

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年4月2日 (02.04.2009)

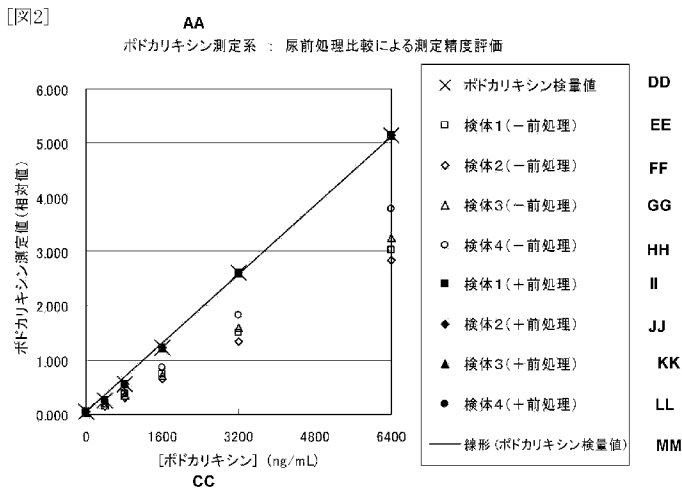
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/041577 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/493 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/067422
- (22) 国際出願日: 2008年9月26日 (26.09.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-251707 2007年9月27日 (27.09.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人新潟大学 (NIIGATA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 斎藤 亮彦 (SAITO, Akihiko) [JP/JP]; 〒9518510 新潟県新潟市中央区旭町通1-757 新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学寄附講座 Niigata (JP). 小笠原 真也 (OGASAWARA, Shinya) [JP/JP]; 〒9591695 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ生研株式会社鏡田工場内 Niigata (JP). 平山 吉朗 (HIRAYAMA, [続葉有]
- 地 Niigata (JP). デンカ生研株式会社 (Denka Seiken Co. Ltd.) [JP/JP]; 〒1030025 東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号 Tokyo (JP).

(54) Title: URINE PRETREATMENT AGENT FOR URINARY PROTEIN DETERMINATION, URINE PRETREATMENT METHOD, AND URINARY PROTEIN DETERMINATION METHOD

(54) 発明の名称: 尿中タンパク質定量用の尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法。



AA PODOCALYXIN MEASUREMENT SYSTEM: EVALUATION OF MEASUREMENT ACCURACY BY COMPARISON OF URINE PRETREATMENT

BB PODOCALYXIN MEASUREMENT VALUE (RELATIVE VALUE)

CC PODOCALYXIN

DD CALIBRATED VALUE OF PODOCALYXIN

EE SPECIMEN 1 (- PRETREATMENT)

FF SPECIMEN 2 (- PRETREATMENT)

GG SPECIMEN 3 (- PRETREATMENT)

HH SPECIMEN 4 (- PRETREATMENT)

II SPECIMEN 1 (+ PRETREATMENT)

JJ SPECIMEN 2 (+ PRETREATMENT)

KK SPECIMEN 3 (+ PRETREATMENT)

LL SPECIMEN 4 (+ PRETREATMENT)

MM LINEAR (CALIBRATED VALUE OF PODOCALYXIN)

(57) Abstract: It is intended to develop a urine pretreatment agent which is capable of reducing or eliminating an effect of pH variation in urine, eliminating an effect of a deposit resulting from deposition of an inorganic salt in the urine, and solubilizing a membrane protein; a urine pretreatment method; and a urinary protein determination method. A urine pretreatment agent for urinary protein determination characterized by containing a buffer, a chelator, and a surfactant; a urine pretreatment method characterized by mixing the urine pretreatment agent in an amount of 10 to 1000 parts by mass based on 100 parts by mass of urine; and a urinary protein determination method characterized by mixing the urine pretreatment agent in an amount of 10 to 1000 parts by mass based on 100 parts by mass of urine and thereafter measuring a protein concentration are provided.

[続葉有]



WO 2009/041577 A1



Yoshiaki) [JP/JP]; 〒9591695 新潟県五泉市木越字鏡田 1 3 5 9 - 1 デンカ生研株式会社鏡田工場内 Niigata (JP). 黒澤 寛之 (KUROSAWA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒9591695 新潟県五泉市木越字鏡田 1 3 5 9 - 1 デンカ生研株式会社鏡田工場内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 牛木 護 (USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 1 4 番 1 号 郵政福祉琴平ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,

MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 尿の pH の変動の影響を低減又は解消し、尿中の無機塩が析出した沈降物の影響を解消し、膜タンパク質の可溶化ができる尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法を開発すること。緩衝剤、キレート剤及び界面活性剤を含むことを特徴とする尿中タンパク質定量用の尿前処理剤と、尿 100 質量部に対して前記尿前処理剤 10~1000 質量部を混合することを特徴とする尿前処理方法と、尿 100 質量部に対して前記尿前処理剤 10~1000 質量部を混合した後、タンパク質濃度を測定することを特徴とする尿中タンパク質定量方法とを提供する。

明 細 書

尿中タンパク質定量用の尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法。

技術分野

[0001] 本発明は尿中タンパク質定量用の尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法に関する。

背景技術

[0002] 尿中のタンパク質の測定は、腎臓や泌尿器系だけでなく、循環器系その他全身のさまざまな疾患及び病状の診断に有用である。しかし、尿中のタンパク質の測定は、pH、無機塩その他の尿中の低分子成分の変動によって影響を受けることが知られている。そして、pH、無機塩その他の尿中の低分子成分は病状を反映して変動する。従来は、尿の組成の影響を低減するために原尿を緩衝液で高度に希釈して尿中のタンパク質の測定に供していた。ところが最近注目を集める尿中のタンパク質のなかには、尿中の濃度が低いために従来のように高度に希釈したのでは検出が困難なものがある。

[0003] 糸球体上皮細胞に発現する機能分子であるポドカリキシンは糸球体の機能・形態の保持において重要な役割を演じている。特許文献1は、固相に結合した第1の抗ヒトポドカリキシン抗体と検体とを反応させた後、第1の抗ヒトポドカリキシン抗体とは対応エピトープが異なる第2の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を反応させ、次いで固相に結合した第2の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を測定することからなる検体中のヒトポドカリキシンの測定方法を開示する。この技術には、尿原液に近い状態で定量系に供することができないために極微量の尿中ポドカリキシンの定量ができない、キレート剤添加による尿前処理を行っていないために尿検体中の無機塩析出沈降物の定量系への沈着もしくは堆積によって精密な定量分析ができない、界面活性剤での可溶化を行わないために尿中の全ポドカリキシンを定量できない、という問題点がある。

特許文献1:特開平6-011507号公報

[0004] 特許文献2は、尿中の α GSTを安定化する量の非-酵素蛋白質、キレート剤ならびに緩衝剤を含有し、その結果、保存液のpHが7.0~7.5であり、 α GSTの免疫学的活性の損失を防止するのに有効である尿中 α GSTのための安定化保存液を開示する。この技術には、尿pHの補正・均一化が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿検体中の無機塩析出沈降物の解消が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿中に膜成分を含んだ形で存在する膜タンパク質の定量ができない、という問題点がある。

特許文献2:特表平10-507269号公報

[0005] 特許文献3は、尿検体中へアルカリ金属アジ化物、金属キレート剤、アルブミン及びサッカロースからなる群から選ばれる化合物を添加することを特徴とする尿中ミオグロビンの安定化方法と、該方法に用いる保存剤とを開示する。この技術には、尿pHの補正・均一化が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿検体中の無機塩析出沈降物の解消が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿中に膜成分を含んだ形で存在する膜タンパク質の定量ができない、という問題点がある。

特許文献3:特開平10-282095号公報

[0006] 特許文献4は、尿検体に還元性酸素酸塩及び/又はイソチアゾロン系化合物を添加し、さらに緩衝剤又はアルカリ剤を含有し、尿検体のpHを6から9の範囲に調整し、さらにキレート剤を含有することを特徴とする尿検体中のアナライトの安定化方法と、該方法を用いる尿検体の保存剤とを記載する。この技術には、尿pHの補正・均一化が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿検体中の無機塩析出沈降物の解消が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿中に膜成分を含んだ形で存在する膜タンパク質の定量ができない、という問題点がある。

特許文献4:特開2000-352565号公報

[0007] 特許文献5は、pHを5.0~9.0に保つための緩衝剤及びキレート剤を含有する尿中有形成分分析用試薬を開示する。この技術には、尿中有形成分分析用試薬であるため、尿上清中あるいは全尿中の成分の定量はできない、原尿に近い状態での尿

検体の処理ができない、という問題点がある。

特許文献5:特開平8-170960号公報

- [0008] 特許文献6には、尿中のポドカリキシンの定量において、尿検体を界面活性剤で処理することが記載されている。この技術では、尿pHの補正・均一化が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、尿検体中の無機塩析出沈降物の解消が完全には行われていないために精密な定量分析ができない、という問題点がある。

特許文献6:国際公開WO2002/037099号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] そこで、原尿を高度に希釈することなく原尿に近い状態で尿中タンパク質の安定な免疫学的検出を行なうために、尿のpHの変動の影響を低減又は解消し、尿中の無機塩が析出した沈降物の影響を解消し、膜タンパク質の可溶化ができる尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法の開発を行なう必要がある。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明は緩衝剤、キレート剤及び界面活性剤を含むことを特徴とする尿中タンパク質定量用の尿前処理剤を提供する。
- [0011] 本発明の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤において、前記緩衝剤はグッドの緩衝剤の場合がある。
- [0012] 本発明の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤は、酢酸、リン酸、クエン酸、ホウ酸、酒石酸からなる群より選択される少なくとも1種類の酸を含む場合がある。
- [0013] 本発明の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤において、前記界面活性剤はポリアルキレンオキサイド誘導体の場合がある。
- [0014] 前記界面活性剤のHLB値は10~18の場合がある。
- [0015] 本発明は、尿100質量部に対して本発明の尿前処理剤10~1000質量部を混合することを特徴とする尿前処理方法を提供する。
- [0016] 本発明は、尿100質量部に対して本発明の尿前処理剤10~1000質量部を混合した後、タンパク質濃度を測定することを特徴とする尿中タンパク質定量方法を提供

する。

[0017] 本発明の尿中タンパク質定量方法は、尿中ポドカリキシン定量方法の場合がある。

[0018] 本発明の尿中タンパク質定量方法は、尿中メガリン定量方法の場合がある。

発明の効果

[0019] 本発明の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法は、尿検体のpHがサンプル間でばらつくのを抑制でき、尿中無機塩析出沈降物の解消し、膜タンパク質の可溶化することができて、原尿に近い状態での微量成分の定量分析ができるという利点がある。

[0020] 本明細書において緩衝剤とは、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン等のアミノ酸と、カルボン酸塩と、リン酸塩と、炭酸塩とグッドの緩衝剤とを含むが、これらに限定されない。

[0021] 本明細書におけるグッドの緩衝剤は、N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N-(2-アセタミド)イミノジ酢酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン、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、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸、2-モルホリノエタンスルホン酸、3-モルホリノプロパンスルホン酸、2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)、N-トリス(ヒドロキシメチル-3-アミノプロパンスルホン酸)、2-ヒドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン、2-アミノ-2-ヒドロキシメチルプロパン-1,3-ジオール、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(N-(2-Acetamido)-2-aminoe

thanesulfonic acid、N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid、N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid、N, N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine、Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane、N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid、N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid、3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propanesulfonic acid、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid、2-Hydroxy-3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propanesulfonic acid、2-Morpholinoethanesulfonic acid、3-Morpholinopropanesulfonic acid、2-Hydroxy-3-morpholinopropanesulfonic acid、Piperazine-1, 4-bis(2-ethanesulfonic acid)、Piperazine-1, 4-bis(2-hydroxy-3-propanesulfonic acid)、N-Tris(hydroxymethyl-3-aminopropanesulfonic acid、2-Hydroxy-N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid、N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid、N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine、2-amino-2-hydroxymethylpropane-1, 3-diol、Tris(hydroxymethyl)aminomethane)を含むが、これらに限定されない。本発明の尿前処理剤の緩衝剤がグッドの緩衝剤の場合には、緩衝能が大きく効率的な尿pH補正・均一化が可能となり、より好ましい。

[0022] 本発明の尿前処理剤に、酢酸、リン酸、クエン酸、ホウ酸及び酒石酸からなる群から選択される弱酸を添加すると、幅広い緩衝範囲を有するため好ましい。上記の弱酸の添加量は特に限定されないが、尿前処理剤100質量部中90質量部以下、好ましくは10~90質量部とすることが好ましい。上記の弱酸の添加量が上記範囲内であれば、適正なpH値としやすく好ましい。

[0023] 本明細書におけるキレート剤は、エチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸、O, O'-ビス(2-アミノエチル)エチレングリコール-N, N, N', N'-四酢酸、O, O'-ビス(2-アミノフェニル)エチレングリコール-N, N, N', N'-四酢酸、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサエン-N, N, N', N'-四酢酸、ジエチル エネトリアミン-N, N, N', N''', N'''-五酢酸、エ

チレンジアミン-N, N'-ジプロピオン酸、N-(2-ヒドロキシエチル)イミノ二酢酸、イミノ二酢酸、ニトリロ三酢酸、ニトリロトリス(メチルホスホン酸)、N, N, N', N'-テトラキス(2-ピリジルメチル)エチレンジアミン、トリエチレンテトラアミン-N, N, N', N'', N''', N'''-六酢酸、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、クエン酸デキストロース及びアデノシン三リン酸(Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid、O, O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid、O, O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid、N, N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine、trans-1, 2-Diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tetraacetic acid、Diethyl enetriamine-N, N, N', N'', N''-pentaacetic acid、Ethylenediamine-N, N'-dipropionic acid、N-(2-Hydroxyethyl)iminodiacetic acid、Iminodiacetic acid、Nitrilotriacetic acid、Nitrilotris(methylphosphonic acid)、N, N, N', N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine、Triethylenetetraamine-N, N, N', N'', N''', N'''-hexaacetic acid、Heparin、Sodium citrate、Sodium fluoride、acid citrate dextrose solution、Adenosine triphosphate)を含むがこれらに限定されない。エチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸が尿中カルシウム及び尿中マグネシウムの高マスキング効果の理由から好ましい。

[0024] 本明細書における界面活性剤は、アニオン系、カチオン系及びノニオン系を含むがこれらに限定されない。ノニオン系界面活性剤の中でもポリアルキレンオキサイド誘導体のポリエチレングリコール系、特にポリエチレンオキサイドモノ(p-イソオクチルフェニルエーテル)が好適に用いられる。

[0025] 本発明の界面活性剤のHLB値(Hydrophile-Lipophile Balance値)は特に限定されないが、10~18とすることが好ましく、11~15であることがより好ましい。HLB値が上記範囲内であれば、尿検体が水相と油相の2相分離せず正確な定量値が得られる。

[0026] 本発明の尿前処理剤及び尿前処理液の配合は特に限定されないが、尿と混合した時点で下記式(1)~(6)の関係を満たすように調合することが好ましい。

[0027] 尿と尿前処理剤の混合液中の尿の割合をX(%)とし、尿と尿前処理剤の混合液中に含まれる緩衝剤の終濃度をA(mM)、尿前処理剤原液中の緩衝剤の濃度をB(mM)とすると、

$$A \geq (20/9) \times X \dots \dots \dots (1)$$

$$B \geq 2000 \times X / 9 \times (100 - X) \dots \dots \dots (2)$$

の関係が成り立つことが好ましい。この範囲内なら、尿前処理剤による尿pHの補正・均一化が可能となる。

[0028] 尿と尿前処理剤の混合液中の尿の割合をX(%)とし、尿と尿前処理剤の混合液中に含まれるキレート剤の終濃度をC(mM)、尿前処理剤原液中のキレート剤の濃度をD(mM)とすると、

$$C \geq (2/9) \times X \dots \dots \dots (3)$$

$$D \geq 200 \times X / 9 \times (100 - X) \dots \dots \dots (4)$$

の関係が成り立つことが好ましい。この範囲内なら、尿前処理剤による尿中無機塩析出沈降物の解消が可能となる。

[0029] 尿と尿前処理剤の混合液中の尿の割合をX(%)とし、尿と尿前処理剤の混合液中に含まれる界面活性剤の終濃度をE(%)、尿前処理剤原液中の界面活性剤の濃度をF(%)とすると、

$$E \geq 0.2 \dots \dots \dots (5)$$

$$F \geq 20 / (100 - X) \dots \dots \dots (6)$$

の関係が成り立つことが好ましい。この範囲内なら、尿前処理剤によって尿中に膜成分を含んだ形で存在する膜タンパク質の可溶化及び、タンパク質系ブロッキング剤なしでの該界面活性剤のみのブロッキング効果が可能となる。

[0030] 前記式(1)～(6)の関係を全て包含する配合の尿前処理剤が好ましく、この範囲内なら、該尿前処理剤を用いて、極微量の尿中アナライトの精密な定量分析も可能である。

[0031] 本発明の尿前処理剤は、保存剤、防腐剤等の添加剤を含む場合がある。防腐剤は、アジ化ナトリウムのほか、5-クロロ-2メチル-4-イソチアゾリン-3オンや2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン等のイソチアゾロン系の防腐剤を含むがこれに

限られない。

- [0032] 本発明の尿前処理剤は、阻害剤を含む場合がある。阻害剤は、プロテインキナーゼ阻害剤、Gタンパク質シグナル・セカンドメッセンジャー関連阻害剤、カルモジュリンキナーゼ関連阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ関連阻害剤、MAPキナーゼシグナル関連阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、Wntシグナル関連阻害剤、Aktキナーゼシグナル関連阻害剤、Notchシグナル阻害剤、プロテインホスファターゼ阻害剤、サイトカインシグナル阻害剤、ホルモン関連阻害剤、HDAC阻害剤、NF κ B転写因子阻害剤、タンパク質・RNAの核-細胞質間輸送阻害剤、カルシウムシグナル・チャネル阻害剤、神経系関連阻害剤、カスパーゼ・プロテアソーム・グランザイムB等の阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、COX・酸化ストレス・NO関連阻害剤、アポトーシス誘導剤及び阻害剤、血管新生阻害剤、細胞骨格・細胞分裂阻害剤、テロメラーゼ阻害剤、糖プロセッシング阻害剤、制癌剤、DNAポリメラーゼ阻害剤、RNAポリメラーゼ阻害剤、タンパク質合成阻害剤、DNA分解酵素阻害剤及びRNA分解酵素阻害剤等を含むがこれらに限られない。
- [0033] 本発明の尿前処理剤は、水や有機溶剤を添加して希釈される場合がある。本発明の尿前処理液の配合は、水100質量部に対して尿前処理剤を固形分換算で10~1000質量部程度とすることが好ましい。
- [0034] 本発明の尿中のタンパク質定量方法は特に限定されず、例えば、尿前処理剤を水等で希釈してなる尿前処理液を作製し、尿に尿前処理液を添加してからタンパク質を定量する場合がある。尿と尿前処理剤の割合は特に限定されないが、尿100質量部に対して尿前処理剤5~100質量部添加することが好ましい。尿と尿前処理剤の割合が上記範囲内であれば尿前処理剤が溶解しやすい。
- [0035] ポドカリキシンの定量にはELISA法、LA (Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay) 法等の方法が適用できる。メガリンの定量にはCLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay) 法、MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) 法等の方法が適用できる。これらの方法では、遠心工程を省略しても清透化を可能することができるので、ブロッキング剤の使用量を削減したり省略することができる。

- [0036] 尿は生体内での恒常性維持の終末として、生理的変動の影響の大きい検体種である。そのため、尿中ポドカリキシン定量には尿検体の採尿時の個人差変動や日差変動、日内変動が要因となって、検査値に誤差を生じやすいが、緩衝剤、キレート剤、及び界面活性剤の添加量を調整することにより、誤差の発生要因である沈殿や相分離を解消することができるので、安定した検査値が得られる。
- [0037] ポドカリキシンの定量に用いる尿検体のpHは特に限定されないが、尿検体のpH値を5.5～7.0に調整することが好ましい。pHがこの範囲外だと検査値に誤差が生じる原因となる場合がある。
- [0038] メガリンの定量に用いる尿検体のpH値は特に限定されないが、尿検体のpH値を7.0～9.0のアルカリ性とすることが好ましい。pHが酸性だと検査値に誤差が生じる原因となる場合があり、pH10を超える検体は皆無である。
- [0039] 本発明の尿検体前処理方法は、尿中のタンパク質定量、例えばポドカリキシン又はメガリンの定量に好適に用いられる。タンパク質定量には免疫測定方法や非免疫学的に物質の結合を定量する測定方法が挙げられる。
- [0040] 免疫測定方法としては、例えばELISA法、CLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay) 法、CLIA (Chemiluminescent Immunoassay) 法、ECLIA (Electro Chemiluminescent Immunoassay) 法、EIA法、FEIA (Fluorescence-Enzyme Immunoassay) 法、IEP (Immunoelectrophoresis) 法、IRMA (Immunoradiometric Assay) 法、LA (Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay) 法、LIFA (Ligand-Mediated Immunofunctional Assay) 法、LPIA (Latex Photometric Immunoassay) 法、MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) 法、PA (Particle Agglutination Test) 法、PIA (Pulse Immuno assay) 法、RIA (Radioimmunoassay) 法、RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination Test) 法、SRID (Single Radial Immunodiffusion) 法、TIA (Turbidimetric Immunoassay) 法、免疫クロマトグラフィー法、免疫ブロットティング法、ウェスタンブロットティング法、金コロイド免疫アッセイ法、比濁分析法 (Nephelometry) 等を含むがこれらに限定されない。
- [0041] 非免疫学的に物質の結合を定量する測定方法としては、例えばSBPA (Sandwic

h Binding Protein Assay)法、RRA(Radio Receptor Assay)法、CPBA(Competitive Protein Binding Assay)法等を含むがこれらに限定されない。これらの定量方法の中でもELISA法やImmunochemistry法に好適に用いられる。

図面の簡単な説明

[0042] [図1]本発明の尿前処理剤を用いて尿pHを補正した際の、緩衝剤の濃度依存効果を示すグラフ。

[図2]本発明の尿前処理剤を用いた際の、尿中ポドカリキシン測定系の測定精度の改善効果を示すグラフ。

[図3]尿中ポドカリキシン測定系のpH依存性を示すグラフ。

[図4]本発明の尿前処理剤を用いた際の、尿中メガリン測定系の測定精度の改善効果を示すグラフ。

[図5]尿中メガリン測定系のpH依存性を示すグラフ。

[図6]本発明の尿前処理剤に添加する界面活性剤のブロッキング効果を示すグラフ。

発明を実施するための最良の形態

[0043] 以下に実施例を示すが、これらは実施態様の例示を意図しており本発明の範囲を限定することは意図しない。

[0044] 以下の実施例で用いる試薬、材料及び器具は以下のとおりである。

・アジュバント: Freund's Complete Adjuvant及び Freund's Incomplete Adjuvant (DIFCO社製)。

・TES: N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid 緩衝剤 (同仁化学研究所製)。

・EDTA: Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid キレート剤 (同仁化学研究所製)。

・Triton X-100: Polyethylene Glycol Mono-p-isoctylphenyl Ether を主体とする界面活性剤、HLB値12 (ナカライテスク社製)。

・ヒトポドカリキシン: ヒト腎臓から単離した糸球体から抽出 (自家調製品)。

・ヒトポドカリキシン水溶液: ヒトポドカリキシン 5mg/L、140mM NaCl、2.7mM K

Cl、10mM Na_2HPO_4 及び1.8mM KH_2PO_4 (pH7.3)の水溶液。

・ヒトメガリン:ヒト腎臓腎皮質から抽出(自家調製品)。

・ヒトメガリン水溶液:ヒトポドカリシン5mg/L、140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 及び1.8mM KH_2PO_4 (pH7.3)の水溶液。

・PBS-T溶液:145mM NaCl、3.6mM Na_2HPO_4 、1.4mM KH_2PO_4 及び0.05%(v./v.) Tween20。

・抗原固相プレート用ブロッキング液:145mM NaCl、7.2mM Na_2HPO_4 、2.8mM KH_2PO_4 、1%(wt./v.)BSA(ウシ血清アルブミン)及び5%(wt./v.)乳糖。

・TMB溶液:TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)を含む水溶液、300mM、TMB One-Step Substrate System(DAKO社製)。

・酵素標識抗体希釈液:145mM NaCl、3.6mM Na_2HPO_4 、1.4mM KH_2PO_4 、0.05%(v./v.)Tween20及び0.5%(wt./v.)BSA。

・リン酸ナトリウム緩衝液:20mMリン酸ナトリウム(pH7.0)水溶液(市販品)。

1mM酢酸緩衝液:1mM酢酸ナトリウム(pH4.0)水溶液、市販品。

・0.5M炭酸緩衝液:120mM Na_2CO_3 及び380mM NaHCO_3 (pH9.6)溶液、市販品。

・10mM 炭酸緩衝液:2.4mM Na_2CO_3 及び7.6mM NaHCO_3 (pH9.6)水溶液、市販品。

・1M Tris緩衝液:Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl(pH9.0)水溶液、市販品。

・標識抗体浮遊液:100mM Tris、145mM NaCl及び1%(v./v.)BSA溶液(pH7.6)、市販品。

・標識抗体保存液:2.8mM KH_2PO_4 、7.2mM Na_2HPO_4 、145mM NaCl、1%(wt./v.)BSA、0.02%(v./v.)フェノール及び40%(wt./v.)D-ソルビトール溶液、市販品。

・HRP:西洋ワサビペロキシダーゼ、Peroxidase from horseradish TypeVI(Sigma社製)。

- 抗体固相プレート用ブロッキング液:86mM NaCl、100mM Tris、0.5% (wt. /v.) BSA及び0.05% (v. /v.) Tween20水溶液、市販品。
- 抗原固相プレート用ブロッキング液:145mM NaCl、7.2mM Na_2HPO_4 、2.8mM KH_2PO_4 、1% (wt. /v.) BSA及び5% (wt. /v.) 乳糖。
- 反応停止液:313mM H_2SO_4 溶液。
- マイクロタイタープレート:Nunc-Immuno™ Module F8 Maxisorp™ Surface plate (Nalge Nunc International社製)。
- プロテインG カラム:HiTrap Protein G HP、5mL (Amersham BioSciences社製)。

[0045] (検体)

尿検体として、健康診断で採取した任意の尿検体80例を使用した。内訳は男性40検体、女性40検体であった。

[0046] (緩衝剤)

緩衝剤は、下記の試薬を使用した。

ADA-NaOH

BES-NaOH

BES-NaOH

HEPES-NaOH

MES-NaOH

MOPS-NaOH

TES-NaOH

Tris-HCl

上記の緩衝剤の化合物名は以下のとおりである。

- ADA:N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid
- BES:N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
- HEPES:2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
- MES:2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate

- MOPS:3-Morpholinopropanesulfonic acid
- TES:N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid
- Bis-Tris:Bis-(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane
- Tris:Tris(hydroxymethyl)aminomethane

実施例 1

[0047] (評価方法)

(1) 尿前処理剤及び尿前処理剤の調製

キレート剤(EDTA)7.4gと、界面活性剤(Triton X-100)10.7gと、表1に示した緩衝剤とを混合して尿前処理剤とし、該尿前処理剤を水と混合して100mLの尿前処理液とした。

[0048] (2) 尿検体の前処理

各尿検体90質量部と、表1の処方に基づき製造した尿前処理液10質量部とを混合した後、pHメーターで各検体のpH値を測定した。尿pHは株式会社堀場製作所製のコンパクトpHメーター(Twin pH)を使用した。

[0049] (結果)

上記の方法により測定した80検体分のpH値の最大、最小、平均、及び標準偏差を表1に、緩衝剤量に対する80検体の標準偏差をプロットしたグラフを図1に示す。

[0050] [表1]

検体 番号	緩衝剤	緩衝剤量 (mM)	80検体のpH値				備考
			最 小	最 大	平 均	標準偏差 σ	
1	原尿	0	5.0	7.8	6.26	0.687	比較例
2	ADA-NaOH	50	5.8	6.8	6.33	0.241	実施例
3	ADA-NaOH	100	6.0	6.7	6.38	0.148	実施例
4	ADA-NaOH	200	6.2	6.7	6.43	0.101	実施例
5	BES-NaOH	50	6.0	7.1	6.59	0.281	実施例
6	BES-NaOH	100	6.1	7.0	6.68	0.191	実施例
7	BES-NaOH	200	6.5	7.0	6.75	0.110	実施例
8	Bis-Tris-HCl	50	5.9	6.9	6.42	0.242	実施例
9	Bis-Tris-HCl	100	6.2	6.8	6.46	0.151	実施例
10	Bis-Tris-HCl	200	6.2	6.7	6.47	0.110	実施例
11	MES-NaOH	50	5.6	6.5	6.00	0.203	実施例
12	MES-NaOH	100	5.6	6.3	5.97	0.141	実施例
13	MOPS-NaOH	50	6.0	7.0	6.56	0.286	実施例
14	MOPS-NaOH	100	6.2	7.0	6.66	0.191	実施例
15	MOPS-NaOH	200	6.5	7.0	6.75	0.121	実施例
16	TES-NaOH	50	5.9	7.3	6.68	0.346	実施例
17	TES-NaOH	100	6.3	7.2	6.85	0.208	実施例
18	TES-NaOH	200	6.6	7.2	6.94	0.120	実施例
19	Tris-HCl	50	6.2	8.2	7.43	0.483	実施例
20	Tris-HCl	100	6.9	8.2	7.78	0.268	実施例
21	Tris-HCl	200	7.5	8.2	7.93	0.132	実施例

[0051] 表1及び図1から、緩衝剤の配合量は前処理後の尿検体中200mM以上でpH調整効果が顕著となることがわかった。

実施例 2

[0052] 実施例2の目的は、尿検体前処理液組成物及びそれを用いた尿検体前処理方法をELISA法を用いた尿中ヒトポドカリキシン検出系に適応させることである。

[0053] (方法)

(1) 抗ヒトポドカリキシン・マウスモノクローナル抗体の作製

ヒトポドカリキシン50 μ gをマウス腹腔にアジュバントとともに数回免疫し、その血清力価が上昇したことを確認した。静脈内に追加免疫後3日目に脾臓を取り出し、得られた脾細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞数で10:1の割合でポリエチレングリコール3500の存在下で融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。

[0054] ハイブリドーマ細胞を5%CO₂雰囲気下、37° Cで1週間培養し、培養上清中の抗ヒトポドカリキシン抗体の有無を調べた。抗体産生を認めたハイブリドーマ細胞の陽性ウェル中の細胞を限界希釈法により希釈し2週間培養し、同様に培養上清の抗ヒトポドカリキシン抗体の有無をヒトポドカリキシン固相化マイクロタイタープレートを用いたEIA法で調べた。陽性ウェル中の細胞を再度限界希釈し、同様の培養を行った。この段階で抗ヒトポドカリキシン抗体を産生している細胞をフラスコにて培養し、その一部を10% ジメチルスルホキシド(DMSO)を含むウシ胎児血清(FCS)に懸濁し(5×10^6 個/mL)、液体窒素中で保存した。

[0055] 次に各ウェルの上清を用い、ヒトポドカリキシンに対する培養上清中の産生抗体の反応性を調べた。まずマイクロタイタープレートのウェルに、100 μ L/ウェルの前記ヒトポドカリキシン水溶液を添加し、500ng/ウェル、4° C、12時間ヒトポドカリキシンをマイクロタイタープレート上に吸着させて抗原を固相化した。12時間後、ウェル中の前記ヒトポドカリキシン水溶液をデカンテーションにより除去し、該ウェルに200 μ L/ウェルのPBS-T溶液を添加してデカンテーションで除去することによって、ウェルに吸着及び固相化しなかった過剰なヒトポドカリキシンを洗浄除去した。この洗浄工程を計2回行った。

[0056] その後、200 μ L/ウェルの抗原固相プレート用ブロッキング液を添加し、ヒトポドカリキシン固相化マイクロタイタープレートのウェル内のブロッキングを4° C、12時間行った。12時間経過後、ブロッキングを完了したヒトポドカリキシン固相化マイクロタイタープレートは4° Cのままで保存された。ブロッキングを完了したヒトポドカリキシン固相化マイクロタイタープレートを培養上清中の抗体の反応性を確認するために用いた。前記ヒトポドカリキシン固相化マイクロタイタープレートの各ウェルに100 μ L/ウェルのハイブリドーマ培養上清を加え、37° C、1時間加温した。その後、前記ウェル中の培養上清をデカンテーションにより除去し、前記ウェルへ200 μ L/ウェルのPB

S-Tを添加し、デカンテーションによってPBS-Tの除去を行い、前記ウェルを洗浄した。この洗浄工程を計3回行った。

[0057] その後、前記ウェルに100 μ L/ウェル(2000倍希釈:0.55 μ g/mL)のペロキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO社製)を添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間加温した。この酵素標識抗体の希釈には酵素標識抗体希釈液を用いた。その後、前記ウェル中の酵素標識抗体をデカンテーションにより除去し、200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションにより除去して洗浄した。この洗浄工程を計3回行った。その後、前記ウェルの100 μ L/ウェルのTMB溶液をペロキシダーゼ反応基質溶液として添加し、25 $^{\circ}$ C、30分静置した。その後直ちに、前記ウェル内の基質反応液に100 μ L/ウェルの反応停止液(313mM H₂SO₄溶液)を添加し、前記ウェル内での酵素反応を停止した。その後、前記ウェルの吸光度を測定し、450nmの吸光度から630nmの吸光度を差し引いた数値を反応性評価の指標とした。

[0058] その結果、固相化したヒトポドカリキシンに強い反応性を示す培養上清を産生するハイブリドーマ細胞を選択した。本培養上清中の免疫グロブリンの抗体クラス及びサブクラスを免疫グロブリン Typing Kit、Mouse(和光純薬工業社製)を用いて、前記ハイブリドーマ細胞のクローン毎に確認した。その結果を基に、得られた単クローン細胞ライブラリーの中から、IgGクラスを産生するクローンの細胞を25mLフラスコで増殖させ、さらに75mLフラスコに移して増殖させた。この細胞をプリスタン処理マウス腹腔中に注射し、腹水を採取した。

[0059] (2)抗ヒトポドカリキシン・マウスモノクローナル抗体IgGの精製

マウス腹水(10mL)と混濁血清処理剤(FRIGEN(登録商標)II、協和純薬工業社製)とを、腹水1.5容に対してFRIGEN(登録商標)IIを1容の比率で混和し、1~2分攪拌振とうし、腹水を脱脂した。遠心分離機で1930 \times g、10分間の遠心分離を行い、清澄化された腹水遠心上清(10mL)を分取した。

[0060] 前記腹水遠心上清(10mL)について氷浴中、1時間、硫酸分画操作(終濃度50%飽和硫酸)を行い、沈降した免疫グロブリン画分をPBSに懸濁溶解させた。前記硫酸分画操作を計2回を行い、腹水からのIgG粗画分を得た。

[0061] 得られた免疫グロブリン粗画分(10mL)に対して等体積のリン酸ナトリウム緩衝液を

混合し、プロテインGカラムを用いてアフィニティ精製を行った。サンプルをプロテインGカラムに吸着後、リン酸ナトリウム緩衝液をプロテインGカラム内に通し、サンプル中のIgG以外の夾雑物を洗浄除去した。その後、プロテインGカラムに吸着したIgGは、0.1M グリシン-HCl(pH2.7)水溶液で溶出した。IgGを含む溶出液は1M Tris緩衝液で中和し、アフィニティ精製の溶出液の体積に対して500倍の体積のPBSで、4°C、6時間の透析を2回行って精製した。透析には透析用セルロースチューブ(Viskase Companies社製)を用いた。透析されたIgG溶出画分を、抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体の精製物とした。抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体は4°Cで保存した。

[0062] なお、上記IgGの精製にはBioLogic LPシステム(Bio Rad Laboratories社製)を使い、前記プロテインGカラムを接続し、流速は1mL/分となるよう制御した。

[0063] (3)抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体固相化マイクロタイタープレートの作成
精製抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を、最終濃度7 μ g/mLとなるようにpH7.3のPBSに溶解した。マイクロタイタープレートのウェルに、100 μ L/ウェルの前記精製抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体/PBS溶液を添加し、4°C、12時間、抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体をマイクロタイタープレート上に固相化した。12時間後、前記ウェル中の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体/PBS溶液をデカンテーションにより除去し、該ウェルに200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションにより除去して、ウェルに吸着及び固相化されなかった過剰分の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を洗浄した。この洗浄工程を計2回行った。その後、200 μ L/ウェルの抗体固相プレート用ブロッキング液を添加し、4°C、12時間抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を固定したマイクロタイタープレートのウェル内のブロッキングを行い、12時間経過後、4°Cで保存した。

[0064] (4)HRP標識化抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体の作成

西洋ワサビペロキシダーゼ(HRP)を純水に4mg/mLの濃度で溶かし、HRP水溶液とした。このHRP溶液500 μ L(2mg)に100 μ Lの100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加えて、20分間、室温で攪拌した。HRP溶液に対して500倍容の1mM 酢酸緩衝液で4°C、6時間の透析を2回行った。この透析操作には透析用セルロー

スチューブ (Viskase Companies社製) を使用した。次に、抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を、10mM 炭酸緩衝液に8mg/mLの濃度で溶かした。前記HRP溶液500 μ L(2mg)に、HRP溶液に対して1/3倍容の0.5M 炭酸緩衝液を加え、さらに、500 μ L(4mg)の前記抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体/10mM 炭酸緩衝液を混合し、室温で2時間攪拌した。その後、4mg/mLの水素化ホウ素ナトリウム溶液(50 μ L)を加え、氷水浴中で2時間攪拌した。この溶液に、硫酸分画操作(終濃度50%飽和硫酸)を氷浴中で1時間行い、沈降した画分を標識抗体浮遊液1mLに懸濁溶解させた。この硫酸分画操作を計2回行い、前記標識抗体浮遊液の総体積に対して3/4倍容の標識抗体保存液を加え、HRP標識化抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体原液を得た。

[0065] (5) 尿中ヒトポドカリキシンの定量

前記抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を固相化したマイクロタイタープレートと、前記HRP標識化抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体とを用いて、尿中のヒトポドカリキシンを定量した。まず、尿サンプル90 μ Lと、2M TES、0.2M EDTA及び2%(v./v.) Triton X-100を含む水溶液(pH7.0)10 μ Lとを混合し、この混合液100 μ Lを抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を固定したマイクロタイタープレートの1個のウェルに添加した。これを37 $^{\circ}$ C、1時間静置し、前記ウェル中の尿サンプル溶液をデカンテーションにより除去し、該ウェルに200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションによって除去して、洗浄を行った。この洗浄工程を計3回行った。

[0066] その後、前記実施例2の(4)節で調製した原液を標識抗体希釈液で10,000倍希釈したHRP標識化抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体溶液を100 μ L/ウェル添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間静置し、その後、前記HRP標識化抗体溶液をデカンテーションにより除去し、前記ウェルに、200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションによって除去を行い、洗浄を行った。この洗浄工程を計3回行った。次に、前記ウェルにペロキシダーゼ酵素反応基質溶液として、100 μ L/ウェルのTMB溶液を添加し、25 $^{\circ}$ C、30分静置した。その後直ちに、前記ウェル内の基質反応液に100 μ L/ウェルの反応停止液を添加し、前記ウェル内での酵素反応を停止させ、吸光

度測定試料を作製した。吸光度測定試料の450nm及び630nmにおける吸光度を測定し、450nmの吸光度から630nmの吸光度を差し引いた数値を尿中ヒトポドカリキシン定量の指標とした。検量線の標準品としては、抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体作出時に免疫用抗原として用いたヒトポドカリキシンを使用した。その検量線から実際の尿中ポドカリキシン濃度を算出した。

[0067] なお、本発明の尿検体前処理液組成及びそれを用いた尿検体前処理方法を尿中ヒトポドカリキシン定量に適応することによって、初めて、尿中ヒトポドカリキシンの精密定量検出が可能となった。本発明の効果を検証するにあたっては、尿中にポドカリキシン排泄が無いことを確認することができた健常人尿を用い、標準品のポドカリキシン抗原を添加して、尿検体間でのポドカリキシン測定誤差の確認と本発明の効果の確認を行った。その効果を表2及び図2に記載した。

[0068] [表2]

[ポドカリキシン]	基準 検量値	検体1		検体2		検体3		検体4		備考	
		前処理 (-)	前処理 (+)	前処理 (-)	前処理 (+)	前処理 (-)	前処理 (+)	前処理 (-)	前処理 (+)		
(ng/mL)		O.D.(450nm-630nm)									
6400	5.146	3.027	5.146	2.837	5.145	3.256	5.146	3.791	5.136	実施例	
3200	2.619	1.503	2.619	1.348	2.618	1.585	2.619	1.813	2.614	実施例	
1600	1.224	0.737	1.224	0.649	1.223	0.711	1.216	0.852	1.223	実施例	
800	0.549	0.359	0.549	0.309	0.549	0.338	0.549	0.393	0.548	実施例	
400	0.253	0.179	0.253	0.150	0.253	0.161	0.253	0.188	0.252	実施例	
0	0.036	0.035	0.036	0.035	0.036	0.035	0.036	0.035	0.036	実施例	
(ng/mL)		基準検量値からの乖離誤差 (%)									
6400	-	64	0	67	1	61	1	51	4		
3200	-	65	0	70	2	63	1	55	5		
1600	-	63	2	69	2	65	8	55	2		
800	-	59	1	66	2	62	1	53	3		
400	-	54	0	64	4	60	2	51	7		
0	-	15	3	18	1	20	2	13	0		

実施例 3

[0069] 実施例3の目的は、ELISA法を用いた尿中ヒトポドカリキシン検出系へのpH依存的反応性を評価することである。

[0070] 実施例2で構築した尿中ポドカリキシン測定系におけるpH依存的反応性を評価し

た。pH依存性を評価するため、尿検体の代わりに、50mM MES-NaOH(pH5.5、pH6.0、pH6.5又はpH7.0)か、50mM Tris-HCl(pH8.0又は8.5)かを含む6種類のpHの異なる緩衝液と、0.2%(v./v.) Triton X-100及び20mM EDTAとを含むpH反応性評価液を用意した。ヒトポドカリキシン抗原をスパイク添加したpH反応性評価液を尿検体の代わりに尿中メガリン測定系に供し、pH依存性を評価した。

[0071] [表3]

[ポドカリキシン] (ng/mL)	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH8.0	pH8.5	備考
	O.D.(450nm-630nm)						
3200	3.368	3.245	3.449	1.872	1.027	0.874	実施例
1600	1.684	1.541	1.660	0.711	0.410	0.370	実施例
800	0.690	0.597	0.641	0.285	0.171	0.168	実施例
400	0.278	0.229	0.248	0.110	0.090	0.083	実施例
200	0.105	0.091	0.098	0.057	0.049	0.050	実施例
100	0.050	0.044	0.047	0.035	0.032	0.034	実施例
50	0.033	0.031	0.032	0.028	0.027	0.025	実施例
0	0.022	0.022	0.021	0.026	0.023	0.021	実施例

[0072] その結果、表3及び図3に示すとおり、高pHでは反応性が低く、pHの低下に伴って尿中ポドカリキシン測定系の反応性が向上する結果が得られた。本発明の目的は、尿検体前処理液組成物及びそれを用いた尿検体前処理方法を使用することにより、尿を検査対象物とした尿検査測定技術・測定方法において、検査値に誤差を生じる要因の検査測定系への影響性を消失させ、尿原液に近い状態で、尿測定サンプルを検査測定系へ供することができることであるが、上述の結果は、簡便で所要時間が短く、且つ、臨床検査における尿検体を用いた精密な定量を可能としており、本発明の効果を大きく支持するものである。

実施例 4

[0073] 実施例4の目的は、尿検体前処理液組成物及びそれを用いた尿検体前処理方法をELISA法を用いた尿中ヒトメガリン検出系に適応させることである。

[0074] (方法)

(1)抗ヒトメガリン・マウスモノクローナル抗体の作製

ヒトメガリン50 μ gをマウス腹腔にアジュバントとともに数回免疫し、その血清力価が上昇したことを確認した。静脈内に追加免疫後3日目に脾臓を取り出し、得られた脾細胞とマウスミエローマ細胞を細胞数で10:1の割合でポリエチレングリコール3500の存在下で融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。該ハイブリドーマ細胞を5%CO₂雰囲気下、37°Cで1週間培養し、培養上清中の抗ヒトメガリン抗体の有無を調べた。抗体産生を認めたハイブリドーマ細胞の陽性ウェル中の細胞を限界希釈法により希釈し2週間培養し、同様に培養上清中の抗ヒトメガリン抗体の有無をヒトメガリン固相化マイクロタイタープレートを用いたEIA法で調べた。さらにその後、抗体産生を認めた陽性ウェル中の細胞を再度限界希釈し、同様の培養を行った。この段階で抗ヒトメガリン抗体を産生している細胞を、フラスコにて培養し、その一部を10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を含むウシ胎児血清(FCS)に懸濁し(5×10⁶個/mL)、液体窒素中で保存した。

[0075] 次に各ウェルの上清を用い、ヒトメガリンに対する培養上清中の産生抗体の反応性を調べた。ヒトメガリン0.05mgを、140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄及び1.8mM KH₂PO₄溶液(pH7.3、以下、「PBS, pH7.3」と略す。)10

mLに溶解した。マイクロタイタープレートのウェルに、100 μ L/ウェルの前記ヒトメガリン/PBS, pH7. 3水溶液を加え、ヒトメガリンを3pmol/ウェル、4 $^{\circ}$ C、12時間マイクロタイタープレート上に固相化した。12時間後、ウェル中の前記ヒトメガリン/PBS, pH7. 3溶液をデカンテーションにより除去し、該ウェルに200 μ L/ウェルのPBS-T溶液を添加してデカンテーションにより除去することによって、ウェルに吸着及び固相化しなかった過剰なヒトメガリンを洗浄した。この洗浄工程を計2回行った。その後、200 μ L/ウェルの抗原固相プレート用ブロッキング液を各ウェルに添加し、4 $^{\circ}$ C、12時間ヒトメガリン固相化マイクロタイタープレートのウェルのブロッキングを行った。12時間経過後、ブロッキングを完了したヒトメガリン固相化マイクロタイタープレートは4 $^{\circ}$ Cのまま保存された。

[0076] 培養上清中の抗体の反応性を確認するために、このブロッキング完了後のヒトメガリン固相化マイクロタイタープレートを用いた。上記ヒトメガリン固相化マイクロタイタープレートのウェルへ、ハイブリドーマ培養上清を100 μ L/ウェルで加え、37 $^{\circ}$ C、1時間加温した。その後、ウェルに加えておいた培養上清をデカンテーションにより除去し、そのマイクロタイタープレートのウェルへPBS-Tを200 μ L/ウェルで添加し、デカンテーションによるPBS-Tの除去を行い、ウェル内の洗浄をした。この洗浄工程を計3回行った。

[0077] その後、ウェルに100 μ L/ウェル(2000倍希釈:0. 55 μ g/mL)のペロキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO社製)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間加温した。この酵素標識抗体の希釈には、酵素標識抗体希釈液を用いた。その後、前記ウェル中の酵素標識抗体をデカンテーションにより除去し、該ウェルに200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションにより除去を行い、前記ウェルを洗浄した。この洗浄工程を3回行った。その後、前記ウェルに100 μ L/ウェルのTMB溶液をペロキシダーゼ酵素反応基質溶液として添加し、25 $^{\circ}$ C、30分静置した。その後直ちに、前記ウェル内の基質反応液に100 μ L/ウェルの反応停止液を添加し、前記ウェル内での酵素反応を停止した。その後、前記ウェルの吸光度を測定し、450nmの吸光度から630nmの吸光度を差し引いた数値を反応性評価の指標とした。

[0078] その結果、固相化したヒトメガリンに強い反応性を示す培養上清を産生するハイブリ

ドーマ細胞を選択し、本培養上清中の免疫グロブリンの抗体クラス及びサブクラスを免疫グロブリン Typing Kit、Mouse (和光純薬工業社製)を用いて、前記ハイブリドーマ細胞のクローン毎に確認した。その結果を基に、得られた単クローン細胞ライブラリーの中から、IgGクラスを産生するクローンの細胞を25mLフラスコで増殖させ、さらに75mLフラスコに移して増殖させた。この細胞をプリスタン処理マウス腹腔中に注射し、腹水を採取した。

[0079] (2) 抗ヒトメガリン・マウスモノクローナル(IgG)抗体の精製

得られた腹水(10mL)と混濁血清処理剤(FRIGEN(登録商標)II、協和純薬工業社製)とを、腹水1.5容に対してFRIGEN(登録商標)IIを1容の比率で混和し、1~2分攪拌振とうすることで、腹水を脱脂した。遠心機で1930×g、10分間の遠心分離を行い、清澄化された腹水遠心上清(10mL)を分取した。前記腹水遠心上清(10mL)について氷浴中、1時間、硫酸分画操作(終濃度50%飽和硫酸)を行い、沈降した免疫グロブリン画分をPBSに懸濁溶解させた。前記硫酸分画操作を計2回を行い、腹水からのIgG粗画分を得た。得られた免疫グロブリン粗画分(10mL)に対して等量のリン酸ナトリウム緩衝液を混合し、プロテインGカラム(HiTrap Protein G HP、5mL:Amersham BioSciences社製)を用いてアフィニティ精製を行った。サンプルをプロテインGカラムに吸着後、50mLの20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)をプロテインGカラム内に通し、サンプル中のIgG以外の夾雑物を洗浄除去した。その後、プロテインGカラムにアフィニティ吸着したIgGは、0.1M グリシン-HCl、pH2.7水溶液で溶出させ、カラムからの溶出直後の溶出画分を1M Tris緩衝液で中和し回収した。中和後、アフィニティ精製物に対して500倍容のPBSで4°C、6時間の透析を2回行った。本透析操作に用いた透析膜は透析用セルロースチューブ(Viskase Companies社製)で行った。得られたIgG溶出画分を、抗ヒトメガリンモノクローナル抗体の精製物とした。抗ヒトメガリンモノクローナル抗体は4°Cで保存した。なお、本精製には、BioLogic LPシステム(Bio Rad Laboratories社製)に上述のプロテインGカラムを接続し、流速は1mL/分で一貫して行った。

[0080] (3) 抗ヒトメガリンモノクローナル抗体固相化マイクロタイタープレートの作成

精製抗ヒトメガリンモノクローナル抗体をPBS、pH7.3水溶液に溶解し、終濃度7

$\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。マイクロタイタープレートのウェルに、 $100\ \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の抗ヒトメガリンモノクローナル抗体/PBS, pH7.3水溶液を加え、 4°C 、12時間、抗ヒトメガリンモノクローナル抗体をマイクロタイタープレート上に固相化した。12時間後、前記ウェル中の抗ヒトメガリンモノクローナル抗体/PBS, pH7.3水溶液をデカンテーションにより除去し、該ウェルに $200\ \mu\text{L}/\text{ウェル}$ のPBS-Tを添加し、デカンテーションにより除去して、ウェルに吸着及び固相化されなかった過剰分の抗ヒトメガリンモノクローナル抗体を洗浄した。この洗浄工程を2回行った。その後、 $200\ \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の抗体固相プレート用ブロッキング液を添加し、 4°C 、12時間ヒトメガリンを固相化したマイクロタイタープレートのウェル内のブロッキングを行い、12時間経過後、 4°C で保存した。

[0081] (4) ペルオキシダーゼ標識化抗ヒトメガリンモノクローナル抗体の作成

西洋ワサビペロキシダーゼ(以下、HRPと略す)(Peroxydase from horseradish Type VI: Sigma社製)を純水に $4\text{mg}/\text{mL}$ の濃度で溶かしてHRP溶液とした。このHRP溶液 $500\ \mu\text{L}$ (2mg)に $100\ \mu\text{L}$ の 100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加えて、20分間、室温で攪拌した。HRP溶液に対して500倍容の 1mM 酢酸緩衝液で 4°C 、6時間の透析を2回行った。透析には透析用セルロースチューブ(Viskase Companies社製)を用いた。透析後、抗ヒトメガリンモノクローナル抗体を、 10mM 炭酸緩衝液に $8\text{mg}/\text{mL}$ の濃度で溶かした。前記HRP溶液 $500\ \mu\text{L}$ (2mg)に、HRP溶液に対して1/3倍容の 0.5M 炭酸緩衝液を加え、さらに、 $500\ \mu\text{L}$ (4mg)の前記抗ヒトメガリンモノクローナル抗体/ 10mM 炭酸緩衝液を混合し、室温で2時間攪拌した。さらに $4\text{mg}/\text{mL}$ の水素化ホウ素ナトリウム溶液($50\ \mu\text{L}$)を加え、氷水浴中で2時間攪拌した。この溶液に、硫酸分画操作(終濃度50%飽和硫酸)を氷浴中で1時間行い、沈降した画分を標識抗体浮遊液 1mL に懸濁溶解させた。この硫酸分画操作を計2回行い、前記標識抗体浮遊液の総体積に対して3/4倍容の標識抗体保存液を加え、HRP標識化抗ヒトメガリンモノクローナル抗体原液を得た。

[0082] (5) 尿中メガリンの定量

HRP標識化抗ヒトメガリンモノクローナル抗体を固相化したマイクロタイタープレート

と、HRP標識化抗ヒトメガリンモノクローナル抗体を用いて、尿中のメガリン(以下、ヒトメガリンともいう)を定量した。ヒトメガリンの定量は、尿サンプル90 μ Lと、2M TES、0.2M EDTA及び2%(v./v.)Triton X-100を含む水溶液(pH7.0)10 μ Lとを混合し、この混合液100 μ Lを抗ヒトメガリンモノクローナル抗体を固相化したマイクロタイタープレートの1個のウェルに添加した。前記マイクロタイタープレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間静置し、前記ウェル中の尿サンプル溶液をデカンテーションにより除去し、該ウェルに200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションによって除去して、洗浄を行った。この洗浄工程を計3回行った。その後、実施例4の(4)節で調製した原液を標識抗体希釈液で10,000倍希釈したHRP標識化抗ヒトメガリンモノクローナル抗体溶液を100 μ L/ウェル添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間静置し、その後、前記HRP標識化抗体溶液をデカンテーションにより除去し、前記ウェルに、200 μ L/ウェルのPBS-Tを添加し、デカンテーションによって除去を行い、洗浄を行った。この洗浄工程を3回行った。次に、前記ウェルにペロキシダーゼ酵素反応基質溶液として、100 μ L/ウェルのTMB溶液を添加し、25 $^{\circ}$ C、30分静置した。前記ウェル内の基質反応液に100 μ L/ウェルの反応停止液を添加し、前記ウェル内での酵素反応を停止させ、吸光度測定試料を作製した。その後、前記ウェルの吸光度を測定し、450nmの吸光度から630nmの吸光度を差し引いた数値を尿中ヒトメガリン定量の指標とした。

[0083] 検量線の標準品としては、抗ヒトメガリンモノクローナル抗体作出時に免疫用抗原として用いたヒトメガリンを使用した。尿中にメガリン排泄が無いことを確認することができた健常人尿を用い、標準品のメガリン抗原を添加して、尿検体間でのメガリン定量誤差の確認と本発明の効果の確認を行った。尿検体前処理を行わない場合は、同一標準抗原量添加においても、尿検体(人差、日内差)によって、測定値に大きな乖離が生じてしまい、定量評価ができなかった。

[0084] この要因としては、検体間での尿pH差や、尿中マグネシウム、カルシウムでのカオトロピック効果、尿中無機塩析出沈降物による測定系への沈着もしくは堆積による負の要因が大きい。本発明の尿検体前処理液組成物と、該組成物を用いた尿検体前処理方法とを尿中ヒトメガリン定量へ適応することによって、初めて尿中ヒトメガリンを

精密に定量検出することができた。本発明の効果を検証するに当たっては、尿中にメガリン排泄が無いことを確認することができた健常人尿を用い、標準品のメガリン抗原を添加して、尿検体間でのメガリン測定誤差の確認と本発明の効果の確認とを行った。その効果を表4及び図4に記載した。

[0085] [表4]

[メガリン] (ng/mL)	基準 検量値	検体 1		検体 2		検体 3		検体 4		備考	
		前処理 (-)	前処理 (+)	前処理 (-)	前処理 (+)	前処理 (-)	前処理 (+)	前処理 (-)	前処理 (+)		
		O.D.(450nm - 630nm)									
25.00	4.740	4.156	4.713	3.977	4.737	1.547	4.718	2.822	4.731	実施例	
12.50	2.718	2.172	2.714	1.993	2.712	0.637	2.706	1.475	2.716	実施例	
6.25	1.223	0.926	1.221	0.846	1.218	0.252	1.212	0.677	1.222	実施例	
3.13	0.509	0.400	0.508	0.366	0.507	0.137	0.504	0.295	0.507	実施例	
1.56	0.231	0.185	0.230	0.179	0.230	0.083	0.229	0.139	0.230	実施例	
0.00	0.039	0.037	0.040	0.037	0.040	0.036	0.040	0.038	0.040	実施例	
(ng/mL)		基準検量値からの乖離誤差 (%)									
25.00	-	35	8	40	3	82	7	64	5		
12.50	-	45	4	52	5	88	7	68	3		
6.25	-	49	5	56	6	89	10	67	3		
3.13	-	46	6	53	7	86	10	65	6		
1.56	-	45	6	47	7	80	7	63	7		
0.00	-	22	0	24	2	27	1	20	2		

[0086] 本発明の尿検体前処理液組成物及びそれを用いた尿検体前処理方法を使用することにより、尿を検査対象物とした尿検査測定技術・測定方法において、検査値に誤差を生じる要因の検査測定系への影響性を消失させ、尿原液に近い状態で、尿測定サンプルを検査測定系へ供することができる。本発明の方法を採用することにより、簡便で所要時間が短く、且つ、臨床検査における尿検体を用いた精密な測定が可能となった。

実施例 5

[0087] 実施例5の目的は、ELISA法を用いた尿中ヒトメガリン検出系へのpH依存的反応性を評価することである。

[0088] 実施例4で示した尿中メガリン測定系へのpH依存的反応性を評価した。操作は実施例4に記載の内容と同様である。pH依存性を評価するため、尿検体の代わりに、MES及びTrisの2種類の緩衝液を用いた。50mM MES-NaOH(pH5.5、pH6.0、pH6.5又はpH7.0)か、50mM Tris-HCl(pH8.0又は8.5)かを含む6種類のpHの異なる緩衝液と、1%(v./v.) Triton X-100及び20mM EDTAとを含むpH反応性評価液を用意した。ヒトメガリン抗原をスパイク添加したpH反応性評価液を尿検体の代わりに尿中メガリン測定系に供し、pH依存性を評価した。その結果、表5及び図5に示すとおり、低pHでは反応性が低く、pHの上昇に伴って尿中メガリン測定系の反応性が向上する結果が得られた。

[0089] [表5]

[メガリン]	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH8.0	pH8.5	備考
(ng/mL)	O.D.(450nm-630nm)						メガリン定量値 (相対値)
50.00	0.991	3.7826	4.293	5.014	5.811	5.243	実施例
25.00	0.479	1.0784	3.863	5.938	5.789	5.631	実施例
12.50	0.257	0.359	1.610	3.492	3.466	3.527	実施例
6.25	0.147	0.1568	0.569	1.530	1.516	1.438	実施例
3.13	0.089	0.0823	0.199	0.528	0.501	0.546	実施例
1.56	0.050	0.0486	0.083	0.184	0.196	0.185	実施例
0.78	0.039	0.0373	0.049	0.083	0.089	0.087	実施例
0.00	0.022	0.0168	0.019	0.023	0.022	0.020	実施例

[0090] 一方、メガリンは生体内においてスカベンジャー受容体として多様なリガンドと結合している。このメガリンとリガンドの結合は、カルシウムイオン依存的に結合し、カルシウムキレート剤の添加とpHのアルカリ環境化によって、リガンドをメガリンは切り離し、メガリンに特徴的な構造領域であるリガンド結合領域を分子表面に露呈させる。今回得られた尿中メガリン測定系のpH依存性の結果は、まさに、このメガリンの分子特性による影響である。pHの上昇によって、メガリン分子のエピトープの露呈、若しくは、メガリン分子と抗メガリン抗体の立体障害の緩和等により、尿中メガリン測定系の反応性がpH依存的に向上したものと考えられる。この特性を活かして、尿中メガリン測定用前処理液を用いることによって、通常は認識できないメガリン特有のエピトープを免疫学的測定法により検出・定量可能とし、本発明の尿前処理液組成及びこれらを用いた前処理方法の効果を大きく支持するものである。

実施例 6

[0091] 実施例6では尿中メガリン定量系への界面活性剤(Triton X-100)の添加効果を評価した。操作は界面活性剤の配合量を変えた点以外は実施例4と同様とした。結果を表6及び図6に示す。

[0092] [表6]

界面活性剤量 (%)	[メガリン] (ng/mL)			備考
	25.00	6.25	1.56	
	O. D. (450nm-630nm)			メガリン定量値 (相対値)
0.000	0.021	0.013	0.013	比較例
0.002	0.037	0.015	0.013	実施例
0.010	1.246	0.337	0.013	実施例
0.020	3.409	0.693	0.118	実施例
0.200	4.832	1.111	0.119	実施例
0.500	4.683	1.116	0.125	実施例
1.000	4.722	1.039	0.118	実施例

[0093] 表6及び図6に示すとおり、Triton X-100未添加の場合は、メガリン抗原濃度が希薄になるに従って、測定時に使用する容器へのメガリン抗原の非特異的吸着による損失が生じ、その結果、正確な測定が行われない結果となった。これに対しTriton X-100添加の場合は、Triton X-100のブロッキング効果によって、メガリン抗原の非特異的吸着による損失が防止され、正確な測定が維持されることがわかった。さらに、界面活性剤でブロッキング効果を奏する尿前処理液組成物及びこれらを用いた前処理方法を提供することが可能となった。

産業上の利用可能性

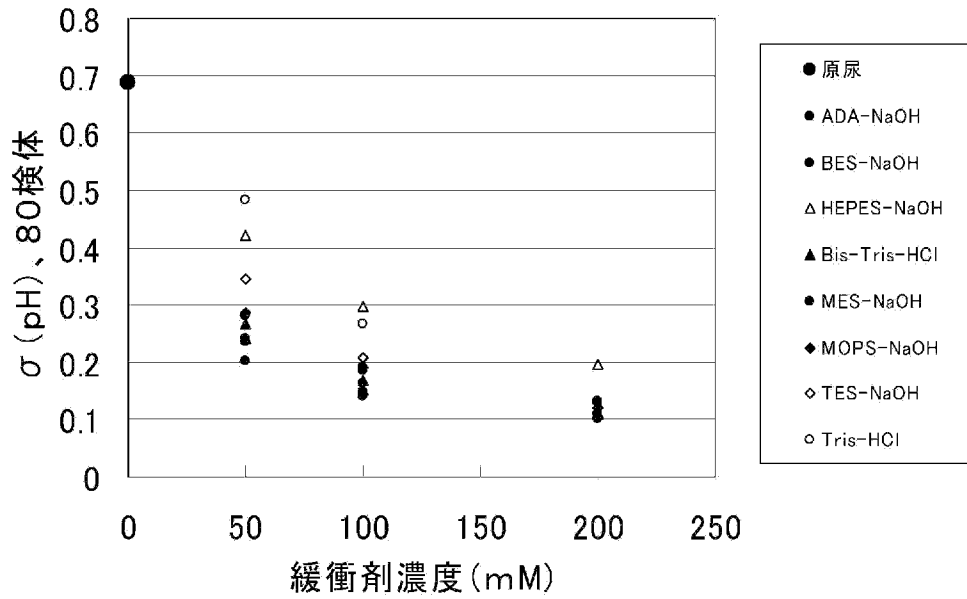
[0094] 本発明の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤、尿前処理方法、及び尿中タンパク質定量方法は、尿検体のpHがサンプル間でばらつくのを抑制でき、尿中無機塩析出沈降物の解消し、膜タンパク質の可溶化することができるという効果を奏するので、尿中のポドカリキシンやメガリンの定量に好適に用いられる。

請求の範囲

- [1] 緩衝剤、キレート剤及び界面活性剤を含むことを特徴とする尿中タンパク質定量用の尿前処理剤。
- [2] 前記緩衝剤はグッドの緩衝剤であることを特徴とする請求項1に記載の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤。
- [3] 酢酸、リン酸、クエン酸、ホウ酸及び酒石酸からなる群より選択される少なくとも1種類の酸を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤。
- [4] 前記界面活性剤はポリアルキレンオキサイド誘導体であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1つに記載の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤。
- [5] 前記界面活性剤のHLB値は10～18であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1つに記載の尿中タンパク質定量用の尿前処理剤。
- [6] 尿100質量部に対して請求項1乃至5のいずれか1つに記載の尿前処理剤10～1000質量部を混合することを特徴とする尿前処理方法。
- [7] 尿100質量部に対して請求項1乃至5のいずれか1つに記載の尿前処理剤10～1000質量部を混合した後、タンパク質濃度を測定することを特徴とする尿中タンパク質定量方法。
- [8] 前記タンパク質はポドカリキシンであることを特徴とする請求項7に記載の尿中タンパク質定量方法。
- [9] 前記タンパク質はメガリンであることを特徴とする請求項7に記載の尿中タンパク質定量方法。

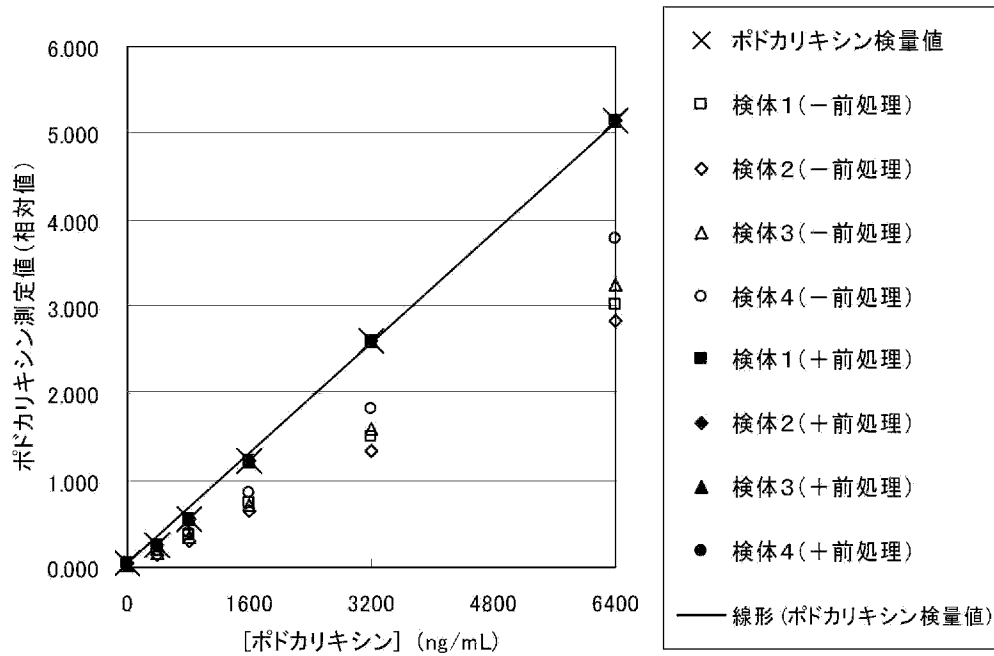
[図1]

緩衝剤添加濃度とpH値のばらつき



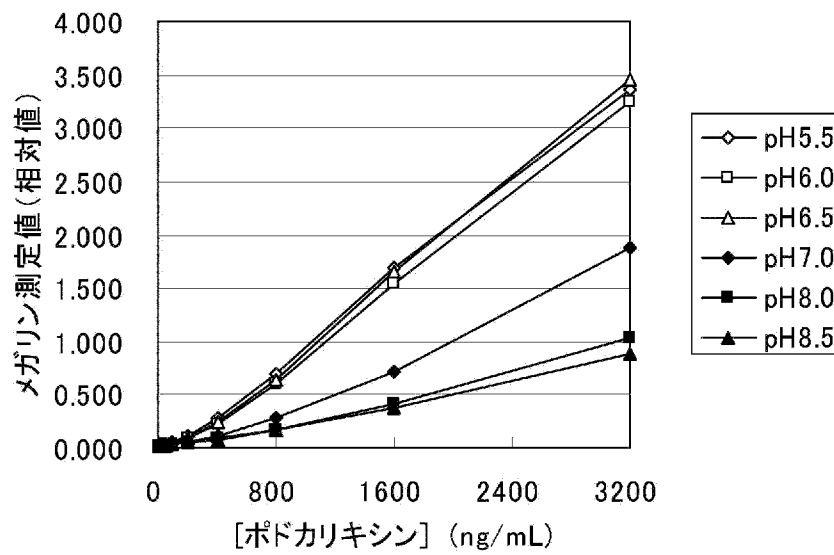
[図2]

ポドカリキシン測定系 : 尿前処理比較による測定精度評価



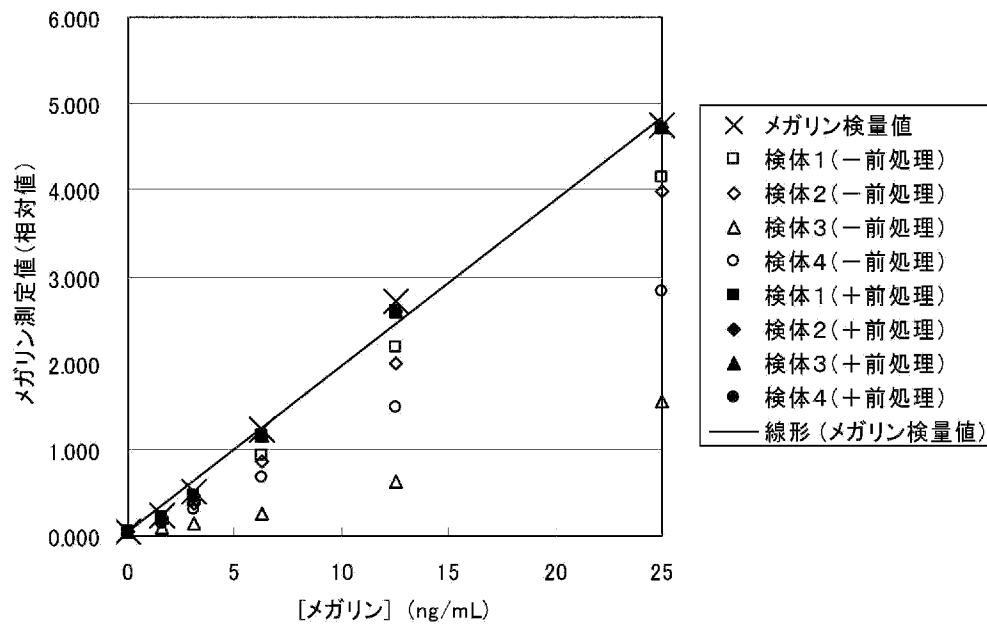
[図3]

ポドカリキシン測定系 : pH依存性

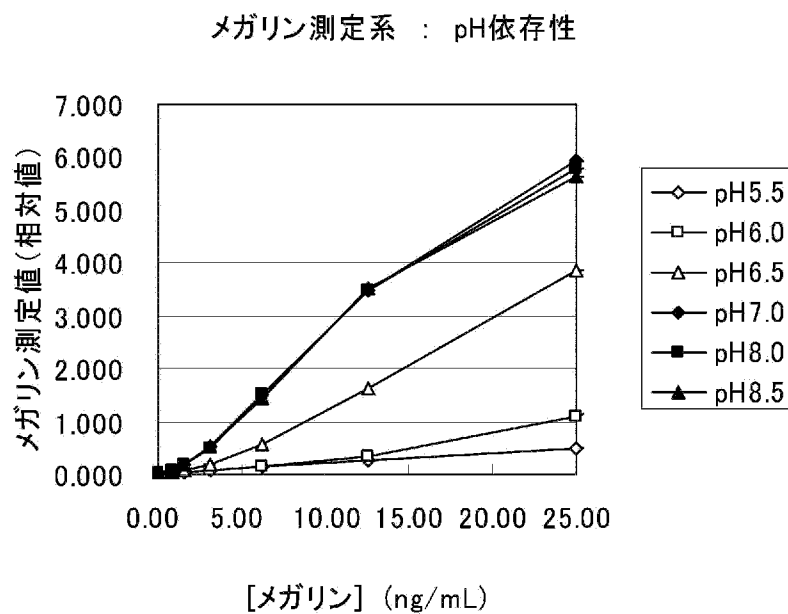


[図4]

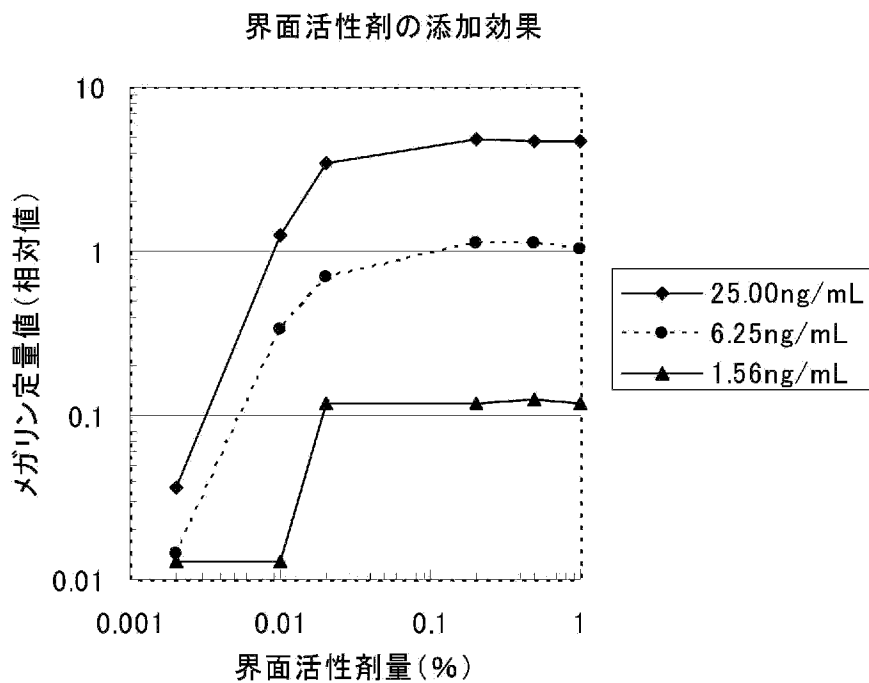
メガリン測定系 : 尿前処理比較による測定精度評価



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/067422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/48(2006.01) i, G01N33/493(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) G01N33/48, G01N33/493, 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 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/008549 A1 (Seikagaku Corp.), 06 March, 1997 (06.03.97), Example 1 & JP 3870242 B	1
Y	WO 2002/037099 A1 (International Reagents Corp.), 10 May, 2002 (10.05.02), Example 1 & US 2004/0058395 A1 & EP 1336845 A1 & AU 9030901 A	1-9
Y	JP 2007-205732 A (Sysmex Corp.), 16 August, 2007 (16.08.07), Par. No. [0018] & US 2007/0177146 A1 & EP 1813931 A2 & CN 101013080 A	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October, 2008 (29.10.08)	Date of mailing of the international search report 11 November, 2008 (11.11.08)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/067422

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, Y	WO 2007/119563 A1 (Niigata University), 25 October, 2007 (25.10.07), Par. No. [0089] & JP 2007-263750 A	1-9
A	JP 11-153602 A (Bayer Corp.), 08 June, 1999 (08.06.99), & US 5908787 A & EP 907081 A1 & AU 8613298 A & CA 2242197 A & AU 731530 B	1-9
A	Katsue KANNO, "Shoni Mesangium Zoshokusei Jin'en ni Okeru Nyochinsa Podocalyxin Teiryō no Rinshoteki Yuyosei ni Tsuite no Kento", Niigata Medical Journal, 2002, Vol.116, No.5, pages 219 to 227	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, G01N33/493(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. G01N33/48, G01N33/493, 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>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008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	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2008年									
日本国実用新案登録公報	1996-2008年									
日本国登録実用新案公報	1994-2008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) JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号								
X	WO 97/008549 A1 (生化学工業株式会社) 1997.03.06, 実施例 1 & JP 3870242 B	1								
Y	WO 2002/037099 A1 (国際試薬株式会社) 2002.05.10, 実施例 1 & US 2004/0058395 A1 & EP 1336845 A1 & AU 9030901 A	1-9								
Y	JP 2007-205732 A (シスメックス株式会社) 2007.08.16, 【0018】 & US 2007/0177146 A1 & EP 1813931 A2 & CN 101013080 A	1-9								
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 29.10.2008	国際調査報告の発送日 11.11.2008									
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) 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3496								

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E Y	WO 2007/119563 A1 (国立大学法人新潟大学) 2007. 10. 25, [0089] & JP 2007-263750 A	1-9
A	JP 11-153602 A (バイエルコーポレーション) 1999. 06. 08, & US 5908787 A & EP 907081 A1 & AU 8613298 A & CA 2242197 A & AU 731530 B	1-9
A	菅野 かつ恵, 小児メサングウム増殖性腎炎における尿沈渣ポドカリキシン定量の臨床的有用性についての検討, 新潟医学会雑誌, 2002, Vol. 116, No. 5, p. 219-227	1-9