(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月23日(23.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/018136 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/573 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/023774

(22) 国際出願日： 2024年7月1日(01.07.2024)

(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 2023-116935 2023年7月18日(18.07.2023) JP

(71) 出願人: 日東紡績株式会社 (**NITTO BOSEKI CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒9608161 福島県福島市郷野目字東１番地 Fukushima (JP).

(72) 発明者: 本多 亨 (**HONDA Toru**); 〒9638061 福島県郡山市富久山町福原字塩島１番地 日東紡績株式会社内 Fukushima (JP). 今井 裕子 (**IMAI Hiroko**); 〒9638061 福島県郡山市富久山町福原字塩島１番地 日東紡績株式会社内 Fukushima (JP). 川崎 大輔 (**KAWASAKI Daisuke**); 〒9638061 福島県郡山市富久山町福原字塩島１番地 日東紡績株式会社内 Fukushima (JP). 菊地 渉 (**KIKUCHI Wataru**); 〒9638061 福島県郡山市富久山町福原字塩島１番地 日東紡績株式会社内 Fukushima (JP). 笹川 久美子 (**SASAGAWA Kumiko**); 〒9638061 福島県郡山市富久山町福原字塩島１番地 ニットーボーメディカル株式会社内 Fukushima (JP). 伊藤 和枝 (**ITO Kazue**); 〒9638061 福島県郡山市富久山町福原字塩島１番地 ニットーボーメディカル株式会社内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人浅村特許事務所 (**ASAMURA IP P.C.**); 〒1000004 東京都千代田区大手町１－５－１ 大手町ファーストスクエア ウエストタワー１７Ｆ 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** TRACP-5b MEASUREMENT METHOD AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称： ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法およびそのためのキット

(57) **Abstract:** Provided is a measurement method capable of selectively detecting TRACP-5b by further reducing the influence of co-existing TRACP-5a in the measurement of TRACP-5b. A reaction for detecting TRACP-5b is performed in the presence of an organic sulfonic acid, a sulfuric acid ester, or a salt thereof, which has a sulfo group ($-S(O)_2OH$), a sulfuric acid group ($-OS(O)_2OH$), and/or a salt thereof at a density of at least 6.5 mmol/g.

(57) 要約： ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定において、共存するＴＲＡＣＰ－５ａの影響をより低減してＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に検出可能な測定法を提供する。 スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、６．５ｍｍｏｌ／ｇ以上の密度で有する、有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の存在下で、ＴＲＡＣＰ－５ｂを検出する反応を行う。

WO 2025/018136 A1

明　細　書

発明の名称 ：

ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法およびそのためのキット

技術分野

[0001] 本発明は、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法およびそのためのキットに関し、より具体的には、ＴＲＡＣＰ－５ａの影響を受けずにＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に測定する方法およびそのためのキットに関する。

背景技術

[0002] 酸性ホスファターゼ（Ａｃｉｄ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ，ＡＣＰ）は、酸性条件下において有機モノリン酸エステルの加水分解活性を有する酵素である。ＡＣＰには複数のアイソザイムが存在し、様々な組織に分布している。血清中に存在するＡＣＰとしては、血小板由来、赤血球由来、前立腺由来、破骨細胞由来、マクロファージ由来などが知られている。これらのアイソザイムはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離され、破骨細胞由来およびマクロファージ由来のＡＣＰは原点より５番目に位置し、酒石酸に対する抵抗性を有することから、Ｂａｎｄ－５　酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Ｂａｎｄ－５　Ｔａｒｔｒａｔｅ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ　Ａｃｉｄ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ，ＴＲＡＣＰ－５）とも呼ばれている（特許文献５、Ｌａｍ　Ｗ．Ｋ．Ｗ．　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．２４（７）：１１０５－１１０８，１９７８およびＬａｍ　Ｗ．Ｋ．Ｗ．　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１４，１７７－１８１，１９８１等）。ＴＲＡＣＰ－５は、糖鎖へのシアル酸の結合が多いＴＲＡＣＰ－５ａと、シアル酸の結合が少ないＴＲＡＣＰ－５ｂに分類され、５ａがマクロファージ由来、５ｂが破骨細胞由来とされている。血清中のＴＲＡＣＰ－５ｂ濃度は破骨細胞の活性を鋭敏に反映することから、骨吸収マーカーとして、代謝性骨疾患および骨転移癌の診断補助並びに治療効果判定で利用されている。そのため、血清中のＡＣＰの中からＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に測定する方法が

検討されている。

[0003] 従来、ＴＲＡＣＰ－５の測定法として、酒石酸の存在下でｐ－ニトロフェニルリン酸などの合成基質を用いて酵素反応を行い、生ずる反応生成物を比色定量することにより酵素活性を求める方法がある。しかし、酒石酸は前立腺由来ＡＣＰを阻害することはできるが、ＴＲＡＣＰ－５ａや赤血球由来、血小板由来ＡＣＰは酒石酸に対して抵抗性を有するため、この方法では、これらのアイソザイムも測定してしまい、ＴＲＡＣＰ－５ｂを特異的に測定することができない。

[0004] 上記方法のＴＲＡＣＰ－５ｂ特異性を改善する方法として、血清を５倍に希釈した液を３７℃で１時間インキュベートした後、同様に酵素活性を測定する方法が知られている（非特許文献３）。この方法においては、前立腺由来ＡＣＰに加え赤血球由来ＡＣＰの影響も回避することができるが、ＴＲＡＣＰ－５ａや血小板由来ＡＣＰについては依然として回避することができない。

[0005] ＴＲＡＣＰ－５ｂ活性を特異的に測定する他の方法としては、酒石酸の存在下で測定したＡＣＰ活性から、酒石酸とフッ化物の共存下で測定したＡＣＰ活性を差し引くことにより、ＴＲＡＣＰ－５ｂの活性を算出する方法がある（特許文献１）。この方法では、フッ化物に対する感受性の差を利用して赤血球由来および血小板由来ＡＣＰの影響を回避することができる。しかしながら、ＴＲＡＣＰ－５ａの影響を除くことができず、また差し引きによってＴＲＡＣＰ－５ｂの活性を求めており、精度の点で問題を有する。

[0006] さらに他の方法としては、ＴＲＡＣＰ－５ｂ以外の酸性ホスファターゼの阻害物質として酸性ムコ多糖を用いて、ＴＲＡＣＰ－５ｂ活性を特異的に測定する方法が報告されている（特許文献２）。しかし、酸性ムコ多糖のＴＲＡＣＰ－５ａ活性の阻害効果は十分ではなく、ＴＲＡＣＰ－５ｂに対する特異性をより改善することが求められる。

[0007] 化学発光基質を用いたＴＲＡＣＰ－５ｂの活性測定法として、ＴＲＡＣＰ－５ｂと化学発光性１，２－ジオキセタン系化合物とを酸性条件下で反応さ

せた後、反応溶液をアルカリ条件にして発光強度を測定する方法が知られている（特許文献３）。また、酵素反応時にＭＥＳなどの特定の緩衝剤を使用することや、マンガンイオンまたはコバルトイオンを添加することで、ＴＲＡＰＣ－５ａに対するＴＲＡＣＰ－５ｂの発光強度比が大きくなることを利用してＴＲＡＣＰ－５ｂを特異的に測定する方法が報告されている（特許文献４）。しかし、これらの方法は化学発光基質を用いた活性測定に限られ、より安価な方法でもＴＲＡＣＰ－５ｂを特異的に測定することが要求されている。

[0008] 抗体を用いたＴＲＡＣＰ－５ｂの免疫測定法としては、例えば、ＴＲＡＣＰ－５に特異的な抗体を用いて、ＴＲＡＣＰ－５ａおよびＴＲＡＣＰ－５ｂの両者を結合した後に、両者の至適ｐＨの差を利用してＴＲＡＣＰ－５ｂを特異的に測定する方法がある（特許文献５）。しかし、至適ｐＨの差のみではＴＲＡＣＰ－５ｂに対する特異性が十分ではなく、差し引きでＴＲＡＣＰ－５ｂ量を求めているため、精度の点でも問題を有している。

[0009] また、ＴＲＡＣＰ－５ｂに対して一定の選択性を有する抗体を使用し、さらに抗体結合後に発色基質として２－クロロ－４－ニトロフェニルリン酸を用いた活性測定を行うことにより、ＴＲＡＣＰ－５ｂをより特異的に測定する方法がある(特許文献６および７)。しかし、この抗体も、ＴＲＡＣＰ－５ｂ選択性をより高めることが望まれている。

[0010] また、ＴＲＡＣＰ－５ｂに対して高い特異性を有するモノクローナル抗体を２クローン使用してＴＲＡＣＰ－５ｂのタンパク量を定量する方法もある(特許文献８)

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開平１０－３３７１９８

特許文献2：特開２００１－２３１５９５

特許文献3：特開２０１１－０２４４７０

特許文献4：特開２０２２－１７４０１５

特許文献5：特表２００２－５１００５０

特許文献6：特開２００４－０２６８０５

特許文献7：ＷＯ２００４／０７７０５９

特許文献8：ＷＯ２０１６／０２７６９７

非特許文献

[0012] 非特許文献1：非特許文献　Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．３３：４５８－４６２．１９８７

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013]　上述した従来技術に対して、本発明は、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定において、共存するＴＲＡＣＰ－５ａの影響をより低減してＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に検出可能な測定法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0014]　本発明者らは、ＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に検出可能な測定法を検討し、ＴＲＡＣＰ－５ａが存在し得る反応系に、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を一定以上の密度で有する化合物を存在させることで、ＴＲＡＣＰ－５ａの影響を大幅に低減でき、ＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に検出可能であることを見出した。

[0015]　即ち、本発明は、以下のＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法およびＴＲＡＣＰ－５ｂ測定用キットを提供するものである。

［１］　検体中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ－５ｂ）の測定方法であって、

スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、６．５ｍｍｏｌ／ｇ以上の密度で有する、有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の存在下で、ＴＲＡＣＰ－５ｂを検出する反応を行う工程を含む、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法。

[0016] ［２］　検体中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ－５ｂ

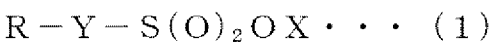
）の測定方法であって、

単位構造あたり、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有する有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩の存在下で、酵素反応または抗原抗体反応を行う工程を含む、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法；あるいは

前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、単位構造あたり、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有する、［１］に記載の方法。

[0017] ［３］　前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、式（１）：

[化1]

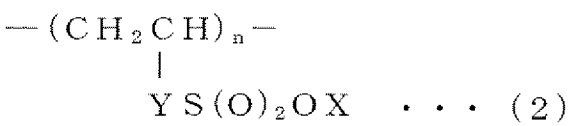


（式（１）中、Ｒは、炭素数１～３のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、Ｙは結合、または酸素原子であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

で表されるか、

式（２）：

[化2]



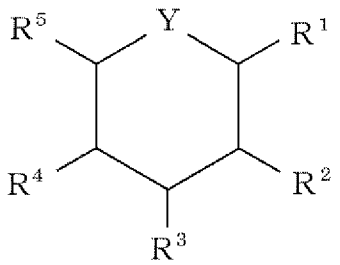
（式（２）中、Ｙは結合、または酸素原子であり、ｎは、２～５０００の整数であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

の繰り返し単位を有するか、

あるいは

式（３）：

[化3]



・・・（３）

（式（３）中、Ｙは、ＯまたはＣＨ$_2$であり、Ｒ^1～Ｒ^{5}のうち、２つは、Ｏ－または結合手であり、残りのうち少なくとも２つは、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）であり、いずれにも該当しないものは、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）である。）

の構造を含む繰り返し単位を有する、［１］または［２］に記載の方法。

[0018] ［４］　前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩が、ビニルスルホン酸もしくはその塩、硫酸ビニルもしくはその塩、ポリビニルスルホン酸もしくはその塩、ポリビニル硫酸もしくはその塩、メタンスルホン酸もしくはその塩、またはデキストラン硫酸もしくはその塩である、［１］または［２］に記載の方法。

[0019] ［５］　前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩が、１）独立して検体または反応系に添加され、あるいは２）検体希釈液、３）基質含有試薬、または４）抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体（典型的には抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体）を含有する試薬に含まれ、これにより、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の存在下で、ＴＲＡＣＰ－５ｂを検出する反応が行われる、［１］～［４］のいずれか１項に記載の方法。

[0020] ［６］　酵素法、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）、化学発光免疫測定法（ＣＬＩＡ法）、またはラテックス凝集法で測定する、［１］～［５］のいずれか１項に記載の方法。

［７］　前記検体が、血液、血清または血漿である、［１］～［６］のいず

れか１項に記載の方法。

[0021] ［８］　ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定キットであって、

スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、６．５ｍｍｏｌ／g以上の密度で有する有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩を含む、キット。

[0022] ［９］　ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定キットであって、

単位構造あたり、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有する有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩を含む、キット；あるいは

前記有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩は、単位構造あたり、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有する、［８］に記載のキット。

[0023] ［１０］　前記有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩は、式（１）：

[化4]

$$R-Y-S(O)_2OX \cdots (1)$$

（式（１）中、Ｒは、炭素数１～５のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、Ｙは結合、または酸素原子であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

で表されるか、

式（２）：

[化5]

$$-(CH_2CH)_n-$$
$$\quad\quad|$$
$$\quad YS(O)_2OX \quad \cdots (2)$$

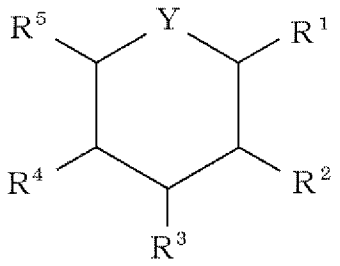
（式（２）中、Ｙは結合、または酸素原子であり、ｎは、２～５０００の整

数であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

の繰り返し構造を有するか、あるいは

式（３）：

[化6]



・・・（３）

（式（３）中、Ｙは、ＯまたはＣＨ$_2$であり、Ｒ^1～Ｒ^{5}のうち、２つは、Ｏ－または結合手であり、残りのうち少なくとも２つは、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）であり、いずれにも該当しないものは、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）である。）

の構造を含む繰り返し構造を有する、

［８］または［９］に記載のキット。

[0024] ［１１］　前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩が、硫酸ビニルもしくはその塩、ビニルスルホン酸もしくはその塩、ポリビニルスルホン酸もしくはその塩、ポリビニル硫酸もしくはその塩、メタンスルホン酸もしくはその塩、またはデキストラン硫酸もしくはその塩である、［８］または［９］に記載のキット。

[0025] ［１２］　酵素法によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するための、［８］～［１１］のいずれか１項に記載のキットであって、

ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬とを含む、キット。

[0026] ［１３］　前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含有する試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、

［１２］に記載のキット。

[0027] ［１４］　酵素免疫測定法（ＥＩＡ）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、［８］～［１１］のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

［１５］　前記抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含有する試薬、前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含有する試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、［１４］に記載のキット。

[0028] ［１６］　酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、［８］～［１１］のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、酵素反応での検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記標識物質を酵素反応で検出するための試薬と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

［１７］　前記第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含有する試薬、前記標識物質を酵素反応で検出するための試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、［１６］に記載のキット。

[0029] ［１８］　化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、［８］～［１１］のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質と、前記有機スルホン

酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

［１９］　前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質を含有する試薬、前記抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含有する試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、［１８］に記載のキット。

[0030] ［２０］　化学発光免疫測定法（ＣＬＩＡ法）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、［８］～［１１］のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、化学発光での検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記標識物質を化学発光で検出するための試薬と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

［２１］　前記第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬、前記第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬、前記標識物質を化学発光で検出するための試薬、または前記検体希釈用試薬を含む試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、［２０］に記載のキット。

[0031] ［２２］　ラテックス凝集法によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する［８］～［１１］のいずれか１項に記載のキットであって、

ラテックス粒子と、前記ラテックス粒子に吸着された抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬とを含む、キット。

［２３］　前記抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体を含む試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、［２２］に記載のキット。

[0032] ［２４］　測定される検体が、血液、血清または血漿である、［８］～［２３］のいずれか１項に記載のキット。

発明の効果

[0033] 本願によれば、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ－５ｂ）の影響を低減してＴＲＡＣＰ－５ｂを選択的に検出可能な手段が提供される。したがって、ＴＲＡＣＰ－５ｂをマーカーとする疾患の診断を行う際に有用である。

発明を実施するための形態

[0034] 本発明の実施の形態を詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施の形態に限定して理解されるべきものではない。

[0035] 本発明は、一の実施形態において、特定の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の存在下で、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ－５ｂ）の検出反応を行う工程を含む、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法を提供する。

また、本発明は、他の実施形態において、特定の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含むＴＲＡＣＰ－５ｂ測定用キットを提供する。

以下では、これら実施形態を詳細に説明する。

[0036] １．ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法

１－１．有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩

この測定方法においては、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、６．５ｍｍｏｌ／ｇ以上の密度で有する、有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を反応系に存在させることで、ＴＲＡＣＰ－５ａを阻害し、ＴＲＡＣＰ－５ｂの選択的な測定を可能とする。

後述する実施例で示す通り、スルホ基、硫酸基またはそれらの塩の密度に応じて、ＴＲＡＣＰ－５ａを阻害する効果が大きくなり、好ましい実施形態において、有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、スルホ基、硫酸基および／またはそれらの塩を、７．５ｍｍｏｌ／ｇ以上の密度で有し

、より好ましくは、８．５ｍｍｏｌ／ｇ以上の密度で有する。

[0037] また、好ましい実施形態において、このような有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、単位構造あたり、スルホ基、硫酸基、および／またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有し、より好ましくは、６０質量％以上有し、さらに好ましくは、７０質量％以上有する。

ここで、本願明細書で使用する場合に、「単位構造」とは、対象とする化合物が繰り返し構造を有する場合には、その繰り返し単位の構造を意味し、対象とする化合物が繰り返し構造を有しない場合には、化合物全体の構造を意味する。また、単位構造が、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、または硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）の塩を有する場合には、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、または硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）として単位構造の分子量を算出することとする。

[0038] このような有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の具体的な一の実施形態としては、

式（１）：

[化7]

$$R-Y-S(O)_2OX \cdots (1)$$

で表される化合物が挙げられる。

式（１）中、Ｒは、炭素数１～３のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、好ましくは、炭素数１～３のアルケニルである。

Ｙは結合、または酸素原子であり、好ましくは、結合である。

Ｘは水素またはアルカリ金属であり、好ましくは、水素またはＮａである。

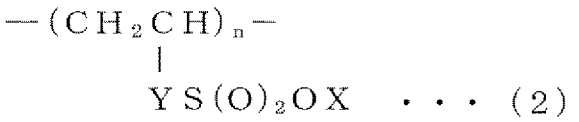
この実施形態の化合物の例としては、例えば、メタンスルホン酸もしくはその塩（例えば、Ｎａ塩）、ビニルスルホン酸もしくはその塩（例えば、Ｎａ塩）、または硫酸ビニルもしくはその塩が挙げられる。

[0039] 上述の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の他の具体的な実

施形態としては、

式（２）：

[化8]



の繰り返し単位を有する化合物が挙げられる。

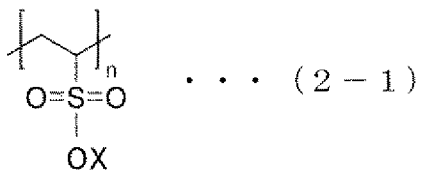
式（２）中、Ｙは結合、または酸素原子であり、好ましくは、結合である。

ｎは、２～５０００の整数であり、好ましくは、１０～５００であり、より好ましくは、２０～１００である。

Ｘは水素またはアルカリ金属であり、好ましくは、水素またはＮａである。

この実施形態の化合物の好ましい例としては、例えば、ポリビニルスルホン酸もしくはその塩（例えば、Ｎａ塩）またはポリビニル硫酸もしくはその塩（例えば、Ｎａ塩）が挙げられ、より好ましくは、以下の繰り返し構造：

[化9]



（式（２－１）中、Ｘは水素またはアルカリ金属であり、好ましくは、水素またはＮａである。）

を２～５０００、より好ましくは１０～５００、さらに好ましくは２０～１００有するポリビニルスルホン酸もしくはその塩が挙げられる。このようなポリビニルスルホン酸もしくはその塩は、通常、２００～５００００の分子量を有し、好ましくは、１０００～５００００の分子量を有し、より好ましくは、４０００～６０００の分子量を有する。

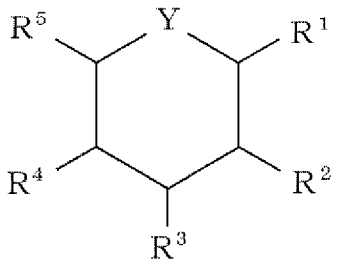
ここで、本願明細書で「分子量」または「平均分子量」という場合、特に

異なる意味で使用しない限り、重量平均分子量（Ｍｗ）を意味する。また、重量平均分子量（Ｍｗ）は、液体クロマトグラフを使用し、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（ＧＰＣ法）によって測定した値を意味する。

[0040] 上述の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩のさらに他の具体的な実施形態としては、

式（３）：

[化10]



・・・（３）

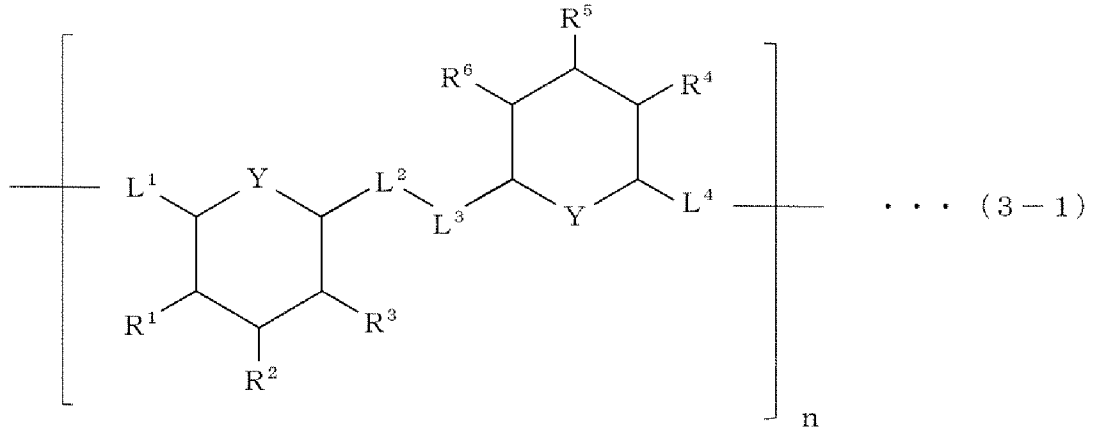
の構造を含む繰り返し単位を有する、化合物が挙げられる。

式（３）中、Ｙは、ＯまたはＣＨ$_2$であり、好ましくは、Ｏである。

Ｒ^1～Ｒ^{5}のうち、２つは、Ｏ－または結合であり、残りのうち少なくとも２つは、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。）であり、いずれにも該当しないものは、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）であり、好ましくは、Ｃ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。好ましくは、Ｒ^1～Ｒ^{5}のうち、２つは、Ｏ－または結合であり、残りは、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。

[0041] また、この構造を含む繰り返し単位としては、

[化11]



・・・（３－１）

が挙げられる。

式（３－１）中、Ｙは、ＯまたはＣＨ$_2$であり、好ましくは、Ｏである。

Ｌ^{1}およびＬ^{4}は、それぞれ独立して、Ｏまたは結合であり、好ましくは、一方がＯ－であり、他方が結合である。

Ｌ^{2}およびＬ^{3}は、それぞれ独立して、Ｏ、ＣＨ$_2$または結合であり、好ましくは、一方がＯであり、他方がＣＨ$_2$または結合である。

Ｒ^1～Ｒ^{3}のうち、少なくとも２つは、それぞれ独立して、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。）であり、残りは、存在する場合、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）であり、好ましくは、Ｃ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。Ｒ^1～Ｒ^{3}は、好ましくは、それぞれ独立して、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）であり、より好ましくは、それぞれ独立して、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。

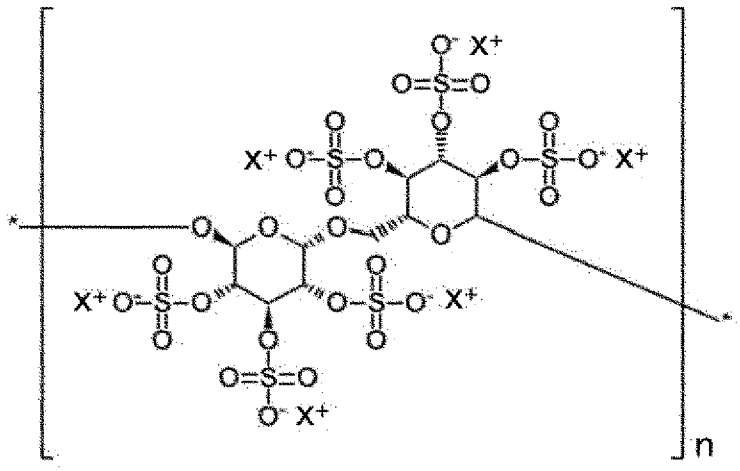
Ｒ^4～Ｒ^{6}のうち、少なくとも２つは、それぞれ独立して、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。）であり、残りは、存在する場合、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）であり、好ましくは、Ｃ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。Ｒ^4～Ｒ^{6}は、

好ましくは、それぞれ独立して、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは、水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）であり、より好ましくは、それぞれ独立して、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。

ｎは、２～１０００であり、好ましくは、３～７００であり、より好ましくは、４～２００であり、５～７０がさらに好ましい。

[0042] また、この実施形態の化合物の好ましい例としては、例えば、デキストラン硫酸もしくはその塩（例えば、Ｎａ）が挙げられ、より好ましくは、以下の繰り返し構造：

[化12]



・・・（３－２）

（式（３－２）中、Ｘは水素またはアルカリ金属（例えば、Ｎａ）である。）

を２～１０００、好ましくは３～７００、より好ましくは５～７０有するデキストラン硫酸もしくはその塩（例えば、Ｎａ）が挙げられる。このようなるデキストラン硫酸もしくはその塩は、通常、１５００～１０００００の分子量を有し、好ましくは、２０００～５５００００の分子量を有し、より好ましくは、４０００～５５０００の分子量を有する。

[0043] 本発明の方法においては、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を反応系に存在させることで、共存するＴＲＡＣＰ－５a抗原特性を改変し、その活性を阻害する。これらＴＲＡＣＰ－５a阻害剤は、様々な形

態で、反応系に存在させることができ、例えば、ＴＲＡＣＰ－５ｂを検出するための反応液中に別途これらＴＲＡＣＰ－５ａ阻害剤またはその溶液を添加してもよいし、検体希釈液中に溶解しておき、これを測定試料に添加してもよいし、反応系に応じて、酵素基質を含有する試薬、または抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体を含有する試薬に添加しておき、これらの試薬を用いて反応（例えば、酵素反応または抗原抗体反応）を行ってもよい。

[0044] 前述の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、後述する実施例に示す通り、これら化合物のスルホ基、硫酸基、およびそれらの塩の密度、ならびに平均分子量に依存してＴＲＡＣＰ－５ａ阻害活性が増大し、ＴＲＡＣＰ－５ａ阻害活性を奏するために必要なこれら化合物の反応液中の濃度の下限値は、当該密度および平均分子量に依存して小さくなる。いずれの化合物でも、この下限値から反応液中の濃度を増大すると、一定範囲では濃度に依存して阻害活性が増大するが、一定以上の濃度になると、阻害活性は濃度に依存して増加しなくなり、一定レベルを維持するようになり、一定レベルの濃度に達すると徐々に阻害活性が減少するようになる。ただし、阻害活性がプラトーに達した場合でも依然として広範囲の濃度で高い阻害活性は維持しており、実用上は、阻害活性が反応液中の濃度に依存して増大しなくなった濃度より高い濃度で使用することが多い。

このため、前述の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の反応液中の濃度は、これらの点を考慮して決定することが好ましい。

[0045] 例えば、平均分子量が４０００～６０００のデキストラン硫酸もしくはその塩を使用する場合、その反応液中の濃度は、０．０３×１０$^{-3}$～１０．０質量％が好ましく、０．１５×１０$^{-3}$～５．０質量％がより好ましく、０．３×１０$^{-3}$～１．０質量％がさらに好ましい。また、分子量４００００～６００００のデキストラン硫酸もしくはその塩を使用する場合、その反応液中の濃度は、０．０３×１０$^{-4}$～５．０質量％が好ましく、０．１５×１０$^{-4}$～１．０質量％がより好ましく、０．５×１０$^{-4}$～０．５質量％がさらに好ましい。また、分子量４０００００～６０００００のデキストラン硫酸もし

くはその塩を使用する場合、その反応液中の濃度は、０．０１×１０$^{-5}$～１．０質量％が好ましく、０．３×１０$^{-4}$～０．１質量％がより好ましく、０．５×１０$^{-5}$～０．０５質量％がさらに好ましい。

[0046] また、ビニルスルホン酸もしくはその塩を使用する場合、その反応液中の濃度は、０．０１２～１５．０質量％が好ましく、０．０２０～５．０質量％がより好ましく、０．１０～３．０質量％がさらに好ましい。また、例えば、平均分子量が４０００～６０００のポリビニルスルホン酸もしくはその塩を使用する場合、その反応液中の濃度は、０．０８×１０$^{-3}$～５．０質量％が好ましく、０．３×１０$^{-3}$～１．０質量％がより好ましく、０．３×１０$^{-2}$～０．３質量％がさらに好ましい。

[0047] 測定方法においては、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩をＴＲＡＣＰ－５ｂを検出する反応系に存在させることで、ＴＲＡＣＰ－５ａを阻害するが、この「反応系」としては、酵素反応および抗原抗体反応が挙げられ、本発明の方法で使用されるＴＲＡＣＰ－５ａ阻害剤は、これらのいずれの反応系でも用いることができる。

[0048] 本願明細書において、「酵素反応」とは、ＴＲＡＣＰ－５ｂとその基質との反応をいい、ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質には、例えば、ｐ－ニトロフェニルリン酸またはその塩、２－クロロ－４－ニトロフェニルリン酸またはその塩、１，２－ジオキセタン誘導体、アクリダン誘導体、リン酸4-メチルウンベリフェリルが含まれる。また、本願明細書において、「抗原抗体反応」とは、ＴＲＡＣＰ－５ｂとそれに対する抗体との反応をいい、ＴＲＡＣＰ－５ｂに対する抗体には、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗原結合断片が含まれる。モノクローナル抗体またはその抗原結合断片としては、特許文献６および７等に記載する抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が挙げられ、より具体的には、例えば、受託番号ＩＰＯＤ　ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８８９、受託番号ＩＰＯＤ　ＦＥＲＭ　ＢＰ－８２４９、または受託番号ＩＰＯＤ　ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８９０のハイブリドーマで産生される抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

[0049] 酵素反応および抗原抗体反応を利用した方法には、様々な測定法があり、例えば、酵素法、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）、化学発光免疫測定法（ＣＬＩＡ法）、およびラテックス凝集測定法が挙げられる。

[0050] 本願明細書において、酵素法は、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素活性を測定する方法であり、例えば、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素基質、例えばＰ‐ニトロフェニルリン酸またはその塩と反応させて、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素活性を測定する。より具体的には、検体に、酒石酸もしくはその塩を含む発色基質溶液（例えば、２－クロロ－４－ニトロフェニルリン酸溶液）を添加し酵素反応を開始させ、特定の時点の間の吸光度変化から酵素活性を求める。この酵素法において、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立に反応液に添加してもよいし、検体に添加してもよいし、発色基質溶液に添加してもよい。

[0051] 本願明細書において、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）は、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素活性を利用して検出する免疫測定法であり、例えば、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを、抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体に結合させ、結合したＴＲＡＣＰ－５ｂに対して、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素基質、例えばＰ‐ニトロフェニルリン酸またはその塩を反応させて、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素活性を測定する。より具体的には、まず、固相支持体に吸着している抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体に検体を接触させ、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを固定されている抗体に結合させる。次いで、固相支持体を洗浄液で洗浄して、抗体に吸着しなかった検体由来の成分を除去した後、反応系にＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素基質、例えばｐ－ニトロフェニルリン酸またはその塩を加え、抗体に結合しているＴＲＡＣＰ－５ｂと基質とを反応させる。反応停止液で酵素反応を停止した後、反応により生成したフェノール類、例えば、ｐ－ニトロフェノールを、所定の波長、例えば、３９０ｎｍ～４５０ｎｍ、好ましくは４００～４３０ｎｍの波長で吸光度を測定する。その吸光度の大きさは、ＴＲＡＣＰ－５ｂ酵素活性を反映するので、その値から、検体中のＴＲ

ＡＣＰ－５ｂを測定できる。この酵素免疫測定法（ＥＩＡ）において、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立に支持体に添加してもよいし、検体もしくは検体希釈液に添加してもよいし、抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬に添加してもよいし、発色基質溶液に添加してもよい。

[0052] 本願明細書において、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）は、ＴＲＡＣＰ－５ｂに対する２つの異なる抗体であって、その一方には、酵素反応による検出を可能とする物質で標識されている抗体を用い、酵素の活性を計測してＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する方法である。例えば、固相支持体に吸着された第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体に検体を接触させて検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを第一次抗体に結合させ、次いで、第一次抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、酵素反応による検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を、固定されているＴＲＡＣＰ－５ｂと接触させて第二次抗体をＴＲＡＣＰ－５ｂに結合させ、第二次抗体の標識を利用して酵素反応によりＲＡＣＰ－５ｂを測定する。

より具体的には、まず、第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を、固相支持体に吸着させ、固定された第一次抗体に検体を接触させ検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを第一次抗体と結合させる。次いで、固相支持体を洗浄液で洗浄して、抗体に吸着しなかった検体由来の成分を除去した後、固定されたＴＲＡＣＰ－５ｂに、酵素反応による検出を可能とする物質、例えば、酵素またはビオチンで標識し、第一次抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合する第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を接触させて第二次抗体をＴＲＡＣＰ－５ｂに結合させる。次いで、第二次抗体の標識から、例えば、ビオチンを、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、ペルオキシダーゼ酵素反応を行う、あるいは標識酵素とその基質とを反応させるなどして、発色物質を生じさせ、この発色物質の吸光度を測定することにより、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する

ことができる。酵素反応による検出を可能とする物質として用いられる酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ等が挙げられ、酵素以外の酵素反応による検出を可能とする物質としては、アビジン、各種酵素の基質が挙げられ、アビジンを用いる場合には、ＡＢＣ系の発色を利用すればよい。

この酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）において、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立に支持体に添加してもよいし、検体もしくは検体希釈液に添加してもよいし、第一次抗体および／または第二次抗体を含む試薬に添加してもよいし、発色基質溶液に添加してもよい。

[0053] 本願明細書において、化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）は、ＴＲＡＣＰ－５ｂの酵素活性を化学発光により検出する免疫測定法であり、例えば、ビーズなどの固相支持体に吸着させた抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体に検体を接触させて抗体に検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを結合させ、ＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質を、固定されたＴＲＡＣＰ－５ｂに接触させ、生じる化学発光を測定することによりＴＲＡＣＰ－５ｂ活性を測定する。より具体的には、まず、磁性粒子などの固相支持体に吸着している抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体に検体を接触させ、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを固定されている抗体に結合させる。次いで、磁性粒子を磁力で固定するなどして固定した固相支持体を洗浄液で洗浄して、抗体に吸着しなかった検体由来の成分を除去した後、反応系にＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質、例えば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［３．３．１．１３，７］デカン］－４－イル｝フェニルホスフェート・二ナトリウム塩（ＣＤＰ－Ｓｔａｒ、登録商標））を加え、抗体に結合しているＴＲＡＣＰ－５ｂを基質と反応させ、発光強度を測定する。その発光強度は、ＴＲＡＣＰ－５ｂ酵素活性を反映するので、その値から、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを測定できる。

この化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）において、上述した有機ス

ルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立に支持体に添加してもよいし、検体もしくは検体希釈液に添加してもよいし、抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬に添加してもよいし、発色基質溶液に添加してもよい。

[0054] 化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）はまた、固相支持体に固定された第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体に検体を接触させて検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを第一次抗体に結合させ、次いで、第一次抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、化学発光基質または化学発光による検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を、固定されたＴＲＡＣＰ－５ｂと接触させてＴＲＡＣＰ－５ｂを第二次抗体に結合させ、第二次抗体の標識から、または当該標識を利用して化学発光を生じさせその発光強度を計測して、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定することもできる。より具体的には、まず、第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を、固相支持体、例えば、磁性粒子に吸着させ、固定された第一次抗体に検体を接触させ検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを第一次抗体と結合させる。次いで、磁性粒子を磁力で固定するなどして固定した固相支持体を洗浄液で洗浄して、抗体に吸着しなかった検体由来の成分を除去した後、固定されたＴＲＡＣＰ－５ｂに、酵素または酵素反応を利用して化学発光を生じさせることができる物質で標識され、第一次抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合する第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を接触させて第二次抗体をＴＲＡＣＰ－５ｂに結合させ、次いで、第二次抗体の標識から、またはこれを利用して化学発光を生じさせその発光強度を計測することにより、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定することができる。

この化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）において、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立に支持体に添加してもよいし、検体に添加してもよいし、第一次抗体および／または第二次抗体を含む試薬に添加してもよい。

[0055] 本願明細書において、ラテックス凝集法は、ラテックス粒子の凝集によって生じる濁度を吸光度として計測してＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する方法であり、例えば、ラテックス粒子に吸着された抗ＴＲＡＣＰ－５ｂポリクローナル抗体に検体を接触させて、ＴＲＡＣＰ－５ｂを介してラテックス粒子の凝集を生じさせ、それによって生じる濁度（吸光度）を計測してＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する。このラテックス凝集法において、上述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立に反応液に添加してもよいし、検体に添加してもよいし、ラテックス粒子を含む試薬に添加してもよい。

[0056] ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定対象とされる検体は、いかなる生体由来の検体でもよいが、通常、哺乳動物由来の検体であり、多くの場合ヒト由来の検体である。また、検体は、いかなる組織または体液由来の検体でもよいが、多くの場合、血液、血清および血漿が使用される。

[0057] ２．ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定キット

本発明の他の実施形態は、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定キットに関し、このキットは、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩を含むことを特徴とする。

有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、キット構成および測定原理に応じて、１）独立した溶液として、２）検体希釈液に含有させて、３）基質含有試薬に含有させて、または４）抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体を含有する試薬に含有させてキットに含ませることができる。

[0058] 各溶液もしくは試薬中の有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の濃度は、上述した反応液中の濃度となるように、有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩のスルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩の密度、これら化合物の分子量ならびに測定プロトコル（特に、希釈倍数（反応液の量（ｖｏｌ）／有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解もしくは添加する溶液もしくは試薬の量（ｖｏｌ））に応じて調整することが好ましい。

[0059] 例えば、平均分子量が４０００～６０００のデキストラン硫酸もしくはそ

の塩を使用する場合、その溶液もしくは試薬中の濃度（Ｃ）は、０．０３×１０$^{-3}$～１０．０質量％が好ましく、０．１５×１０$^{-3}$～５．０質量％がより好ましく、０．３×１０$^{-3}$～１．０質量％がさらに好ましい。また、分子量４００００～６００００のデキストラン硫酸もしくはその塩を使用する場合、その溶液もしくは試薬中の濃度は、０．０３×１０$^{-4}$～５．０質量％が好ましく、０．１５×１０$^{-4}$～１．０質量％がより好ましく、０．５×１０$^{-4}$～０．５質量％がさらに好ましい。また、分子量４０００００～６０００００のデキストラン硫酸もしくはその塩を使用する場合、その溶液もしくは試薬中の濃度（Ｃ）は、０．０１×１０$^{-5}$～１．０質量％が好ましく、０．３×１０$^{-4}$～０．１質量％がより好ましく、０．５×１０$^{-5}$～０．０５質量％がさらに好ましい。

[0060] また、ビニルスルホン酸もしくはその塩を使用する場合、その溶液もしくは試薬中の濃度（Ｃ）は、０．０１２～１５．０質量％が好ましく、０．０２０～５．０質量％がより好ましく、０．１０～３．０質量％がさらに好ましい。また、例えば、平均分子量が４０００～６０００のポリビニルスルホン酸もしくはその塩を使用する場合、その溶液もしくは試薬中の濃度（Ｃ）は、０．０８×１０$^{-3}$～５．０質量％が好ましく、０．３×１０$^{-3}$～１．０質量％がより好ましく、０．３×１０$^{-2}$～０．３質量％がさらに好ましい。

[0061] 前述の通り、ＴＲＡＣＰ－５ｂは様々な方法で測定することができ、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定キットも測定方法に応じて、異なる試薬構成となる。

[0062] 例えば、酵素法によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するためのキットは、ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質と、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬とを含む。また、このキットにおいて、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立の溶液中に、あるいは、ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含有する試薬、または検体希釈用試薬に含有させることができる。独立してキットに含まれる溶液、および検体希釈用試薬では、例えば、トリス等の緩衝液中に前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解することができる。

[0063] 酵素免疫測定法（ＥＩＡ）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するためのキットは、マルチウェルプレートなどの固相支持体と、固相支持体に吸着されている抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質と、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む。

抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体は、固相支持体とは別に抗体溶液としてキットに含まれてもよく、この場合には、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する際、抗体を固相支持体に吸着させる。洗浄液は、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを抗体に結合させた後、吸着しなかった検体中の成分を除去するために使用され。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含むトリス緩衝液を使用することができる。

検体希釈液は、検体の濃度を調製する際に使用され、例えば、トリス等の緩衝液を使用できる。また、緩衝液には、必要に応じて、ＥＤＴＡ・２Ｎａ等のキレート剤、食塩等の無機塩を加えてもよい。

固相支持体の材料としては、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネイト、ポリエチレン、ナイロン、メタアクリレートなどが挙げられる。固相支持体の形状としては、プレート、（磁気）ビーズ（粒子）等が挙げられる。

このキットにおいて、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立の溶液中に、あるいは、ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含む試薬、抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬、または検体希釈用試薬に含有させることができる。独立してキットに含まれる溶液、および検体希釈用試薬では、例えば、トリス等の緩衝液中に前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解することができる。

[0064] 酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するためのキットは、固相支持体と、固相支持体に固定された第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、酵素反応での検出

を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体の標識物質を酵素反応で検出するための試薬と、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む。

第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体は、固相支持体とは別に抗体溶液としてキットに含まれてもよく、この場合には、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する際、第一次抗体を固相支持体に吸着させる。洗浄液は、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを第一次抗体または第二次抗体に結合させた後、これら抗体に結合しなかった成分を除去するために使用される。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含むトリス緩衝液を使用することができる。

検体希釈液は、検体の濃度を調製する際に使用され、例えば、トリス等の緩衝液を使用できる。また、緩衝液には、必要に応じて、ＥＤＴＡ・２Ｎａ等のキレート剤、食塩等の無機塩を加えてもよい。

このキットにおいて、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立の溶液中に、あるいは、第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体の標識を酵素反応で検出可能とするための試薬、第一次抗体または第二次抗体を含む試薬、または検体希釈用試薬に含有させることができる。独立してキットに含まれる溶液、および検体希釈用試薬では、例えば、トリス等の緩衝液中に前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解することができる。

酵素反応での検出を可能とする物質としては、ＡＣＰ以外の酵素、ＡＣＰ以外の酵素の基質またはビオチンを上げることができる。

また、標識物質を酵素反応で検出するための試薬は、例えば、標識物質がビオチンの場合、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、テトラメチルベンジジンのペルオキシダーゼ酵素基質、及び過酸化水素を含む試薬である。また、標識物質が、酵素である場合には、その基質であり、例えば、アルカリホスファターゼの場合は、その酵素の基質であるｐ－ニトロフェニルリ

ン酸などである。

固相支持体の材料としては、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネイト、ポリエチレン、ナイロン、メタアクリレートなどが挙げられる。固相支持体の形状としては、プレート、（磁気）ビーズ（粒子）等が挙げられる。

[0065] 化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するためのキットは、例えば、固相支持体と、固相支持体に吸着された抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、ＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質と、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む。

抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体は、固相支持体とは別に抗体溶液としてキットに含まれてもよく、この場合には、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する際、抗体を固相支持体に吸着させる。

[0066] 化学発光基質としては、例えば、

（１）３－（４－メトキシスピロ{１，２－ジオキセタン－３，２－（５’－クロロ）トリシクロ［３．３．１．１３，７］デカン}－４－イル）フェニルリン酸・二ナトリウム塩、４－クロロ－３－（メトキシスピロ{１，２－ジオキセタン－３，２’－（５’－クロロ）トリクシロ［３．３．１．１３，７］デカン}－４－イル）フェニルリン酸・二ナトリウム塩、３－（４－メトキシスピロ｛１，２－ジオキセタン－３，２’－トリシクロ［３．３．１．１（３，７）］デカン｝－４－イル）リン酸フェニル・二ナトリウム塩、４－メトキシ－４－（３－リン酸フェニル）スピロ［１，２－ジオキセタン－３，２’－アダマンタン］・二ナトリウム塩などの１，２－ジオキセタン誘導体；あるいは

（２）［１０－メチル－９（１０Ｈ）－アクリジニルイデン］フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩などのアクリダン誘導体

が挙げられる。

[0067] 検体希釈液は、検体の濃度を調製する際に使用され、例えば、２－（Ｎ－

モルフォリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液、３－（Ｎ－モルフォリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳＯ）緩衝液、３－モルフォリノプロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）緩衝液、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（ＢＥＳ）緩衝液、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（ＴＥＳ）緩衝液、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（ＨＥＰＥＳ）緩衝液、Ｎ－（２－アセトアミド）イミノ二酢酸（ＡＤＡ）緩衝液、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸（ＡＣＥＳ）緩衝液、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ）緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ）緩衝液、およびリン酸緩衝液から成る群より選ばれる緩衝液を使用できる。また、緩衝液には、必要に応じて、金属イオンとしてコバルトイオンまたはマンガンイオンを加えてもよい。

洗浄液は、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを抗体に結合させた後、吸着しなかった検体中の成分を除去するために使用され。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含む上述の緩衝液を使用することができる。

このキットにおいて、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立の溶液中に、あるいは、ＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質を含む試薬、抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬、または検体希釈用試薬に含有させることができる。独立してキットに含まれる溶液、および検体希釈用試薬では、例えば、上述の緩衝液中に前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解することができる。

[0068] 化学発光免疫測定法（ＣＬＩＡ法）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するためのキットはまた、固相支持体と、固相支持体に吸着された第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、化学発光での検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、標識を化学発光で検出可能とする試薬と、前述した有機スルホン

酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む。

第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体は、固相支持体とは別に抗体溶液としてキットに含まれてもよく、この場合には、ＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する際、第一次抗体を固相支持体に吸着させる。洗浄液は、検体中のＴＲＡＣＰ－５ｂを第一次抗体または第二次抗体に結合させた後、これら抗体に結合しなかった成分を除去するために使用される。　洗浄液および検体希釈液は、上述と同様である。

標識を化学発光で検出可能とする試薬は、例えば、標識がビオチンの場合、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、ペルオキシダーゼ化学発光基質、及び過酸化水素を含む試薬であり、標識が酵素、例えば、アルカリホスファターゼの場合は、その酵素の基質、例えば、ｐ－ニトロフェニルリン酸などである。化学発光基質は、上述と同様である。

固相支持体の材料としては、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネイト、ポリエチレン、ナイロン、メタアクリレートなどが挙げられる。固相支持体の形状としては、プレート、（磁気）ビーズ（粒子）等が挙げられる。

このキットにおいて、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、独立の溶液中に、あるいは、標識を化学発光で検出可能とする試薬、第一次抗体または第二次抗体を含む試薬、または検体希釈用試薬に含有させることができる。独立してキットに含まれる溶液、および検体希釈用試薬では、例えば、上述の緩衝液中に前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解することができる。

[0069]　ラテックス凝集法によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するためのキットは、ラテックス粒子と、ラテックス粒子に吸着された抗ＴＲＡＣＰ－５ｂポリクローナル抗体または抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬とを含む。このキットにおいて、前述した有機スルホン酸、硫酸エステルま

たはそれらの塩は、独立の溶液中に、あるいは、ラテックス粒子を含む試薬、または検体希釈用試薬に含有させることができる。独立してキットに含まれる溶液、および検体希釈用試薬では、例えば、緩衝液中に前述した有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を溶解することができる。また、緩衝液としては、２－（Ｎ－モルフォリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液、３－（Ｎ－モルフォリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳＯ）緩衝液、３－モルフォリノプロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）緩衝液、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（ＢＥＳ）緩衝液、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（ＴＥＳ）緩衝液、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（ＨＥＰＥＳ）緩衝液、Ｎ－（２－アセトアミド）イミノ二酢酸（ＡＤＡ）緩衝液、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸（ＡＣＥＳ）緩衝液、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ）緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ）緩衝液およびリン酸緩衝液を挙げることができる。

実施例

[0070] 以下、本発明を実施例によって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い。

なお、実施例で使用されている略語の意味は以下の通りである。

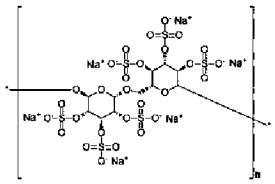
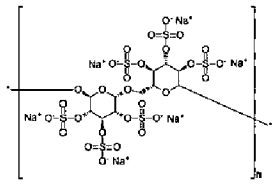
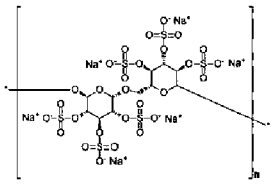
DSS Na 5k	平均分子量５０００のデキストラン硫酸ナトリウム
DSS Na 50k	平均分子量５００００のデキストラン硫酸ナトリウム
DSS Na 500k	平均分子量５０００００のデキストラン硫酸ナトリウム
PVSA Na 5k	平均分子量５０００のポリビニルスルホン酸ナトリウム
VSA Na	ビニルスルホン酸ナトリウム
β-CyD-S Na	β－シクロデキストリン硫酸ナトリウム
PAA 5k	平均分子量５０００のポリアクリル酸
Poly-Glu Na	ポリグルタミン酸ナトリウム
Chon S Na	コンドロイチン硫酸ナトリウム
PEG 6k	平均分子量６０００のポリエチレングリコール

[0071] 試験１．酵素法でのＴＲＡＣＰ－５ａ阻害剤の評価

１－１．評価化合物

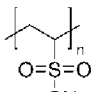
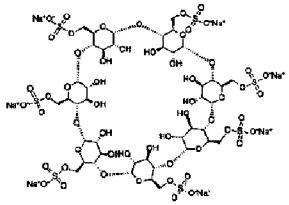
以下の化合物について、酵素法でのＴＲＡＣＰ－５a阻害効果を評価した。

[表1]

	実施例1	実施例2	実施例3
	DSS Na 5K	DSS Na 50K	DSS Na 500K
構造式 (組成式)	 $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6 \cdot 6Na)_n$	 $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6 \cdot 6Na)_n$	 $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6 \cdot 6Na)_n$
単位構造 分子量(wt)*	790．6	790．6	790．6
酸性官能基 分子量*/ 単位構造 分子量	62%	62%	62%
スルホ基 分子量*/ 単位構造 分子量	62%	62%	62%
スルホ基の 密度 (mmol/g)	7．59	7．59	7．59
平均 分子量(wt)	5000	50000	500000

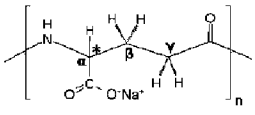
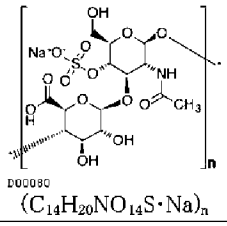
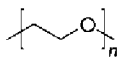
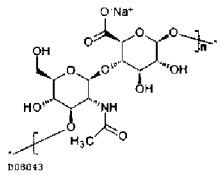
＊単位構造分子量、酸性官能基分子量、およびスルホ基分子量は、それぞれ、－$OS(O)_2ONa$を、－$OS(O)_2OH$として計算した。

[表2]

	実施例4	実施例5	比較例1	比較例2
	PVSA Na 5K	VSA Na	β-CyD-S Na	PAA 5k
構造式 (組成式)	 ($C_2H_3O_3S$・Na)	CH_2=CH-SO_3Na	 ($C_{42}H_{63}O_{56}S_7$・7Na)	[-CH_2CH(COOH)-]$_n$
単位構造 分子量(wt)*	108. 1	108. 1	1695	72
酸性官能基 分子量*/ 単位構造 分子量	75%	75%	33%	63%
スルホ基 分子量*/ 単位構造 分子量	75%	75%	33%	0
スルホ基の 密度 (mmol/g)	9. 25	9. 25	4. 13	0
平均 分子量(wt)	5000	108	1695	5000

＊PVSA Na、VSA Na、β―CyD－S Naの単位構造分子量、酸性官能基分子量、およびスルホ基分子量は、ぞれぞれ、－S(O)$_2$ONaを、－S(O)$_2$OHとして計算した。

[表3]

	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
	Poly-Glu Na	Chon S Na	PEG 6K	ヒアルロン酸Na
構造式 (組成式)		 $(C_{14}H_{20}NO_{14}S\cdot Na)_n$		 $(C_{14}H_{20}NO_{12}\cdot Na)_n$
単位構造 分子量(wt)*	129	459	40	395
酸性官能基 分子量*/ 単位構造 分子量	35%	27%	0	11%
スルホ基 分子量*/ 単位構造 分子量	0	17.6%	0	0
スルホ基の 密度 (mmol/g)	0	2.18	0	0
平均 分子量(wt)	-	-	6000	-

＊Chon S Naの単位構造分子量、酸性官能基分子量、およびスルホ基分子量は、それぞれ、－S(O)$_2$ONaを、－S(O)$_2$OHとして計算した。同様に、Poly－Glu Naおよびヒアルロン酸Naの単位構造分子量、および酸性官能基分子量は、それぞれ、－C(O)ONaを、－C(O)OHとして計算した。

[0072] １－２．測定試料

ニットーボーメディカル社製ＴＲＡＣＰ－５ｂおよびＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製ＴＲＡＣＰ－５ａを、２２ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．０）で希釈して、７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、および７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を調製し、測定試料とした。なお、ヒアルロン酸Ｎａの測定では、同様に調製した、７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、および８Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を用いた。

[0073] １－３．測定試薬（発色基質溶液）

以下の組成の発色基質溶液を用いた。

５ｍＭ　２－クロロ－４－ニトロフェニルリン酸

１０９ｍＭ　ＭＥＳ

４０ｍＭ　酒石酸Ｎａ

０．１質量％　評価化合物

ｐＨ６．６

[0074] １－４．測定方法

測定には汎用の日立自動分析装置７１８０形（日立ハイテク）を用いた。７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、または７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ａ溶液もしくは８Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ａ溶液１６μＬに、評価化合物を含む発色基質溶液２００μＬを添加し酵素反応を開始させ、その３４０．５秒後から５１６．０秒間の吸光度（主波長４０５ｎｍ、副波長４８０ｎｍ）を測定した。両時点間の吸光度変化から１分間あたりの吸光度変化量（酵素反応中の単位時間当たりの吸光度変化量）を求めた。

また、活性既知のＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液の２２ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．０）での連続希釈溶液、ならびにブランクとしての２２ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．０）を調製し、各評価化合物を含む発色基質溶液を用いてＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液の連続希釈溶液を測定してＴＲＡＣＰ－５ｂの標準直線を作製し、評価化合物を含まない発色基質溶液を用いて同様にＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液の連続希釈溶液を測定してＴＲＡＣＰ－５ｂの標準直線を作製した。これらの標準直線を用いて、各評価化合物を含む発色基質溶液および評価化合物を含まない発色基質溶液を用いてＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、およびＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を測定して得られた吸光度変化量から活性値を算出した。

なお、ヒアルロン酸Ｎａを用いた測定は、他の評価化合物とは別バッチで測定した。

[0075] １－５．測定結果

[表4]

	評価化合物	平均分子量	スルホ基の密度 (mmol/g)	活性値(U/L)		5b/5a比
				5a	5b	
対照	化合物無し	-	-	6.5	6.9	1.1
実施例1	DSS Na 5k	5000	7.59	1.4	6.8	4.9
実施例2	DSS Na 50k	50000	7.59	1.3	7.0	5.4
実施例3	DSS Na 500k	500000	7.59	1.6	7.0	4.4
実施例4	PVSA Na 5k	5000	9.25	1.3	6.9	5.3
実施例5	VSA Na	108	9.25	1.6	6.5	4.1
比較例1	β-CyD-S Na	1695	4.13	2.3	6.7	2.9
比較例2	PAA	-	0	3.7	6.9	1.9
比較例3	Poly-Glu Na	-	0	3.9	6.8	1.7
比較例4	Chon S Na	-	2.18	4.5	6.3	1.4
比較例5	PEG 6k	6000	0	8.6	8.8	1.0
対照	化合物無し	-	-	8.0	6.9	0.9
比較例6	ヒアルロン酸Na	-	0	8.2	7.1	0.9

[0076] 試験２．ＴＲＡＣＰ－５ａ阻害剤の添加濃度の検討

デキストラン硫酸Ｎａ（５Ｋ）、デキストラン硫酸Ｎａ（５０Ｋ）、ポリビニルスルホン酸Ｎａ（５Ｋ）、およびビニルスルホン酸Ｎａについて、添加濃度の阻害活性への影響を検討した。

[0077] ２－１．各評価化合物の添加濃度

各評価化合物の測定試薬（発色基質溶液）中の濃度を以下の通りに調整した。

[表5]

	PVSA Na 5K (質量%)
対照	0
実施例6	0.00005
実施例7	0.0001
実施例8	0.0002
実施例9	0.0003

	PVSA Na 5K (質量%)
対照	0
実施例10	0.25
実施例11	0.50
実施例12	1.00

	VSA Na (質量%)	PVSA Na 5K (質量%)
対照	0	0
実施例13	0	0.0003
実施例14	0.0200	0
実施例15	0.0150	0
実施例16	0.0100	0

	DSS Na 5K (質量%)
対照	0
実施例17	0.000025
実施例18	0.00005
実施例19	0.0001
実施例20	0.0002
実施例21	0.0003

	DSS Na 50K (質量%)
対照	0
実施例22	0.000005
実施例23	0.00001
実施例24	0.00002
実施例25	0.00003
実施例26	0.00004

[0078] ２－２．測定試料

デキストラン硫酸Ｎａ（５Ｋ）、およびデキストラン硫酸Ｎａ（５０Ｋ）を含む試薬を用いた試験では、７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、および７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を使用し、ポリビニルスルホン酸Ｎａ（５Ｋ）を含む試薬を用いた試験では、７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、および７Ｕ／Ｌもしくは８Ｕ／ＬＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を使用し、ビニルスルホン酸Ｎａを含む試薬を用いた試験では、７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液、および８Ｕ／ＬＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を使用した。

[0079] ２－３．測定試薬（発色基質溶液）および測定方法

各評価化合物の濃度を上述にした以外は、試験１と同様の組成の発色基質溶液を用いた。また、測定方法は、試験１と同様の手順で実施した。

[0080] ２－４．測定結果

[表6]

	PVSA Na 5K (質量%)	活性値(U/L) 5a	5b	5b/5a 比
対照	0	7.2	7.1	1.0
実施例 6	0.00005	6.3	7.2	1.1
実施例 7	0.0001	4.7	7.3	1.6
実施例 8	0.0002	2.9	7.2	2.5
実施例 9	0.0003	2.4	7.3	3.0

[表7]

	PVSA Na 5K (質量%)	活性値(U/L) 5a	5b	5b/5a 比
対照	0	7.8	6.7	0.9
実施例 10	0.25	1.7	6.8	4.0
実施例 11	0.50	1.9	6.6	3.5
実施例 12	1.00	2.2	6.6	3.0
実施例 4 (参考)	0.10			5.3

実施例４は、別バッチでのデータであるが、試験１でのデータを参考として掲載した。

[表8]

	VSA Na (質量%)	PVSA Na 5K (質量%)	活性値(U/L) 5a	5b	5b/5a 比
対照	0	0	8.0	6.9	0.9
実施例 13	0	0.0003	3.1	6.8	2.2
実施例 14	0.0200	0	4.5	6.9	1.5
実施例 15	0.0150	0	5.6	6.8	1.2
実施例 16	0.0100	0	6.8	6.8	1.0
実施例 5 (参考)	0.1				4.1

実施例５は、別バッチでのデータであるが、試験１でのデータを参考として

掲載した。

[表9]

	DSS Na 5k (質量%)	活性値(U/L) 5a	5b	5b/5a 比
対照	0	6.8	6.8	1.0
実施例 17	0.000025	5.8	6.6	1.1
実施例 18	0.00005	4.8	6.6	1.4
実施例 19	0.0001	3.5	6.6	1.9
実施例 20	0.0002	2.0	6.6	3.3
実施例 21	0.0003	1.7	6.7	3.9
実施例 1 (参考)	0.1			4.9

実施例１は、別バッチでのデータであるが、試験１でのデータを参考として掲載した。

[表10]

	DSS Na 50k (質量%)	活性値(U/L) 5a	5b	5b/5a 比
対照	0	7.6	6.9	0.9
実施例 22	0.000005	4.6	6.9	1.5
実施例 23	0.00001	3.4	7.1	2.1
実施例 24	0.00002	2.3	6.9	3.0
実施例 25	0.00003	1.9	6.9	3.6
実施例 26	0.00004	1.7	6.9	4.1
実施例 2 (参考)	0.1			5.4

実施例２は、別バッチでのデータであるが、試験１でのデータを参考として掲載した。

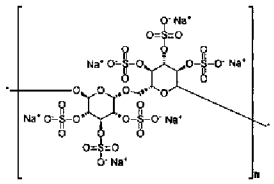
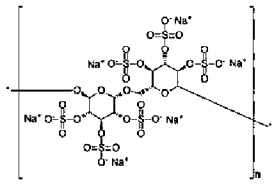
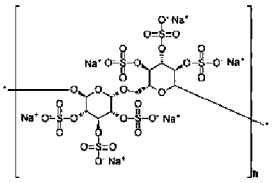
[0081] ３．ＥＩＡ法でのＴＲＡＣＰ－５ａ阻害剤の評価

３－１．評価化合物

以下の化合物について、ＥＩＡ法でのＴＲＡＣＰ－５a阻害効果を評価した

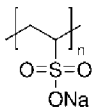
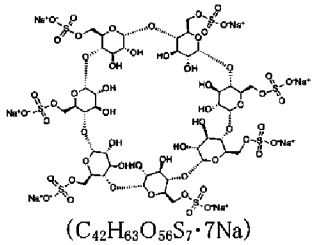
。

[表11]

	実施例27	実施例28	実施例29
	DSS Na 5K	DSS Na 50K	DSS Na 500K
構造式 (組成式)	 $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6 \cdot 6Na)_n$	 $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6 \cdot 6Na)_n$	 $(C_{11}H_{12}O_{28}S_6 \cdot 6Na)_n$
単位構造 分子量(wt)*	790.6	790.6	790.6
酸性官能基 分子量*/ 単位構造 分子量	62%	62%	62%
スルホ基 分子量*/ 単位構造 分子量	62%	62%	62%
スルホ基の 密度 (mmol/g)	7.59	7.59	7.59
平均 分子量(wt)	5000	50000	500000

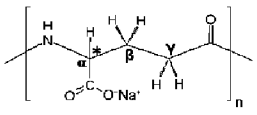
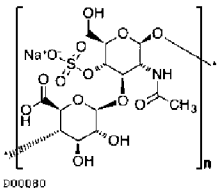
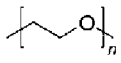
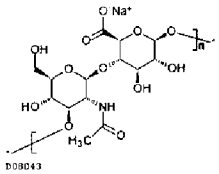
＊単位構造分子量、酸性官能基分子量、およびスルホ基分子量は、それぞれ、－OS(O)$_2$ONaを、－OS(O)$_2$OHとして計算した。

[表12]

	実施例30	実施例31	比較例7	比較例8
	PVSA Na 5K	VSA Na	β-CyD-S Na	PAA 5k
構造式 (組成式)		CH_2=CH-SO_3Na	 ($C_{42}H_{63}O_{56}S_7 \cdot 7Na$)	$[-CH_2CH(COOH)-]_n$
単位構造 分子量(wt)*	108.1	108.1	1695	72
酸性官能基 分子量*/ 単位構造 分子量	75%	75%	33%	63%
スルホ基 分子量*/ 単位構造 分子量	75%	75%	33%	0
スルホ基の 密度 (mmol/g)	9.25	9.25	4.13	0
平均 分子量(wt)	5000	108	1695	-

＊PVSA Na、VSA Na、β—CyD－S Naの単位構造分子量、酸性官能基分子量、およびスルホ基分子量は、ぞれぞれ、－S(O)$_2$ONaを、－S(O)$_2$OHとして計算した。

[表13]

	比較例9	比較例10	比較例11	比較例12
	Poly-Glu Na	Chon S Na	PEG 6K	ヒアルロン酸Na
構造式 (組成式)		 $(C_{14}H_{20}NO_{14}S\cdot Na)_n$		 $(C_{14}H_{20}NO_{12}\cdot Na)_n$
単位構造 分子量(wt)*	129	459	40	395
酸性官能基 分子量*/ 単位構造 分子量	35%	27%	0	11%
スルホ基 分子量*/ 単位構造 分子量	0	17.6%	0	0
スルホ基の 密度 (mmol/g)	0	2.18	0	0
平均 分子量(wt)	-	-	6000	-

＊Chon S Naの単位構造分子量、酸性官能基分子量、およびスルホ基分子量は、ぞれぞれ、$-S(O)_2ONa$を、$-S(O)_2OH$として計算した。同様に、Poly－Glu Naおよびヒアルロン酸Naの単位構造分子量、および酸性官能基分子量は、ぞれぞれ、$-C(O)ONa$を、$-C(O)OH$として計算した。

[0082] ３－２．抗体固定化プレートの作製

ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体（受託番号ＩＰＯＤ　ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８９０）を、ＰＢＳ（８ｍＭ　リン酸水素二ナトリウム、１．５ｍＭ　リン酸二水素ナトリウム、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．５）にて１０　μｇ／ｍＬに希釈し、ＥＬＩＳＡプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ社製、品番４６８６７）の各ウェルに１００μＬ添加した。一晩冷蔵で静置後、ＴＢＳ－Ｔ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ―ＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．５）３００μＬで３回洗浄後、１．５％ＢＳＡ含有ＴＢＳを３００μＬ添加し一晩冷蔵で静置した。

[0083] ３－３．測定方法

作製した抗体固定化プレートから１．５％ＢＳＡ含有ＴＢＳを除去後、Ｔ

ＢＳ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．５）１００μＬ、及び７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ｂ溶液もしくは７Ｕ／Ｌ　ＴＲＡＣＰ－５ａ溶液を各ウェルに５０μＬ添加し、攪拌しながら１時間反応させた（２５℃、７００ｒｐｍ）。ＴＢＳ－Ｔ３００μＬで３回洗浄後、評価化合物を０．１質量％の濃度で添加した発色基質溶液（５ｍＭ　２－クロロ－４－ニトロフェニルリン酸、１０９ｍＭ　ＭＥＳ、４０ｍＭ　酒石酸Ｎａ、ｐＨ６．６）１００μＬを各ウェルに添加し、３７℃で１時間静置した。その後、０．５Ｎ　ＮａＯＨを５０μL添加し、プレートリーダーにて吸光度（主波長４０５ｎｍ、副波長４９０ｎｍ）を測定した。

[0084] ３－４．測定結果

[表14]

	評価化合物	平均分子量	スルホ基の密度 (mmol/g)	Abs. 405 nm 5a	Abs. 405 nm 5b	5b/5a 比
対照	化合物無し	-	-	0.1956	0.2477	1.3
実施例 27	DSS Na 5K	5000	7.59	0.0555	0.2112	3.8
実施例 28	DSS Na 50K	50000	7.59	0.0500	0.2331	4.7
実施例 29	DSS Na 500K	500000	7.59	0.0575	0.2398	4.2
実施例 30	PVSA Na	5000	9.25	0.0720	0.2626	3.6
実施例 31	VSA Na	108	9.25	0.0775	0.2600	3.4
比較例 7	β-CyD-S Na	-	4.13	0.0853	0.1971	2.3
比較例 8	PAA	-	0	0.1894	0.2310	1.2
比較例 9	Poly-Glu Na	-	0	0.1078	0.2406	2.2
比較例 10	Chon S Na	-	2.18	0.0987	0.2778	2.8
比較例 11	PEG 6k	6000	0	0.1807	0.2362	1.3
比較例 12	ヒアルロン酸 Na	-	0	0.2611	0.3024	1.2

請求の範囲

[請求項1] 検体中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ－５ｂ）の測定方法であって、

スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、６．５ｍｍｏｌ／ｇ以上の密度で有する、有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の存在下で、ＴＲＡＣＰ－５ｂを検出する反応を行う工程を含む、ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定方法。

[請求項2] 前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、単位構造あたり、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩は、式（１）：

[化1]

$$R-Y-S(O)_2OX \cdots (1)$$

（式（１）中、Ｒは、炭素数１～３のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、Ｙは結合、または酸素原子であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

で表されるか、

式（２）：

[化2]

$$-(CH_2CH)_n-$$
$$\quad\quad|$$
$$\quad\quad YS(O)_2OX \quad \cdots (2)$$

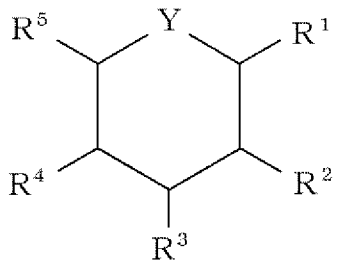
（式（２）中、Ｙは結合、または酸素原子であり、ｎは、２～５０００の整数であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

の繰り返し単位を有するか、

あるいは

式（３）：

[化3]



・・・（３）

（式（３）中、Ｙは、ＯまたはＣＨ$_2$であり、Ｒ^1～Ｒ^{5}のうち、２つは、Ｏ－または結合であり、残りのうち少なくとも２つは、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）であり、いずれにも該当しないものは、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）である。）

の構造を含む繰り返し単位を有する、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩が、ビニルスルホン酸もしくはその塩、硫酸ビニルもしくはその塩、ポリビニルスルホン酸もしくはその塩、ポリビニル硫酸もしくはその塩、メタンスルホン酸もしくはその塩、またはデキストラン硫酸もしくはその塩である、請求項１または２に記載の方法。

[請求項5] 前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩が、１）独立して反応系または検体に添加され、あるいは２）検体希釈液、３）基質含有試薬、または４）抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体を含有する試薬に含まれ、これにより、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩の存在下で、ＴＲＡＣＰ－５ｂを検出する反応が行われる、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 酵素法、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）、化学発光免

疫測定法（ＣＬＩＡ法）、またはラテックス凝集法で測定する、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記検体が、血液、血清または血漿である、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] ＴＲＡＣＰ－５ｂの測定キットであって、

スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）および／またはそれらの塩を、６．５ｍｍｏｌ／g以上の密度で有する有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩を含む、キット。

[請求項9] 前記有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩は、単位構造あたり、スルホ基（－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ）、硫酸基（－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＨ）またはそれらの塩を、Ｓ（Ｏ）$_2$Ｏ$^-$換算値で、５０質量％以上有する、請求項８に記載のキット。

[請求項10] ・ 前記有機スルホン酸、硫酸エステルおよび／またはそれらの塩は、式（１）：

[化4]

$$R-Y-S(O)_2OX \cdots (1)$$

（式（１）中、Ｒは、炭素数１～５のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、Ｙは結合、または酸素原子であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

で表されるか、

式（２）：

[化5]

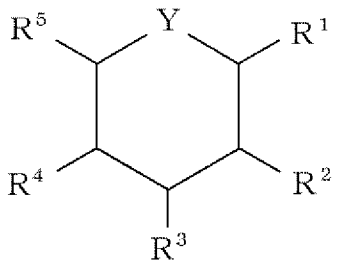
$$-(CH_2CH)_n-$$
$$\quad\quad|$$
$$\quad YS(O)_2OX \quad \cdots (2)$$

（式（２）中、Ｙは結合、または酸素原子であり、ｎは、２～５０００の整数であり、Ｘは水素またはアルカリ金属である。）

の繰り返し構造を有するか、あるいは

式（３）：

[化6]



・・・（３）

（式（３）中、Ｙは、ＯまたはＣＨ$_2$であり、Ｒ^1～Ｒ^{5}のうち、２つは、Ｏ－または結合手であり、残りのうち少なくとも２つは、Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＸまたはＳ（Ｏ）$_2$ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）であり、いずれにも該当しないものは、ＯＸまたはＣ（Ｏ）ＯＸ（Ｘは水素またはアルカリ金属である。）である。）

の構造を含む繰り返し構造を有する、

請求項８または９に記載のキット。

[請求項11] 前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩が、ビニルスルホン酸もしくはその塩、硫酸ビニルもしくはその塩、ポリビニルスルホン酸もしくはその塩、ポリビニル硫酸もしくはその塩、メタンスルホン酸もしくはその塩、またはデキストラン硫酸もしくはその塩である、請求項８または９に記載のキット。

[請求項12] 酵素法によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定するための、請求項８～１１のいずれか１項に記載のキットであって、

ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬とを含む、キット。

[請求項13] 前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含有する試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、請求項１２に記載のキット。

[請求項14] 酵素免疫測定法（ＥＩＡ）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、請

求項８～１１のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

[請求項15] 前記抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含有する試薬、前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含有する試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、請求項１４に記載のキット。

[請求項16] 酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、請求項８～１１のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、酵素反応での検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記標識物質を酵素反応で検出を可能とするための試薬と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

[請求項17] 前記第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含有する試薬、前記標識物質を酵素反応で検出を可能とするための試薬、または検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、請求項１６に記載のキット。

[請求項18] 化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ法）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、請求項８～１１のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの化学発光基質と、前記

有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

[請求項19] 前記ＴＲＡＣＰ－５ｂの基質を含有する試薬、前記抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含有する試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、請求項１８に記載のキット。

[請求項20] 化学発光免疫測定法（ＣＬＩＡ法）によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する、請求項８～１１のいずれか１項に記載のキットであって、

固相支持体と、前記固相支持体に吸着される第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と異なるエピトープでＴＲＡＣＰ－５ｂに結合し、化学発光での検出を可能とする物質で標識されている第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体と、前記標識物質を化学発光で検出可能とする試薬と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬と、場合により洗浄液とを含む、キット。

[請求項21] 前記第一次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬、前記第二次抗ＴＲＡＣＰ－５ｂモノクローナル抗体を含む試薬、前記標識を化学発光で検出可能とする試薬、または前記検体希釈用試薬を含む試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、請求項２０に記載のキット。

[請求項22] ラテックス凝集法によりＴＲＡＣＰ－５ｂを測定する請求項８～１１のいずれか１項に記載のキットであって、

ラテックス粒子と、前記ラテックス粒子に固定された抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体と、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩と、場合により検体希釈用試薬とを含む、キット。

[請求項23] 前記抗ＴＲＡＣＰ－５ｂ抗体を含む試薬、または前記検体希釈用試薬に、前記有機スルホン酸、硫酸エステルまたはそれらの塩を含む、請求項２２に記載のキット。

[請求項24] 測定される検体が、血液、血清または血漿である、請求項８～２３のいずれか１項に記載のキット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/023774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/573(2006.01)i
FI: G01N33/573 A

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)

G01N33/573

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-231595 A (FUARUKO BIO SYST KK) 28 August 2001 (2001-08-28) claims, paragraphs [0007], [0019], examples	1-24
A	JP 2022-174015 A (YAMASA CORPORATION) 22 November 2022 (2022-11-22) claims, paragraphs [0019]-[0020]	1-24
A	中西守, Bans 5b TrACP活性測定法の開発, 第１７回日本骨代謝学会プログラム抄録集, 26 June 1999, P-84, 250, non-official translation (NAKANISHI, Mamoru. Development of a method for measuring Band 5b TrACP activity. Abstracts of the 17th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research.) entire text	1-24
A	WO 2004/077059 A1 (NITTO BOSEKI CO., LTD.) 10 September 2004 (2004-09-10) entire text, all drawings	1-24
A	JP 2004-026805 A (NITTO BOSEKI CO., LTD.) 29 January 2004 (2004-01-29) entire text, all drawings	1-24

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
14 August 2024	**27 August 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/023774

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-510050 A (HALLEEN, Jussi) 02 April 2002 (2002-04-02) entire text, all drawings	1-24
A	WO 2016/027697 A1 (NITTO BOSEKI CO., LTD.) 25 February 2016 (2016-02-25) entire text, all drawings	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023774

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2001-231595 A	28 August 2001	US 6448027 B1	
JP 2022-174015 A	22 November 2022	(Family: none)	
WO 2004/077059 A1	10 September 2004	US 2006/0154317 A1 entire text, all drawings EP 1598670 A1	
JP 2004-026805 A	29 January 2004	US 2003/0204062 A1 entire text, all drawings EP 1359161 A2	
JP 2002-510050 A	02 April 2002	CN 1295667 A entire text, all drawings	
WO 2016/027697 A1	25 February 2016	US 2017/0267782 A1 entire text, all drawings EP 3184634 A1 CN 107002065 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/023774

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/573(2006.01)i
FI: G01N33/573 A

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））

G01N33/573

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
A	JP 2001-231595 A (株式会社ファルコバイオシステムズ) 28.08.2001 (2001-08-28) 特許請求の範囲、[0007],[0019],実施例	1-24
A	JP 2022-174015 A (ヤマサ醤油株式会社) 22.11.2022 (2022-11-22) 特許請求の範囲、[0019]-[0020]	1-24
A	中西守, Bans 5b TrACP活性測定法の開発, 第１７回日本骨代謝学会プログラム抄録集, 1999.06.26, P-84, 250 全文	1-24
A	WO 2004/077059 A1 (NITTO BOSEKI CO., LTD.) 10.09.2004 (2004-09-10) 全文全図	1-24
A	JP 2004-026805 A (日東紡績株式会社) 29.01.2004 (2004-01-29) 全文全図	1-24
A	JP 2002-510050 A (ハーリーン、ジュッシ) 02.04.2002 (2002-04-02) 全文全図	1-24

☑ 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。

* 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
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
14.08.2024	27.08.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

中村　直子 2J 4406

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
A	WO 2016/027697 A1 (日東紡績株式会社) 25.02.2016 (2016-02-25) 全文全図	1-24

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023774

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2001-231595 A	28.08.2001	US 6448027 B1	
JP 2022-174015 A	22.11.2022	（ファミリーなし）	
WO 2004/077059 A1	10.09.2004	US 2006/0154317 A1 全文全図 EP 1598670 A1	
JP 2004-026805 A	29.01.2004	US 2003/0204062 A1 全文全図 EP 1359161 A2	
JP 2002-510050 A	02.04.2002	CN 1295667 A 全文全図	
WO 2016/027697 A1	25.02.2016	US 2017/0267782 A1 全文全図 EP 3184634 A1 CN 107002065 A	