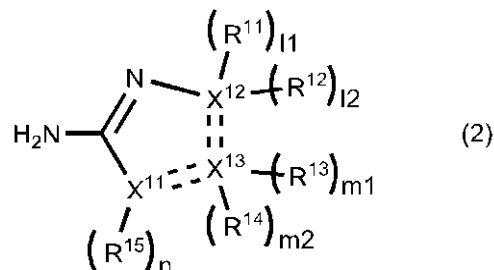
上記 l_1 、 l_2 、 m_1 、 m_2 及び n の値並びに X^{11} と X^{13} との間の二重破線及び X^{12} と X^{13} との間の二重破線の結合は、 $X^{11} \sim X^{13}$ の原子価と整合して定まる値及び結合を示す] 化合物又はその塩である。

30

【 0 0 3 6 】

さらに式 (2) の化合物は、

【 化 6 】



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、

50

⁴ 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^{1 5} 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^{1 1} ~ X^{1 3}、l^{1 1}+l^{1 2}、m¹+m²、n (l^{1 1}、l^{1 2}、m¹、m² 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^{1 1} は硫黄原子、X^{1 2} 及び X^{1 3} は炭素原子であり、l^{1 1}+l^{1 2} は 2、m¹+m² は 2、n は 0 であり、X^{1 1} と X^{1 3} との間及び X^{1 2} と X^{1 3} との間の二重破線は単結合であるか、

(b) X^{1 1} は硫黄原子、X^{1 2} 及び X^{1 3} は炭素原子であり、l^{1 1}+l^{1 2} は 1、m¹+m² は 1、n は 0 であり、X^{1 1} と X^{1 3} との間の二重破線は単結合、X^{1 2} と X^{1 3} との間の二重破線は二重結合であるか、

(c) X^{1 1} は窒素原子、X^{1 2} 及び X^{1 3} は炭素原子であり、l^{1 1}+l^{1 2} は 2、m¹+m² は 2、n は 1 であり、X^{1 1} と X^{1 3} との間及び X^{1 2} と X^{1 3} との間の二重破線は単結合であるか、

(d) X^{1 1} は窒素原子、X^{1 2} 及び X^{1 3} は炭素原子であり、l^{1 1}+l^{1 2} は 1、m¹+m² は 1、n は 1 であり、X^{1 1} と X^{1 3} との間の二重破線は単結合、X^{1 2} と X^{1 3} との間の二重破線は二重結合であるか、

(e) X^{1 1} 及び X^{1 2} は窒素原子、X^{1 3} は炭素原子であり、l^{1 1}+l^{1 2} は 1、m¹+m² は 1、n は 0 であり、X^{1 1} と X^{1 3} との間の二重破線は二重結合、X^{1 2} と X^{1 3} との間の二重破線は単結合であるか、又は、

(f) X^{1 1} 及び X^{1 2} 及び X^{1 3} は窒素原子であり、l^{1 1}+l^{1 2} は 0、m¹+m² は 0、n は 1 であり、X^{1 1} と X^{1 3} との間の二重破線は単結合、X^{1 2} と X^{1 3} 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。

【 0 0 3 7 】

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 NH₂ - 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。

【 0 0 3 8 】

さらに、本発明の分子内に NH₂ - C = N - の部分構造を有する化合物としては、グアニジノ基 (H₂N - (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)、グアニジンスルファミン酸塩 (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。

10

【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 / 003155 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 / 003155 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。

20

【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。

30

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。

40

【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

50

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、0.01～5%、0.02～5%、0.03～5%、0.04～5%、0.05～5%、0.1～5%、0.2～5%、0.3～5%、0.4～5%、0.75～5%、1～5%、1～4%、1～3%が挙げられ、好適には、0.05～5%、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BPF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BPF-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-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、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。

【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-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。

【0047】

具体的には、L-FABP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-FABP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-FABP-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-FABP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BPF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-FABP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

10

20

30

40

50

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。

【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-FABP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。

10

【0051】

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。

20

【0052】

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

【0053】

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、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。

30

【0054】

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、ProClin 300等)が挙げられる。

【0055】

さらに、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リ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技術より、リコンビナント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ビナント蛋白質を用いることがより好ましい。

40

【実施例】

50

【 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 - 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 . 6 4 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 1 2 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。

10

(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 . 6 4 m g / m L 含む 5 m m o l / L T r i s 緩衝液 (p H 7 . 5) 8 m L に、平均粒径 0 . 3 1 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 T r i s 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。

20

【 0 0 5 8 】

(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 5 9 】

(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 6 0 】

(対照第一試薬：標準物質希釈液を兼ねる)

3 0 0 m m o l / L B i s - T r i s 緩衝液 (p H 6 . 9)

1 0 0 m m o l / L N a C l

0 . 4 7 ~ 0 . 5 7 % L i p i d u r e - B L 4 0 3 S E

(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)

3 . 7 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。

40

(凍結融解尿)

採取後、- 3 0 で凍結保存されていた部分尿 (n = 3 2 、基準法での測定値 0 . 3 ~ 4 . 6 n g / m L) を、一度だけ融解して測定に使用した。

【 0 0 6 1 】

(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 2 】

50

〔実施例 1〕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 1

第一試薬に添加する蛋白質が、添加なし（対照例 1）、B S A（比較例 1）、0.1% B P F（実施例 1）の場合の、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

（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% B P F 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 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 - F A B P 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% B S A 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。

【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 - 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 1 に示した。

【0064】

【表 1】

	添加蛋白質	R ²	回帰式
実施例 1	0.1% B P F	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% B S A	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 - F A B P の測定において、B P F を添加することにより、L - F A B P 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〕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 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% B P F（実施例 2～5）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、-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】

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-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2に示した。

10

【0068】

【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

【0069】

実施例2～5における測定値と基準測定値とのR²は0.896～0.939であり、相関関係は良好であった。

20

【0070】

〔実施例6～9〕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

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0.01～1% BPF(実施例6～9)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、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BPF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。

30

【0071】

2. 結果

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-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3に示した。

40

【0072】

【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

【0073】

実施例6～9における測定値と基準測定値とのR²は0.579～0.673であった。

50

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】

【0074】

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、 $2 . 2 \pm 2 . 3 \mu \text{g} / \text{g C R}$ 。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】

2016136917000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/531(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kenjiro KIMURA, "L-FABP no Rinshoteki Igi to Kongo no Tenbo", Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation, 2014, vol.39, no.4, page 433	1-14
Y	WO 2007/074860 A1 (Sekisui Medical Co., Ltd.), 05 July 2007 (05.07.2007), abstract; page 1, lines 20 to 25; page 2, lines 23 to 28; paragraph [0011]; page 9, lines 22 to 23 & EP 1970704 A1 page 2, lines 23 to 28; page 3, lines 7 to 9; paragraph [0011]; page 6, lines 51 to 52 & US 2010/0167310 A1 & CN 101351707 A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ 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
15 June 2016 (15.06.16)Date of mailing of the international search report
28 June 2016 (28.06.16)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055728

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-211056 A (Konica Corp.), 20 August 1996 (20.08.1996), paragraph [0002] (Family: none)	1-14
Y	WO 2005/003155 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 13 January 2005 (13.01.2005), Background Art; example 5; fig. 10 & US 2006/0183173 A1 fig. 10; Background Art; example 5 & EP 1642904 A1 & CN 1816562 A	1-14
A	JP 11-242026 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 07 September 1999 (07.09.1999), example 5 & US 2007/0243560 A1 examples 5A, 5B & US 7592148 B1 & WO 1999/027363 A1 & EP 1043587 A1	1-14
A	JP 5-322891 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 07 December 1993 (07.12.1993), abstract; paragraph [0009] (Family: none)	1-14
P,A	Nobuhiro SATO, "Nyo-chu L-FABP no Sokuji Sokutei o Kano ni suru Shinki Latex-ho Shiyaku Norudia L-FABP no Kisoteki Seino Hyoka", Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation, 01 September 2015 (01.09.2015), vol.40, no.4, page 523 269	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 5 7 2 8										
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)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i												
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/531, G01N33/53, G01N33/543												
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)												
C. 関連すると認められる文献												
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
Y	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, Vol.39 No.4, Page.433	1-14										
Y	WO 2007/074860 A1 (積水メディカル株式会社) 2007.07.05, [要約] 1 ページ 20 行 ~ 25 行、2 ページ 23 行 ~ 28 行、[0011]、9 ページ 22 行 ~ 23 行 & EP 1970704 A1 page.2 line 23-28, page.3 line 7-9, [0011], page.6 line 51-52 & US 2010/0167310 A1 & CN 101351707 A	1-14										
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。												
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> 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 </td> </tr> </table>				* 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							
* 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 15.06.2016		国際調査報告の発送日 28.06.2016										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td>2 J</td> <td>3 3 1 2</td> </tr> <tr> <td colspan="3">三木 隆</td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101</td> <td colspan="2">内線 3252</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	3 3 1 2	三木 隆			電話番号 03-3581-1101	内線 3252	
特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	3 3 1 2										
三木 隆												
電話番号 03-3581-1101	内線 3252											

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 5 7 2 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 8-211056 A (コニカ株式会社) 1996.08.20, [0002] (ファミリーなし)	1-14
Y	WO 2005/003155 A1 (東洋紡績株式会社) 2005.01.13, [背景技術]、 実施例5、図10 & US 2006/0183173 A1 Fig. 10, BACKGROUND ART, EXAMPLE5 & EP 1642904 A1 & CN 1816562 A	1-14
A	JP 11-242026 A (田辺製薬株式会社) 1999.09.07, 実施例5 & US 2007/0243560 A1 Example5A, Example5B & US 7592148 B1 & WO 1999/027363 A1 & EP 1043587 A1	1-14
A	JP 5-322891 A (株式会社京都第一科学) 1993.12.07, [要約][0009] (ファミリーなし)	1-14
PA	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, 2015.09.01, Vol.40 No.4, Page.523 269	1-14

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	C 0 7 K 16/18	
	C 0 7 K 14/245	

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

F ターム(参考) 4H045 AA30 BA62 CA11 CA40 DA75 EA50

(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)	用于该方法的免疫学测量方法和测量试剂		
公开(公告)号	JPWO2016136917A1	公开(公告)日	2018-02-01
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		
[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 G01N33/543.581.J G01N33/543.583 G01N33/53.D G01N33/543.521 C07K16/18 C07K14/245		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA62 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
优先权	2015035903 2015-02-25 JP		
其他公开文献	JP6660933B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种更精确和灵敏的测量方法，降低L-FABP免疫学测量中发生非特异性反应的可能性。更具体而言，目的在于提供即使分析物浓度低（例如，L-FABP浓度在正常值附近）也是准确且灵敏的测量方法。在使用抗L-FABP抗体的L-FABP的免疫测定方法中，通过由DnaK的氨基酸序列编号419～607的氨基酸构成的多肽，可以容易地抑制非特异性反应，热休克蛋白（HSP），其源自如SEQ ID NO：1所示的大肠杆菌或者即使在高灵敏度测量中也与该多肽具有至少90％序列同一性的多肽。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2016/136917	
発行日 平成30年2月1日 (2018.2.1)		(43) 国際公開日 平成28年9月1日 (2016.9.1)			
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
G O 1 N 33/531 (2006.01)		G O 1 N 33/531		Z N A B 4 H 0 4 5	
G O 1 N 33/543 (2006.01)		G O 1 N 33/543		5 8 1 J	
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N 33/543		5 8 3	
C O 7 K 16/18 (2006.01)		G O 1 N 33/53		D	
C O 7 K 14/245 (2006.01)		G O 1 N 33/543		5 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く					
出願番号 特願2017-502492 (P2017-502492)		(71) 出 発 人 390037327			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/055728		積水メディカル株式会社			
(22) 国際出願日 平成28年2月25日 (2016.2.25)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号			
(31) 優先権主張番号 特願2015-35903 (P2015-35903)		(74) 代理人 110000774			
(32) 優先日 平成27年2月25日 (2015.2.25)		特許業務法人 もえぎ特許事務所			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(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】 免疫学的測定方法及び該方法に用いられる測定試薬					