(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
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/136850 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055541

(22) 国際出願日: 2016 年 2 月 25 日(25.02.2016)

(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 2015-037717 2015 年 2 月 27 日(27.02.2015) JP

(71) 出願人: 株式会社Ｊ－オイルミルズ (J-OIL MILLS, INC.) [JP/JP]; 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 草間　健 (KUSAMA Ken); 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号株式会社Ｊ－オイルミルズ内 Tokyo (JP). 小林　夕香 (KOBAYASHI Yuka); 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号株式会社Ｊ－オイルミルズ内 Tokyo (JP). 上野　泰 (UENO Yasushi); 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号株式会社Ｊ－オイルミルズ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 中嶋　伸介 (NAKAJIMA Shinsuke); 〒1010032 東京都千代田区岩本町２丁目１０－５－６０５中嶋弁理士事務所 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 発明者である旨の申立て (規則 4.17(iv))

添付公開書類:

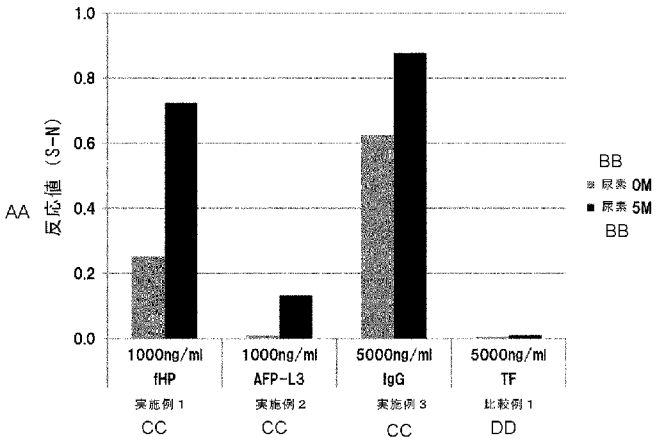
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

[続葉有]

(54) **Title**: SIGNAL ENHANCER

(54) 発明の名称 : シグナル増強剤

[図1]



AA Reaction value (S-N)
BB Urea
CC Example
DD Comparative example

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a signal enhancer that enhances a signal based on reaction between an α1-6 fucose sugar chain and an α1-6 fucose specific lectin bound thereto, a method for using the same, and use of the same. [Solution] A signal enhancer enhances a signal based on reaction between an α1-6 fucose sugar chain and an α1-6 fucose specific lectin bounded thereto, and is characterized by having, as an active ingredient, at least one selected from the group consisting of urea and thiourea. The final concentration of the urea is preferably 1-9 M and the final concentration of the tiourea is 0.1-1.5 M. Since the signal enhancer allows accurate measurement of an α1-6 fucose sugar chain, the signal enhancer is greatly useful in detection and determination of a disease related to an α1-6 fucose sugar chain and in academic study of an α1-6 fucose sugar chain.

(57) 要約: 【課題】α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づくシグナルを強化するシグナル増強剤、その使用方法及びその用途を提供する。 【解決手段】α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強するシグナル増強剤は、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とすることを特徴とする。尿素の終濃度は、好ましくは１～９Ｍであり、チオ尿素の終濃度は好ましくは０．１～１．５Ｍである。このシグナル増強剤によれば、α１－６フコース糖鎖を正確に測定できるので、α１－６フコース糖鎖が関係する疾患の検出や判定やα１－６フコース糖鎖の学術研究に大いに役立つ。

WO 2016/136850 A1

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： シグナル増強剤

技術分野

[0001] 本発明は、シグナル増強剤に関し、より詳細には、α１－６フコース糖鎖とα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づくシグナルの増強剤に関する。

背景技術

[0002] Ｎ結合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１－６フコース（コアフコースともいう）を転移させるα１－６フコース転移酵素（α１－６ＦｕｃＴ）の遺伝子は、肝細胞の癌化にともなって発現することが知られている。肝細胞癌になると、αフェトプロテイン（ＡＦＰ）という分子量約７０，０００の糖タンパク質の糖鎖のＮ－アセチルグルコサミンにα１－６結合でフコースが転移するようになる。このα１－６結合でフコースが転移したＡＦＰは、現在、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして使用されている。被験者の血清を、フコースに親和性をもつレンズマメレクチン（ＬＣＡ）を用いたレクチン親和電気泳動にかけると、陽極側よりＡＦＰ－Ｌ１、ＡＦＰ－Ｌ２、ＡＦＰ－Ｌ３と呼ばれる３本のバンドが出現する。肝硬変等の良性肝疾患ではレクチン非結合型のＡＦＰ－Ｌ１バンドが主であるが、肝細胞癌になるとレクチン結合型のＡＦＰ－Ｌ３バンドが増加する。総ＡＦＰに対するＡＦＰ－Ｌ３の割合（ＡＦＰ－Ｌ３％）を求め、その値が１０％を越えるようであれば、肝細胞癌が疑われる。α１－６結合でフコースが転移したＡＦＰの割合を正確に識別することができれば、肝細胞癌の診断の確度も一層高まる。

[0003] α１－６フコースは、肝癌の他にも、膵臓癌、大腸癌等の疾患と関係することが知られている。

[0004] 従来、α１－６フコースと親和性を有するレクチンとして、レンズマメレクチン（ＬＣＡ）、エンドウマメレクチン（ＰＳＡ）、ヒイロチャワンタケ

レクチン（ＡＡＬ）、ラッパスイセンレクチン（ＮＰＡ）、ソラマメレクチン（ＶＦＡ）、麹菌レクチン（ＡＯＬ）等が知られていた。しかし、ＡＡＬやＡＯＬは、α１－２フコース、α１－３フコース等にも親和性を有し、ＬＣＡ、ＰＳＡ及びＶＦＡは、フコースα１－６をもたないＮ結合型一本鎖及び／又は二本鎖糖鎖にも親和性を有するといったように、これらのレクチンは、α１－６フコース糖鎖の他に、α１－６結合以外のフコースを持つ糖脂質系糖鎖や、フコースを持たない高マンノース糖鎖にも親和性を示す。

[0005] 本発明者等は、従来知られている上記レクチンよりも特異的にα１－６フコース糖鎖を検出するレクチンとして、天然のキノコからスギタケレクチン（ＰｈｏＳＬ）（非特許文献１）、サケツバタケレクチン（ＳＲＬ）（特許文献１）等のレクチンを新規に発見している。さらに、このレクチンの化学合成やリコンビナント作製も行なっている（特許文献４及び５）。そして、このレクチンを用いて、ＡＦＰ－Ｌ３の検出（特許文献１）、大腸癌の悪化度の判別（特許文献２）、及び膵臓癌の検出（特許文献３）にも成功している。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許４５１４１６３（フコースα１→６特異的レクチン）

特許文献2：特許５２６３９７９（大腸癌の判別方法）

特許文献3：特許４９００９８３（膵臓癌の検出方法）

特許文献4：特開２０１１－１４８７３６（ペプチド）

特許文献5：特開２０１１－１４８７３５（遺伝子）

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｙｕｋａ Ｋｏｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，”Ａ Ｎｏｖｅｌ Ｃｏｒｅ Ｆｕｃｏｓｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｌｅｃｔｉｎ ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｍｕｓｈｒｏｏｍ Ｐｈｏｌｉｏｔａ ｓｑｕａｒｒｏｓａ”，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ，２０１２，２８７，ｐ３３９７３－３３９８２

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明者等が発見したα１－６フコース特異的レクチンによって、α１－６フコース糖鎖の特異的検出が可能になった。α１－６フコース糖鎖とα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づくシグナルを増強することができれば、α１－６フコース糖鎖の正確な検出が可能となる。そこで、本発明の目的は、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づくシグナルを強化するシグナル増強剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者等は、上記課題を鋭意検討した結果、以下の発明によれば上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強するシグナル増強剤であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とすることを特徴とする前記シグナル増強剤を提供する。前記「α１－６フコース糖鎖」という用語は、本明細書において、「Ｎ型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１－６結合でフコースが結合した構造」を意味する。また、前記「α１－６フコース特異的レクチン」という用語は、本明細書において、「（１）α１－６フコース糖鎖に対して結合定数１．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上（２５℃において）で示される親和性を有する、かつ（２）α１－６フコースを含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１－６フコースを含まない糖脂質糖鎖に対して実質的に結合しないことを特徴とするレクチン」を意味する。

[0010] 特開２０１０－１４５２０２には、抗原抗体反応を増強する方法であって、抗原と抗体とをポリエチレングリコール及び尿素の共存下で反応させる方法が開示されている。本発明のシグナル増強剤が適用される反応は、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応であって、抗原抗体反応でなく、また、ポリエチレングリコールを必要とし

ない点で、特開２０１０－１４５２０２の発明と明確に相違する。

[0011] 本発明は、また、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強する方法であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤の存在下で、前記糖鎖と前記レクチンとを反応させるステップを含む、前記方法を提供する。

[0012] 本発明は、また、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強する方法であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤を含む洗浄液で、前記糖鎖を洗浄するステップと、前記糖鎖と前記レクチンとを反応させるステップ、を含む、前記方法を提供する。

[0013] 本発明は、また、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種、及び、α１－６フコース特異的レクチンを有効成分とするシグナル増強剤を含む、α１－６フコース糖鎖の検出キットを提供する。

発明の効果

[0014] 尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種（以下、尿素等という）を含むことを必須とする本発明のシグナル増強剤は、後述する実施例に示すように、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応を増感し、それに基づくシグナルを強化することができる。前記尿素等は、後述の比較例１に示すように、α１－６フコース糖鎖を持たない糖鎖（例えばトランスフェリン）とα１－６フコース特異的レクチンとの反応を増感しない。また、前記尿素等は、比較例２に示すように、α１－６フコース糖鎖を持つ糖鎖と、α１－６フコースに親和性を有するが特異的ではないレクチン（例えばＡＡＬ）との反応を増感しない。データを示していないが、前記尿素等は、α１－６フコース糖鎖を持つ糖鎖とα１－６フコースに親和性を有さないレクチン（例えば、ハリエニシダレクチン１（ＵＥＡ－１）、ミヤコグサレクチン（Ｌｏｔｕｓ）、タチナタマメレクチン（ＣｏｎＡ）等）との反応も増感しない。したがって、前記尿素等を

含む本発明のシグナル増強剤は、α１－６フコース糖鎖とα１－６フコース特異的レクチンとの特異的反応に向けられる。

[0015] 本発明のシグナル増強剤によれば、α１－６フコース糖鎖を正確に測定できる。これは、α１－６フコース糖鎖が関係する疾患の検出や判定や、α１－６フコース糖鎖の学術研究に大いに貢献する。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]尿素存在下及び不存在下でα１－６フコース特異的レクチンとさまざまな糖タンパク質との間の反応値（Ｓ－Ｎ）を調べた結果を示す棒グラフである。棒グラフの左側が尿素不存在下、そして右側が５Ｍ尿素の存在下を示す。α１－６フコース糖鎖を有するｆＨＰ、ＡＦＰ－Ｌ３及びＩｇＧのいずれに対するＰｈｏＳＬの反応性も、尿素存在下で増している。一方、α１－６フコース糖鎖に属さないＴＦに対する反応性は、尿素存在下でも変わらない。

[図2]尿素存在下及び不存在下でα１－６フコース特異的レクチン（ＰｈｏＳＬ、ＰｈｏＳＬペプチド及びＳＲＬ）、又はα１－６フコース親和性を有するがα１－６フコース特異的でないレクチン（ＡＡＬ）とｆＨＰとの間の反応値（Ｓ－Ｎ）を調べた結果を示す棒グラフである。棒グラフの左側が尿素不存在下、そして右側が５Ｍ尿素の存在下を示す。すべてのα１－６フコース特異的レクチンとｆＨＰとの反応値（Ｓ－Ｎ）が、尿素存在下で増大している。一方、α１－６フコースに親和性を有するものの、特異的でないＡＡＬとｆＨＰとの反応値（Ｓ－Ｎ）は、尿素存在下でも増大しない。

[図3]尿素及びフコースの存在下（実施例７）、又は尿素及びチログロブリンの存在下（実施例８）で、ＰｈｏＳＬとｆＨＰとの反応を調べた棒グラフである。尿素存在下でのＰｈｏＳＬとｆＨＰとの反応は、フコース又はチログロブリンによって濃度依存的に阻害される。これは、ＰｈｏＳＬとｆＨＰのα１－６フコース特異的結合に尿素が関与していることを示している。

[図4]ｆＨＰとＰｈｏＳＬとの反応を、共存させる尿素濃度を変更しながら測定した反応値（Ｓ－Ｎ）のグラフである。図４から、尿素濃度１～９Ｍにお

いてシグナルが１．２～２．８倍に増強されていることがわかる。

[図5]ｆＨＰとＰｈｏＳＬとの反応を、共存させるチオ尿素濃度を変更しながら測定した反応値（Ｓ－Ｎ）のグラフである。図５から、チオ尿素濃度０．１～１．５Ｍにおいてシグナルが１．２～４．１倍に増強されていることがわかる。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明のシグナル増強剤は、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強するシグナル増強剤であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を含むことを特徴とする。

[0018] シグナル増強剤中の尿素濃度は、通常、１～９Ｍでよく、好ましくは２．５～９Ｍであり、さらに好ましくは３～８Ｍ、特に好ましくは３．５～７Ｍである。また、シグナル増強剤中のチオ尿素濃度は、通常、０．１～１．５Ｍでよく、好ましくは０．６～１．５Ｍであり、さらに好ましくは０．８～１．５Ｍ、特に好ましくは１～１．４Ｍである。

[0019] シグナル増強剤中の前記尿素等は、溶媒に溶解して使用することが好ましい。溶媒の例には、水；リン酸緩衝化生理食塩水やトリス緩衝化生理食塩水等の生理食塩水；リン酸緩衝液やトリス緩衝液等の緩衝液；ウシ血清アルブミン等のタンパク質を溶解した緩衝液やその水溶液；並びにＴｗｅｅｎ－２０等の界面活性剤を含む緩衝液やその水溶液が挙げられる。

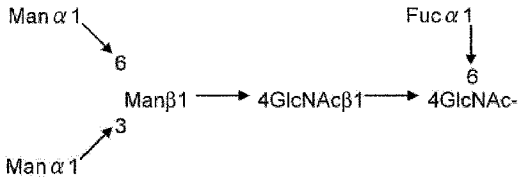
[0020] シグナル増強剤のｐＨは、通常、４～１０であり、好ましくは５～９である。

[0021] 上記α１－６フコース糖鎖とは、Ｎ型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１－６結合でフコースが結合した構造を意味し、Ｎ結合型糖鎖である限り、遊離のオリゴ糖鎖、糖ペプチド、糖タンパク質、細胞等のすべてを包含する。また、標識のようにオリゴ糖鎖等を化学修飾したものも含まれる。上記Ｎ結合型の糖鎖は、高マンノース型、複合型、混成型等であり得る。さらに、前記糖鎖は、酸、ヒドラジン等で化学的に前記糖鎖を部分的に

分解したもの、シアリダーゼ、ガラクシトターゼ、Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ、α1－２フコース・α１－３フコース・α１－４フコースを切断するフコシダーゼ、マンノシダーゼのいずれかの酵素を同時にあるいは段階的に使用して前記糖鎖を部分的に分解したものであってもよい。また、グルコースのような糖、アセチル基、硫酸基、リン酸基のような官能基等を前記糖鎖に付加したものであってもよい。

[0022] フコースα１－６糖鎖の代表例を、以下に示す。

[化1]



〔式中、Ｍａｎはマンノース、ＧｌｃＮＡｃはＮ－アセチルグルコサミン、Ｆｕｃはフコースを意味する〕

[0023] α１－６フコース糖鎖の特に好ましい具体例は、ＡＦＰ－Ｌ３、フコシル化ハプトグロビン等の腫瘍マーカーである。

[0024] α１－６フコース特異的レクチンは、α１－６フコース糖鎖に対して親和性を有する従来のレクチン（例えばＡＡＬ）と比べてより特異的にα１－６フコース糖鎖と結合することを特徴とする。この特徴は、（１）α１－６フコース糖鎖に対する結合定数の下限と、（２）α１－６フコースを含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１－６フコースを含まない糖脂質糖鎖に対する結合定数の上限によって定義可能である。すなわち、α１－６フコース特異的レクチンとは、

（１）α１－６フコース糖鎖に対して結合定数１．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上（２５℃において）で示される親和性を有する、

（２）α１－６フコース糖鎖を含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１－６フコースを含まない糖脂質糖鎖に対して実質的に結合しない

ことを特徴とする。

[0025] 前記結合定数は、本明細書において、例えばフロンタルアフィニティクロ

マトグラフィー（ＦＡＣ法）を用い、分析温度２５℃において測定される数値を意味する。ＦＡＣ法の詳細は、例えば、本出願人の出願した特許文献１に記載されている。特許文献１を参照のために本明細書に編入する。

[0026] α１－６フコース特異的レクチンの（１）α１－６フコース糖鎖に対して結合定数（２５℃において）は、好ましくは５．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上、より好ましくは１．０×１０^{5}Ｍ$^{-1}$以上、さらに好ましくは１．０×１０^{6}Ｍ$^{-1}$以上である。

[0027] α１－６フコース特異的レクチンの「（２）α１－６フコース糖鎖を含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１－６フコース糖鎖を含まない糖脂質糖鎖に対して実質的に結合しない」とは、本明細書において、α１－６フコース糖鎖を含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１－６フコースを含まない糖脂質糖鎖に対する結合定数（２５℃において）が、通常、１．０×１０^{3}Ｍ$^{-1}$以下であり、好ましくは１．０×１０^{2}Ｍ$^{-1}$以下、特に好ましくは０であることを意味する。

[0028] α１－６フコース特異的レクチンのＳＤＳ電気泳動法による分子量は、通常、４，０００～４０，０００であり、好ましくは４，０００～２０，０００である。ここで、ＳＤＳ電気泳動法による分子量は、例えばＬａｅｍｍｉの方法（Ｎａｔｕｒｅ，２２７巻，６８０頁，１９７６年）に準じて測定されるものである。α１－６フコース特異的レクチンは、サブユニットが、通常、２～１０個、好ましくは２～６個、さらに好ましくは２～３個結合したものでもよい。

[0029] α１－６フコース特異的レクチンは、その非還元末端にシアル酸を有するα１－６フコース糖鎖に対しても高い親和性を有する。一方、ＬＣＡ、ＮＰＡ及びＰＳＡは、非還元末端にシアル酸を有するα１－６フコース糖鎖に対しては親和性が低い。

[0030] α１－６フコース特異的レクチンは、さらにα１－６フコースの結合したＮ結合型の一本鎖、二本鎖、三本鎖及び／又は四本糖鎖に対する結合定数（２５℃において）が、好ましくは、１．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上、より好ましくは

、５．０×１０^{4}M^{-1}以上、さらに好ましくは１．０×１０^{5}M^{-1}以上で示される親和性を有する。

[0031] α１－６フコース特異的レクチンは、天然物から抽出及び／又は精製することができる。天然物由来のα１－６フコース特異的レクチンの入手方法は、本出願人の出願した特許文献１、及び本出願人の投稿した非特許文献１に詳細に記載されている。なお、特許文献１に記載のツチスギタケレクチン（ＰＴＬ）をスギタケレクチン（ＰｈｏＳＬ）と読み替える。以下に天然物から取得するα１－６フコース特異的レクチンを概説する。

[0032] 上記天然物は、例えば担子菌、子嚢菌等のキノコである。モエギタケ科、キシメジ科、タコウキン科及びテングタケ科は、担子菌に属している。モエギタケ科としては、スギタケ、ツチスギタケ、サケツバタケ、クリタケ、ヌメリスギタケモドキ、ヌメリスギタケ等が挙げられる。キシメジ科としては、コムラサキシメジ等が挙げられる。タコウキン科としては、シロハカワラタケ、ツヤウチワタケ等が挙げられる。テングタケ科としては、ベニテングタケ等が挙げられる。

[0033] これらの担子菌又は子嚢菌のうち、レクチンのα１－６フコース糖鎖認識特異性とレクチンの回収効率の観点から、モエギタケ科、キシメジ科又はテングタケ科が特に好ましく、さらに好ましくはスギタケ、ツチスギタケ、ヌメリスギタケモドキ、サケツバタケ、クリタケ、コムラサキシメジ又はベニテングタケである。

[0034] α１－６フコース特異的レクチンは、好ましくは担子菌由来のレクチンであり、好ましくはスギタケレクチン（ＰｈｏＳＬ）、ツチスギタケレクチン（ＰＴＬ）、サケツバタケレクチン（ＳＲＬ）、クリタケレクチン（ＮＳＬ）、コムラサキシメジレクチン（ＬＳＬ）、及びベニテングタケレクチン（ＡＭＬ）であり、さらに好ましくはＰｈｏＳＬ、ＰＴＬ、ＳＲＬ、ＮＳＬ及びＡＭＬである。

[0035] 上記α１－６フコース特異的レクチンは、例えば担子菌や子嚢菌から、公知の抽出方法、分離方法、精製方法等を適宜組み合わせることにより、単離

することができる。例えば、水系媒体を抽出溶媒として用いて、担子菌及び／又は子嚢菌の水系媒体抽出物を得る工程を含む。これらの担子菌及び／又は子嚢菌の使用部位は、子実体であることが好ましい。この前記抽出物から、ＳＤＳ電気泳動法による分子量が、通常、４，０００～４０，０００、好ましくは４，０００～２０，０００、及びα１－６フコース糖鎖に対する結合定数（２５℃において）が、通常、１．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上、好ましくは５．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上、より好ましくは１．０×１０^{5}Ｍ$^{-1}$以上、さらに好ましくは１．０×１０^{6}Ｍ$^{-1}$以上で示される親和性を有するレクチンを得る。

[0036] α１－６フコース特異的レクチンは、また、上記天然物からの抽出の他に、天然由来のレクチンのアミノ酸配列に基づいて化学合成されたペプチドやタンパク質であってもよい。さらに、化学合成のペプチドやタンパク質は、天然由来のレクチン（例えば本明細書に添付した配列番号１のアミノ酸配列からなるＰｈｏＳＬ）のアミノ酸配列中の１又は数個のアミノ酸がリジン及び／又はアルギニンで置換されかつ糖結合活性を有するペプチド（例えば本明細書に添付した配列番号２のアミノ酸配列からなるＰｈｏＳＬペプチド）であってもよい。その合成方法は、本出願人の出願した特許文献４に詳細に記載されている。特許文献４の明細書を参照のために本明細書に編入する。

[0037] α１－６フコース特異的レクチンは、また、上記天然物からの抽出の他に、天然由来のレクチンのアミノ酸配列をコードする核酸を用いて天然由来とは異なる公知の宿主内で人工的に発現させたリコンビナント（例えば実施例１８に示すＰｈｏＳＬ組換えレクチン）であってもよい。リコンビナントの発現方法は、特許文献５に詳細に記載されている。本出願人の出願した特許文献５の明細書を参照のために本明細書に編入する。

[0038] α１－６フコース特異的レクチンは、検出可能にする標識手段が組み込まれていることが好ましい。前記標識手段としては、特に制限なく、公知の標識化方法を適用することができ、例えば、放射性同位元素による標識化、標識化合物の結合等を挙げることができる。前記放射性同位元素としては、例えば^{14}Ｃ、^{3}Ｈ及び^{32}Ｐが挙げられる。

[0039] 前記標識化合物としては、例えば酵素標識（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等）、ビオチン標識、ジゴキシゲニン標識、蛍光標識（フロオレッセインイソチアシアナート、ＣｙＤｙｅ（登録商標）、４－アミノ安息香酸エチル（ＡＢＥＥ）、アミノピリジン、アロフィコシアニン、フィコエリスリン等）等を挙げることができる。これらの標識化合物は、常法によりレクチンと結合することができる。特に、ビオチン標識は、感度が高い点で好ましい。

[0040] 本発明は、また、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強する方法であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするグナル増強剤の存在下で、前記糖鎖と前記レクチンとを反応させるステップを含む、前記方法を提供する。

[0041] 前記反応ステップの尿素濃度は、通常、１～９Ｍでよく、好ましくは２．５～９Ｍであり、さらに好ましくは３～８Ｍ、特に好ましくは３．５～７Ｍである。また、前記反応ステップのチオ尿素濃度は、通常、０．１～１．５Ｍでよく、好ましくは０．６～１．５Ｍであり、さらに好ましくは０．８～１．５Ｍ、特に好ましくは１～１．４Ｍである。

[0042] 本発明は、また、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強する方法であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤を含む洗浄液で、前記糖鎖を洗浄するステップ、及び、前記糖鎖と前記レクチンとを反応させるステップ、を含む、前記方法を提供する。

[0043] 前記洗浄液の尿素濃度は、通常、１～９Ｍでよく、好ましくは２．５～９Ｍであり、さらに好ましくは３～８Ｍ、特に好ましくは３．５～７Ｍである。また、前記洗浄液のチオ尿素濃度は、通常、０．１～１．５Ｍでよく、好ましくは０．６～１．５Ｍであり、さらに好ましくは０．８～１．５Ｍ、特に好ましくは１～１．４Ｍである。また、前記糖鎖と前記レクチンとを反応

させるステップは、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするグナル増強剤の存在下で行ってもよい。

[0044] 上記方法において、α１－６フコース特異的レクチンと反応したα１－６フコース糖鎖を検出する手段は、特に制限されない。検出手段として、例えば、ＥＬＩＳＡ（直接吸着法、サンドウィッチ法、及び競合法）、レクチンアフィニティクロマトグラフィー、レクチン染色、レクチンチップ、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）法、凝集法、表面プラズモン共鳴法（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）システム）、電気泳動、ビーズ等を使用可能である。いくつかの代表的な検出方法を、以下に概説する。

[0045] 直接吸着ＥＬＩＳＡ法では、血液等の検体をプレートに添加して固定化する。次いで、ビオチン標識したレクチンをシグナル増強剤と共に添加して、糖鎖とレクチンとをシグナル増強剤の存在下で反応させる。あるいは、シグナル増強剤を含む洗浄液を先に添加し、廃棄後にシグナル増強剤を含まないレクチン溶液を添加してもよい。２次標識化合物としてＨＲＰ（ホースラディッシュパーオキシダーゼ）標識ストレプトアビジン溶液を添加して、ビオチンとストレプトアビジンとを反応させる。次いで、ＨＲＰ用発色基質を加えて発色させ、発色強度を吸光光度計で測定する。予め、既知の濃度の糖鎖を含む標準試料によって検量線を作成しておけば、糖鎖の定量化も可能である。

[0046] サンドイッチＥＬＩＳＡ法では、α１－６フコース糖鎖を有する抗原に結合する抗体をプレートに添加し固定化してから、血清等の検体を添加する。次いで、ビオチン標識したレクチンをシグナル増強剤と共に添加して、糖鎖とレクチンとをシグナル増強剤の存在下で反応させる。あるいは、シグナル増強剤を含む洗浄液を先に添加し、廃棄後にシグナル増強剤を含まないレクチン溶液を添加してもよい。２次標識化合物としてＨＲＰ（ホースラディッシュパーオキシダーゼ）標識ストレプトアビジン溶液を添加して、ビオチンとストレプトアビジンとを反応させる。次いで、ＨＲＰ用発色基質を加えて発色させ、発色強度を吸光光度計で測定する。予め、既知の濃度の標準試料

によって検量線を作成しておけば、α１－６フコース糖鎖の定量化も可能である。

[0047] レクチンアフィニティクロマトグラフィーは、担体に固定化されたレクチンが糖鎖と特異的に結合する性質を利用したアフィニティクロマトグラフィーである。ＨＰＬＣと組み合わせることでハイスループットを期待することができる。

[0048] レクチンの固定化担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース、スターチ、ポリアクリルアミド等のゲル材が一般的である。これらには、市販のものを特に制限なく使用でき、例えばセファロース４Ｂやセファロース６Ｂ（共にＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）が挙げられる。レクチンクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、マイクロプレートやナノウエルにレクチンを固定化したものも含まれる。

[0049] 固定化するレクチンの濃度は、通常、０．００１～１００ｍｇ／ｍＬ、好ましくは０．０１～２０ｍｇ／ｍＬである。担体がアガロースゲルの場合、それをＣＮＢｒ等で活性化してからレクチンとカップリングさせる。活性化スペーサーを導入したゲルにレクチンを固定化してもよい。さらには、ホルミル基を導入したゲルにレクチンを固定化してから$NaCNBH_3$で還元してもよい。また、ＮＨＳ－セファロース（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）のような市販の活性化ゲルを使用してもよい。

[0050] 検体をシグナル増強剤と共にカラムに供与した後、洗浄の目的で緩衝液を流す。あるいは、緩衝液中にシグナル増強剤を添加した状態で検体をカラムに供与する。緩衝液の一例は、モル濃度が、通常、５～５００ｍＭ、好ましくは１０～５００ｍＭであり、ｐＨが、通常、４．０～１０．０、好ましくは６．０～９．０であり、ＮａＣｌ含量が、通常、０～０．５Ｍ、好ましくは０．１～０．２Ｍであり、$CaCl_2$、$MgCl_2$、又は、$MnCl_2$含量が、通常、０～１０ｍＭ、好ましくは０～５ｍＭの緩衝液である。

[0051] アフィニティカラムの洗浄後、糖鎖の溶出は、糖鎖を有効に溶出できる中性の非変性緩衝液中で、塩化ナトリウム、ハプテン糖等の脱着剤を用いて行

われる。この緩衝液は、上記と同様であってもよい。脱着剤の濃度は、好ましくは、１～５００ｍＭ、特に好ましくは１０～２００ｍＭ濃度である。溶出緩衝液には、シグナル増強剤を含まないことが好ましい。

[0052] レクチン染色では、腫瘍組織から検体を薄く切り出し、その薄片をガラスプレートに貼り付ける。ブロッキングバッファーにプレートを浸し、室温で緩く攪拌する。適宜、内因性ペルオキシダーゼ不活性化を行う。ビオチン標識レクチン溶液（２～５μｇ／ｍＬにブロッキングバッファーで希釈）をシグナル増強剤と共にプレートを浸し、室温で１時間、緩く撹拌する。あるいは、シグナル増強剤を含む洗浄液を先に添加し、洗浄液を廃棄後にシグナル増強剤を含まないレクチン溶液を添加してもよい。ＨＲＰ標識アビジン溶液にプレートを浸し、室温で緩く攪拌する。発色液にプレートを浸し、室温で数分間発色させる。発色が十分確認できたら水で洗浄し、反応を停止させる。発色した組織を光学顕微鏡で観察する。レクチン染色には、市販のレクチン染色キットを用いることができる。

[0053] ＦＡＣＳ法では、細胞（検体）をリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）に懸濁する。２１Ｇの針をつけた２．５ｍＬサイズのシリンジで、１０回程度強く出し入れして細胞をほぐした後、５０μｍのメッシュで細胞を濾過する。このように調製した細胞に、蛍光標識したレクチンの溶液をシグナル増強剤と共に加えて、細胞とレクチンとをシグナル増強剤の存在下で結合させる。あるいは、シグナル増強剤を含む洗浄液を先に添加し、洗浄液を廃棄後にシグナル増強剤を含まないレクチン溶液を添加してもよい。その後、フローサイトメーター（例えば、ベックマンコールター社製Ｃｙｔｏｍｉｃｓ　ＦＣ　５００）で、レクチンの結合した細胞の量や割合を分析する。

[0054] 上記の検出手段に用いる検体は、特に限定されない。例えば、血液、血漿、血清、涙、唾液、体液、乳汁、尿、細胞の培養上清、形質転換動物からの分泌物等が挙げられる。

[0055] 本発明は、また、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤、及びα１－６フコース特異的レクチ

ンを含む、α１－６フコース糖鎖の検出キットを提供する。

[0056] 検出キットは、適宜、各種の標識化合物、緩衝液、プレート、ビーズ、反応停止液等の検出キットに汎用のものを含んでもよい。検出キットは、また、生体の血液から取得した検体からα１－６フコース糖鎖を有する糖タンパク質を抽出するための試薬（例えば、抗ハプトグロビン抗体、抗αフェトプロテイン抗体等の抗体やプロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＬ等の免疫グロブリン結合タンパク質）を含むことが好ましい。

[0057] 本発明のα１－６フコース糖鎖の検出キットの用途は、α１－６フコース糖鎖の検出を目的とするものである限り、特に限定されない。その具体例を、以下に説明する。

[0058] ＡＦＰ－Ｌ３バンド（コアフコースの転移したαフェトプロテインのバンド）の確度の高い検出は、臨床的に肝硬変に合併する肝細胞癌の早期診断、肝細胞癌の緻密な経過観察、治療効果の正確な判定、胎児性腫瘍の早期発見、劇症肝炎の肝再生の指標等として有用である。コアフコースの転移したα５β１インテグリンもまた、肝癌診断の指標として期待される。

[0059] 大腸癌で悪性度の低いものや原発癌では、コアフコースを含むフコース全般が増加する。一方、大腸癌の悪性度が高いものや転移癌では、α１－６結合フコースが減少する傾向がある。そこで、一次スクリーニングで大腸癌と診断された者の大腸癌の腫瘍組織にα１－６フコース特異的レクチンを作用させ、α１－６結合フコースの量を調べることで、悪性度の高い大腸癌や転移癌の判別が可能となる。

[0060] 膵臓癌になると、糖タンパク質であるハプトグロビンにコアフコースが付加したフコシル化ハプトグロビンが生成する。このフコシル化ハプトグロビンは、膵臓癌の病期の進展とともに増え、膵臓癌の腫瘍部摘出後には消失する。α１－６フコース特異的レクチンとフコシル化ハプトグロビンとの反応に本発明のシグナル増強剤を共存させることで、α１－６フコース特異的レクチンによる検出感度を高めることができる。また、フコシル化ハプトグロビンを、シグナル増強剤を含む洗浄液で洗浄後、洗浄液を廃棄後にシグナル

増強剤を含まないレクチン溶液を添加してもよい。さらに、α１－６フコース特異的レクチンと抗ハプトグロビン抗体を用いたアッセイによれば、膵臓癌を迅速かつ簡便に検出することが可能である。さらに、膵臓癌マーカーＣＡ１９－９の抗体とα１－６フコース特異的レクチンとを組み合わせることで膵臓癌と膵炎との判別が可能である。その際、本発明のシグナル増強剤を共存させると、判別が一層容易となる。

[0061] 本発明の検出キットは、上記の疾患の診断や研究のほかに、前立腺癌、乳癌、胃癌、小腸癌、結腸直腸癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、軟部肉腫、骨肉腫、メラノーマ、膠芽腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、急性リンパ腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、非ホジキン病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病等の腫瘍；アレルギー疾患；自己免疫疾患；並びに肺気腫等の循環器疾患の診断や研究に使用することが期待される。

実施例

[0062] 以下に本発明の実施例を示して、本発明をより詳細に説明する。しかし本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0063] 本発明に使用する試薬を、以下の手順で調製した。

（１） リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）

リン酸水素二ナトリウム（和光純薬社製）５．７５ｇ、リン酸二水素カリウム（和光純薬社製）１．０ｇ、塩化カリウム（和光純薬社製）１．０ｇ、塩化ナトリウム（和光純薬社製）４０．０ｇを秤量し、水を４００ｍＬ入れ溶解した後、メスシリンダーに移し、水で５００ｍＬにメスアップし、１０倍濃度のリン酸緩衝化生理食塩水（１０×ＰＢＳ）とした。１０×ＰＢＳを水で１０倍に希釈し、ＰＢＳを調製した。

[0064] （２） １％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）／ＰＢＳ

ＢＳＡ（和光純薬社製）を１ｇ秤量し、１００ｍＬのＰＢＳに溶解して調製した。

[0065] （３） ０．０５％ Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳ

５ＬのＰＢＳに対してポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（Ｔｗｅｅｎ２０　ナカライ社製）を２．５ｍＬ添加した。

[0066] （４）　ビオチン標識ＰｈｏＳＬ

α１－６フコース特異的レクチンとして、非特許文献１に記載の方法に従って、スギタケからスギタケレクチン（ＰｈｏＳＬ、配列番号１）を精製した。このスギタケレクチンを量り取り、０．１Ｍ　炭酸水素ナトリウム溶液を加え溶解した（濃度；５ｍｇ／ｍＬ）。ビオチン化試薬（ＳＩＧＭＡ社製；型番：Ｂ２６４３）をジメチルスルホキシドに溶解し、レクチン溶液に加え反応させた。反応液は限外ろ過（３Ｋの膜、ミリポア社製）で水に対して溶媒置換を行い、凍結乾燥してビオチン標識ＰｈｏＳＬを得た。

[0067] （５）　ビオチン標識ＰｈｏＳＬペプチド

特許文献４の実施例６の記載に基づいて（ただし、特許文献４のＰＴＬをＰｈｏＳＬと読み替える）、ＰｈｏＳＬペプチド（配列番号２）を合成した。このレクチンをビオチン標識ＰｈｏＳＬと同様の手順でビオチン標識した。

[0068] （６）　ビオチン標識ＳＲＬ

特許文献２に記載の方法に従って、ＳＲＬ（配列番号３）を抽出した。このレクチンをビオチン標識ＰｈｏＳＬと同様の手順でビオチン標識した。

[0069] （７）ビオチン標識ヒイロチャワンタケレクチン（ビオチン標識ＡＡＬ）

ビオチン標識ヒイロチャワンタケレクチン（株式会社Ｊ－オイルミルズ社製）を用意した。

[0070] （４）～（６）のα１－６フコース特異的レクチン（標識前）の配列表を、表１に示す。

[表1]

名称	アミノ酸配列	配列番号
PhoSL	APVPVTKLVX DGDTYKXTAX LDXGDGXWV A QTXTXVFHXG	1
PhoSL peptide	KPVPVTKLVC DGDTYKCTAK LDFGDGRWV A QWDTNVFHK	2
SRL	APVXVYXLXX DGXSTKXTAX LDYGDGXWXA QWXXNVFHX	3

[0071] 配列番号１の第１０及び１７番目のＸは、任意のアミノ酸残基であってよいが、好ましくはＣｙｓであり、第２０、２３、２７、３３、３５及び３９番目のＸは、それぞれ、Ｔｙｒ／Ｓｅｒ、Ｐｈｅ／Ｔｙｒ、Ａｒｇ／Ｌｙｓ／Ａｓｎ、Ａｓｐ／Ｇｌｙ／Ｓｅｒ、Ａｓｎ／Ａｌａ、及び、Ｔｈｒ／Ｇｌｎである。

[0072] 配列番号２は、配列番号１の具体例（ＡＰＶＰＶＴＫＬＶＣ　ＤＧＤＴＹＫＣＴＡＹ　ＬＤＦＧＤＧＲＷＶＡ　ＱＷＤＴＮＶＦＨＴＧ）において、１番目のＡｌａ、２０番目のＴｙｒ、及び３９番目のＴｈｒがＬｙｓに置換され、さらに４０番目のＧｌｙが欠失している。

[0073] 配列番号３の第１０及び１７番目のＸは、任意のアミノ酸残基であってよいが、好ましくはＣｙｓであり、第４、７、９、１３、２０、２７、２９、３３、３４及び３９番目のＸは、それぞれ、Ｐｒｏ／Ｇｌｙ、Ｇｌｕ／Ｌｙｓ、Ｖａｌ／Ａｓｐ、Ａｓｎ／Ａｓｐ／Ｇｌｕ、Ｈｉｓ／Ｓｅｒ、Ｌｙｓ／Ｈｉｓ、Ｖａｌ／Ｉｌｅ、Ｇｌｙ／Ａｓｎ／Ｓｅｒ、Ａｌａ／Ｔｈｒ、及び、Ａｒｇ／Ｔｈｒである。

[0074] 〔実施例１～３〕シグナル増強試験（１）

直接吸着ＥＬＩＳＡ法にて、α１－６フコース糖鎖を有する糖タンパク質

とα１－６フコース特異的レクチンとを、尿素の存在下又は不存在下で反応させ、糖鎖とレクチンとの結合反応に基づくシグナルの増強の有無を調べた。具体的な手順は、以下のとおりである。

[0075] α１－６フコース糖鎖を有する糖タンパク質として、フコシル化ハプトグロビン（以下、「ｆＨＰ」という）、α-フェトプロテインＬ３（以下、「ＡＦＰ－Ｌ３」という）、マウス免疫グロブリンＧ（ＳＩＧＭＡ社製、以下、「ＩｇＧ」という）を用意した。比較のため、α１－６フコース糖鎖でない糖タンパク質として、トランスフェリン（ＳＩＧＭＡ社製、以下、「ＴＦ」という）も用意した。ｆＨＰ及びＡＦＰ－Ｌ３の調製方法は、以下のとおりである。

[0076] （１） ｆＨＰ溶液の調製

膵臓癌細胞株（ＰＳＮ－１、ＤＳファーマ社より入手）を常法に従い培養し、培養上清液を得た。培養上清液１０００ｍＬを、限外ろ過フィルター（製品名：ＶＩＶＡ ＳＰＩＮ ２０‐１０Ｋ、ザルトリウス社製）で１ｍＬに濃縮した。ＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥヘルスケア社製）に抗ハプトグロビン抗体（Ｔｈｅ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｉｔｅ社製）を固定化したゲル０．５ｍＬに上記濃縮液を添加した。室温で１０分毎に混和して１時間後、前記ゲルを含む溶液を０．４５μｍフィルターチューブ（ミリポア社製）に加え、４００×ｇ、温度４℃で５分間遠心し、ろ液を廃棄した。次に、ＰＢＳ ２００μＬを加えて４００×ｇ、温度４℃で５分間遠心して、ろ液を廃棄した。これを２回繰り返した。次いで、Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ（１００ｍＭ グリシン、０．５Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ３．０）２００μＬを加えて、４００×ｇ、温度４℃で５分間遠心して、ろ液を回収した。これを２回繰り返した。この液を合わせて得た溶液を３ＮのＮａＯＨで中和した後、ＰＢＳ ６００μＬを加え、ｆＨＰ溶液を得た。このｆＨＰ溶液をさらにＰＢＳで希釈して、１０００ｎｇ／ｍＬのｆＨＰ溶液を調製した。

[0077] （２） ＡＦＰ－Ｌ３溶液の調製

肝臓癌細胞株（ＨｅｐＧ２、理化学研究所より入手）を常法に従い培養し、培養上清液を得た。培養上清液１０００ｍＬを、限外ろ過フィルター（製品名：ＶＩＶＡ　ＳＰＩＮ　２０‐１０Ｋ、ザルトリウス社製）で１ｍＬに濃縮した。ＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥヘルスケア社製）に抗ＡＦＰ抗体（ＤＡＫＯ社製）を固定化したゲル０．５ｍＬに上記濃縮液を添加した。室温で１０分毎に混和して１時間後、前記ゲルを含む溶液を０．４５μｍフィルターチューブ（ミリポア社製）に加え、４００×ｇ、温度４℃で５分間遠心し、ろ液を廃棄した。次に、ＰＢＳ　２００μＬを加えて４００×ｇ、温度４℃で５分間遠心して、ろ液を廃棄した。これを２回繰り返した。次いで、Ｅｌｕｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（１００ｍＭ　グリシン、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ３．０）２００μＬを加えて、４００×ｇ、温度４℃で５分間遠心して、ろ液を回収した。これを２回繰り返した。この液を合わせて得た溶液を３ＮのＮａＯＨで中和した後、ＰＢＳ　６００μＬを加え、ＡＦＰ－Ｌ３溶液を得た。このＡＦＰ－Ｌ３溶液をさらにＰＢＳで希釈して１０００ｎｇ／ｍＬのＡＦＰ－Ｌ３溶液を調製した。

[0078] （３）ＩｇＧ及びＴＦ溶液の調製

ＩｇＧ及びＴＦをそれぞれ、ＰＢＳで溶解して、５０００ｎｇ／ｍＬのＩｇＧ溶液、及び５０００ｎｇ／ｍＬのＴＦ溶液を調製した。

[0079] 直接吸着ＥＬＩＳＡ法の手順を、以下に示す。

（１）抗原固定化

ｆＨＰ、ＡＦＰ－Ｌ３、ＩｇＧ又はＴＦの前記溶液を、マイクロタイタープレート（グライナー社製）のウェルに５０μＬ添加して、４℃で１６時間放置後、添加した液を廃棄した。

（２）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。

（３）ブロッキング

各ウェルに１％　ＢＳＡ／ＰＢＳを２００μＬ添加して、３７℃で１時間放置後、添加した液を廃棄した。

（４）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（５）レクチン反応

ビオチン標識ＰｈｏＳＬを１％ＢＳＡ／ＰＢＳで希釈し、そして尿素（和光純薬社製）を添加して、レクチン溶液（ビオチン標識ＰｈｏＳＬ終濃度１μｇ／ｍＬ、尿素終濃度５Ｍ）を調製した。このレクチン溶液５０μＬをウェルに添加して４℃で３０分間放放置後、添加した液を廃棄した。対照として、尿素を添加していないレクチン溶液（ビオチン標識ＰｈｏＳＬ終濃度１μｇ／ｍＬ、尿素０Ｍ）も、同様の反応を実施した。

（６）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（７）ＨＲＰ標識ストレプトアビジン反応

ＨＲＰ標識ストレプトアビジン溶液（Ｖｅｃｔｏｒ社製、１μｇ／ｍＬ　ＰＢＳに調製）を、ウェルに５０μＬ添加して、室温で３０分間放置後、添加した液を廃棄した。

（８）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（９）発色反応

ＨＲＰ用発色基質（製品名：ＴＭＢ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　ｓｙｓｔｅｍ、ＫＰＬ社製）を、ウェルに５０μＬ添加し、室温で５分間放置した。

（１０）反応停止

１Ｍ　リン酸を５０μＬ添加し、反応を停止した。

[0080] プレートリーダー（製品名：ＰＯＷＥＲＳＣＡＮ（登録商標）ＨＴ、ＤＳＰＨＡＲＭＡ社製）を用いて、波長４５０ｎｍ及び６３０ｎｍの吸光度を測定した。４５０ｎｍの吸光度値から６３０ｎｍの吸光度値を引いた値を検出値（シグナル：Ｓ）とした。同様に、糖タンパク質未添加のウェルの検出値（ノイズ：Ｎ）を測定し、検出値（Ｓ）からウェル自体の検出値（Ｎ）を引いた値を反応値$(S-N)_{尿素5M}$とした。また、尿素不存在下でレクチンと糖タンパク質とを反応させた場合の反応値$(S-N)_{尿素0M}$も求めた。

[0081] シグナルの増大量及び増大率を、それぞれ以下の数式：

[数1]

$$シグナル増大量=(S-N)_{尿素5M}-(S-N)_{尿素0M}$$

[数2]

$$シグナル増大率=\frac{(S-N)_{尿素5M}}{(S-N)_{尿素0M}}$$

により求めた。

[0082] 各種糖タンパク質に対するＰｈｏＳＬの反応値（Ｓ－Ｎ）を、表２及び図１に示す。

[表2]

	レクチン	糖タンパク質	反応値			
			$(S-N)_{尿素0M}$	$(S-N)_{尿素5M}$	シグナル増大量	シグナル増大率
実施例1	PhoSL	fHP	0.253	0.724	0.471	2.86
実施例2		AFP-L3	0.008	0.132	0.124	16.5
実施例3		IgG	0.625	0.878	0.253	1.40
比較例1		TF	0.006	0.011	0.005	1.83

$(S-N)_{尿素0M}$：尿素不存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

$(S-N)_{尿素5M}$：尿素５Ｍの存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

[0083] 表２及び図１から、尿素存在下でのｆＨＰ、ＡＦＰ－Ｌ３又はＩｇＧとＰ

ｈｏＳＬとの反応に基づくシグナルは、尿素不存在下の場合と比べて、シグナル増大量及びシグナル増大率ともに有意に増大したことがわかる。一方、α１－６フコース糖鎖ではないＴＦとＰｈｏＳＬとの反応に基づくシグナルは、シグナル増大率は高いものの、シグナル増大量が有意に増大しなかった。

[0084] 〔実施例４～６〕シグナル増強試験（２）

サンドイッチＥＬＩＳＡ法にて、α１－６フコース糖鎖を有する糖タンパク質であるｆＨＰと各種α１－６フコース特異的レクチンとを尿素の存在下又は不存在下で反応させ、糖タンパク質とレクチンとの結合反応に基づくシグナルの増強の有無を調べた。具体的な手順は以下のとおりである。

[0085] α１－６フコース特異的レクチンとして、ビオチン標識ＰｈｏＳＬ、ビオチン標識ＰｈｏＳＬペプチド、及びビオチン標識ＳＲＬを用いた。比較のために、α１－６以外のフコースを有する糖鎖にも結合するビオチン標識ＡＡＬを用いた。

[0086] サンドイッチＥＬＩＳＡ法の手順を以下に示す。

（１）抗体固定化

糖鎖除去した抗ハプトグロビン抗体（日本バイオテスト社製）をＰＢＳで５μｇ／ｍＬに希釈し、マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに５０μＬずつ添加して４℃で１６時間放置後、添加した液を廃棄した。

（２）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。

（３）ブロッキング

各ウェルに１％　ＢＳＡ／ＰＢＳを２００μＬ添加して、３７℃で１時間放置後、添加した液を廃棄した。

（４）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加し

た液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（５）抗原抗体反応

１％ＢＳＡ／ＰＢＳで希釈した２００ｎｇ／ｍＬ　ｆＨＰを５０μＬ、各ウェルに添加して、室温で１時間放置後、添加した液を廃棄した。

（６）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（７）レクチン反応

ビオチン標識ＰｈｏＳＬ、ビオチン標識ＰｈｏＳＬペプチド、ビオチン標識ＳＲＬ又はビオチン標識ＡＡＬを、１％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液で希釈し、そして尿素（和光純薬社製）を添加して、各レクチン溶液（ビオチン標識レクチン終濃度１μｇ／ｍＬ、尿素終濃度５Ｍ）を調製した。このレクチン溶液５０μＬをウェルに添加して、４℃で３０分間放置後、添加した液を廃棄した。対照として、尿素を添加していないレクチン溶液（ビオチン標識レクチン終濃度１μｇ／ｍＬ、尿素０Ｍ）も実施した。

（８）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（９）ＨＲＰ標識ストレプトアビジン反応

ＨＲＰ標識ストレプトアビジン溶液（１μｇ／ｍＬ）を、ウェルに５０μＬ添加して、室温で３０分間放置後、添加した液を廃棄した。

（１０）洗浄

各ウェルに０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳを２５０μＬ添加し、添加した液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。

（１１）発色反応

ＨＲＰ用発色基質（製品名：ＴＭＢ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　ｓｙｓｔｅｍ、ＫＰＬ社製）を、ウェルに５０μＬ添加し、室温で５分間放置した。

（１２）反応停止

１Ｍ　リン酸を５０μＬ添加し、反応を停止した。

[0087] 前記プレートリーダーを用いて波長４５０ｎｍ及び６３０ｎｍの吸光度を実施例１と同様に測定し、さらに反応値（Ｓ－Ｎ）$_{尿素5M}$を求めた。尿素不存在下でレクチンと糖タンパク質とを反応させた場合の反応値（Ｓ－Ｎ）$_{尿素0M}$も求めた。尿素存在下と尿素不存在下の反応値（Ｓ－Ｎ）、その増大量及び増大率を、表３及び図２に示す。

[0088] [表3]

	レクチン	糖タンパク質	反応値			
			$(S-N)_{尿素0M}$	$(S-N)_{尿素5M}$	シグナル増大量	シグナル増大率
実施例4	PhoSL	fHP	0.265	0.796	0.531	3.00
実施例5	PhoSLペプチド		0.162	0.214	0.052	1.32
実施例6	SRL		0.430	0.863	0.433	2.01
比較例2	AAL		0.877	0.774	-0.103	0.88

$(S-N)_{尿素0M}$：尿素不存在下で反応させたときの反応値（S-N）

$(S-N)_{尿素5M}$：尿素５Ｍの存在下で反応させたときの反応値（S-N）

[0089] 図２及び表３から、ＰｈｏＳＬ、ＰｈｏＳＬペプチド又はＳＲＬとｆＨＰとの５Ｍ尿素（終濃度）存在下での反応は、尿素不存在下の場合と比較して、シグナル増大量及びシグナル増大率ともに有意に改善したことがわかる。一方、α１－６フコース以外のフコースにも結合するＡＡＬは、反応系に尿素を添加しても、シグナルは増強しなかった。

[0090] 実施例１～６に示したように、本発明のシグナル増強剤は、α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づくシグナルを強化する。尿素は、α１－６フコース糖鎖を持たないトランスフェリンとα１－６フコース特異的レクチンとの反応を増感しない（比較例

１）。尿素は、α１－６フコース糖鎖を持つ糖鎖と、α１－６フコースに親和性を有するが特異的ではないＡＡＬとの反応も増感しない（比較例２）。データを示していないが、尿素は、α１－６フコース糖鎖とα１－６フコースに親和性を有さないＵＥＡ－１、Ｌｏｔｕｓ、ＣｏｎＡ等との反応を増感しなかった。以上のことから、本発明のシグナル増強剤によるシグナル増強は、α１－６フコース糖鎖とα１－６フコース特異的レクチンとの反応のみに起きる現象であるといえる。

[0091] 〔実施例７～８〕シグナル増強作用の阻害試験

本発明のシグナル増強剤のシグナル増大効果が、α１－６フコース糖鎖とα１－６フコース特異的レクチンとの特異的結合によるものであるか否かを調べるため、サンドイッチＥＬＩＳＡ法を用いた阻害試験を行った。

[0092] 実施例７では、５Ｍ尿素存在下でのｆＨＰとＰｈｏＳＬとの反応に、終濃度２０ｍＭ又は１００ｍＭのフコース（ナカライテスク社製）を共存させた。実施例８では、実施例７のフコースに代えて、終濃度０．０１ｍｇ／ｍＬ又は０．１ｍｇ／ｍＬのチログロブリン（ＳＩＧＭＡ社製、以下、「ＴＧ」という）を共存させた。単糖であるフコースを２０～１００ｍＭ程度で共存させると、ｆＨＰとＰｈｏＳＬとの糖鎖特異的結合が阻害されることが知られている。また、α１－６フコース糖鎖を有するＴＧは、同様に、ｆＨＰとＰｈｏＳＬとの糖鎖特異的結合を阻害することが知られている。

[0093] 実施例１と同様に、前記プレートリーダーを用いて波長４５０ｎｍ及び６３０ｎｍの吸光度を測定し、さらに反応値（Ｓ－Ｎ）を求めた。フコース又はＴＧを添加したときの検出結果を、図３に示す。

[0094] 図３から、反応値（Ｓ－Ｎ）は、フコース又はＴＧの添加濃度の増大とともに低下することがわかる。これから、レクチンと糖タンパク質の結合に基づくシグナルが尿素存在下で増大する効果は、α１－６フコース特異的レクチンとα１－６フコース糖鎖との特異的結合によるものであることが確認された。

[0095] 〔実施例９〕尿素濃度の変更試験

サンドイッチＥＬＩＳＡ法にて、シグナル増強剤としての尿素の好適範囲を調べた。実施例４において、ｆＨＰ（５０ｎｇ／ｍＬ）を使用したこと、及びレクチン溶液に対する尿素終濃度を０～９Ｍとしたこと以外は、実施例４と同様の手順で行った。

[0096] 実施例１と同様にして、前記プレートリーダーを用いて波長４５０ｎｍ及び６３０ｎｍの吸光度を測定し、さらに反応値（Ｓ－Ｎ）を求めた。尿素の各終濃度における、尿素未添加と比べたシグナル増大率を図４に示す。

[0097] 図４から、終濃度１～９Ｍの尿素の存在下において、シグナルが１．２～２．８倍に増強されていることがわかる。尿素の終濃度は、好ましくは３～９Ｍであり、さらに好ましくは３～８Ｍ、特に好ましくは３～７Ｍである。

[0098] 〔実施例１０～１１〕チオ尿素での試験

直接吸着ＥＬＩＳＡ法にて、α１－６フコース糖鎖を有する糖タンパク質（ｆＨＰ又はＡＦＰ－Ｌ３）とα１－６フコース特異的レクチン（ＰｈｏＳＬ）とを、チオ尿素の存在下又は不存在下で反応させ、糖鎖とレクチンとの結合反応に基づくシグナルの増強の有無を調べた。手順は、実施例１において、尿素５Ｍをチオ尿素（和光純薬社製）１．２Ｍに代えた以外は実施例１と同様とした。

[0099] 得られた吸光度から反応値（Ｓ－Ｎ）を、実施例１と同様に求めた。また、チオ尿素不存在下でレクチンと糖タンパク質とを反応させた場合の反応値（Ｓ－Ｎ）も求めた。

[0100] シグナルの増大量及び増大率を、それぞれ以下の数式：

[数3]

$$\text{シグナル増大量} = (S-N)_{\text{チオ尿素1.2M}} - (S-N)_{\text{チオ尿素0M}}$$

[数4]

$$\text{シグナル増大率} = \frac{(S-N)_{\text{チオ尿素1.2M}}}{(S-N)_{\text{チオ尿素0M}}}$$

により求めた。

[0101] 各種糖タンパク質に対するＰｈｏＳＬの反応値（Ｓ－Ｎ）を、表４に示す

。

[表4]

	レクチン	糖タンパク質	反応値			
			$(S-N)_{チオ尿素0M}$	$(S-N)_{チオ尿素1.2M}$	シグナル増大量	シグナル増大率
実施例10	PhoSL	fHP	0.360	1.041	0.681	2.89
実施例11		AFP-L3	0.003	0.117	0.114	39.0

（Ｓ－Ｎ）$_{チオ尿素0M}$：チオ尿素不存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

（Ｓ－Ｎ）$_{チオ尿素1．2M}$：チオ尿素１．２Ｍの存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

[0102] ｆＨＰ及びＡＦＰ－Ｌ３とＰｈｏＳＬとのチオ尿素存在下での反応に基づくシグナルは、チオ尿素不存在下の場合と比べて、シグナル増大量及びシグナル増大率ともに有意に増大した。

[0103] 〔実施例１２〕チオ尿素濃度の変更試験

サンドイッチＥＬＩＳＡ法にて、シグナル増強剤としてのチオ尿素の好適範囲を調べた。実施例４において、尿素に代えてチオ尿素を使用し、レクチン溶液に対するチオ尿素終濃度を０～１．５Ｍとしたこと以外は、実施例４と同様の手順で行った。

[0104] 実施例１と同様にして、前記プレートリーダーを用いて波長４５０ｎｍ及び６３０ｎｍの吸光度を測定し、さらに反応値（Ｓ－Ｎ）を求めた。実施例１０と同様に、チオ尿素の各終濃度における、チオ尿素不存在下と比べたシグナル増大率を求め、その結果を図５に示す。

[0105] 図５から、終濃度０．１～１．５Ｍのチオ尿素の存在下において、シグナルが１．２～４．１倍に増強されていることがわかる。チオ尿素の終濃度は、通常、０．１～１．５Ｍでよく、好ましくは０．６～１．５Ｍであり、さらに好ましくは０．８～１．５Ｍ、特に好ましくは１～１．４Ｍである。

[0106] 〔実施例１３～１４〕洗浄液へのシグナル増強剤の添加試験

サンドイッチＥＬＩＳＡ法にて、α１－６フコース糖鎖からなる糖タンパ

ク質（ｆＨＰ）を添加後、尿素又はチオ尿素を含む溶液で洗浄を行い、溶液を廃棄後、レクチン溶液と反応させ、糖鎖とレクチンとの結合反応に基づくシグナルの増強の有無を調べた。

[0107] 具体的には、実施例４において、「（６）洗浄」における洗浄液（０．０５％　Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳ）に対して終濃度５Ｍ尿素又は終濃度１．２Ｍチオ尿素を添加した点と、「（７）レクチン反応」におけるレクチン溶液に尿素を添加しない点を除いて、実施例４と同様の手順で実施した。

[0108] 前記プレートリーダーを用いて波長４５０ｎｍ及び６３０ｎｍの吸光度を実施例１と同様に測定し、さらに反応値（Ｓ－Ｎ）を求めた。さらに、洗浄液中に尿素又はチオ尿素を添加した場合の、尿素及びチオ尿素未添加と比べたシグナル増大量及び増大率を上記と同様に算出し、表５に示す。

[0109] [表5]

	洗浄液の尿素又はチオ尿素濃度	糖タンパク質	反応値			
			$(S-N)_{0M}$	$(S-N)_{尿素5M}$ 又は $(S-N)_{チオ尿素\ 1.2M}$	シグナル増大量	シグナル増大率
実施例 13	尿素 5M	fHP	0.545	1.002	0.457	1.84
実施例 14	チオ尿素 1．2M		0.545	0.909	0.364	1.67

（Ｓ－Ｎ）$_{0M}$：尿素及びチオ尿素不存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

（Ｓ－Ｎ）$_{尿素５Ｍ}$：尿素５Ｍの存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

（Ｓ－Ｎ）$_{チオ尿素１．２Ｍ}$：チオ尿素１．２Ｍの存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

[0110] 表５から、α１－６フコース糖鎖を有する糖タンパク質を尿素又はチオ尿素を含む洗浄液で洗浄した後、α１－６フコース特異的レクチンを反応させても、糖鎖とレクチンとの結合反応に基づくシグナルの増強が図れることが判明した。

[0111] 〔実施例１５～１７〕

スギタケレクチンと同様に、ツチスギタケ、クリタケ及びベニテングタケからツチスギタケレクチン（ＰＴＬ）、クリタケレクチン（ＮＳＬ）、及びベニテングタケレクチン（ＡＭＬ）の精製をした。得らえたレクチンをビオチン標識ＰｈｏＳＬと同様の手順でビオチン標識し、ビオチン標識ＰＴＬ、ビオチン標識ＮＳＬ及びビオチン標識ＡＭＬを得た。

[0112] ビオチン標識ＰｈｏＳＬをビオチン標識ＰＴＬ、ビオチン標識ＮＳＬ又はビオチン標識ＡＭＬに置き換えた以外は実施例４と同様の方法で、サンドイッチＥＬＩＳＡを行った。結果を表６に示す。

[0113] [表6]

	レクチン	糖タンパク質	反応値			
			$(S-N)_{尿素0M}$	$(S-N)_{尿素5M}$	シグナル増大量	シグナル増大率
実施例 15	PTL	fHP	0.542	1.285	0.743	2.37
実施例 16	NSL		0.423	1.345	0.922	3.18
実施例 17	AML		0.027	0.548	0.521	20.3

$(S-N)_{尿素0M}$：尿素不存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

$(S-N)_{尿素5M}$：尿素５Ｍの存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

[0114] 表６に示すように、いずれのα１－６フコース特異的レクチンも、尿素存在下でシグナルが増強されることがわかった。

[0115] 〔実施例１８〕ビーズを用いた検出方法

磁気ビーズ（インビトロジェン社製、１４２０４）の説明書に従い、糖鎖除去した抗ハプトグロビン抗体を固定化することにより、抗体固定化磁気ビーズを調製した。

[0116] ビーズを用いた検出を、常法に従って行った。具体的には、フコシル化ハプトグロビン（ｆＨＰ）（終濃度：０μｇ／ｍＬ又は０．４５μｇ／ｍＬ）、尿素（終濃度０Ｍ又は５Ｍ）、配列番号４に示すＰｈｏＳＬ組換えレクチ

ン（特許文献５：特開２０１１－１４８７３５の配列番号１にＤＹＫＤＤＤＤＫタグを付加したもの、終濃度５μｇ／ｍＬ）を混合し、複合体を形成させた。複合体を含む上記溶液を１０倍に希釈し、抗体固定化磁気ビーズを添加し、磁石を用いて洗浄した後、ＨＲＰ標識抗ＦＬＡＧ抗体（ＳＩＧＭＡ社製）を添加し、検出抗体との複合体を形成させた。前記ＨＲＰ用発色基質を用いて、発色させ、１Ｍ　リン酸を用いて、発色反応を停止した。得られた溶液の吸光度を前記同様プレートリーダーで測定した。

[0117] ｆＨＰ存在下における４５０ｎｍの吸光度値から６３０ｎｍの吸光度値を引いた値を検出値（シグナル：Ｓ）とし、同様にｆＨＰ不存在下の検出値（ノイズ：Ｎ）とした。５Ｍ尿素存在下の検出値（Ｓ）からウェル自体の検出値（Ｎ）を引いた値を反応値（Ｓ－Ｎ）$_{尿素5M}$とした。また、同様に尿素不存在下の場合の反応値（Ｓ－Ｎ）$_{尿素0M}$を求めた。また、５Ｍ尿素存在下の検出値Ｓを検出値Ｎで除した値を反応値（Ｓ／Ｎ）$_{尿素5M}$とした。同様に尿素不存在下の場合を反応値（Ｓ／Ｎ）$_{尿素0M}$とした。実施例１と同様に、シグナルの増大量及び増大率を算出した。その結果を表７に示す。

[0118] [表7]

	レクチン	糖タンパク質	反応値					
			$(S-N)_{尿素0M}$	$(S-N)_{尿素5M}$	シグナル増大量	シグナル増大率	$(S/N)_{尿素0M}$	$(S/N)_{尿素5M}$
実施例18	組換えレクチン	fHP	0.455	0.708	0.253	1.56	6.83	26.29

（Ｓ－Ｎ）$_{尿素0M}$：尿素不存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

（Ｓ－Ｎ）$_{尿素5M}$：尿素５Ｍ存在下で反応させたときの反応値（Ｓ－Ｎ）

（Ｓ／Ｎ）$_{尿素0M}$：尿素不存在下で反応させたときの反応値（Ｓ／Ｎ）

（Ｓ／Ｎ）$_{尿素5M}$：尿素５Ｍ存在下で反応させたときの反応値（Ｓ／Ｎ）

[0119] 表７から、尿素存在下でのｆＨＰと組換えレクチンとの反応に基づくシグナルは、尿素不存在下の場合と比べて、シグナル増大量及びシグナル増大率ともに有意に増大したことがわかる。同様に、反応値（Ｓ／Ｎ）も、尿素不

存在下の場合と比べて顕著に増大する。ビーズを用いた検出方法においても、本発明の効果が得られることが確認された。

請求の範囲

[請求項1] α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強するシグナル増強剤であって、尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とする前記シグナル増強剤。

[請求項2] 前記シグナル増強剤中の尿素濃度が、１～９Ｍである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記シグナル増強剤中のチオ尿素濃度が、０．１～１．５Ｍである、請求項１に記載の方法。

[請求項4] α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強する方法であって、
尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤の存在下で、前記糖鎖と前記レクチンとを反応させるステップ
を含む、前記方法。

[請求項5] 前記尿素の前記反応時の濃度が、１～９Ｍである、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記チオ尿素の前記反応時の濃度が、０．１～１．５Ｍである、請求項４に記載の方法。

[請求項7] α１－６フコース糖鎖とそれに結合するα１－６フコース特異的レクチンとの反応に基づいたシグナルを増強する方法であって、
尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤を含む洗浄液で、前記糖鎖を洗浄するステップ、及び
前記糖鎖と前記レクチンとを反応させるステップ
を含む、前記方法。

[請求項8] 前記洗浄ステップを前記反応ステップの直前に行う、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 前記洗浄液の尿素濃度が、１～９Ｍである、請求項７に記載の方法。

[請求項10] 前記洗浄液のチオ尿素濃度が、０．１～１．５Ｍである、請求項７に記載の方法。

[請求項11] 尿素及びチオ尿素からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分とするシグナル増強剤、及び、α１－６フコース特異的レクチンを含む、α１－６フコース糖鎖の検出キット。

[図1]

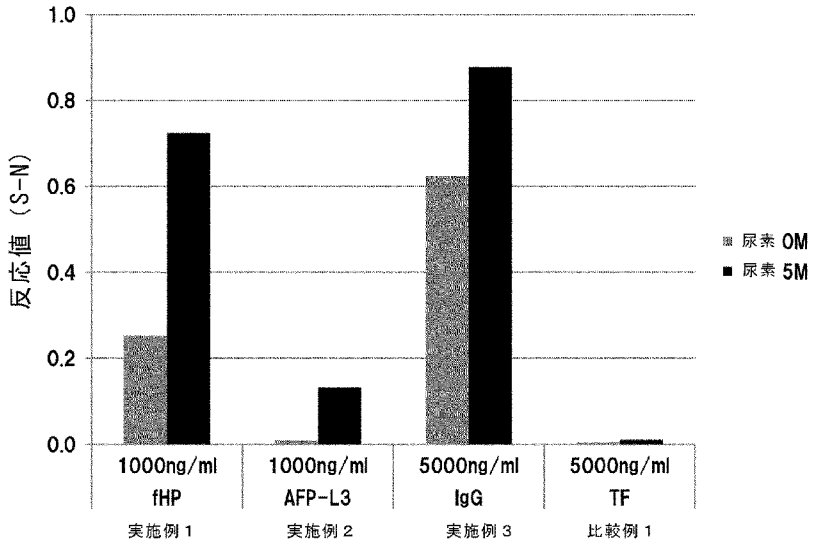


図１

[図2]

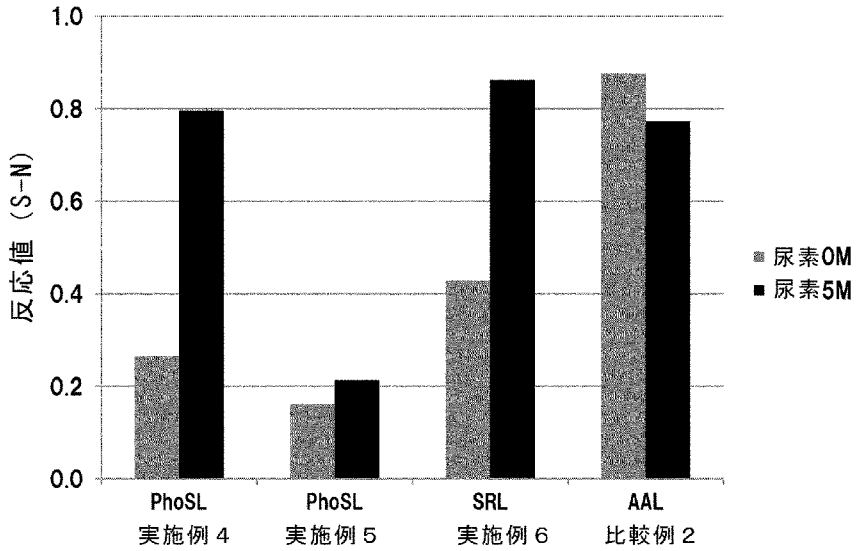


図２

[図3]

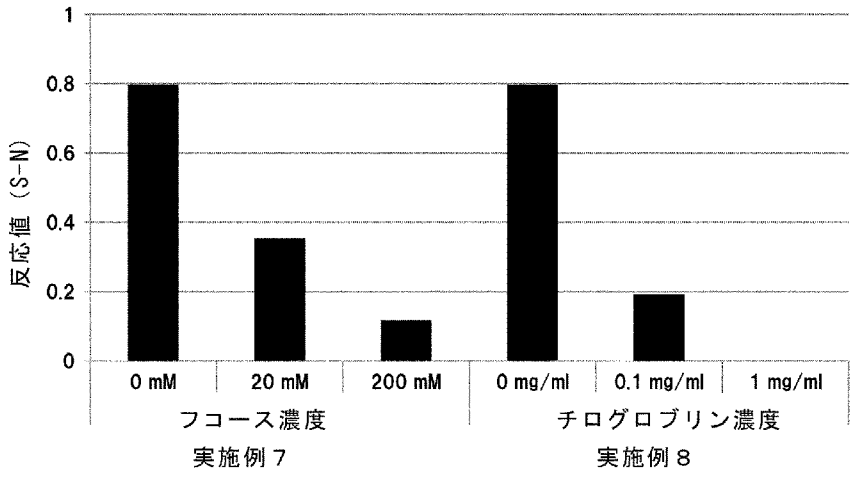


図３

[図4]

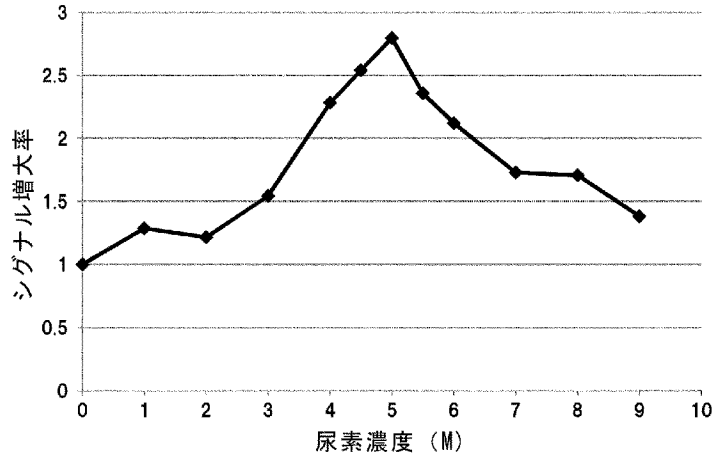

シグナル増大率
尿素濃度（M）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

図４

[図5]

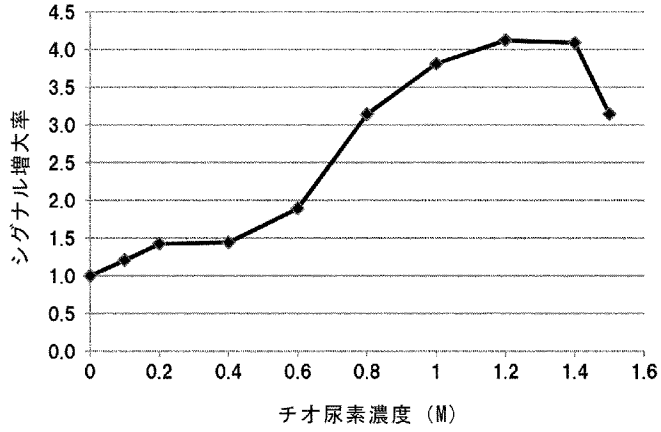

シグナル増大率
チオ尿素濃度（M）
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6

図６

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/055541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/574(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)
G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
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 2010-145202 A (Tosoh Corp.), 01 July 2010 (01.07.2010), (Family: none)	1-11
A	WO 2011/089988 A1 (J-Oil Mills, Inc.), 28 July 2011 (28.07.2011), & JP 4900983 B2 & US 8481275 B2 & EP 2498094 A1	1-11
A	Yuka KOBAYASHI, "Screening for New Lectins and Their Applications", Oyo Toshitsu Kagaku, 2013, vol.3, no.3, pages 200 to 201	1-11
A	WO 2014/046248 A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 27 March 2014 (27.03.2014), (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 May 2016 (13.05.16)	24 May 2016 (24.05.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０５５５４１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/574(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.　G01N33/574

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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

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 2010-145202 A（東ソー株式会社）2010.07.01,（ファミリーなし）	1-11
A	WO 2011/089988 A1（株式会社Ｊ－オイルミルズ）2011.07.28, & JP 4900983 B2 & US 8481275 B2 & EP 2498094 A1	1-11
A	小林夕香，新規レクチンの探索とその応用，応用糖質科学，2013, Vol.3,No.3, p.200-201	1-11

☑　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
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １３．０５．２０１６	国際調査報告の発送日 ２４．０５．２０１６
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　２Ｊ　９８１２ 大瀧　真理 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2014/046248 A1（三菱化学株式会社）2014.03.27,（ファミリーなし）	1-11