

明 細 書

発明の名称： バイオピリンの分解防止剤

技術分野

[0001] 本発明は、バイオピリンの分解防止剤、バイオピリンの分解防止剤が添加された生体試料、及びバイオピリンの分解防止剤の使用法、例えば、バイオピリンの分解防止剤を用いる、生体試料中のバイオピリンの分解を防止する方法、生体試料の保存方法、生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する方法、及び酸化ストレス状態を評価するための方法に関する。

背景技術

[0002] バイオピリンは、生体内でビリルビンが活性酸素と反応して生成される酸化的分解物である。生体内バイオピリンは、酸化ストレスや精神疾患のマーカーとして有用であることが示唆されており（非特許文献1～9）、生体内バイオピリンを測定するための幾つかの方法及び装置が開発されてきた（特許文献1及び非特許文献8）。しかし、バイオピリンは、分解が早く、その輸送及び保存が困難であるという問題があった。実際、患者から尿を採取したとしても、検査センターへの輸送中や保管中にバイオピリンの分解が生じ、その正確な濃度を測定することができなかった。このため、生体内バイオピリンをマーカーとして利用する診断方法は、未だ実用化に至っていない。そこで、バイオピリンの分解を防止するための薬剤が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2007-218593号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Masayo Matsuzaki et al., "Effects of lifestyle factors on urinary oxidative stress and serum antioxidant markers in pregnant Japanese women: A cohort study", BioScience Trends. 2014; 8(3):176-18

非特許文献2: Tsuyoshi Miyaoka et al., "Urinary excretion of biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, increases in patients with psychiatric disorders", European Neuropsychopharmacology 15 (2005) 249-252

非特許文献3: Tsuyoshi Miyaoka et al., "Analysis of oxidative stress expressed by urinary level of biopyrrins and 8-hydroxydeoxyguanosine in patients with chronic schizophrenia", Psychiatry and Clinical Neurosciences 2015; 69: 693-698

非特許文献4: Tomoya Miyashita et al., "Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine", Biochemical and Biophysical Research Communications 349 (2006) 775-780

非特許文献5: Tokio Yamaguchi et al., "Psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine", Biochemical and Biophysical Research Communications 293 (2002) 517-520

非特許文献6: Rei Yasukawa et al., "Increased urinary excretion of biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in patients with schizophrenia", Psychiatry Research 153 (2007) 203-207

非特許文献7: 静岡県立大学 環境科学研究所 下位香代子ら、"尿の成分でストレスの度合いを知る"、静岡中部都市エリア産学官連携促進事業 フーズ・サイエンス ヒルズ 平成18年度 研究成果

非特許文献8: 塩地出ら、"バイオピリン"、臨床検査 Vol.45、no.3、2011年、p.265-269

非特許文献9: 山口登喜夫ら、"低分子抗酸化物質（ビリルビンの抗酸化作用を主に）"、生物試料分析 Vol.32, No.4 (2009)、p.281-288

発明の概要

発明が解決しようとする課題

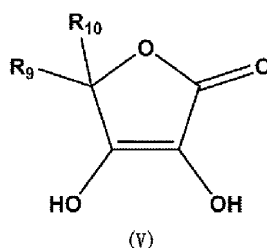
[0005] 本発明は、バイオピリンの分解防止剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] バイオピリンはビリルビンの活性酸素による分解産物である。本発明者らは、バイオピリンは活性酸素に影響され得るだろうと考え、様々な抗酸化物質を用いてバイオピリンの分解が抑えられるか否かについて検討した。その結果、エンジオール構造を有する抗酸化物質が、バイオピリンの分解を防止できることを発見した（実施例1参照）。

[0007] したがって、本発明は、エンジオール構造を有する抗酸化物質、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体を含む、バイオピリンの分解防止剤を提供する。具体的な実施態様において、前記エンジオール構造を有する抗酸化物質は、レダクトンである。さらに具体的な実施態様において、前記レダクトンは、3,4-ジヒドロキシ-フラン-2(5H)-オン構造を有する化合物である。さらに具体的な実施態様において、前記3,4-ジヒドロキシ-フラン-2(5H)-オン構造を有する化合物は、式(V)の化合物である：

[化1]



（式中、 R_9 及び R_{10} は、それぞれ独立に、水素；アルキル；又はヒドロキシ、カルボキシ、アルコキシ、アルコシカルボニル、オキソ、アシル、及びアシルオキシからなる群から選択される、同一若しくは異なってもよい1つ以上の置換基で置換されたアルキルである。）。さらに具体的な実施態様において、前記式(V)の化合物は、アスコルビン酸である。

[0008] また、本発明は、本発明の分解防止剤が添加された生体試料を提供する。一実施態様において、前記生体試料は、尿である。具体的な実施態様において、前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質は、約1 mM～約20 mMの範囲内の濃度で生体試料中に存在する。さらに具体的な実施

態様において、前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質は、約10 mMの濃度で生体試料中に存在する。

[0009] さらに、本発明は、本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程を含む、生体試料中のバイオピリンの分解を防止する方法を提供する。

さらに、本発明は、生体試料の保存方法であって、(a) 本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程、及び(b) 該生体試料を、周囲温度以下で保存する工程を含む、前記方法を提供する。

[0010] さらに、本発明は、生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する方法であって、(a) 本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程、及び(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程を含む、前記方法を提供する。一実施態様において、該方法は、前記工程(a)の後に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含む。

[0011] さらに、本発明は、対象の酸化ストレス状態を評価するためのデータの取得方法であって、(a) 本発明の分解防止剤を該対象から得られた生体試料に添加する工程；(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程を含む、前記方法を提供する。ここで、該測定された濃度が参照試料中のバイオピリンの濃度よりも高い場合、該対象が酸化ストレス状態にあることを示す。一実施態様において、該方法は、前記工程(a)の後に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含む。

[0012] 一実施態様において、前記方法における生体試料は尿である。具体的な実施態様において、前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質は、約1 mM～約20 mMの範囲内の濃度となるように生体試料に添加される。さらに具体的な実施態様において、前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質は、約10 mMの濃度となるように生体試料に添加される。

発明の効果

[0013] 本発明の分解防止剤は、バイオピリンの分解を防止することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、様々な抗酸化物質を用いた尿中バイオピリンの分解抑制試験の結果を示す。尿に、様々な抗酸化物質を添加し、48時間、27℃でインキュベーションした。各濃度は、標準試料（抗酸化物質非添加、-80℃で保存）におけるバイオピリン濃度を100%として補正した。

[図2]図2は、本発明のバイオピリンの分解防止剤を用いた、尿中バイオピリン濃度の経時的変化を示す。尿に、アスコルビン酸を最終濃度が10 mMとなるように添加し、4℃で保存した。添加から24時間、48時間、72時間、96時間、及び120時間後に、尿中バイオピリン濃度を測定した。

発明を実施するための形態

[0015] (1. 定義)

本明細書で使用される用語「バイオピリン」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、生体内におけるビリルビンの活性酸素による分解産物を意味する。バイオピリンは、酸化ストレスマーカー、精神疾患発症危険状態（ARMS）のマーカー、及び精神疾患のマーカーとして有用であることが知られている。また、バイオピリンはその親水性のために尿中に排泄されるため、尿中のバイオピリンレベルは生体内の活性酸素種の量を反映し得る。

[0016] 本明細書で使用される用語「分解防止剤」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、ある物質の分解を防止する薬剤を意味する。分解防止剤は、保存料とも呼ばれ得る。一実施態様において、分解防止剤は、酸化防止剤である。

[0017] 本明細書で使用される用語「抗酸化物質」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、空気中の酸素、液体中の溶存酸素又は生体内の活性酸素種などによって媒介される酸化反応を阻止する化合物を意味する。

[0018] 本明細書で使用される用語「塩」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、無機酸若しくは無機塩基、又は有機酸若しくは有機塩基を含む、酸又は塩基を用いて形成され得る。塩の例を挙げ

ると、制限されないが、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム及び亜鉛などから形成される金属塩、又はリジン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（N-メチルグルカミン）及びプロカインなどから形成される有機塩などがある。また、塩は、酸付加塩及び塩基付加塩を含み得る。

[0019] 本明細書で使用される用語「配糖体」は、発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、糖類と非糖部分（アグリコン）がグリコシド結合したものを意味する。配糖体は、グリコシドともいう。配糖体は、O-グリコシドを含む。本明細書で使用される用語「O-グリコシド」は、発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、環状糖のヘミアセタール性ヒドロキシにアグリコンのヒドロキシが縮合してできた配糖体を意味する。

[0020] 本明細書で使用される用語「エステル」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、酸とアルコールとから水を失って生成する化合物を意味する。エステルは、カルボン酸エステル、リン酸エステル（例えば、リン酸モノエステル）又はリン酸エステルの塩などを含む。

本明細書で使用される用語「溶媒和物」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、本発明化合物に対する1つ又は複数の溶媒分子の会合により形成される含溶媒化合物を意味する。溶媒和物は、例えば、一溶媒和物、二溶媒和物、三溶媒和物、及び四溶媒和物を含む。また、溶媒が水の場合、溶媒和物は、水和物である。

[0021] 本明細書で使用される用語「立体異性体」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有する。立体異性体は、ジアステレオマー（シス-トランス異性体など）及び鏡像異性体を含む。

本明細書で使用される用語「互変異性体」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有する。互変異性体は、ケト-エノール互変異

性を含む。

[0022] 本明細書で使用される用語「レダクトン」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、エンジオールの隣にカルボニル基を有する化合物、すなわち、 $-C(OH)=C(OH)-C(=O)-$ 基を有する化合物を意味する。レダクトンは、直鎖状化合物であっても環状化合物であってもよい。

[0023] 本明細書で使用される用語「生体試料」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、対象から得られた尿、血液（血清、血漿又は全血）、組織、又は細胞などの試料を意味する。

[0024] 本明細書で使用される用語「約」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、示された数値の誤差の容認可能な程度を意味する。用語「約」は、例えば、所与の値または値の範囲について、 $\pm 0.1 \sim 20\%$ 、 $\pm 0.1 \sim 10\%$ 、 $\pm 0.1 \sim 5\%$ 、 $\pm 0.1 \sim 1.0\%$ 、又は $\pm 0.1 \sim 0.5\%$ の変動があることをいう。

[0025] 本明細書で使用される用語「酸化ストレス」又は「酸化ストレス状態」は、本発明の技術分野において用いられている最も広い意味を有し、一般に、生体内において、活性酸素の生成と消去のバランスが崩れた状態を意味する。

[0026] 本明細書で使用される「アルキル」は、脂肪族飽和炭化水素の水素原子1個が失われて生じる1価の基を意味する。アルキルは、例えば、1～20個の炭素原子、典型的には、1～10個、1～8個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、又は2～6個の炭素原子を有する。アルキルは、直鎖若しくは分枝状であってもよい。アルキルの例を挙げると、制限されないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-デシル、n-ペンタデシル、n-ヘキサデシル、n-ヘプタデシル、及びn-オクタデシルなどがある。アルキルは、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0027] 本明細書で使用される用語「アルケニル」は、少なくとも1つの二重結合を持つ脂肪族不飽和炭化水素の水素原子1個が失われて生じる1価の基を意味する。アルケニルは、例えば、2～20個の炭素原子、典型的には、2～10個、2～8個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、3～6個、3～8個、4～6個、4～7個、又は4～8個の炭素原子を有する。アルケニルは、直鎖若しくは分枝状であってもよい。アルケニルの例を挙げると、制限されないが、ビニル ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、アリル ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、及び1,3-ブタジエニル ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$) などがある。アルケニルは、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0028] 本明細書で使用される用語「アルキニル」は、少なくとも1つの三重結合を持つ脂肪族不飽和炭化水素の水素原子1個が失われて生じる1価の基を意味する。アルキニルは、例えば、2～20個の炭素原子、典型的には、2～10個、2～8個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、3～6個、4～6個、4～7個、又は4～8個の炭素原子を有する。アルキニルは、直鎖若しくは分枝状であってもよい。アルキニルの例を挙げると、制限されないが、エチニル ($-\text{C}\equiv\text{CH}$)、及び $-\text{CH}-\text{C}\equiv\text{CH}$ などがある。アルキニルは、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0029] 本明細書で使用される用語「アルコキシ」は、 $-\text{OR}$ を意味する。Rは、任意の炭化水素基、例えば、非置換の、又は同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基で置換された、アルキル、アルケニル、アルキニル、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、又は芳香族複素環式基などである。アルコキシの例を挙げると、制限されないが、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、及びブトキシなどがある。

本明細書で使用される用語「アルコキシカルボニル」は、 $-\text{CO}-$ アルコキシ、すなわち、 $-\text{COOR}$ を意味する。Rは、「アルコキシ」の項目で説明したものである。

本明細書で使用する用語「ヒドロキシ」は、-OHを意味する。

本明細書で使用する用語「ヒドロキシアルキル」は、アルキルの水素原子の少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ又はそれ以上）が-OH基で置換されたものを意味する。ヒドロキシアルキルの例を挙げると、制限されないが、1-ヒドロキシエチル、2-ヒドロキシエチル、1,1-ジヒドロキシエチル、1,2-ジヒドロキシエチル、2,2-ジヒドロキシエチル、1,1,2-トリヒドロキシエチル、1,2,2-トリヒドロキシエチル、2,2,2-トリヒドロキシエチル、及び1,2,3-トリヒドロキシプロピルなどがある。

本明細書で使用する用語「カルボキシ」は、-COOHを意味する。

[0030] 本明細書で使用する用語「アシル」は、-CO-R' で表される基を意味する。R' は、任意の炭化水素基、例えば、非置換の、又は同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基で置換された、アルキル、アルケニル、アルキニル、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、又は芳香族複素環式基などである。アシルの例を挙げると、制限されないが、アセチル (-COCH₃)、及びベンゾイル (-CO-Ph) などがある。

本明細書で使用する用語「アシルオキシ」は、-O-アシル、すなわち、-O-CO-R' を意味する。R' は「アシル」の項目で説明したものである。アシルオキシの例を挙げると、制限されないが、アセトキシ (-OCOCH₃)、-OCO-n-C₁₅H₃₁、及び-OCO-n-C₁₇H₃₅などがある。

本明細書で使用する用語「カルボニル」は、-(C=O)-を意味する。

本明細書で使用する用語「オキシ」は、=Oを意味する。

[0031] 本明細書で使用する用語「非芳香族炭素環」は、環状の飽和炭化水素、又は環状の非芳香族不飽和炭化水素を意味する。非芳香族炭素環は、少なくとも1つの二重結合を有することができる。非芳香族炭素環は、単環、又は二環若しくは三環などの縮合環を含む。非芳香族炭素環の1つの環は、例えば、3~10員環、典型的には、3~8員環、3~6員環、4~6員環又は5~6員環である。非芳香族炭素環の例を挙げると、制限されないが、シクロアルカン及びシ

クロアルケン、より具体的には、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロペンテン、シクロペンタジエン、シクロヘキサン、及びシクロヘキセンなどがある。非芳香族炭素環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0032] 本明細書で使用される用語「非芳香族炭素環式基」は、環状の飽和炭化水素基、又は環状の非芳香族不飽和炭化水素基を意味する。非芳香族炭素環式基は、非芳香族炭素環の水素原子1個が失われて生じる1価の基である。非芳香族炭素環式基は、少なくとも1つの二重結合を有することができる。非芳香族炭素環式基の例を挙げると、制限されないが、シクロアルキル及びシクロアルケニル、具体的には、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキシル、及びシクロヘキセニルなどがある。非芳香族炭素環式基は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0033] 本明細書で使用される用語「非芳香族複素環」は、0、S及びNから任意に選択される同一又は異なるヘテロ原子を環内に1個以上有する、非芳香族環を意味する。非芳香族複素環は、少なくとも1つの二重結合を有することができる。非芳香族複素環は、単環、又は二環若しくは三環などの縮合環を含む。非芳香族複素環の1つの環は、例えば、3～10員環、典型的には、3～8員環、3～6員環、4～6員環又は5～6員環である。非芳香族複素環の例を挙げると、制限されないが、テトラヒドロフラン、ジヒドロフラン（2,5-ジヒドロフラン、又は2,3-ジヒドロフラン）、テトラヒドロピラン、ジヒドロピラン（例えば、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン）、ピロリジン、ピロリン、及びピペリジンなどがある。非芳香族複素環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。非芳香族複素環は、ラクトンを含み得る。

[0034] 本明細書で使用される用語「非芳香族複素環式基」は、0、S及びNから任意に選択される同一又は異なるヘテロ原子を環内に1個以上有する、非芳香族環

式基を意味する。非芳香族複素環式基は、非芳香族複素環の水素原子1個が失われて生じる1価の基である。非芳香族複素環式基は、少なくとも1つの二重結合を有することができる。非芳香族複素環式基の例を挙げると、制限されないが、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル（2,5-ジヒドロフラニル、又は2,3-ジヒドロフラニル）、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル（例えば、3,4-ジヒドロ-2H-ピラニル）、ピロリジニル、ピロリニル、及びペリリジニルなどがある。非芳香族複素環式基は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0035] 本明細書で使用される用語「芳香族炭素環」は、環状の芳香族炭化水素を意味する。芳香族炭素環は、単環、又は二環若しくは三環などの縮合環を含む。芳香族炭素環の1つの環は、例えば、3～10員環、典型的には、3～8員環、3～6員環、4～6員環、5～6員環、又は6員環である。芳香族炭素環の例を挙げると、制限されないが、ベンゼン、ナフタレン、及びアントラセンなどがある。芳香族炭素環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0036] 本明細書で使用される用語「芳香族炭素環式基」は、環状の芳香族炭化水素基を意味する。芳香族炭素環式基は、芳香族炭素環の水素原子1個が失われて生じる1価の基である。芳香族炭素環式基の例を挙げると、制限されないが、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルなどがある。芳香族炭素環式基は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0037] 本明細書で使用される用語「芳香族複素環」は、0、S及びNから任意に選択される同一又は異なるヘテロ原子を環内に1個以上有する、芳香族環を意味する。芳香族複素環は、単環、又は二環若しくは三環などの縮合環を含む。芳香族複素環の1つの環は、例えば、3～10員環、典型的には、3～8員環、3～6員環、4～6員環又は5～6員環である。芳香族複素環の例を挙げると、制限さ

れないが、フラン、ピロール、ピラゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、及びオキサゾールなどがある。芳香族複素環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0038] 本明細書で使用される用語「芳香族複素環式基」は、O、S及びNから任意に選択される同一又は異なるヘテロ原子を環内に1個以上有する、環状の芳香族環式基を意味する。芳香族複素環式基は、芳香族複素環の水素原子1個が失われて生じる1価の基である。芳香族複素環式基の例を挙げると、制限されないが、フラニル、ピロリル、ピラゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、及びオキサゾリルなどがある。芳香族複素環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0039] 本明細書で使用される用語「ラクトン」は、環内にエステル基（-CO-O-）を持つ環状化合物を意味する。環内に少なくとも1つの二重結合を有していてもよい。環は、例えば、3員環、4員環、5員環、6員環、又は7員環である。ラクトンは、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基によって置換されてもよい。

[0040] 本明細書で使用される用語「置換基」とは、ある化学構造式において導入することが可能な、1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の基を意味する。複数の置換基が導入される場合、該置換基は、同一若しくは異なってもよい。置換基の例を挙げると、制限されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシカルボニル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、カルボキシ、アシル、アシルオキシ、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、芳香族複素環式基、及びオキソなどがある。

[0041] （2. 本発明のバイオピリンの分解防止剤）

本発明のバイオピリンの分解防止剤（「本発明の分解防止剤」ともいう）は、エンジオール構造を有する抗酸化物質；又はエンジオール構造を有する

抗酸化物質の塩、エステル、若しくは配糖体；或いは、エンジオール構造を有する抗酸化物質又はエンジオール構造を有する抗酸化物質の塩、エステル、若しくは配糖体の、溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体を含む。エンジオールは、 $-C(OH)=C(OH)-$ である。幾つかの実施態様において、エンジオール構造を有する抗酸化物質は、還元剤として作用し得る。エンジオール構造を有する抗酸化物質は、直鎖状化合物であっても環状化合物であってもよい。

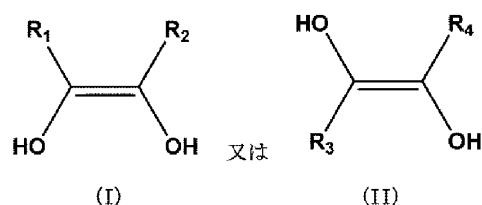
[0042] 塩は、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、又はマグネシウム塩などである。エステルは、例えば、リン酸、ステアリン酸、又はパルミチン酸などと形成されるエステルである。エステルは、カルボン酸エステル、リン酸エステル（例えば、リン酸モノエステル）又はリン酸エステルの塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、又はマグネシウム塩などであり得る。配糖体は、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、又はフルクトースなどの糖と形成されるO-グリコシドである。エンジオール構造を有する抗酸化物質は、塩、エステル又は配糖体を形成させて保存し、使用直前に人工的に、又は生体内の酵素などにより、該エンジオール構造を有する抗酸化物質に変換されてもよい。塩、エステル又は配糖体は、エンジオール構造中のOH基と形成されてもよい。その場合、塩、エステル又は配糖体は、いずれか一方のOH基と形成されてもよいし、両方のOHと形成されてもよい。エンジオール構造を有する抗酸化物質が、エンジオール構造以外のOH基を有する場合、塩、エステル又は配糖体は、該エンジオール構造以外のOH基と形成されてもよい。

[0043] 本発明の分解防止剤は、単体化合物として、複数種の単体化合物の混合物として、又は単体化合物若しくは複数種の単体化合物の混合物を含む組成物として提供され得る。組成物は、溶媒（例えば、水、アルコール又はこれらの混合物）などの賦形剤を含むことができる。

[0044] エンジオール構造を有する抗酸化物質の例を挙げると、制限されないが、下記式(I)若しくは式(II)の化合物、又はその塩、エステル、若しくは配糖体

、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体がある。

[化2]



式中、R₁、R₂、R₃及びR₄は、例えば、それぞれ独立に、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、カルボキシ、アシル、アシルオキシ、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、及び芳香族複素環式基からなる群から選択される。これらのアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、ヒドロキシアルキル、アシル、アシルオキシ、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、及び芳香族複素環式基は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基により置換されていてもよい。

あるいは、R₁とR₂とは、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、非芳香族炭素環、非芳香族複素環、芳香族炭素環、又は芳香族複素環などの環を形成してもよい。該環は、例えば、3員環、4員環、5員環、6員環、7員環又は8員環である。該環は、好ましくは、5員環又は6員環である。非芳香族複素環は、ラクトンを含み得る。該環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基により置換されていてもよい。該環は、非芳香族炭素環、非芳香族複素環、芳香族炭素環、及び芳香族複素環からなる群から選択される同一又は異なる少なくとも2以上の縮合環であってもよい。

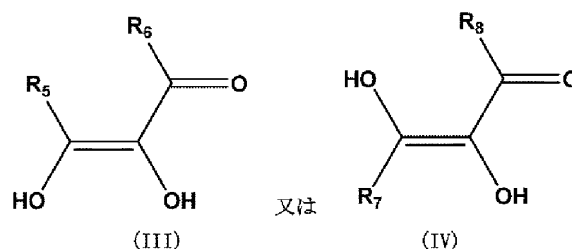
前記置換基は、好ましくは、アルキル；又はヒドロキシ、カルボキシ、アルコキシ、アルコキシカルボニル、オキソ、アシル、及びアシルオキシからなる群から選択される、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ

、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上)の置換基で置換されたアルキルなどである。該置換基は、好ましくは、ヒドロキシアルキルである。

[0045] エンジオール構造を有する抗酸化物質のさらなる例を挙げると、制限されないが、レダクトン、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体などがある。エンジオール構造を有する抗酸化物質の具体的な例を挙げると、制限されないが、アスコルビン酸、タルトロンアルデヒド、レダクチン酸、エリソルビン酸、グルコレダクトン、 α -ピリドイン、 α -ピリドイン誘導体、カテキン、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体などがある。

[0046] レダクトンの例を挙げると、制限されないが、下記式(III)若しくは式(IV)の化合物、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体などがある。

[化3]



式中、 R_5 、 R_6 、 R_7 及び R_8 は、それぞれ、上記式(I)若しくは式(II)において説明した R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 のものと同一であってよい。また、 R_5 と R_6 とは、結合して、上記式(I)若しくは式(II)において説明した R_1 と R_2 とそれらが結合する炭素原子とで形成されるような環を形成してもよい。

例えば、式中、 R_5 、 R_6 、 R_7 及び R_8 は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシカルボニル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、カルボキシ、アシル、アシルオキシ、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、及び芳香族複素環式基から

なる群から選択される。これらのアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、ヒドロキシアルキル、アシル、アシルオキシ、非芳香族炭素環式基、非芳香族複素環式基、芳香族炭素環式基、及び芳香族複素環式基は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基により置換されていてもよい。

あるいは、 R_5 と R_6 とは、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、非芳香族炭素環、非芳香族複素環、芳香族炭素環、又は芳香族複素環などの環を形成してもよい。該環は、例えば、3員環、4員環、5員環、6員環、7員環又は8員環である。該環は、好ましくは、5員環又は6員環である。非芳香族複素環は、ラクトンを含み得る。該環は、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基により置換されていてもよい。該環は、非芳香族炭素環、非芳香族複素環、芳香族炭素環、及び芳香族複素環からなる群から選択される同一又は異なる少なくとも2以上の縮合環であってもよい。

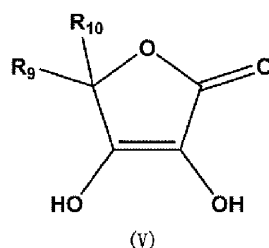
前記置換基は、好ましくは、アルキル；又はヒドロキシ、カルボキシ、アルコキシ、アルコキシカルボニル、オキソ、アシル、及びアシルオキシからなる群から選択される、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基で置換されたアルキルなどである。該置換基は、好ましくは、ヒドロキシアルキルである。

[0047] レダクトンのさらなる例を挙げると、3,4-ジヒドロキシ-フラン-2(5H)-オン（3,4-ジヒドロキシ-2(5H)-フラノンともいう）構造を有する化合物、糖のアルカリ処理により得られる化合物、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体がある。レダクトンの具体的な例を挙げると、アスコルビン酸、エリソルビン酸、タルトロンアルデヒド、レダクチン酸、グルコレダクトン、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体などがある。

[0048] 3,4-ジヒドロキシ-フラン-2(5H)-オン構造を有する化合物は、例えば、下

記式(V)の化合物、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体である。

[化4]



式中、 R_9 及び R_{10} は、それぞれ独立に、水素；アルキル；又はヒドロキシ、カルボキシ、アルコキシ、アルコシカルボニル、オキソ、アシル、及びアシルオキシからなる群から選択される、同一若しくは異なってもよい1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ若しくはそれ以上）の置換基で置換されたアルキルなどである。好ましくは、 R_9 は、ヒドロキシアルキルであり、 R_{10} は、水素である。より好ましくは、 R_9 は、1,2-ジヒドロキシエチルであり、 R_{10} は、水素である。

[0049] 好ましくは、式(V)の化合物は、アスコルビン酸、エリソルビン酸、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体がある。該塩の例を挙げると、制限されないが、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸マグネシウム、エリソルビン酸ナトリウム、又はエリソルビン酸マグネシウムなどがある。該エステルの例を挙げると、制限されないが、パルミチン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、アスコルビルリン酸ナトリウム、アスコルビルリン酸マグネシウム、パルミチン酸エリソルビル、ステアリン酸エリソルビル、エリソルビルリン酸ナトリウム、又はエリソルビルリン酸マグネシウムなどがある。該配糖体の例を挙げると、制限されないが、アスコルビン酸-2グルコシド、アスコルビン酸-6グルコシド、エリソルビン酸-2グルコシド、又はエリソルビン酸-6グルコシドなどがある。アスコルビン酸又はエリソルビン酸は、L体、D体、又

はそれらの任意の割合の混合物（例えば、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、2:1、3:1、4:1、又は5:1）を含むことができる。

[0050] アスコルビン酸などのエンジオール構造を有する抗酸化物質、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体は、商業的に入手可能である。また、当業者であれば、エンジオール構造を有する抗酸化物質、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体は、一般的な有機化学合成手法に基づき、製造することができる。

[0051] （3．本発明のバイオピリンの分解防止剤の使用方法）

本発明の分解防止剤は、バイオピリンの分解を防止するため、特に、生体試料中のバイオピリンの分解を防止するために使用することができる。生体試料中のバイオピリンの分解を防止するために、本発明の分解防止剤が、生体試料に添加される。これにより、本発明の分解防止剤が添加された生体試料、本発明の分解防止剤を含む生体試料、及び本発明の分解防止剤と生体試料との混合物が提供される。本発明の分解防止剤が添加された生体試料は、周囲温度以下で長期間、バイオピリンの分解を抑制することができ、したがって、長期保存が可能である。

[0052] 一実施態様において、本発明の分解防止剤は、生体試料中のバイオピリンの分解を防止する方法に使用される。該方法は、本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程を含む。

さらに本発明の分解防止剤は、生体試料の保存方法に使用することができる。該方法は、

- （a）本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程、及び
- （b）該生体試料を、周囲温度以下で保存する工程、を含む。

[0053] 本発明の分解防止剤は、生体試料中のバイオピリンの測定に何ら影響を与えない。したがって、他の実施態様において、本発明の分解防止剤は、生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する方法に使用される。該方法は、

- （a）本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程、及び

(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程、を含む。

該方法は、前記工程 (a) の後かつ工程 (b) の前に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含むことができる。

[0054] 尿中バイオピリンの濃度は、尿の濃縮具合によって変化され得る。したがって、バイオピリンの濃度は、通常、内部標準としてクレアチニンを用い、その濃度に対する相対量として提供される。したがって、通常、バイオピリンの濃度を測定する際には、同時にクレアチニンの濃度も測定される。本発明の分解防止剤は、生体試料中のクレアチニン濃度の測定に何ら影響を与えない。したがって、一実施態様において、本発明の分解防止剤は、同一生体試料中で、バイオピリンとクレアチニンとの濃度を測定する方法に使用される。この際、バイオピリンの濃度は、内部標準であるクレアチニンの濃度に対する相対量として提供することができる。該方法は、

(a) 本発明の分解防止剤を生体試料に添加する工程、

(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度とクレアチニンの濃度とを測定する工程、を含む。

該方法は、クレアチニン濃度に対するバイオピリン濃度の相対値を算出する工程をさらに含むことができる。バイオピリン濃度の測定とクレアチニン濃度の測定とは、どちらが先であってもよい。該方法は、前記工程 (a) の後かつ工程 (b) の前に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含むことができる。

[0055] バイオピリンは、酸化ストレスマーカー、精神疾患マーカー、及び精神疾患発症危険状態 (ARMS) のマーカーとして知られている。したがって、一実施態様において、本発明の分解防止剤は、対象の酸化ストレス状態を評価する方法に使用される。該方法は、

(a) 本発明の分解防止剤を該対象から得られた生体試料に添加する工程；

(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程、を含む。

該方法は、前記工程 (a) の後かつ工程 (b) の前に、前記生体試料を周

囲温度以下で保存する工程をさらに含むことができる。工程（b）において測定された濃度が参照試料中のバイオピリンの濃度よりも高い場合（例えば、約1.2倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約5倍、約10倍又はそれ以上である場合）、該対象が酸化ストレス状態にあることを示し得る。参照試料は、健常者の生体試料、又は対象の過去（例えば健常時）の生体試料などである。

[0056] 別の実施態様において、本発明の分解防止剤は、対象の酸化ストレスに起因する疾患（例えば、精神疾患）若しくはA R M Sを診断する方法、又はこれらを診断するためのデータの取得方法に使用される。診断は、酸化ストレスに起因する疾患若しくはA R M Sにある対象を特定すること、又は該対象の病期を判定することを含み得る。該方法は、

（a）本発明の分解防止剤を該対象から得られた生体試料に添加する工程；

（b）該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程、を含む。

該方法は、前記工程（a）の後かつ工程（b）の前に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含むことができる。工程（b）において測定された濃度が参照試料中のバイオピリンの濃度よりも高い場合（例えば、約1.2倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約5倍、約10倍又はそれ以上である場合）、該対象が酸化ストレスに起因する疾患を有する可能性があること、又は該対象がA R M Sである可能性があることを示し得る。また、工程（b）において測定された濃度が参照試料中のバイオピリンの濃度よりも高い場合（例えば、約1.2倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約5倍、約10倍又はそれ以上である場合）、該対象の病期が進行していることを示し得る。参照試料は、健常者の生体試料、対象の過去（例えば健常時）の生体試料、又は特定の病期にあることが判明している対象の生体試料などである。

[0057] さらに別の実施態様において、本発明の分解防止剤は、対象の酸化ストレス状態、酸化ストレスに起因する疾患（例えば、精神疾患）若しくはA R M Sの薬物治療の予後を評価する方法、又はこれらを評価するためのデータの取得方法に使用される。また、本発明の分解防止剤は、酸化ストレス状態、

酸化ストレスに起因する疾患（例えば、精神疾患）若しくはA R M Sの治療用若しくは予防用候補薬物をスクリーニングする方法、又はこれらをスクリーニングするためのデータの取得方法に使用される。該方法は、

（a）薬物を投与する前の該対象から得られた生体試料に本発明の分解防止剤を添加する工程；

（b）該生体試料中のバイオピリンの第1の濃度を測定する工程；

（c）薬物を投与した後に該対象から得られた生体試料に本発明の分解防止剤を添加する工程；及び

（d）該生体試料中のバイオピリンの第2の濃度を測定する工程、を含む。

該方法は、前記工程（a）の後かつ工程（b）の前に、並びに/又は前記工程（c）の後かつ工程（d）の前に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含むことができる。該第2の濃度が該第1の濃度よりも低い場合（例えば、約5/6、約3/2、約1/2、約1/3、約1/5、約1/10又はそれ以下である場合）、該薬物によって該酸化ストレス状態、酸化ストレスに起因する疾患、又はA R M Sが改善され、予後が良好であることを示し得る。該第2の濃度が該第1の濃度よりも低い場合（例えば、約5/6、約3/2、約1/2、約1/3、約1/5、約1/10又はそれ以下である場合）、該薬物は、酸化ストレス状態、酸化ストレスに起因する疾患又はA R M Sの治療用若しくは予防用候補薬物となり得る。このようにスクリーニングされた治療用若しくは予防用候補薬物は、対象の酸化ストレス状態、酸化ストレスに起因する疾患又はA R M Sの治療若しくは予防方法に使用することができる。該治療若しくは予防方法は、該治療用若しくは予防用候補薬物を対象に投与することを含む。また、このようにスクリーニングされた治療用若しくは予防用候補薬物は、酸化ストレス状態、酸化ストレスに起因する疾患又はA R M Sの治療用若しくは予防用医薬組成物の製造に使用することができる。該治療用若しくは予防用医薬組成物は、該治療用若しくは予防用候補薬物を含む。該医薬組成物は、溶媒などの医薬として許容し得る賦形剤をさらに含むことができる。

[0058] 酸化ストレスに起因する疾患（例えば、精神疾患）は、制限されないが、

統合失調症、自閉症、アルツハイマー病、認知異常、うつ病、双極性障害（躁うつ病）、脳神経発達障害、妊娠中の感染症による神経障害に起因する認知機能障害、免疫障害に起因する精神障害、てんかん、脳器質性精神障害、中毒性精神障害、知的障害（精神遅滞）、精神病質、神経症、梅毒性精神障害、老年期精神障害、脳血管性精神障害、頭部外傷による精神障害、非定形内因性精神病、内分泌性精神障害及び外因反応型、及び退行期精神障害などがある。

[0059] 本発明の分解防止剤を生体試料に適用する具体的な方法について以下更に説明する。以下の説明は、前記方法のいずれにも適用することができる。

本発明の分解防止剤は、生体試料に添加される。添加後、さらに、混合してもよい。本発明の分解防止剤を生体試料に添加する方法は、特に制限されない。例えば、本発明の分解防止剤は、ピペット、マイクロピペット、又はシリンジなどを用いて添加することができる。本発明の分解防止剤を生体試料に添加する時期は、対象から生体試料を得た後、早ければ早いほどよい。例えば、対象から生体試料を得た後約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、又は約60秒以内である。好ましくは、本発明の分解防止剤は、対象から生体試料を得た直後に添加される。バイオピリンは採取された直後から分解が開始すると考えられるので、たとえ長期保存を意図していなくても、本発明の分解防止剤を添加することが好ましい。

[0060] 本発明の分解防止剤は、エンジオール構造を有する抗酸化物質の最終濃度が、例えば、約0.1 mM～約50 mM、約0.5 mM～約30 mM、約1 mM～約20 mM、約2 mM～約20 mM、約3 mM～約20 mM、約4 mM～約20 mM、約5 mM～約15 mM、約5 mM～約10 mM、好ましくは、約10 mMとなるように添加される。エンジオール構造を有する抗酸化物質の最終濃度は、生体試料の種類、予測される生体試料中のバイオピリンの量、保存方法、及び保存期間などによって変更することができる。

[0061] 生体試料は、対象から採取される。採取方法は、当業者に公知の一般的な方法でよく、特に制限されない。対象は、ヒト又は非ヒト動物を包含する。非

ヒト動物は、例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、又はミニブタなどの非ヒト哺乳動物を含む。対象が非ヒト動物である場合、該対象は、オスであってもメス（妊娠若しくは非妊娠）であってもよい。対象がヒトである場合、該対象は、「被験者」又は「患者」とも呼ばれる。対象がヒトである場合、該対象は、男性であっても女性（妊娠若しくは非妊娠）であってもよい。該対象の年齢は、特に制限されないが、例えば、新生児、乳児、幼児、児童（少年）、青年、壮年、中年、又は老年である。

[0062] 生体試料の種類は、制限されないが、尿、血液（血清、血漿又は全血）、組織、又は細胞などである。好ましくは、生体試料は、尿である。生体試料は、必要に応じて、ホモジナイズ、粉碎、分離（例えば、遠心分離）、濾過、抽出、溶媒の添加、及び/又は界面活性剤の添加などの前処理を受けたものであってもよい。例えば、生体試料が尿である場合、前処理をせずに直接測定を行うことができるが、生体試料が全血であり、測定結果が色で現れる場合には、赤血球が妨害となり判別できない可能性があるため、全血を分離することが好ましい。生体試料は、本発明の分解防止剤を生体試料に添加した後で、測定のために前処理してもよい。生体試料はバイオピリンを含み得るが、本発明の分解防止剤は、バイオピリンが含まれている生体試料、バイオピリンが含まれていることが分かっている生体試料、バイオピリンが含まれている可能性がある生体試料、及びバイオピリンが含まれているか否か不明な生体試料に対して使用することができる。

[0063] 生体試料中のバイオピリンの濃度は、当業者に公知の一般的な方法により測定することができる。例えば、該測定は、HPLC、質量分析、ELISA、及びイムノクロマトグラフィー法によって行うことができる。具体的には、該測定は、レドックスアッセイ バイオピリンELISAキット（メタロジェニクス株式会社）を用いて行うことができる。生体試料中のクレアチニンの濃度も、当業者に公知の一般的な方法により測定することができる。例えば、該測定は、HPLC、質量分析、ELISA、及びイムノクロマトグラフィー法によって行うことができる。具体的には、該測定は、ラボアッセイクレアチニン（富士フイ

ルム和光純薬株式会社)を用いて行うことができる。

[0064] 本発明の分解防止剤が添加された生体試料は、周囲温度以下で長期間、バイオピリンの分解を抑制することができる。したがって、本発明の分解防止剤が添加された生体試料は、長期保存が可能である。周囲温度以下とは、室温（例えば、約10℃～約40℃、約15℃～約35℃、約20℃～約30℃、若しくは約25℃～約27℃）又は低温条件下（例えば、冷蔵庫温度、具体的には、約0℃～約10℃、約0℃～約8℃、約2℃～約6℃、若しくは約2℃～約4℃、又は冷凍庫温度、具体的には、約-80℃以下、約-80℃～約-0℃、約-60℃～約-0℃、約-40℃～約-0℃、約-30℃～約-0℃、約-20℃～約-10℃、約-15℃～約-20℃、若しくは約-18℃）である。好ましくは、該温度は、室温又は約4℃である。保存期間は、約0.5時間～約240時間、約1時間～約120時間、例えば、約30分、約1時間、約3時間、約6時間、約12時間、約24時間（約1日）、約36時間、約48時間（約2日）、約60時間、約72時間（約3日）、約84時間、約96時間（約4日）、約108時間、約120時間（約5日）、約144時間（約6日）、約168時間（約7日）、約192時間（約8日）、約216時間（約9日）、又は約240時間（約10日）、或いは、それ以上である。

[0065] 好ましくは、本発明の分解防止剤が添加された生体試料は、室温で、約24時間（約1日）、約48時間（約2日）、又は約72時間（約3日）以上保存される。好ましくは、本発明の分解防止剤が添加された生体試料は、低温で、約72時間（約3日）、約96時間（約4日）、又は約120時間（約5日）以上保存される。

実施例

[0066] （4．実施例）

以下に本発明の実施例を記載する。下記実施例は、本発明の特許請求の範囲に関する理解を深めるために記載しているものであり、本発明の特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。以下の実施例において、「アスコルビン酸」は、L-アスコルビン酸を意味する。

[0067] （実施例1：バイオピリンの分解防止剤の検討）

抗酸化物質を尿に添加し、尿中バイオピリンの分解が抑えられるか否かについて調査した。抗酸化物質として、アスコルビン酸（富士フィルム和光純薬株式会社）、塩化ナトリウム（富士フィルム和光純薬株式会社）、還元型グルタチオン（ナカライテスク株式会社）、L-システイン（富士フィルム和光純薬株式会社）、リボフラビン（富士フィルム和光純薬株式会社）、及びペルオキシターゼ（富士フィルム和光純薬株式会社）を選択した。

[0068] ヒトから尿を採取し（N=4）、抗酸化物質を添加し、48時間、27℃でインキュベーションした。その後、各試料中のバイオピリン濃度を測定した。標準試料として、ヒトから採取した尿に抗酸化物質を添加せず、-80℃で保存したものを調製した。バイオピリン濃度は、レドックスアッセイ バイオピリンELISAキット（メタロジェニクス株式会社）を用いて測定した。

[0069] 結果を図1及び表1に示す。表中の抗酸化物質の濃度は、最終濃度である。各測定値は、標準試料（抗酸化物質非添加、-80℃で保存）におけるバイオピリン濃度を100%として補正した。抗酸化物質としてアスコルビン酸を用いた場合、バイオピリン濃度は、標準試料のものとほぼ変わらなかった。この結果は、アスコルビン酸が、バイオピリンの分解防止剤として使用できることを示している。

[0070] [表1]

抗酸化物質	バイオピリン相対濃度
アスコルビン酸 10mM	100±3%
アスコルビン酸 3mM	100±5%
塩化ナトリウム	47.3±5%
グルタチオン 0.1mM	46.8±5%
グルタチオン 0.03mM	51.9±11%
リボフラビン 0.1mM	35.5±6%
リボフラビン 0.03mM	17.7±1%
ペルオキシターゼ 1ug/ml	検出限界以下
ペルオキシターゼ 0.3ug/ml	検出限界以下
L-システイン 0.1mM	53.3±7%
L-システイン 0.03mM	49.8±6%
無処置	49.8±6%

[0071] 理論によって拘束されるものではないが、アスコルビン酸は、他の抗酸化物質に比べ、複数種の活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 1O_2) をトラップすることができる。このアスコルビン酸の優れた抗酸化作用は、アスコルビン酸のエンジオール構造によるものであることが知られている（例えば、日医大医会誌2013: 9(3)、特に、p167のFig. 3、及びp168の左欄第2段落を参照されたい。）。本実施例において使用した抗酸化物質の化学構造を考慮すれば、バイオピリンの分解防止には、エンジオール構造を有することが重要であると考えられる。したがって、アスコルビン酸に加えて、エンジオール構造を有する他の抗酸化物質も、バイオピリンに対して同等の分解防止作用を有するものと考えられる。

[0072] （実施例2：過酷な温度環境下における尿中バイオピリン濃度の経時的変化）

本実験は、真夏の過酷な温度環境（約28℃～約32℃）であっても、本願発明の分解防止剤が、尿中バイオピリンの分解を抑制できるかについて調べた。

[0073] 健常人3人（男性2人、女性1人）から尿を採取し、以下の条件（1）～（3）下で尿試料を5日間保存した。標準試料として、ヒトから採取した尿に抗酸化物質を添加せず、-80℃で保存したものを調製した。各尿サンプル中のバイオピリンの濃度を、実験開始から24時間、48時間、72時間、96時間、及び120時間の時点で測定した。該測定は、バイオピリンELISAキット（メタロジェニック社）を用いて行った。

（条件）

- （1）無処置：28℃～32℃で保存
- （2）無処置：4℃で保存
- （3）尿採取後速やかにアスコルビン酸（10 mM）を添加し、28℃～32℃で保存

[0074] 結果を表2に示す。表中の抗酸化物質の濃度は、最終濃度である。各測定値は、標準試料（抗酸化物質非添加、-80℃で保存）におけるバイオピリン濃

度を100%として補正した。表2に示されるように、アスコルビン酸は、過酷な条件下であっても、バイオピリンの分解を抑制できることが分かった。

[表2]

	無処置 (28~32℃)	無処置 (4℃)	アスコルビン酸 10mM添加 (28~32℃)
24時間	58±20%	85.4±2.8%	95.8±7.4%
48時間	33.6±13.1%	74.6±3.7%	98.1±7.5%
72時間	32.7±23.6%	66.1±9.8%	98.4±6.2%
96時間	21.6±17%	48.9±12.3%	84.4±5%
120時間	21.4±12.5%	42.6±10.3%	88.3±8.7%

平均±標準誤差 N=3

[0075] (実施例3：低温条件下における尿中バイオピリンの経時的変化)

本実験は、低温条件下（約4℃）の場合に、本願発明の分解防止剤が、尿中バイオピリンの分解をどの程度抑制できるかについて調べた。

[0076] 実施例2と同じ尿試料を用いた。アスコルビン酸を添加（最終濃度10 mM）し、4℃で保存した。尿試料中のバイオピリンの濃度を、実験開始から24時間、48時間、72時間、96時間、及び120時間の時点で測定した。該測定は、バイオピリンELISAキット（メタロジェニック社）を用いて行った。

[0077] 結果を、表3及び図2に示す。バイオピリンの濃度は、-80℃保存した場合と変化は全くなかった。この結果は、アスコルビン酸10 mMを用い、4℃で保存した場合、確実に120時間以上の保存が可能であることを示している。

[表3]

時間	バイオピリン濃度 (umol/L)
-80℃保存	8.5
24	8.7
48	8.9
72	8.3
96	8.6
120	8.7

[0078] (実施例4：クレアチニンへの影響の確認)

尿中バイオピリンの濃度は、尿の濃縮具合によって変化され得る。したが

って、バイオピリン濃度は、通常、内部標準としてクレアチニンを用い、その濃度に対する相対量として提供される。もし抗酸化物質がクレアチニンの濃度や測定に影響を及ぼす場合、バイオピリンの相対量を正確に測定することができなくなる。そこで、本発明の抗酸化物質が、クレアチニン濃度の測定に影響を及ぼすか否かについて調査した。

[0079] ヒトから尿を採取し（N=4）、アスコルビン酸を添加し、48時間、27℃でインキュベーションした。その後、各試料中のクレアチニン濃度を測定した。標準試料として、ヒトから採取した尿に抗酸化物質を添加せず、-80℃で保存したものを調製した。クレアチン濃度は、ラボアッセイクレアチニン（富士フイルム和光純薬株式会社）を用いて測定した。

[0080] 結果を表4に示す。表中の抗酸化物質の濃度は、最終濃度である。各測定値は、標準試料（抗酸化物質非添加、-80℃で保存）における各成分の濃度を100%として補正した。結果、アスコルビン酸は、クレアチニン濃度の測定に影響を及ぼさないことが分かった。

[表4]

抗酸化物質	クレアチニン相対濃度
アスコルビン酸 10mM	94.6±5%
アスコルビン酸 3mM	98.3±5%
無処置	92.7±10%

[0081] また、実施例2と同様の条件で実験を行い、本実施例と同様にクレアチニン濃度を測定した。結果を表5に示す。表中の抗酸化物質の濃度は、最終濃度である。各測定値は、標準試料（抗酸化物質非添加、-80℃で保存）における各成分の濃度を100%として補正した。アスコルビン酸は、28℃～32℃という過酷な温度環境下であっても、クレアチニン濃度の測定に影響を及ぼさないことが分かった。

[表5]

クレアチニン相対濃度

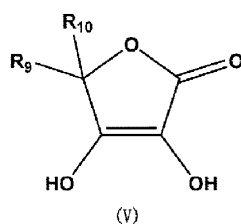
	無処置 (28～32℃)	無処置 (4℃)	アスコルビン酸 5mM添加 (28～32℃)	アスコルビン酸 10mM添加 (28～32℃)
24時間	103±1%	101±1%	106±1%	99.2±0.9%
48時間	102±2%	106±3%	102±0.6%	104±0.9%
72時間	94±2%	105±3.5%	99.1±0.8%	104±2.9%
96時間	95±3%	102±2.4%	94.9±2.7%	103±3.1%
120時間	101±3%	102±2.5%	102±2.5%	103±1.8%

平均±標準誤差 N=3

請求の範囲

- [請求項1] エンジオール構造を有する抗酸化物質、又はその塩、エステル、若しくは配糖体、或いは、その溶媒和物、立体異性体、若しくは互変異性体を含む、バイオピリンの分解防止剤。
- [請求項2] 前記エンジオール構造を有する抗酸化物質が、レダクトンである、請求項1記載の分解防止剤。
- [請求項3] 前記レダクトンが、3,4-ジヒドロキシ-フラン-2(5H)-オン構造を有する化合物である、請求項2記載の分解防止剤。
- [請求項4] 前記3,4-ジヒドロキシ-フラン-2(5H)-オン構造を有する化合物が、式(V)の化合物である、請求項3記載の分解防止剤：

[化1]



(式中、 R_9 及び R_{10} は、それぞれ独立に、水素；アルキル；又はヒドロキシ、カルボキシ、アルコキシ、アルコシカルボニル、オキソ、アシル、及びアシルオキシからなる群から選択される、同一若しくは異なってもよい1つ以上の置換基で置換されたアルキルである。)

- [請求項5] 前記式(V)の化合物が、アスコルビン酸である、請求項4記載の分解防止剤。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか一項記載の分解防止剤が添加された生体試料。
- [請求項7] 尿である、請求項6記載の生体試料。
- [請求項8] 前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質が、約1 mM～約20 mMの範囲内の濃度で存在する、請求項6又は7記載の生体試料。

- [請求項9] 前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質が、約10 mMの濃度で存在する、請求項6～8のいずれか一項記載の生体試料。
- [請求項10] 請求項1～5のいずれか一項記載の分解防止剤を生体試料に添加する工程を含む、生体試料中のバイオピリンの分解を防止する方法。
- [請求項11] 生体試料の保存方法であって、
(a) 請求項1～5のいずれか一項記載の分解防止剤を生体試料に添加する工程、及び
(b) 該生体試料を、周囲温度以下で保存する工程、
を含む、前記方法。
- [請求項12] 生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する方法であって、
(a) 請求項1～5のいずれか一項記載の分解防止剤を生体試料に添加する工程、及び
(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程、
を含む、前記方法。
- [請求項13] 前記工程 (a) の後に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含む、請求項12記載の方法。
- [請求項14] 対象の酸化ストレス状態を評価するためのデータの取得方法であって、
(a) 請求項1～5のいずれか一項記載の分解防止剤を該対象から得られた生体試料に添加する工程；
(b) 該生体試料中のバイオピリンの濃度を測定する工程、を含み、
ここで、該測定された濃度が参照試料中のバイオピリンの濃度よりも高い場合、該対象が酸化ストレス状態にあることを示す、前記方法。
- [請求項15] 前記工程 (a) の後に、前記生体試料を周囲温度以下で保存する工程をさらに含む、請求項14記載の方法。
- [請求項16] 前記生体試料が、尿である、請求項10～15のいずれか一項記載の方

法。

[請求項17] 前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質が、約1 mM～約20 mMの範囲内の濃度となるように添加される、請求項10～16のいずれか一項記載の方法。

[請求項18] 前記分解防止剤に含まれるエンジオール構造を有する抗酸化物質が、約10 mMの濃度となるように添加される、請求項10～17のいずれか一項記載の方法。