

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/221544

発行日 令和2年4月2日(2020.4.2)

(43) 国際公開日 平成30年12月6日(2018.12.6)

(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	B
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号	特願2019-521247 (P2019-521247)	(71) 出願人	000162478
(21) 国際出願番号	PCT/JP2018/020635		日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社
(22) 国際出願日	平成30年5月30日(2018.5.30)		東京都中央区晴海一丁目8番10号
(31) 優先権主張番号	特願2017-107509 (P2017-107509)	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成29年5月31日(2017.5.31)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100160923
			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
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子-23の測定方法、測定試薬及び測定キット

(57) 【要約】

以下の工程(1)~(3)を含み、工程(1)及び/又は工程(2)の反応を、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等の界面活性剤を含有する水性媒体中で行うことを特徴とする、試料中の線維芽細胞増殖因子-23(以下、FGF-23と記す)の測定方法。

(1) 試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で反応させる工程；

(2) FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を、水性媒体中で、前記工程(1)で生成した免疫複合体1と反応させ、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23、及びFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体2を生成させる工程；

(3) 前記工程(2)で生成した免疫複合体2を測定する工程

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程(1)～(3)を含み、工程(1)及び/又は工程(2)の反応を、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体及びポリオキシエチレン多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有する水性媒体中で行うことを特徴とする、試料中の線維芽細胞増殖因子-23(以下、FGF-23と記す)の測定方法。

(1) 試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で反応させ、FGF-23、及びFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体1を生成させる工程；

(2) FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を、水性媒体中で、前記工程(1)で生成した免疫複合体1と反応させ、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23、及びFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体2を生成させる工程；

(3) 前記工程(2)で生成した免疫複合体2を測定する工程。

【請求項 2】

界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、炭素数8～24のアルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項2記載の方法。

【請求項 4】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、炭素数12～20のアルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項3記載の方法。

【請求項 5】

線維芽細胞増殖因子-23(以下、FGF-23と記す)に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片、並びに、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体及びポリオキシエチレン多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有することを特徴とする、試料中のFGF-23測定試薬。

【請求項 6】

界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項5記載の試薬。

【請求項 7】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、炭素数8～24のアルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項6記載の試薬。

【請求項 8】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、炭素数12～20のアルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項7記載の試薬。

【請求項 9】

線維芽細胞増殖因子-23(以下、FGF-23と記す)に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含有する第1試薬、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含有する第2試薬を含み、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体及びポリオキシエチレン多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤が第1試薬、及び、第2試薬の少なくとも1つの試薬に含まれる、FGF-23の測定キット。

【請求項 10】

線維芽細胞増殖因子-23(以下、FGF-23と記す)に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含有する第1試薬、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含有する第2試薬、並びに、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体及びポリオキシエチレン多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有する第3試薬を含む、FGF-23の測定キット。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項 9 又は 1 0 記載のキット。

【請求項 1 2】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、炭素数 8 ~ 2 4 のアルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項 1 1 記載のキット。

【請求項 1 3】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、炭素数 1 2 ~ 2 0 のアルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項 1 2 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0 0 0 1】**

本発明は、試料中の線維芽細胞増殖因子-23（以下、FGF-23と記す）の測定方法、測定試薬及び測定キットに関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

FGF-23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）。

20

【0 0 0 3】

FGF-23は、N末端の24アミノ酸が脱離した227アミノ酸からなるポリペプチドが修飾を受け、糖鎖が付加した構造として、約32.5 k D a の成熟したタンパクとして細胞外に放出される。また、FGF-23は、トロニンによりN末端より197番目と198番目の間の結合が切断され、198-251番目のフラグメントがC末フラグメントとして血中に存在する。

【0 0 0 4】

これまでに、FGF-23に対する抗体が取得され（特許文献 1 及び 2 ；非特許文献 2 参照）、当該抗体を用いた、血清又は血漿中のFGF-23の免疫測定法が報告されており（特許文献 1 ；非特許文献 2 参照）、本測定法に基づく測定キットも市販されている〔Human Intact FGF-23 ELISA Kit(Immutopics社)、Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit(Immutopics社)、FGF-23測定試薬（カイノス社）〕。また、磁性粒子を用いるFGF-23の免疫測定方法も報告されている（特許文献 3 参照）。

30

【先行技術文献】**【特許文献】****【0 0 0 5】**

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 3 / 0 5 7 7 3 3 パンフレット

【特許文献 2】特表 2 0 0 4 - 5 0 4 0 6 3 号公報

【特許文献 3】国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 9 8 3 7 号パンフレット

【非特許文献】**【0 0 0 6】**

40

【非特許文献 1】腎と骨代謝，vol.15，No.4，p.351～356（2002）.

【非特許文献 2】N ENGL J MED，Vol.348，No.17，pp.1656-1663（2003）.

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 7】**

本発明の目的は、正確、かつ、高感度な試料中のFGF-23の測定方法、測定試薬及び測定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】**【0 0 0 8】**

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、試料と、FGF-23に結合する抗

50

体若しくは該抗体断片との反応を、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（以下、POEアルキルエーテルという）、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体（以下、POE・POP共重合体）、及びポリオキシエチレン多環フェニルエーテル（以下、POE多環フェニルエーテルという）からなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤を含有する水性媒体中で行うことにより、試料中のFGF-23を正確、かつ、高感度に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、以下の〔 １ 〕～〔 １ ３ 〕に関する。

〔 １ 〕以下の工程（ １ ）～（ ３ ）を含み、工程（ １ ）及び／又は工程（ ２ ）の反応を、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤を含有する水性媒体中で行うことを特徴とする、試料中のFGF-23の測定方法。

10

（ １ ）試料と、FGF-23に結合する第 １ 抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で反応させ、FGF-23、及びFGF-23に結合する第 １ 抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体 １ を生成させる工程；

（ ２ ）FGF-23に結合する第 ２ 抗体若しくは該抗体断片を、水性媒体中で、前記工程（ １ ）で生成した免疫複合体 １ と反応させ、FGF-23に結合する第 １ 抗体若しくは該抗体断片、FGF-23、及びFGF-23に結合する第 ２ 抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体 ２ を生成させる工程；

（ ３ ）前記工程（ ２ ）で生成した免疫複合体 ２ を測定する工程。

20

〔 ２ 〕界面活性剤が、POEアルキルエーテルである〔 １ 〕記載の方法。

〔 ３ 〕POEアルキルエーテルが、炭素数 ８ ～ ２ ４ のアルキルを有するPOEアルキルエーテルである〔 ２ 〕記載の方法。

〔 ４ 〕POEアルキルエーテルが、炭素数 １ ２ ～ ２ ０ のアルキルを有するPOEアルキルエーテルである〔 ３ 〕記載の方法。

【 0 0 1 0 】

〔 ５ 〕FGF-23に結合する第 １ 抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第 ２ 抗体若しくは該抗体断片、並びに、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤を含有することを特徴とする、試料中のFGF-23測定試薬。

30

〔 ６ 〕界面活性剤が、POEアルキルエーテルである〔 ５ 〕記載の試薬。

〔 ７ 〕POEアルキルエーテルが、炭素数 ８ ～ ２ ４ のアルキルを有するPOEアルキルエーテルである〔 ６ 〕記載の試薬。

〔 ８ 〕POEアルキルエーテルが、炭素数 １ ２ ～ ２ ０ のアルキルを有するPOEアルキルエーテルである〔 ７ 〕記載の試薬。

【 0 0 1 1 】

〔 ９ 〕FGF-23に結合する第 １ 抗体若しくは該抗体断片を含有する第 １ 試薬、及び、FGF-23に結合する第 ２ 抗体若しくは該抗体断片を含有する第 ２ 試薬を含み、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤が第 １ 試薬、及び、第 ２ 試薬の少なくとも１つの試薬に含まれる、FGF-23の測定キット。

40

〔 １ ０ 〕FGF-23に結合する第 １ 抗体若しくは該抗体断片を含有する第 １ 試薬、FGF-23に結合する第 ２ 抗体若しくは該抗体断片を含有する第 ２ 試薬、並びに、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤を含有する第 ３ 試薬を含む、FGF-23の測定キット。

〔 １ １ 〕界面活性剤が、POEアルキルエーテルである〔 ９ 〕又は〔 １ ０ 〕記載のキット。

〔 １ ２ 〕POEアルキルエーテルが、炭素数 ８ ～ ２ ４ のアルキルを有するPOEアルキルエーテルである〔 １ １ 〕記載のキット。

〔 １ ３ 〕POEアルキルエーテルが、炭素数 １ ２ ～ ２ ０ のアルキルを有するPOEアルキルエーテルである〔 １ ２ 〕記載のキット。

50

【発明の効果】**【0012】**

本発明により、正確、かつ、高感度な試料中のFGF-23の測定方法、測定試薬及び測定キットが提供される。

【発明を実施するための形態】**【0013】****1. 測定方法**

本発明の試料中のFGF-23の測定方法は、以下の工程(1)～(3)を含み、工程(1)及び/又は工程(2)の反応を、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有する水性媒体中で行うことを特徴とする方法である。

(1) 試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で反応させ、FGF-23、及びFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体1を生成させる工程；

(2) FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を、水性媒体中で、前記工程(1)で生成した免疫複合体1と反応させ、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23、及びFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体2を生成させる工程；

(3) 前記工程(2)で生成した免疫複合体2を測定する工程。

【0014】

さらに、工程(3)の後に以下の工程(4)及び工程(5)を行うことにより、試料中のFGF-23の濃度を決定することができる。

(4) 試料として、既知濃度のFGF-23を用いて前記工程(1)から(3)を行い、FGF-23濃度と測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

(5) 工程(4)で作成された検量線と、工程(3)の測定により得られた測定値とから、試料中のFGF-23の濃度を決定する工程。

【0015】**工程(1)**

工程(1)において、試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で反応させる方法は、FGF-23、及びFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体1を生成させる方法であれば特に制限はない。

【0016】

FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片は不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。

FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が不溶性担体に固定化されている場合、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とを、抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。

【0017】

一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とを用いて、工程(1)において免疫複合体1を生成させる方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。

・試料と、一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とを、水性媒体中で同時に反応させて、免疫複合体1を生成させる方法；

・試料と、一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で反応させた後、当該反応の反応液中に一組の親和性物質の

10

20

30

40

50

他方 (a) が結合した不溶性担体を添加し、免疫複合体 1 を生成させる方法 ;

・ 一組の親和性物質の一方 (A) が結合した FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方 (a) が結合した不溶性担体とを、水性媒体中で反応させた後、当該反応の反応液中に試料を添加し、免疫複合体 1 を生成させる方法。

【 0 0 1 8 】

A - a の組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

・ ビオチンとアビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等) との組み合わせ ;

・ アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等) とビオチンとの組み合わせ ;

・ FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片の Fc 領域と、Fc 領域と結合する抗体との組み合わせ。

【 0 0 1 9 】

不溶性担体としては、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片を固定化し、本発明の FGF-23 の測定方法を可能とする不溶性担体であれば特に制限はなく、例えばマイクロタイタープレート等の合成樹脂製プレート、ガラス製または合成樹脂製の粒状物 (ビーズ) 、ガラス製または合成樹脂製の球状物 (ボール) 、ラテックス、磁性粒子、ニトロセルロース膜等の各種メンブレン、合成樹脂製の試験管等が挙げられる。合成樹脂製プレートとしては、例えばポリエチレンプレート、ポリプロピレンプレート、ポリスチレンプレート等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片の不溶性担体への固定化としては、本発明の FGF-23 の測定方法を可能とする固定化であれば特に制限はなく、物理吸着、化学結合による固定化等が挙げられる。物理吸着としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片は、前述の物理吸着及び / 又は化学結合を利用して、直接、不溶性担体に固定化してもよいし、間接的に不溶性担体に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばビオチンとアビジン類 (アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等) との特異的結合を介して、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片を不溶性担体に固定化する方法等が挙げられる。また、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体に固定化してもよい。

【 0 0 2 2 】

リンカーとしては、不溶性担体表面の官能基と、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片が有する官能基の両者を共有結合できる分子等が挙げられ、例えば、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片が有する官能基と反応することができる第 1 の反応活性基と、不溶性担体表面の官能基と反応することができる第 2 の反応活性基とを同時に持つ分子であって、第 1 の反応活性基と第 2 の反応活性基が異なる基である分子が好ましく用いられる。FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片が有する官能基、および不溶性担体はその表面に保持している官能基としては、例えばカルボキシル基、アミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、N-ヒドロキシサクシニル基、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける反応活性基としては、例えばアリルアジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ペンタフルオロフェニル (PFP) エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

工程 (1) における、試料と、FGF-23 に結合する第 1 抗体若しくは該抗体断片との反応の反応温度は、本発明の FGF-23 の測定方法を可能とする温度であれば特に制限はなく、通

10

20

30

40

50

常、0～50 であり、4～45 が好ましく、20～40 が特に好ましい。当該反応の反応時間は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1分間～4時間であり、5分間～3時間が好ましく、10分間～2時間が特に好ましい。FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片の反応溶液中の濃度は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常0.01～100 µg/mLであり、0.1～20 µg/mLが好ましい。

【0024】

工程(2)

工程(2)において、工程(1)で生成した免疫複合体1に、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を添加して反応させてもよいし、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片に、工程(1)で生成した免疫複合体1を添加して反応させてもよい。

10

【0025】

工程(2)における、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、FGF-23と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片とからなる免疫複合体2を生成させる反応の反応温度は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする温度であれば特に制限はなく、通常、0～50 であり、4～45 が好ましく、20～40 が特に好ましい。当該反応の反応時間は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1分間～4時間であり、5分間～3時間が好ましく、10分間～2時間が特に好ましい。FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片の反応溶液中の濃度は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常0.01～100 µg/mLであり、0.1～20 µg/mLが好ましい。

20

【0026】

工程(1)、工程(2)のいずれか、又は、両方の工程は、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有する水性媒体中で行われる。

【0027】

本発明におけるPOEアルキルエーテルとしては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とするPOEアルキルエーテルであれば特に制限はなく、例えば炭素数8～24のアルキルを有するPOEアルキルエーテルが挙げられ、炭素数12～20のアルキルを有するPOEアルキルエーテルが好ましい。炭素数8～24のアルキルとしては、例えばオクチル、イソオクチル、ノニル、デシル、イソデシル、ウンデシル、ドデシル(ラウリル)、トリデシル、テトラデシル(ミリスチル)、ペンタデシル、ヘキサデシル(セチル)、ヘプタデシル、オクタデシル(ステアリル)、オレイル、ノナデシル、イコシル、ヘネイコシル、ドコシル(ベヘニル)、トリコシル、テトラコシル等が挙げられる。炭素数12～20のアルキルとしては、例えばドデシル(ラウリル)、トリデシル、テトラデシル(ミリスチル)、ペンタデシル、ヘキサデシル(セチル)、ヘプタデシル、オクタデシル(ステアリル)、オレイル、ノナデシル、イコシル等が挙げられる。POEアルキルエーテルの市販品としては、例えばノニオンK-204、ノニオンK-220(以上、ポリオキシエチレンラウリルエーテル;日油社製)、ノニオンE-205、ノニオンE-230(以上、ポリオキシエチレンオレイルエーテル;日油社製)、ノニオンS-215、ノニオンS-225(以上、ポリオキシエチレンステアリルエーテル;日油社製)、エマルゲン108、エマルゲン120(以上、ポリオキシエチレンラウリルエーテル;花王社製)、エマルゲン220(ポリオキシエチレンセチルエーテル;花王社製)、エマルゲン320P(ポリオキシエチレンステアリルエーテル;花王社製)、エマルゲン420(ポリオキシエチレンオレイルエーテル;花王社製)、アデカトールLA-875、アデカトールLA-975(以上、ポリオキシエチレンラウリルエーテル;ADEKA社製)、アデカトールOA-7(ポリオキシエチレンオレイルエーテル;ADEKA社製)、エマルミンNL-70、エマルミンNL-90、エマルミンNL-100、エマルミンNL-110、エマルミンLS-80、エマルミンLS-90(以上、ポリオキシエチレンラウリルエーテル;三洋化成工業社製)、BLAUNON EL-1507、BLAUNON EL-1509、BLAU

30

40

50

NON EL - 1512P、BLAUNON EL - 1515、BLAUNON EL - 1521 (以上、ポリオキシエチレンラウリルエーテル; 青木油脂社製)、BLAUNON CH - 310、BLAUNON CH - 310L、BLAUNON CH - 313 (以上、ポリオキシエチレンセチルエーテル; 青木油脂社製)、BLAUNON SR - 711 (ポリオキシエチレンステアリルエーテル; 青木油脂社製)、BLAUNON EN - 1511 (ポリオキシエチレンオレイルエーテル; 青木油脂社製)、ノイゲンSD - 60、ノイゲンSD - 70、ノイゲンSD - 80、ノイゲンSD - 110、ノイゲンSD - 150 (以上、ポリオキシエチレンイソデシルエーテル; 第一工業製薬社製)、ノイゲンTDS - 80、ノイゲンTDS - 100、ノイゲンTDS - 200D (以上、ポリオキシエチレントリデシルエーテル; 第一工業製薬社製) 等が挙げられる。

10

【0028】

本発明におけるPOE・POP共重合体としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とするPOE・POP共重合体であれば特に制限はない。本発明におけるPOE・POP共重合体のポリオキシエチレンの付加モル数は特に限定されないが、5～300モルが好ましく、17～200モルがより好ましい。また、ポリオキシプロピレンの付加モル数も特に限定されないが、17～70モルが好ましく、20～40モルがより好ましい。POE・POP共重合体の市販品としては、アデカブルロニックL - 61 (ポリオキシエチレン(5)ポリオキシプロピレングリコール(30); ADEKA社製)、アデカブルロニックL - 71 (ポリオキシエチレン(5)ポリオキシプロピレングリコール(35); ADEKA社製)、プロノン201 (ポリオキシエチレン(5)ポリオキシプロピレングリコール(35); 日本油脂社製)、アデカブルロニックL - 34 (ポリオキシエチレン(16)ポリオキシプロピレングリコール(17); ADEKA社製)、ニューボールPE - 78 (ポリオキシエチレン(150)ポリオキシプロピレングリコール(35); 三洋化成社製)、プロノン208 (ポリオキシエチレン(150)ポリオキシプロピレングリコール(35); 日本油脂社製)、アデカブルロニックF - 68 (ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレングリコール(30); ADEKA社製)、エマルゲンPP - 290 (ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレングリコール(30); 花王社製)、アデカブルロニックF - 88 (ポリオキシエチレン(200)ポリオキシプロピレングリコール(40); ADEKA社製) 等が挙げられる。

20

【0029】

本発明におけるPOE多環フェニルエーテルとしては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とするPOE多環フェニルエーテルであれば特に制限はない。本発明におけるPOE多環フェニルエーテルにおける多環フェニルとは、基内に1つの芳香環を有する基(置換基)が2つ以上置換したフェニル基、基内に2つ以上の芳香環を有する基(置換基)が1つまたは複数置換したフェニル基等が挙げられる。基内に1つの芳香環を有する基としては、例えばベンジル、1-(フェニル)エチル等が挙げられる。基内に2つ以上の芳香環を有する基としては、例えばナフチル等が挙げられる。POE多環フェニルエーテルの市販品としては、例えばニューコール704、ニューコール706、ニューコール707、ニューコール708、ニューコール709、ニューコール710、ニューコール711、ニューコール712、ニューコール714、ニューコール740、ニューコール610、ニューコール2607、ニューコール2609、ニューコール2614 (以上、日本乳化剤社製) 等が挙げられる。

30

40

【0030】

本発明のFGF-23の測定方法においては、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる界面活性剤を、2種類以上組み合わせて用いてもよい。

【0031】

本発明におけるPOEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる界面活性剤の反応溶液中の濃度は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常0.0001～10%(w/v)であり、0.001～5%(w/v)

50

v)が好ましく、0.01～1%(w/v)が特に好ましい。

【0032】

工程(1)と工程(2)とは順次行われてよいが、同時に行われてもよい。工程(1)と工程(2)とを同時に行う場合には、試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片とを、水性媒体中で同時に反応させ、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23、及びFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体2を生成させ、生成した免疫複合体2を測定することにより、試料中のFGF-23を測定する。工程(1)と工程(2)とを同時に行う場合には、免疫複合体2は、前述の不溶性担体上に生成されることが好ましい。不溶性担体上に免疫複合体2を生成させる方法としては、例えば、次のような方法等が挙げられる。

10

(i)試料を、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片、及び、不溶性担体と、水性媒体中で同時に反応させる方法；

(ii)試料を、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片と、水性媒体中で同時に反応させる方法。

(iii)試料を、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片と、水性媒体中で同時に反応させて免疫複合体2を生成させ、生成した免疫複合体2と不溶性担体とを反応させる方法。

【0033】

20

上記(i)及び(iii)の方法においては、一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とを用いることが好ましい。当該(A)-(a)の組み合わせとしては、前述の組み合わせ等が挙げられる。

【0034】

また、工程(1)と工程(2)の間に、必要に応じて、工程(1)の反応後の不溶性担体を洗浄する工程を追加してもよい。工程(1)の反応後の不溶性担体の洗浄の際に使用する洗浄液としては、本発明のFGF-23の測定方法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、pH 7.2、以下、PBSと記す)や界面活性剤を含有するPBS等が挙げられる。

30

【0035】

工程(2)の後に、前述の洗浄工程を追加しても、追加しなくてもよいが、追加することが好ましい。工程(2)の後の不溶性担体の洗浄に用いられる洗浄液は、本発明のFGF-23の測定方法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。

【0036】

工程(3)

工程(3)において、工程(2)で生成した免疫複合体2を以下の方法を用いて測定することにより、試料中のFGF-23濃度が決定される。

40

【0037】

(i) FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片が標識化されていない場合

FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片に結合する抗体(以下、第3抗体と記す)若しくは該抗体断片に標識が結合した標識化第3抗体若しくは該抗体断片を、免疫複合体2中のFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片と反応させて、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、FGF-23と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片と、標識化第3抗体若しくは該抗体断片とからなる免疫複合体3を形成させ、該免疫複合体中の標識を後述の方法により測定することにより、工程(2)で生成した免疫複合体2の量を測定することができる。第3抗体としては、例えばFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片のFc領域に結合する抗体若しくは該抗体断片等が挙げられる。

50

【 0 0 3 8 】

標識化第3抗体若しくは該抗体断片と、免疫複合体2中のFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片との反応の反応温度は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする温度であれば特に制限はなく、通常、0~50℃であり、4~45℃が好ましく、20~40℃が特に好ましい。当該反応の反応時間は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする時間であれば特に制限はなく、通常、1分間~4時間であり、5分間~3時間が好ましく、10分間~2時間が特に好ましい。標識化第3抗体若しくは該抗体断片の反応溶液中の濃度は、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする濃度であれば特に制限はなく、通常0.01~100 µg/mLであり、0.1~20 µg/mLが好ましい。

【 0 0 3 9 】

(ii) FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片が標識化されている場合

免疫複合体2中の標識を測定することにより、工程(2)で生成した免疫複合体2の量を測定することができる。すなわち、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片に標識が結合した標識化第2抗体若しくは該抗体断片からなる免疫複合体2中の標識を測定することにより、工程(2)で生成した免疫複合体2を測定することができる。標識化第2抗体若しくは該抗体断片は、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片に後述の標識が結合した物質であり、公知の方法により調製することができる。

【 0 0 4 0 】

標識としては、例えば酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、タグ配列を含むポリペプチド、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子等が挙げられる。

【 0 0 4 1 】

酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

【 0 0 4 2 】

蛍光物質としては、例えば、フルオレッセイン イソチオシアナート(FITC)、ローダミンB - イソチオシアナート(RITC)等が挙げられる。その他の蛍光物質としては、例えば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)等の蛍光を発する蛋白質が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステルおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。ルテニウム錯体化合物としては、例えば、Clin. Chem. 37, 9, 1534-1539, 1991に示されたルテニウム錯体化合物等が挙げられる。

放射性同位元素としては、例えば、³H、¹⁴C、³⁵S、³²P、¹²⁵I、¹³¹I等が挙げられる。

【 0 0 4 4 】

FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、FGF-23と、標識化された、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片とからなる免疫複合体2中の標識の測定、及び、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、FGF-23と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片と、標識化第3抗体若しくは該抗体断片とからなる免疫複合体3中の標識の測定は、用いる標識により適宜、選択することができる。

【 0 0 4 5 】

標識が蛍光物質の場合には、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等を用いて蛍光強度を測定することができる。

標識が発光物質の場合には、発光光度計や発光マルチウェルプレートリーダー等を用いて、発光強度を測定することができる。

標識が放射性同位元素である場合、放射活性をシンチレーションカウンター、γ - ウェルカウンター等により、放射活性を測定することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

標識が酵素である場合、標識量は、酵素活性を測定することにより定量することができる。例えば酵素の基質を当該酵素と反応させ、生成した物質を測定することにより、標識量を測定することができる。

【 0 0 4 7 】

酵素がペルオキシダーゼである場合には、例えば吸光度法、蛍光法等によりペルオキシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼと、その基質である過酸化水素および酸化発色型色原体の組み合わせとを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。

10

【 0 0 4 8 】

ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジジン、o-フェニレンジアミン、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム塩(DA-64)、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジンナトリウム塩(DA-67)、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。

20

【 0 0 4 9 】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カブラーとアニリン類(トリンダー試薬)との組み合わせ、カブラーとフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。

カブラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N,N-ジメチル-3-メチルアニリン、N,N-ビス(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3,5-ジメトキシアニリン(F-DAOS)等が挙げられる。

30

40

フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等が挙げられる。

【 0 0 5 1 】

蛍光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼと、その基質である過酸化水素および蛍光物質の組み合わせとを反応させ、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で生成した蛍光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該蛍光物質としては、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

50

ル) プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

発光法によるペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼと、その基質である過酸化水素および発光物質の組み合わせとを反応させ、発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で生成した発光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該発光物質としては、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 5 3 】

酵素がアルカリホスファターゼである場合には、例えば発光法等によりアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。発光法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する方法としては、例えばアルカリホスファターゼとその基質とを反応させ、生成した発光の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。

10

【 0 0 5 4 】

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^{3,7}]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CDP-StarTM)、3-[4'-メトキシ-5-クロロスピロ[トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-2,3'-[1,2]ジオキセタン]-4'-イル]フェニルホスフェート・二ナトリウム塩(CSPDTM)、9-[(フェニルオキシ)(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、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(LumigenTM APS-5)等が挙げられる。

20

【 0 0 5 5 】

酵素がβ-D-ガラクトシダーゼである場合には、例えば吸光度法(比色法)、発光法又は蛍光法等によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法(比色法)によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばβ-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。β-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド等が挙げられる。発光法によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばβ-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。β-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン-プラス[Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社製]及びその類似化合物等が挙げられる。蛍光法によりβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばβ-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の蛍光度を蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。β-D-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-β-D-ガラクトピラノシド等が挙げられる。

30

【 0 0 5 6 】

酵素がルシフェラーゼである場合には、例えば発光法等によりルシフェラーゼ活性を測定することができる。発光法によりルシフェラーゼ活性を測定する方法としては、例えばルシフェラーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。ルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等が挙げられる。

40

【 0 0 5 7 】

標識が蛍光物質、発光物質、放射性同位元素および酵素以外の場合は、当該標識に特異的に結合する物質を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、酵素等で標識した標識体と、免疫複合体2中の標識、又は、免疫複合体3中の標識とを結合させ、当該標識に特異的に結合する物質を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素又は酵素を、上述の方

50

法により測定することにより、当該標識を測定することができる。標識に特異的に結合する物質としては、標識に特異的に結合する抗体の他、標識がビオチンの場合は、アビジン類等が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

本発明における試料としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする試料であれば特に制限はなく、例えば生体試料等が挙げられる。生体試料としては、例えば全血、血漿、血清、尿、髄液、唾液、羊水、汗、腓液等が挙げられ、全血、血漿、血清、尿等が好ましい。

【 0 0 5 9 】

本発明におけるFGF-23に結合する抗体（第1抗体及び第2抗体）は、本発明のFGF-23の測定を可能とする抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用できるが、モノクローナル抗体が好ましい。

10

【 0 0 6 0 】

本発明における抗体断片としては、例えば、抗体をバ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')₂、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。

【 0 0 6 1 】

本発明において使用されるFGF-23に結合する第1抗体と第2抗体において、それぞれの抗体が結合するFGF-23の部位は同じであっても、異なっている場合もよいが、異なっていることが好ましい。

20

【 0 0 6 2 】

本発明において使用される抗体は、FGF-23そのもの、又は、FGF-23中のエピトープに相当するペプチドを抗原として用いて通常の抗体の作製方法により取得することができるが、市販品としても入手可能である。FGF-23に結合する抗体としては、例えばFERM BP-7838、FERM BP-7839、FERM BP-7840、FERM BP-8268としてそれぞれ寄託されたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体等が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

また、本発明において、FGF-23に結合する抗体の代わりに、FGF-23に結合するアプタマー等の、抗体以外のFGF-23認識物質を用いることもできる。

【 0 0 6 4 】

本発明における水性媒体としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする水性媒体であれば特に制限はなく、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられ、緩衝液が好ましい。緩衝液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH 1 ~ 11の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グッド緩衝剤等が挙げられる。

30

【 0 0 6 5 】

グッド緩衝剤としては、例えば2 - モルホリノエタンスルホン酸（MES）緩衝剤、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）緩衝剤、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）緩衝剤、N - （2 - アセトアミド）イミノ二酢酸（ADA）緩衝剤、ピペラジン - N , N ' - ビス（2 - エタンスルホン酸）（PIPES）緩衝剤、2 - [N - （2 - アセトアミド）アミノ] エタンスルホン酸（ACES）緩衝剤、3 - モルホリノ - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸（MOPSO）緩衝剤、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）緩衝剤、3 - モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）緩衝剤、2 - { N - [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）緩衝剤、N - （2 - ヒドロキシエチル） - N ' - （2 - スルホエチル）ピペラジン（HEPES）緩衝剤、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）緩衝剤、2 - ヒド

40

50

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) 緩衝剤、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) 緩衝剤、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) 緩衝剤、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) 緩衝剤、[N - トリス (ヒドロキシメチル) メチルグリシン] (Tricine) 緩衝剤、[N , N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) グリシン] (Bicine) 緩衝剤、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) 緩衝剤、2 - (N - シクロヘキシルアミノ) エタンスルホン酸 (CHES) 緩衝剤、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) 緩衝剤、3 - (N - シクロヘキシルアミノ) プロパンスルホン酸 (CAPS) 緩衝剤等が挙げられる。

10

【 0 0 6 6 】

水性媒体には、塩類、金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等が含有されてもよい。塩類としては、例えば塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化アンモニウム、臭化リチウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化マグネシウム、臭化アンモニウム等が挙げられる。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、プロクリン300、プロキセル (Proxel) G X L 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 (以下、BSAと記す) 等が挙げられる。蛋白質安定化剤としては、例えばペルオキシダーゼ安定化緩衝液 [Peroxidase Stabilizing Buffer、ダコサイトメーション (DakoCytomation) 社製] 等が挙げられる。

20

【 0 0 6 7 】

2 . 測定試薬

本発明のFGF-23の測定試薬は、本発明のFGF-23の測定方法に用いられる試薬であり、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片、並びに、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有する試薬である。

30

【 0 0 6 8 】

本発明の測定試薬におけるFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片としては、例えば前述のFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片がそれぞれ挙げられる。本発明の測定用試薬におけるFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片の含量としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で0.01 ~ 100 μ g/mLであり、0.1 ~ 20 μ g/mLが好ましい。

【 0 0 6 9 】

本発明の測定試薬において、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、不溶性担体に固定化されていることが好ましい。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

40

【 0 0 7 0 】

また、本発明の測定試薬において、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。

【 0 0 7 1 】

この場合、本発明の測定試薬には、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の一方 (A) が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方 (a) が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Aとaの組み合わせとし

50

ては、例えば前述の組み合わせ等が挙げられる。

【0072】

本発明の測定試薬は、凍結乾燥状態でも液状でもよい。凍結乾燥状態の測定試薬を使用する場合には、測定前に水性媒体で溶解して液状にして測定に供する。

液状の測定試薬においては、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片、並びに、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種は、水性媒体で溶解された状態となっている。

【0073】

水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の塩類、金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等が含有されてもよい。

【0074】

本発明の測定試薬におけるPOEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルとしては、例えば前述のPOEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルがそれぞれ挙げられる。

【0075】

本発明の測定試薬におけるPOEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルのそれぞれの界面活性剤の含量としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で0.0001~10%(w/v)となる含量であり、0.001~5%(w/v) (w/v)となる含量が好ましく、0.01~1% (w/v)となる含量が特に好ましい。

【0076】

本発明の測定試薬においては、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる界面活性剤が、2種類以上、組み合わせられて含有されてもよい。

【0077】

本発明の測定試薬におけるFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片には、標識が結合していてもよい。標識としては、例えば前述の標識等が挙げられる。

【0078】

3. 測定キット

本発明のFGF-23の測定試薬は、保存、運搬、流通等の観点からキットの形態を取ることでもできる。本発明の測定キットは、本発明のFGF-23の測定方法に用いられる。

【0079】

本発明のFGF-23の測定キットは、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含む第1試薬と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含む第2試薬とを含有し、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤が、第1試薬、及び、第2試薬の少なくとも1つの試薬に含まれるキットである。

【0080】

また、本発明のFGF-23の測定キットは、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含有する第1試薬、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含有する第2試薬、並びに、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤を含有する第3試薬を含む、FGF-23の測定キットである。

【0081】

本発明の測定キットにおけるFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片としては、例えば前述のFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片がそれぞれ挙げられる。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明の測定キットの、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含む第1試薬におけるFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片の含量としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で0.01~100 µg/mLであり、0.1~20 µg/mLが好ましい。

【0083】

本発明の測定キットの、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含む第2試薬におけるFGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片の含量としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で0.01~100 µg/mLであり、0.1~20 µg/mLが好ましい。

【0084】

本発明の測定キットにおいて、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、不溶性担体に固定化されていることが好ましい。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

【0085】

また、本発明の測定キットにおいて、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。

【0086】

この場合、本発明の測定キットには、FGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Aとaの組み合わせとしては、例えば前述の組み合わせ等が挙げられる。

【0087】

この場合、本発明の測定キットにおいて、一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とは同一の試薬に含まれても、別々の試薬に含まれてもよいが、別々の試薬に含まれることが好ましい。

【0088】

一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体とが、別々の試薬に含まれているキットの場合、以下のキットも本発明のキットに含まれる。

【0089】

一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含む第1試薬と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体、及び、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含む第2試薬とを含み、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤が第1試薬及び第2試薬の少なくとも1つに含まれるキット；

【0090】

一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含む第1試薬と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含む第2試薬と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体を含む第3試薬とを含み、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤が第1~3試薬の少なくとも1つに含まれるキット；及び、

【0091】

一組の親和性物質の一方(A)が結合したFGF-23に結合する第1抗体若しくは該抗体断片を含む第1試薬と、FGF-23に結合する第2抗体若しくは該抗体断片を含む第2試薬と、一組の親和性物質の他方(a)が結合した不溶性担体を含む第3試薬と、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少な

10

20

30

40

50

くとも１種の界面活性剤を含む第４試薬とを含むキット。

【００９２】

本発明の測定キットの構成試薬は、凍結乾燥状態でも液状でもよい。

測定キットの構成試薬が凍結乾燥状態である場合には、測定前に水性媒体で溶解して液状にして測定に供する。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の塩類、金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等が含有されてもよい。

【００９３】

測定キットの構成試薬が液状である場合には、FGF-23に結合する第１抗体若しくは該抗体断片、FGF-23に結合する第２抗体若しくは該抗体断片、並びにPOEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１種は、水性媒体で溶解された状態となっている。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体が挙げられる。水性媒体には、前述の塩類、金属イオン、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等が含有されてもよい。

10

【００９４】

本発明の測定キットの構成試薬におけるPOEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１種の界面活性剤の含量としては、本発明のFGF-23の測定方法を可能とする含量であれば特に制限はなく、通常、前述の水性媒体中、又は、前述の水性媒体で溶解された状態で0.0001～10%(w/v) (w/v)となる含量であり、0.001～5%(w/v)となる含量が好ましく、0.01～1% (w/v)となる含量が特に好ましい。

20

【００９５】

本発明の測定キットを構成する各試薬には、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、及びPOE多環フェニルエーテルからなる群より選ばれる界面活性剤が、２種類以上、組み合わされて含有されてもよい。

【００９６】

本発明の測定キットにおけるFGF-23に結合する第２抗体若しくは該抗体断片には、標識が結合していてもよい。標識としては、例えば前述の標識等が挙げられる。

【００９７】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。なお、本実施例においては、下記メーカーの試薬を使用した。

30

【００９８】

リン酸水素二ナトリウム（リン酸緩衝液；関東化学社製）、リン酸二水素ナトリウム（リン酸緩衝液；関東化学社製）、塩化ナトリウム（和光純薬工業社製）、MES（同仁化学研究所社製）、MOPS（同仁化学研究所社製）、Tween 20（関東化学社製）、ペプシン（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩（ナカライテスク社製）、アルカリホスファターゼ（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、Sulfo-HMCS（同仁化学研究所社製）、ノニオンE-230（POEアルキルエーテル；日本油脂社製）、ノニオンK-220（POEアルキルエーテル；日本油脂社製）、プロノン208（POE・POP共重合体；日本油脂社製）、ニューコール740（POE多環フェニルエーテル；日本乳化剤社製）、BSA〔プロリアント(Proliant)社製〕。

40

【実施例１】

【００９９】

以下の検体希釈液、抗FGF-23抗体固定化マイクロプレート、及びアルカリホスファターゼ（ALP）標識抗FGF-23抗体溶液からなるFGF-23測定キット１～４を作製した（第１表、第２表）。なお、界面活性剤を含まない検体希釈液及びALP標識抗FGF-23抗体溶液を含むキットを、比較例としてキット５とした（第１表）。

【０１００】

< 検体希釈液 >

MES (pH6.5)

0.05 mol/L

50

BSA 0.1 % (w/v)
 塩化ナトリウム 0.1 mol/L
 界面活性剤 (第1表及び第2表に記載の界面活性剤と濃度)

【0101】

< 抗FGF-23抗体固定化マイクロプレート >

96ウェルブラックポリスチレンプレート (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) の各ウェルに、5 µg/mLの抗FGF-23抗体 (第1抗体: FERM BP-7838として寄託されたハイブリドーマが生産する抗FGF-23モノクローナル抗体) の固定用緩衝液 [0.14 mol/Lの塩化ナトリウムを含有する0.01 mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.3)] 溶液を、100 µL/ウェルとなるように加えて、25℃で16時間インキュベートした。次いで、当該抗FGF-23抗体溶液を除去し、ブロッキング液 [1% (w/v) BSA、0.05% (w/v) Tween20を含むリン酸緩衝液 (pH7.2)] を各ウェルに250 µLを加えて洗浄した後、当該ブロッキング液を各ウェルに250 µLを加えて、25℃で16時間インキュベートした。その後、当該ブロッキング液を除去し、抗FGF-23抗体固定化マイクロプレートを調製した。

10

【0102】

< ALP標識抗FGF-23抗体溶液 >

抗FGF-23抗体 (第2抗体: FERM BP-7839として寄託されたハイブリドーマが生産する抗FGF-23モノクローナル抗体) をペプシンで消化した後、G3000SWカラム (東ソー社製) を用いたHPLCシステム (日立ハイテクサイエンス社製) でF(ab')₂を分離した。得られたF(ab')₂を2-メルカプトエチルアミン塩酸塩で還元した後、G3000SWカラムを用いたHPLCシステム (日立ハイテクサイエンス社製) でFab'を分離した。得られたFab'とアルカリホスファターゼとを以下の手順により、マレイミド法によって結合させた。

20

【0103】

マレイミド化試薬Sulfo-HMCS [N-(8-マレイミドカプリルオキシ)スルホサクシンイミドナトリウム塩] を用いて、アルカリホスファターゼをマレイミド化し、反応混合物をセファデックスG-25カラム (GEヘルスサイエンス・ジャパン社製) に供して未反応のSulfo-HMCSを除去し、マレイミド化アルカリホスファターゼを得た。

【0104】

調製したマレイミド化アルカリホスファターゼとFab'とを混合し、アルカリホスファターゼ標識Fab'抗体を作製した。得られたアルカリホスファターゼ標識Fab'抗体を用いて、以下の組成からなるALP標識抗FGF-23抗体溶液を調製した。

30

MES (pH6.5) 0.05 mol/L
 アルカリホスファターゼ標識Fab'抗体 0.4 µg/mL
 BSA 0.1 % (w/v)
 塩化ナトリウム 0.1 mol/L
 界面活性剤 (第1表及び第2表に記載の界面活性剤と濃度)

【実施例2】

【0105】

測定系において、測定可能な最小濃度を評価する方法として、変動係数 [Coefficient of Variation: CV (%) = (標準偏差) / (平均値) × 100] を用いて統計学的に評価する方法がある。具体的には、[1] 0 pg/mL試料、及び、複数の既知濃度のFGF-23試料のそれぞれの試料中のFGF-23を10重測定し、[2] 得られた測定値を、測定値とFGF-23濃度との間の関係を示す検量線に照らし合わせて、実測値としてのFGF-23濃度を決定し、[3] 当該FGF-23濃度のCV(%)を算出し、[4] 当該CV(%)と、当該FGF-23濃度との間の関係を示す近似式を作成し、[5] 当該近似式から、CVが10%となるFGF-23濃度を最小検出感度 (実効感度) として算出する方法である。最小検出感度が小さいほど、測定感度が高いことを意味する。

40

【0106】

WO2003/057733に記載された方法によって製造したFGF-23を、0.2% BSA (w/v)、0.3 mol/L塩化ナトリウムを含有する0.01 mol/Lリン酸緩衝液 (pH6.5) を用いて、0 pg/mL、5 pg/mL、12.5 pg/mL、47.6 pg/mLの各測定試料を調製した。また、上記方法と同様の方法で

50

、検量線用の標準試料として、0 pg/mL、5 pg/mL、12.5 pg/mL、47.6 pg/mL、190.3 pg/mL、741.7 pg/mL、2981.3 pg/mLの各FGF-23溶液を調製した。

【0107】

第1表に記載された測定用キット1~5を用いて、以下の方法により測定し、最小検出感度を検出した。

(1) 検量線の作成

実施例1で調製した抗FGF-23抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、検体希釈液(80 µL)及び各濃度の標準試料(20 µL)添加し、25℃で90分間反応を行った(1次反応)。1次反応後のプレートの各ウェルを、洗浄液[0.075% Tween 20、0.15 mol/L塩化ナトリウムを含む0.005 mol/L MOPS緩衝液(pH7.3)]で洗浄した後、各ウェルに、実施例1
10
で調製したALP標識抗FGF-23抗体溶液(100 µL)を添加し、25℃で90分間反応を行った(2次反応)。2次反応後のプレートの各ウェルを前記洗浄液で洗浄した後、各ウェルに、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・ニナトリウム塩(Lumigen™ APS-5)を主成分とする発光基質液(100 µL)を加えて攪拌し、生じた発光量(RLU)を測定しFGF-23濃度と発光量(RLU)との関係を表す検量線を作成した。

【0108】

(2) 測定試料の測定とFGF-23濃度の決定

上記(1)の標準試料の代わりに、0 pg/mL、5 pg/mL、12.5 pg/mL、47.6 pg/mLの各測定試料を用いる以外は、(1)と同様の方法により、当該測定試料に対する発光量(RLU)を測定
20
した。各測定に対して得られた発光量(RLU)と、(1)で作成した検量線とから、各測定試料中の、実測値としてのFGF-23濃度を決定した。

【0109】

各測定試料のFGF-23濃度からCV(%)を算出し、当該CV(%)とFGF-23濃度との関係を示す近似式(二次関数)からCVが10%となる値を算出し、最小検出感度とした。それぞれのキットにおける最小検出感度(pg/mL)を第1表に示す。

【0110】

【表1】

第1表

	比較例	実施例			
	キット5	キット1	キット2	キット3	キット4
界面活性剤 % (w/v)	無添加	POEアルキル エーテル ノニオン E-230 (0.1%)	POEアルキル エーテル ノニオン K-220 (0.1%)	POE・POP 共重合体 プロノン 208 (0.1%)	POE多環 フェニルエーテル ニューコール740 (0.1%)
最小検出感度 (pg/mL)	22	5.0	3.0	5.5	7.0

【0111】

第1表から明らかなように、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、POE多環フェニルエーテルのいずれの界面活性剤も含有しない測定キット5(比較例)を用いて測定した場合、すなわち、抗原抗体反応において当該界面活性剤が存在しない場合の最小検出感度が22 pg/mLであったのに対して、第1表の界面活性剤を含有する測定キット1~4(実施例)
40
を用いて測定した場合、すなわち、抗原抗体反応において当該界面活性剤が存在する場合の最小検出感度は3.0~7.0 pg/mLであり、測定感度が上昇し、FGF-23を高感度に測定できることが判明した。

【実施例3】

【0112】

正確な測定値が得られているかどうかを判定する方法として、正確性試験がしばしば実施される。正確性試験とは、測定対象成分の濃度があらかじめ設定されている試料中の当
50

該測定対象成分の濃度（基準値）と、当該試料の濃度を実際に測定することにより決定された当該測定対象成分の濃度（実測値）とを用いて、「 $\text{実測値} \div \text{基準値} \times 100 (\%)$ 」の計算式より算出する。正確性が100%に近いほど、正確な測定ができていることを意味する。

【0113】

FGF-23濃度が設定されている3種類の慢性腎臓病患者又は透析患者由来の血清（検体1：28 pg/mL、検体2：315 pg/mL、検体3：2035 pg/mL）について、実施例1で作製したキット1～4の各キットを用いて、実施例2の方法に従い各検体中のFGF-23濃度を決定し、正確性を算出した。各キットにおける正確性の結果を第2表に示す。

【表2】

第2表

		実施例			
		キット1	キット2	キット3	キット4
界面活性剤 % (w/v)		POEアルキル エーテル ノニオン E-230 (0.1%)	POEアルキル エーテル ノニオン K-220 (0.1%)	POE・POP 共重合体 プロノン 208 (0.1%)	POE多環 フェニルエーテル ニューコール740 (0.1%)
正確性	検体1	108%	108%	102%	106%
	検体2	108%	103%	113%	106%
	検体3	115%	117%	121%	115%

【0114】

第2表に示されるように、POEアルキルエーテル、POE・POP共重合体、又は、POE多環フェニルエーテルを含有する本発明の測定キット1～4を用いた場合の正確性は102～121%であり、従って、本発明の測定キットを用いることにより、検体中のFGF-23を正確に測定できることが判明した。

【産業上の利用可能性】

【0115】

本発明により、低リン血症性くる病、腫瘍性骨軟化症、腎不全等の疾患の診断に有効な、正確、かつ、高感度な、試料中のFGF-23の測定方法、測定試薬及び測定キットが提供される。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/020635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/531(2006.01) i, G01N33/53(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)

Int.Cl. G01N33/531, G01N33/53

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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	WO 2012/029837 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 08 March 2012, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0014]-[0043], etc. & US 2013/0273575 A1, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0032]-[0087], etc. & EP 2613146 A1	1-13
Y	WO 2012/147670 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 01 November 2012, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0020], [0036]-[0040], etc. & US 2014/0147936 A1, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0025], [0049]-[0052], etc. & EP 2703815 A1	1-13



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
23 August 2018 (23.08.2018)Date of mailing of the international search report
04 September 2018 (04.09.2018)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/JP2018/020635

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 2004-144728 A (SHINO-TEST CORPORATION) 20 May 2004, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0106], [0107], etc. (Family: none)	1-13
Y	WO 2007/010995 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 25 January 2007, entire text, in particular, see paragraphs [0020]-[0023], etc. & US 2009/0035803 A1, entire text, in particular, see paragraphs [0031]-[0034], etc. & EP 1921453 A1	1-13
A	JP 07-082171 A (TEIKOKU SEIYAKU CO., LTD.) 28 March 1995, see entire text (Family: none)	1-13
A	JP 02-138223 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 28 May 1990, see entire text & US 5314872 A & EP 345660 A1	1-13
P, X	WO 2017/104567 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 22 June 2017, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0043]-[0045], etc. (Family: none)	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 0 6 3 5									
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											
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 <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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018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	WO 2012/029837 A1（協和メデックス株式会社）2012.03.08, 全文、特に、 [特許請求の範囲]、段落[0014]－[0043]等参照 & US 2013/0273575 A1, 全文, 特に, 特許請求の範囲, 段落[0032]－[0087]等参 照 & EP 2613146 A1	1-13									
Y	WO 2012/147670 A1（協和メデックス株式会社）2012.11.01, 全文、特に、 [特許請求の範囲]、段落[0020]、[0036]－[0040]等参照 & US 2014/0147936 A1 全文, 特に, 特許請求の範囲, 段落[0025], [00 49]－[0052]等参照 & EP 2703815 A1	1-13									
☒ 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 23.08.2018		国際調査報告の発送日 04.09.2018									
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		特許庁審査官（権限のある職員） 草川 貴史 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 8 / 0 2 0 6 3 5
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 2004-144728 A (株式会社シノテスト) 2004.05.20, 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落[0106]、[0107]等参照 (ファミリーなし)	1-13
Y	WO 2007/010995 A1 (協和メデックス株式会社) 2007.01.25, 全文、特に、段落 [0020] - [0023] 等参照 & US 2009/0035803 A1, 全文、特に、段落 [0031] - [0034] 等参照 & EP 1921453 A1	1-13
A	JP 07-082171 A (帝國製薬株式会社) 1995.03.28, 全文参照 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 02-138223 A (武田薬品工業株式会社) 1990.05.28, 全文参照 & US 5314872 A & EP 345660 A1	1-13
P, X	WO 2017/104567 A1 (協和メデックス株式会社) 2017.06.22, 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落[0043] - [0045] 等参照 (ファミリーなし)	1-13

フロントページの続き

(81)指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(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 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(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 山口 雄平

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社 研究所内

(72)発明者 宮▲崎▼ 広海

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社 研究所内

(72)発明者 小野 仁

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社 研究所内

(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)	成纤维细胞生长因子-23的测定方法，测定试剂和测定试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2018221544A1	公开(公告)日	2020-04-02
申请号	JP2019521247	申请日	2018-05-30
[标]发明人	山口雄平 小野仁		
发明人	山口 雄平 宮▲崎▼ 広海 小野 仁		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.D		
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	2017107509 2017-05-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种测定样品中成纤维细胞生长因子-23 (以下称为FGF-23) 的方法，该方法包括以下步骤：(1) 在水性介质中，样品与结合的第一抗体或其抗体片段反应 FGF-23; (2) 在水性介质中与结合有FGF-23的第二抗体或其抗体片段在上述步骤 (1) 中产生的免疫复合物1反应，产生由第一抗体或 与FGF-23，FGF-23结合的抗体片段，与FGF-23结合的第二抗体或其抗体片段；(3) 测定在上述步骤 (2) 中制备的免疫复合物2；其中步骤 (1) 和/或步骤 (2) 的反应在包含表面活性剂如聚氧乙烯烷基醚的水性介质中进行。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2018/221544	
発行日 令和2年4月2日 (2020. 4. 2)		(43) 国際公開日 平成30年12月6日 (2018. 12. 6)		テーマコード (参考)	
(51) Int. Cl. G O 1 N 33/531 (2006. 01) G O 1 N 33/53 (2006. 01)		F I G O 1 N 33/531 G O 1 N 33/53		B D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)					
出願番号 特願2019-521247 (P2019-521247)		(71) 出願人 000162478			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/020635		日立化成ダイアグノスティクス・システムズ株式会社			
(22) 国際出願日 平成30年5月30日 (2018. 5. 30)		東京都中央区晴海一丁目8番10号			
(31) 優先権主張番号 特願2017-107509 (P2017-107509)		(74) 代理人 100102118			
(32) 優先日 平成29年5月31日 (2017. 5. 31)		弁理士 春名 雅夫			
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)		(74) 代理人 100102978			
		弁理士 清水 初志			
		(74) 代理人 100160923			
		弁理士 山口 裕孝			
		100119507			
		(74) 代理人 弁理士 刑部 俊			
		100142929			
		(74) 代理人 弁理士 井上 隆一			
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子-23の測定方法、測定試薬及び測定キット					