

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/112445

発行日 平成20年12月11日 (2008. 12. 11)

(43) 国際公開日 平成18年10月26日 (2006. 10. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/531 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/531	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

出願番号	特願2007-528145 (P2007-528145)	(71) 出願人	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ ジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/308079	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(22) 国際出願日	平成18年4月17日 (2006. 4. 17)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(31) 優先権主張番号	特願2005-118192 (P2005-118192)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
(32) 優先日	平成17年4月15日 (2005. 4. 15)	(72) 発明者	青山 宗夫 日本国茨城県つくば市東光台5丁目1番地 3 エーザイ株式会社 筑波研究所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チトクロムcの免疫化学的測定方法及び測定キット

## (57) 【要約】

体液、特に血中のチトクロムc量を正確に測定する免疫化学的方法、並びに測定キットを提供する。抗体とチトクロムcの反応を酸性領域の緩衝液中で行うことにより、妨害物質の影響を排除でき、正確なチトクロムc量の測定が可能となる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定する方法であって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うことを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

体液が血液である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定するキットであって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うための測定キット。 10

## 【請求項 5】

酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である請求項 4 に記載の測定キット。

## 【請求項 6】

少なくとも、

( 1 ) チトクロム c と反応する抗体及び

( 2 ) 酸性領域で反応させる緩衝液

を含む、請求項 4 又は 5 に記載の測定キット。

## 【請求項 7】

チトクロム c と反応する抗体が、固相化した抗体及び / 又は標識した抗体である、請求項 6 に記載の測定キット。 20

## 【請求項 8】

体液が血液である請求項 4 から 7 のいずれか一項に記載の測定キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、体液、特に血中のチトクロム c を正確に測定する免疫化学的方法、及び測定キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

チトクロム c は古くは電子伝達系の蛋白質として、また、近年ではアポトーシス関連蛋白質として研究され、細胞内のチトクロム c 濃度や血中のチトクロム c 濃度を免疫化学的に測定する方法が知られている ( 非特許文献 1 )。また、血中のチトクロム c 濃度が体内で起こっているアポトーシスの指標となることが知られ ( 非特許文献 2、特許文献 1、2 )、多くの疾患の診断薬としての用途が期待されている。 30

## 【0003】

従来のチトクロム c 測定法や測定キットを用いて体液、特に血中のチトクロム c を測定する場合、その測定値がチトクロム c 量を反映し、体内で起こっているアポトーシスを検査する上で支障が無いことは確認されていた。しかしこれまで、測定値が正確に体液中のチトクロム c 量を反映しているか否かは検証されておらず、体液中のチトクロム c の測定値を正確に求められる測定方法及び測定キットが求められていた。 40

【特許文献 1】 WO 01/35093

【特許文献 2】 特開 2003 028860

【非特許文献 1】 Andrea Renz, et al. Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and markers cell death in vivo, BLOOD, 98(5)1542 1548, 2001

【非特許文献 2】 Z.BEN ARI, et al. Circulating soluble cytochromec in liver disease as marker of apoptosis, Journal of Internal Medicine, 254,168 175,2003

## 【発明の開示】

## 【0004】

本発明の課題は、体液、特に血中のチトクロム c を正確に測定する免疫化学的方法、及び測定キットを提供することにある。

【 0 0 0 5 】

本発明者らは従来のサンドイッチ法で、血清に既知量のチトクロム c を添加し、その測定値を測定する添加回収試験を行ったところ、添加量の多寡を反映した測定値が得られることが判明したものの、添加量を正確に反映した測定値を得ることができなかった。

【 0 0 0 6 】

種々の測定条件について検討した結果、チトクロム c と抗チトクロム c 抗体を反応させる際の緩衝液の pH を酸性領域にすることにより、血清中チトクロム c の正確な測定値を得ることができることを見出して、発明を完成するに至った。

10

【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、以下に関する。

[ 1 ] 体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定する方法であって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うことを特徴とする方法。

[ 2 ] 酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である [ 1 ] に記載の方法。

[ 3 ] 体液が血液である [ 1 ] 又は [ 2 ] に記載の方法。

[ 4 ] 体液中のチトクロム c を免疫化学的に測定するキットであって、抗体とチトクロム c の反応を酸性領域の緩衝液中で行うための測定キット。

[ 5 ] 酸性領域が pH 3.5 から pH 5.0 である [ 4 ] に記載の測定キット。

[ 6 ] 少なくとも、

20

( 1 ) チトクロム c と反応する抗体及び

( 2 ) 酸性領域で反応させる緩衝液

を含む、 [ 4 ] 又は [ 5 ] に記載の測定キット。

[ 7 ] チトクロム c と反応する抗体が、固相化した抗体及び / 又は標識した抗体である、 [ 6 ] に記載の測定キット。

[ 8 ] 体液が血液である [ 4 ] ~ [ 7 ] のいずれか一項に記載の測定キット。

【 0 0 0 8 】

更に本発明者らは、質量解析を用いたプロテオーム技術により、正確なチトクロム c の定量を妨げるヒト血清中の妨害物質が、1 酸性糖蛋白質 ( 1 acid glycoprotein )、1 アンチトリプシン等の酸性度の高い蛋白質であることを明らかにした。

30

【 0 0 0 9 】

本発明は、血清中の酸性度の高い蛋白質がチトクロム c と抗体との結合に影響を与えること、その影響が酸性領域でチトクロム c と抗体を反応させることで無くなることを明らかにしたものであり、酸性度の高い蛋白質が、チトクロム c と抗体との反応に影響を与えることを抑制するその他の方法、例えば反応液の塩濃度を調整する等の方法も、本発明に含まれるものである。

【 0 0 1 0 】

本発明により、体液中、特に血中のチトクロム c を正確に測定する免疫化学的測定法が確立され、チトクロム c 測定値の信頼性が高まる。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 ヒト血清をゲルろ過に付して得られた各フラクションのチトクロム c 測定に対する妨害活性を示す。

【 図 2 】 妨害物質が含まれるフラクションの二次元電気泳動の結果を示す ( 電気泳動写真 ) 。スポットには、同定された蛋白質の名称を付記している。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】

本発明の主題は、体液中、特に血中のチトクロム c の量を測定する免疫化学的測定方法において、酸性領域で抗チトクロム c 抗体とチトクロム c を反応させ、抗チトクロム c 抗体とチトクロム c の結合に影響を与える体液中の妨害物質の影響を減弱させて、正確なチ

50

トクロム c の測定値が得られるようにする方法にある。

【 0 0 1 3 】

従って本明細書でいう酸性領域とは、抗体とチトクロム c の結合に影響を与える体液中の妨害物質の影響が減弱する pH 領域である。pH を低下させることにより妨害物質の影響を減弱させることができるが、同時に抗体とチトクロム c の結合も弱くなるため、本発明の免疫化学的な測定における pH は、下記 1 及び 2 を満たす pH に決められる。

【 0 0 1 4 】

1 . 緩衝液中で 10 ng/mL、好ましくは 1 ng/mL のチトクロム c が定量可能な測定感度が得られる。

2 . 体液存在下での添加回収試験における回収率が 70% 以上、好ましくは 80% 以上、更に好ましくは 90% 以上得られる。

10

【 0 0 1 5 】

抗体とチトクロム c の結合に及ぼす pH の効果は用いる抗体により異なるため、当該免疫化学的測定方法に用いる pH は、抗体毎に最適な pH を定めることができる。好ましくは pH 7 以下、更に好ましくは pH 3 ~ pH 6、更に好ましくは pH 3.5 ~ pH 5、更に好ましくは pH 3.5 ~ pH 4.5 である。

【 0 0 1 6 】

以下に、本発明の免疫化学的な測定における pH を決める方法を具体的に示すが、pH を決める方法は、これに限定されるものではない。

【 0 0 1 7 】

1 . 測定感度への pH の影響

必要により BSA 等の適当な蛋白質、NaCl 等の適当な塩類、必要により適当な界面活性剤他を含む pH 3 ~ pH 7.5 の緩衝液に、チトクロム c を 1 ~ 1000 ng/mL に希釈する。

20

【 0 0 1 8 】

当該免疫化学的な測定法が 2 ステップサンドイッチ法の場合、希釈したチトクロム c と固相化した抗チトクロム c 抗体を反応させ、洗浄後、標識した抗チトクロム c 抗体を加えて標識物質に対応した活性、放射性標識であれば放射活性、酵素標識であれば酵素活性により標識物質を検出する。

【 0 0 1 9 】

また、当該免疫化学的な測定法が 1 ステップサンドイッチ法の場合、希釈したチトクロム c と固相化した抗チトクロム c 抗体、標識した抗チトクロム c 抗体を加えて反応させ、標識物質に対応した活性、放射性標識であれば放射活性、酵素標識であれば酵素活性により標識物質を検出する。

30

【 0 0 2 0 】

10 ng/mL、好ましくは 1 ng/mL のチトクロム c を含む検体から得られるシグナルが、チトクロム c を含まない緩衝液のみの検体のシグナルと比較して十分に強ければ、当該 pH は免疫化学的測定法に用いる緩衝液の pH の候補として挙げられる。

【 0 0 2 1 】

2 . 添加回収への pH の影響

免疫化学的測定法に用いる検体に対応した体液、例えば血清中のチトクロム c を測定するのであれば血清に、既知量のチトクロム c を添加する。チトクロム c を添加した血清、及び添加しなかった血清中のチトクロム c 量を、当該免疫化学的な方法により測定し、理論値に対する測定値の比率を回収率とする。

40

【 0 0 2 2 】

回収率は、添加したチトクロム c 量を A、チトクロム c 未添加血清中のチトクロム c 測定値を B、チトクロム c 添加血清中のチトクロム c 測定値を C として、

(1). 測定値 ( C ) / 理論値 ( A と B の加重平均 )、

(2). チトクロム c 添加による測定値の上昇値 ( C - B ) / 添加量 ( A )、

の何れでも計算できる。

【 0 0 2 3 】

50

回収率が70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の場合、当該pHは免疫化学的測定法に用いる緩衝液のpHの候補として挙げられる。

【0024】

当該免疫化学的方法に用いる緩衝液のpHは1．測定感度へのpHの影響、2．添加回収へのpHの影響を勘案して決定する。

【0025】

また本発明の、免疫化学的なチトクロムcの測定に当たり、酸性領域の緩衝液を用いる方法は、固相化した抗体と検体中のチトクロムcとを反応させる第1反応のみならず、第1反応で妨害物質が除去しきれなかった時に、第2反応(チトクロムcと標識抗体を反応させる工程)に用いても有効である。

本発明の方法は、第1反応で酸性領域の緩衝液を用いる方法に限られるものではない。

【0026】

血液中のチトクロムcとチトクロムcに対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液は、上記1．測定感度へのpHの影響、2．添加回収へのpHの影響を勘案して決定される。緩衝液の種類は、酸性条件に調整し得る緩衝液であれば特に制限されないが、例えばこはく酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液などが挙げられる。

【0027】

本発明の方法は、上述のように、酸性領域で抗チトクロムc抗体とチトクロムcを反応させる他は、通常の、体液中のチトクロムcの量を測定する免疫学的方法と同様でよい。

【0028】

ここで免疫化学的方法とは、チトクロムcに対する抗体を用いて、チトクロムcを定量する方法である。免疫化学的方法としては、チトクロムcを標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体コートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法等、様々な方法があるが、チトクロムcに対する抗体を用いた方法であれば、本発明の方法に含まれる。抗チトクロムc抗体は、チトクロムcを検出できるものであれば特に制限はなく、IgG、IgG F(ab')<sub>2</sub>フラグメントやFabフラグメントでもよく、モノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また抗体は固相化されたものでも、標識されたものでもよい。標識には、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ピオチン標識等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。抗体の作製法及び標識法は、例えば続生化学実験講座5免疫生化学研究法(社団法人日本生化学会編 株式会社東京化学同人発行)または新生化学実験講座12分子免疫学III(社団法人日本生化学会編株式会社東京化学同人発行)に記載されている。

【0029】

本明細書中において体液としては、生体より採取された血液・血漿・血清・脳脊髄液・臍帯血・尿・羊水・気管支肺洗浄液等が挙げられるが、このうち血液が好ましい。

【0030】

本発明の方法では、通常には、酸性領域で抗チトクロムc抗体と試料中のチトクロムcを反応させた後に、反応したチトクロムcの検出を行う。検出は、好ましくは洗浄を行った後、標識された2次抗体を反応させ、標識に応じた検出法により、検出する方法が挙げられる。例えば、ピオチン標識された2次抗体を用いる場合は、さらに、アビジン標識されたペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素を反応させた後、該酵素の基質を用いて発光又は発色により検出することができる。また、酵素標識された2次抗体、蛍光標識された2次抗体、ルテニウム標識された2次抗体などを用いてもよい。

【0031】

チトクロムcを測定する免疫化学的方法の例としては、例えば下記の参考例に記載した方法で調製したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体を用いる方法が挙げられる。

【0032】

さらに本発明は、体液中のチトクロムcを免疫化学的に測定するキットに関する。本発明のキットは、抗チトクロムc抗体とチトクロムcの反応を酸性領域の緩衝液中で行うための測定キットである。例えば、キット付属の使用説明書に、酸性条件でチトクロムcと

10

20

30

40

50

抗チトクロム c 抗体の反応を行う旨が記載されたキットが挙げられる。また、酸性に調整した反作用緩衝液を含むキットでもよい。本発明のキットは抗チトクロム c 抗体の他に、2次抗体、チトクロム c 標準液、希釈液、洗浄液、検出用の基質などを含むものでもよい。

#### 【0033】

通常には、本発明のキットは、体液、特に血液中のチトクロム c をチトクロム c に対する抗体を用いて定量するための試薬（チトクロム c 測定試薬）を含む。チトクロム c 測定試薬の一例として、サンドイッチ法によりチトクロム c を測定する測定試薬は、例えば1).抗チトクロム c 抗体コートカップ、あるいは抗チトクロム c 抗体コートビーズ、2).標識抗チトクロム c 抗体を含み、好ましくは更に3).既知濃度のチトクロム c 標準液、4).希釈液、5).洗浄液を含有する試薬である。更に酵素標識であれば、6).発色基質、7).反応停止液が含まれてもよい。

10

#### 【0034】

本発明の測定キットは、血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液を含むことが好ましい。

#### 【0035】

本発明の測定キットに含まれる緩衝液は、そのまま反応に用いることができる緩衝液であっても、希釈して用いる緩衝液であっても許される。また、適当な量の酸性あるいはアルカリ性の溶液を加えて本発明に適した酸性領域のpHとなるように調整されたもの、あるいはその様な指示書を含むものであっても良い。

20

#### 【実施例】

#### 【0036】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

#### 【0037】

##### [参考例1] 抗チトクロム c IgGの精製

ラットチトクロム c (シグマ社製) をウサギに免疫し、チトクロム c に対する抗血清を得た。その抗血清に最終濃度2 Mになるように硫酸アンモニウムを添加し、室温(20-30)で5時間攪拌した。攪拌した溶液を10000回転で30分遠心し上清を捨て、沈殿物に0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.2を加え溶解後、0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.2にて透析した。

#### 【0038】

透析した溶液を、ウシチトクロム c (シグマ社) を結合したCNBr Sepharose4B (GEヘルスケアバイオサイエンス社) カラムに流し、0.15M NaClを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5でカラムを洗浄後、0.1 M塩酸グアニジンでIgGを溶出した。溶出されたIgGを0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で透析し抗チトクロム c IgG精製物とした。

30

#### 【0039】

##### [参考例2] 抗チトクロム c IgG(F(ab'))<sub>2</sub>:ポリクローナル抗体の調製

精製した抗チトクロム c IgGを0.1 M酢酸緩衝液pH 4.2で透析し、ペプシン(シグマ社)を蛋白質濃度比で20:1の割合になるように加え、37°Cで16時間反応させた。1 N NaOHを加えpHを7.5に調整し、0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で平衡化したSephacryl S 200 (GEヘルスケアバイオサイエンス社) カラムに流しゲル濾過を行った。フラクションの第一ピークを集め、濃縮し、抗チトクロム c IgG F(ab')<sub>2</sub>:ポリクローナル抗体とした。

40

#### 【0040】

##### [参考例3] 抗チトクロム c モノクローナル抗体の作製

ヒトチトクロム c (R&D Systems社) 110 µg/100 µLと65 mMリン酸緩衝液pH 7.5に溶解した2 mg/mLオブアルブミン55 µLを混合して、そこへ65 mMリン酸緩衝液pH 7.5で希釈した1 mMグルタルアルデヒド42 µLを加え、室温で2時間攪拌した。次に、0.15 M NaClで48時間透析し、等量のFCAとアジュバントを作製し、BALB/Cマウス腹腔に0.1 mL免疫した。2週間おきに合計3回同様に免疫した。3回目の免疫の2週間後、マウスに生理食塩水に溶解したヒトチトクロム c 50 µg/100 µLを尾静脈より静注した。3日後マ

50

ウスから脾臓を摘出して、常法に従い、脾臓リンパ球をポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞P3X63 Ag8U.1と細胞融合した。ヒトチトクロムcを抗原としてスクリーニングを行い、ヒトチトクロムcに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(clone: 3G7および27G9)を樹立した。

#### 【0041】

樹立したハイブリドーマをエスクロンSF B培地(三光純薬社)で培養して増殖させ、BALB/Cマウス腹腔に接種した。1週間後、腹水を採取した。採取した腹水からプロテインAを用いてIgGを精製し、抗チトクロムc抗体(3G7抗体および27G9抗体)を得た。

#### 【0042】

##### [参考例4] 抗チトクロムc抗体固相化ビーズの作製

抗チトクロムcモノクローナル抗体(clone: 2B5F8(R&D Systems社)またはclone: 6H2.B4(Becton Dickinson社))を、0.15M NaClを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2)で透析し、OD 280 nmが0.56になるよう0.15M NaClを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2)で希釈した。希釈した抗体1.67 mLを、あらかじめ磁石を用いて0.15M NaClを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2) 3 mLで3回洗浄したビーズ(Dynabeads<sup>®</sup> M 450 Epoxy, Dynal社) 3.36 mL分と混合し、室温で17時間攪拌した。次にビーズをブロッキングバッファー(50 mM Tris・HCl, 1% BSA, 0.15 M NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH7.5) 3 mLで懸濁し、室温で7時間攪拌してビーズをブロッキングした。ブロッキングされたビーズを使用時に濃度を調整して測定に用いた。

#### 【0043】

##### [参考例5] ルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体の作製

参考例3で作製した抗チトクロムcモノクローナル抗体(3G7抗体または27G9抗体)あるいは参考例2で作製した抗チトクロムc IgG F(ab')<sub>2</sub>ポリクローナル抗体をPBSで透析し、抗体濃度を0.5 mg/mLから2 mg/mLの範囲に調製する。抗体1 mLに、ジメチルスルホキシドに10mg/mL濃度で溶解したルテニウム錯体(ruthenium(II) tris(bipyridyl) N hydroxysuccinimide, IGEN Corp. USA)を12.2 μL加え室温で30分攪拌した。次に2 M グリシンを50 μL加え、室温で10分攪拌した。それを、PBS 3(10 mMリン酸カリウム, 0.15M NaCl, 0.05% NaN<sub>3</sub>, pH 6.0)であらかじめ平衡化したSephadex G 25(GEヘルスケアバイオサイエンス社)カラム(1.5 cm x 30 cm)にアプライしてPBS 3で溶出し、1 mLでフラクション分取した。各フラクションのOD 280 nmを測定し、第1ピークのフラクションを集めルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体とした。抗体濃度をMicro BCA protein Assay kit(PIERCE社)を用いて測定した。

#### 【0044】

##### [参考例6] ヒトチトクロムc標準抗原の調製

チトクロムc標準抗原は、ヒトチトクロムc(R&D Systems社)を5% BSA、0.15 M NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.15 Mリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.4で1000 ng/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mLに希釈して作製した。

#### 【0045】

##### [実施例1] ヒト血清中のチトクロムc測定値に対するpHの影響

緩衝液に30、100、500、1000 ng/mLとなるように希釈したヒトチトクロムc(抗原1、抗原2、抗原3、抗原4)、血清1、血清2及び血清3の20 μLを、酸性検体希釈液(0.15M NaCl, 15mM EDTA, 5% N102(日本油脂社製), 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.1 Mクエン酸リン酸緩衝液pH 4.0)、または中性検体希釈液(0.15M NaCl, 15mM EDTA, 5% N102(日本油脂社製), 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液pH 7.5) 200 μLに加えた。

#### 【0046】

以下の測定は、電気化学発光酵素免疫測定機ピコルミ<sup>®</sup> 8220(三光純薬社)を用いて行った。

#### 【0047】

1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01 容量% Tween 20, 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.15 M PBS, pH 7.5でビーズ濃度1mg/mLに調整した抗チトクロムc抗体固相化ビーズ25 μLを加えて9分反応

させ、ピコルミ<sup>®</sup> BF洗淨液（三光純薬社）350  $\mu$ Lで2回洗淨後、1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01 容量% Tween 20, 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.15 M PBS, pH 7.5で0.5 - 1  $\mu$ g/mL濃度に調整したルテニウム錯体標識抗チトクロム c 抗体200  $\mu$ Lを加えて9分反応させた。ピコルミ<sup>®</sup> BF洗淨液350  $\mu$ Lで2回洗淨後、ピコルミ<sup>®</sup> 発光電解液（三光純薬社）を300  $\mu$ L加えて発光カウント値を計測した。

【0048】

横軸にヒトチトクロム c 標準抗原濃度、縦軸にヒトチトクロム c 標準抗原のカウント値をプロットして標準曲線を描き、その標準曲線を基に、抗原 1、抗原 2、抗原 3、抗原 4、血清 1、血清 2 及び血清 3 の発光カウント値からそれぞれに含まれるチトクロム c 量を算出した。

【0049】

次いで、抗原と抗原、あるいは抗原と血清をそれぞれ10  $\mu$ Lずつ混合し、同様に酸性検体希釈液あるいは中性検体希釈液200  $\mu$ Lを加えて、電気化学発光酵素免疫測定法にてチトクロム c 量を算出して、その実測値と理論値を比較して回収率を求めた。ビーズに抗チトクロム c モノクローナル抗体6H2.B4抗体を固相化し、ルテニウム錯体標識抗体として抗チトクロム c IgG F(ab')<sub>2</sub>ポリクローナル抗体を用いた結果を表 1 に、ビーズに2B5F8モノクローナル抗体を固相化し、ルテニウム錯体標識抗体として27G9モノクローナル抗体を用いた結果を表 2 に示す。

【0050】

どちらの抗体系を用いた場合においても、抗原のみの場合はpHにかかわらず100%に近い回収率を示すのに対し、血清が加わるとpH 7.5では回収率が20%近くまで低下し、pH 4にすることで回収率が100%に回復することが明らかとなった。

【0051】

また、どちらの組合せの抗体を用いた場合でも、pH 4の緩衝液中での測定感度が、1 ng/mL以上であることが確認され、この条件が感度・回収率の両方を満たすものであることが示された。

【0052】

【表 1】

表 1

6H2B4-Poly抗体  
pH 7.5

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	28.8	抗原1 抗原2	73.4	75.7	97.0%
抗原2	122.5	抗原3 抗原4	748.9	717.7	104.3%
抗原3	623.5	抗原2 血清3	13.6	68.1	20.0%
抗原4	811.9	抗原1 血清2	4.0	16.7	24.0%
血清1	2.6	抗原4 血清1	113.5	407.3	27.9%
血清2	4.5				
血清3	13.6				

6H2B4-Poly抗体  
pH 4

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	29.6	抗原1 抗原2	68.0	71.7	94.8%
抗原2	113.8	抗原3 抗原4	750.1	733.9	102.2%
抗原3	616.8	抗原2 血清3	111.9	110.0	101.8%
抗原4	850.9	抗原1 血清2	35.0	38.1	91.9%
血清1	29.0	抗原4 血清1	535.0	440.0	121.6%
血清2	46.6				
血清3	106.1				

【表 2】

表 2

2B5F8-27G9抗体  
pH 7.5

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	30.2	抗原1 抗原2	80.2	76.8	104.5%
抗原2	123.3	抗原3 抗原4	761.5	715.1	106.5%
抗原3	587.7	抗原2 血清3	2.2	62.8	3.5%
抗原4	842.5	抗原1 血清2	0.3	15.4	1.9%
血清1	0.3	抗原4 血清1	35.9	421.4	8.5%
血清2	0.6				
血清3	2.3				

2B5F8-27G9抗体  
pH 4

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	29.2	抗原1 抗原2	81.8	75.7	108.1%
抗原2	122.1	抗原3 抗原4	761.4	728.5	104.5%
抗原3	595.5	抗原2 血清3	101.7	93.8	108.5%
抗原4	861.5	抗原1 血清2	32.6	29.6	110.3%
血清1	19.1	抗原4 血清1	468.7	440.3	106.5%
血清2	29.9				
血清3	65.4				

【 0 0 5 3 】

[ 実施例 2 ] こはく酸緩衝液を用いたヒト血清中のチトクロムc測定

クエン酸リン酸緩衝液に代えてこはく酸緩衝液を用いてヒト血清中のチトクロム c の測定を行った。

【 0 0 5 4 】

検体希釈液 ( 0.1M こはく酸, 0.15M NaCl, 2% リピジュアBL802 ( 日本油脂社 ), 2% リピジュアBL405 ( 日本油脂社 ), 15mM EDTA・2Na, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH4.0 ) 200 μ Lに、緩衝液 ( 0.05M Tris・HCl, pH7.8, 5% BSA, 0.15M NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> ) で5、10、100、1000、3000 ng/mLとなるように希釈したヒトチトクロム c ( 抗原 1、抗原 2、抗原 3、抗原 4、抗原 5 )、血清 1、血清 2、血清 3 及び血清 4 の20 μ Lを加えた。

【 0 0 5 5 】

以下の測定は、電気化学発光酵素免疫測定機ピコルミ<sup>®</sup> 8 2 2 0 ( 三光純薬社 ) を用いて行った。

【 0 0 5 6 】

1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% トレハロース, 0.01 v/v % Tween20, 10 mM EDTA・2Na, 25 μ g/mLマウスIgG, 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.05 M Tris・HCl, pH7.5, でビーズ濃度1mg/mLに調整した抗チトクロム c 抗体固相化ビーズ25 μ Lを加えて9分反応させ、ピコルミ<sup>®</sup> BF洗浄液 ( 三光純薬社 ) 350 μ Lで2回洗浄後、1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% トレハロース, 0.01 v/v % Tween20, 0.3% NaN<sub>3</sub>を含む0.05M Tris・HCl, pH7.5で濃度1 μ g/mLに調整したルテニウム錯体標識抗チトクロム c 抗体200 μ Lを加えて9分反応させた。ピコルミ<sup>®</sup> BF洗浄液350 μ Lで2回洗浄後、ピコルミ<sup>®</sup> 発光電解液 ( 三光純薬社 ) を300 μ L加えて発光カウント値を計測した。

【 0 0 5 7 】

横軸にヒトチトクロム c 標準抗原濃度、縦軸にヒトチトクロム c 標準抗原のカウント値をプロットして標準曲線を描き、その標準曲線を基に、抗原 1、抗原 2、抗原 3、抗原 4、抗原 5、血清 1、血清 2、血清 3 及び血清 4 の発光カウント値からそれぞれに含まれるチトクロム c 量を算出した。

【 0 0 5 8 】

ビーズに抗チトクロム c モノクローナル抗体2B5F8抗体を固相化し、ルテニウム錯体標識抗体として抗チトクロム27G9モノクローナル抗体あるいは6H2.B4モノクローナル抗体を用いた結果を表3に示す。この試薬を用いた場合においても、回収率が100%を示し、測定感度が、1 ng/mL以上であることが確認され、この条件も感度・回収率の両方を満たすものであることが示された。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

【表3】

表3

## 2B5F8-27G9抗体

チトクロムc定量値 (ng/mL)	抗原の組み合わせ		実測値	理論値	回収率
	(A)	(B)	(C)	(D) = ((A)+(B))/2	(C)/(D)
抗原1 5.0	抗原1	血清1	14.7	13.5	109.3%
抗原2 10.2	抗原2	血清1	16.5	16.1	102.8%
抗原3 97.1	抗原2	血清2	46.3	43.4	106.8%
抗原4 1033.2	抗原3	血清2	86.6	86.8	99.8%
抗原5 2927.1	抗原3	血清3	331.6	304.5	108.9%
血清1 21.9	抗原4	血清3	740.5	772.6	95.9%
血清2 76.5	抗原4	血清4	1205.4	1243.1	97.0%
血清3 511.9	抗原5	血清4	2195.7	2190.0	100.3%
血清4 1452.9					

## 2B5F8-6H2. B4抗体

チトクロムc定量値 (ng/mL)	抗原の組み合わせ		実測値	理論値	回収率
	(A)	(B)	(C)	(D) = ((A)+(B))/2	(C)/(D)
抗原1 4.6	抗原1	血清1	12.1	12.4	98.0%
抗原2 9.2	抗原2	血清1	14.3	14.7	97.6%
抗原3 108.3	抗原2	血清2	44.9	42.8	104.9%
抗原4 1090.0	抗原3	血清2	91.8	92.4	99.4%
抗原5 2859.8	抗原3	血清3	370.3	324.7	114.1%
血清1 20.1	抗原4	血清3	794.4	815.5	97.4%
血清2 76.4	抗原4	血清4	1339.8	1276.7	104.9%
血清3 541.0	抗原5	血清4	2072.1	2161.6	95.9%
血清4 1463.4					

## 【0060】

[実施例3] チトクロムcの正確な測定を妨げるヒト血清中の妨害物質の同定

## (1) ヒト血清のゲルろ過

ヒト血清2mLを、PBSを溶出液としてSephacryl S 200 (GEヘルスケアバイオサイエンス社)カラムゲルクロマトグラフィー(サイズ 2.5cm × 120cm)によりゲルろ過し、1フラクション約7 mLで分取した。各フラクション0.5 mLに、ヒトチトクロムc (R&D Systems社)を10 µg/mLの濃度に精製水で溶解したものを50 µL加えて混合し、その50 µLを反応用溶液(0.15 M PBS, 15 mM EDTA, 1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH 7.5) 50 µLで希釈した。これを、電気化学発光免疫自動測定機ピコルミ<sup>®</sup>8220 (三光純薬社)を用い、参考例で作製した抗チトクロムc抗体(2B5F8)結合ビーズ、1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01容量% Tween20, 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.15M PBS, pH7.5で2 µg/mLに希釈した参考例で作製したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体(3G7)、ピコルミ<sup>®</sup>発光電解液(三光純薬社)、ピコルミ<sup>®</sup>BF洗浄液(三光純薬社)、ピコルミ<sup>®</sup>セルクリナー液(三光純薬社)、ピコルミ<sup>®</sup>ノズルリンス液(三光純薬社)をセットし、抗チトクロムc抗体結合ビーズ分注量25 µL、ルテニウム標識抗チトクロムc抗体分注量100 µL、ピコルミ<sup>®</sup>発光電解液分注量300 µL、1ステップ

、反応時間26分の条件で測定した。

【 0 0 6 1 】

その結果、フラクションNo.41付近で発光カウント値が減少した。したがって、フラクションNo.41にチトクロムcと抗チトクロムc抗体との反応を阻害する妨害物質が含まれていることがわかった(図1)。

【 0 0 6 2 】

(2) 妨害物質が含まれるフラクションの2次元電気泳動と質量分析による同定

Hiroyuki Katayama et al., Optimization of in gel protein digestion system in combination with thin gel separation and negative staining in 96 well plate format : Rapid Commun. in Mass Spectrom. 2003; 17 : 1071 1078に記載されている方法を参考にして、妨害物質が含まれるフラクションを2次元電気泳動で分離し、各スポットを質量分析により同定した(プロテオーム技術)。

【 0 0 6 3 】

ゲルろ過フラクションNo.41の0.5 mLをSwell Gel<sup>®</sup>Blue Albumin Removal kit (PIERCE社)を用いて、アルブミン除去処理した。次に、二次元電気泳動を行うため、膨潤バッファ(8 M 尿素, 2%CHAPS, 0.5% IPG Buffer, プロモフェノールブルー, 0.6% ジチオスレイトール)0.44 mLとアルブミン除去したゲルろ過フラクション0.11 mLを混合し、そこへ等電点電気泳動用ゲルImmobilize Dry Strip pH3 10, 18cm (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を浸し、室温で一晩放置し、ゲルを膨潤させた。ゲルをCoolPhoreStarIPG IEF Type P (アナテック社)にセットし、PowerPhoreStar Pro (アナテック社)で500V2h, 700V1h, 1000V1h, 1500V1h, 2000V1h, 2500V1h, 3000V1h, 3500V10h~の電圧をかけて、電気泳動を行った。泳動したゲルをSDS処理バッファ(50 mM Tris・HCl, pH 6.8, 6 M 尿素, 0.25% ジチオスレイトール, 2% SDS, 0.0025%プロモフェノールブルー, 30容量% グリセロール)に浸して室温で10min攪拌し、次に、還元アルキル化処理バッファ(50 mM Tris・HCl, pH 6.8, 6 M 尿素, 2%SDS, 0.0025%プロモフェノールブルー, 30容量% グリセロール, 4.5%ヨードアセトアミド)に浸して室温で10 min攪拌した後、2Dクイックゲル(アナテック社)にセットし、電気泳動した。泳動したゲルをCoomasie Brilliant blueで染色して、スポットをカッターで切り出した。

【 0 0 6 4 】

切り出したゲルをカッターで細かく砕き、チューブに入れ50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>:アセトニトリル=1:1を100 μL注入し、室温で60分攪拌した。50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>:アセトニトリル=1:1を入れ替え、さらに室温で40分攪拌しCoomasie Brilliantblueを脱色した。

【 0 0 6 5 】

洗浄液(50% メタノール、10% 酢酸、40% 精製水)100 μLで置換し、4℃で保存一時保存した。洗浄液を除去し、50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>:アセトニトリル=1:1を用いて100 μL/tubeで3回洗浄した。次に、100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を100 μL/tube入れて、室温で5分間攪拌した。液を除去し、DTT 2.5 mg/mLを含む100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を100 μL/tube入れて、15分間攪拌した。液を除去し、アクリルアミド45 mg/mLを含む100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を100 μL/tube入れ15分間攪拌した。液を除去し、メタノール:酢酸:精製水=5:1:4を500 μL/tube入れ、室温で16時間攪拌した。液を入れ替えてさらに室温で30分間攪拌した。液を除去し、50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を500 μL/tube入れ、室温で10分間攪拌した。液を除去し、アセトニトリル500 μL/tube入れ、室温で5分間攪拌した。

【 0 0 6 6 】

チューブのふたを開け、減圧遠心乾燥機(トミー精工社、Speed vac)にセットし、乾固するまで減圧乾燥させた。次に、0.2% n オクチルグルコシド(シグマ社)液:50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>=1:1液45 μLに200 μg/mLトリプシンを5 μL加えた液を2.5 μLとり、乾燥させたゲルに加え、室温で5分間反応させた。そこへ50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>:0.2% n - オクチルグルコシド液=1:1を8 μL加え、37℃で16時間放置した。そこへ、0.1% TFAを含む50% アセトニトリルを40 μL加え、10分間超音波水槽にかけた。液を別なチューブに移し、残ったゲルに、0.1% TFAを含む75%アセトニトリルを40 μL入れ、超音波水槽で10分間処理した。液を取り

出し、先に別チューブに移しておいた液と合わせた。次に、凍結真空乾燥機で液を乾燥させた。

【 0 0 6 7 】

乾燥させたサンプルに0.1% TFAを含む5%アセトニトリルを50  $\mu$ L入れ、攪拌してサンプルを溶解した。C18逆相クロマトグラフィー用ゲルを詰め、あらかじめメタノール200  $\mu$ Lと50  $\mu$ Lで2回洗浄したカラムに、溶解したサンプルを全量アプライした。2000 rpm、5分遠心し、アプライしたサンプルを完全に流した。次に、カラムに0.1% TFAを含む5%アセトニトリルを50  $\mu$ L入れ、2000 rpm、5分遠心し洗浄した。この洗浄を3回行った。次に、0.1% TFAを含む95%アセトニトリルを25  $\mu$ L入れ、2000 rpm、5分遠心しサンプルを溶出した。溶出された液を37 に放置し、液を乾燥させた。

10

【 0 0 6 8 】

0.1% TFAを含む5%アセトニトリルをチューブに入れてサンプルを溶解し、LC MASS分析装置（サーモエレクトロン社、LCQ）を用いて、質量解析を行い、二次元電気泳動において得られたスポットを同定した。結果を図2に示した。

【 0 0 6 9 】

(3) 同定された蛋白質のチトクロムc測定に対する影響

同定された蛋白質のうち、アルブミンを除く市販されていて入手可能なものについて、蛋白質をチトクロムcの測定系に添加して、チトクロムc測定を行い、妨害活性があるか調べた。

【 0 0 7 0 】

- 1).ヒトトランスフェリン(Biogenesis社)6.5 mgを精製水0.65 mLで溶解し10 mg/mLのトランスフェリン溶液を調製した。
- 2).ヒト  $\alpha$ 1酸性糖蛋白質 (Athens Research&Technology社) 1 mgを0.5 mLのPBS 1で溶解し、  $\alpha$ 1酸性糖蛋白質溶液とした。
- 3).ヒト  $\alpha$ 1アンチトリプシン (CALBIOCHEM社) 1 mgを0.33 mLの精製水で溶解し、  $\alpha$ 1アンチトリプシン溶液とした。
- 4).ヒトトランスチレチン(プレアルブミン) (Sigma社) 1 mgを0.3 mLの0.15 M NaClを含む50mM リン酸緩衝液pH 7.5で溶解しトランスチレチン溶液とした。
- 5).ヒトビタミンD結合蛋白質(Gc グロブリン)(CALBIOCHEM社)1 mgを0.5 mLの精製水で溶解し、ビタミンD結合蛋白質溶液とした。

20

【 0 0 7 1 】

反応用溶液 (0.15M PBS, 15 mM EDTA, 1% BSA, 0.1%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.5) 100  $\mu$ Lに、同定された蛋白質の溶液を0または10  $\mu$ L、ヒトチトクロムc (10  $\mu$ g/mL) を1  $\mu$ L添加した。これを、電気化学発光免疫自動測定機ピコルミ<sup>®</sup>8220 (三光純薬社)を用い、参考例で作製した抗チトクロムc抗体(2B5F8)結合ビーズ、ルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体(27G9)、ピコルミ<sup>®</sup>発光電解液 (三光純薬社)、ピコルミ<sup>®</sup>BF洗浄液 (三光純薬社)、ピコルミ<sup>®</sup>セルクリーナー液 (三光純薬社)、ピコルミ<sup>®</sup>ノズルリンス液 (三光純薬社)をセットし、抗チトクロムc抗体結合ビーズ分注量25  $\mu$ L、ルテニウム標識抗チトクロムc抗体分注量100  $\mu$ L、ピコルミ<sup>®</sup>発光電解液分注量300  $\mu$ L、1ステップ、反応時間26分の条件で測定した。その結果、  $\alpha$ 1酸性糖蛋白質および  $\alpha$ 1アンチトリプシンに添加回収率の低下が認められ、妨害活性を有することがわかった (表4)。

30

40

【 0 0 7 2 】

【表 4】

表 4

同定された蛋白質	添加回収率 (対照に対する%)
トランスフェリン	99%
α1 酸性糖蛋白質	40%
α1 アンチトリプシン	58%
トランスチレチン	100%
ビタミン D 結合蛋白質	93%

## 【 0 0 7 3 】

( 4 ) 同定された妨害物質の酸性領域でのチトクロム c 測定に対する影響

反応条件を以下に示す酸性条件、または、中性条件で、測定方法に従って測定した。

## 1) 酸性条件

- ・酸性反应用溶液 ( 0.05 M クエン酸, 1% BSA, 0.15 M NaCl, 15 mM EDTA, pH 4.0 )
- ・ルテニウム希釈液 ( 0.05 M クエン酸, 1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% スクロース, 0.01% Tween20, pH 4.0 )

## 2) 中性条件

- ・中性反应用溶液 ( 0.15 M PBS, 15 mM EDTA, 1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH7.5 )
- ・ルテニウム希釈液 ( 0.15 M PBS, 1% BSA, 0.3% スクロース, 0.01% Tween20, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH 7.5 )

## 【 0 0 7 4 】

## 3) 測定方法

反应用溶液 100 μL に、妨害活性の認められた蛋白質の溶液である α1 酸性糖蛋白質液 ( 2 mg/mL ) または α1 アンチトリプシン液 ( 3mg/mL ) 10 μL、及び、ヒトチトクロム c ( R&D Systems 社 ) を 10 μg/mL の濃度に精製水で溶解したもの 1 μL を加えて混合した。これを、電気化学発光免疫自動測定機ピコルミ<sup>®</sup>8220 ( 三光純薬社 ) を用い、参考例で作製した抗チトクロム c 抗体 ( 2B5F8 ) 結合ビーズ、ルテニウム希釈液で希釈した参考例で作製したルテニウム標識抗チトクロム c 抗体 ( 3G7 )、ピコルミ<sup>®</sup>発光電解液 ( 三光純薬社 )、ピコルミ<sup>®</sup>BF 洗浄液 ( 三光純薬社 )、ピコルミ<sup>®</sup>セルクリーナー液 ( 三光純薬社 )、ピコルミ<sup>®</sup>ノズルリンス液 ( 三光純薬社 ) をセットし、抗チトクロム c 抗体結合ビーズ分注量 25 μL、ルテニウム標識抗チトクロム c 抗体分注量 100 μL、ピコルミ<sup>®</sup>発光電解液分注量 300 μL、1 ステップ、反応時間 26 分の条件で測定した。

## 【 0 0 7 5 】

その結果、表 5 に示すとおり、ヒト血清中での測定と同様に抗原抗体反応時の pH を下げることで妨害活性を回避できることが明らかとなった。

## 【 0 0 7 6 】

妨害活性を有する物質は共に酸性度の高い蛋白質であり、これら酸性度の高い蛋白質が塩基性の強いチトクロム c と相互作用することにより、チトクロム c の測定に影響を与えていたと考えられる。酸性領域で測定することによりチトクロム c と妨害物質の相互作用は弱くなることから、酸性領域では正確な定量が可能となったものと考えられる。従って、実施例で試験した以外の抗体に関しても、酸性領域とすることでチトクロム c の正確な測定が可能となるものと考えられる。

## 【 0 0 7 7 】

20

30

40

50

【表 5】

表 5

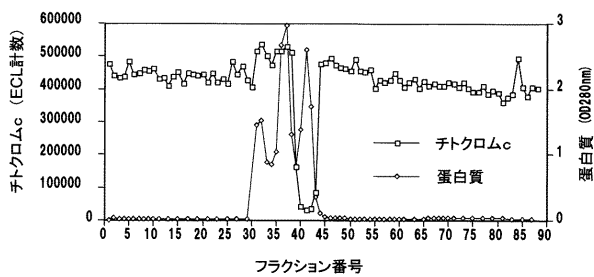
	添加回収率	
	pH4.0	pH7.5
対照	100.0%	100.0%
$\alpha$ 1酸性糖蛋白質	99.8%	66.7%
$\alpha$ 1アンチトリプシン	99.2%	74.0%

## 【産業上の利用の可能性】

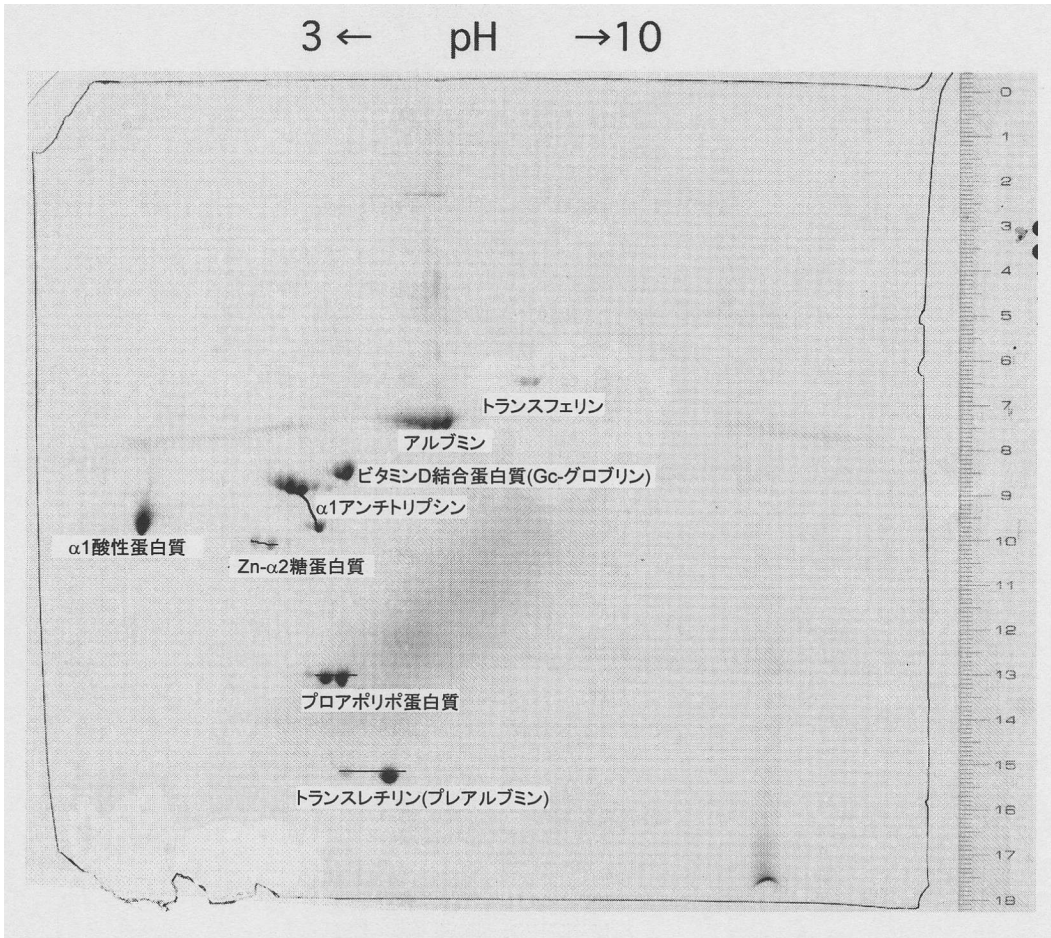
## 【0078】

体液中のチトクロムcが体内で起こっているアポトーシスの指標となることが知られ、多くの疾患の診断薬として有効であることが明らかとなっている。本願の酸性領域の緩衝液を用いるチトクロムcの免疫化学的測定法により、より正確なチトクロムc量の測定が可能となり、本方法の診断薬への応用が期待される。

【図 1】



【図2】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/308079
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53		
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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2001-35093 A (Eisai Co., Ltd.), 17 May, 2001 (17.05.01), & EP 1229328 A & US 7070924 A	1-8
A	JP 03-257367 A (Morinaga & Co., Ltd.), 15 November, 1991 (15.11.91), (Family: none)	1-8
A	JP 2003-28860 A (Eisai Co., Ltd.), 29 January, 2003 (29.01.03), (Family: none)	1-8
A	WO 98/02579 A (Emory University), 22 January, 1998 (22.01.98), (Family: none)	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 August, 2006 (02.08.06)		Date of mailing of the international search report 15 August, 2006 (15.08.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/308079									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006, 01) i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2006年										
日本国実用新案登録公報	1996-2006年										
日本国登録実用新案公報	1994-2006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) MEDLINE (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	WO 2001/35093 A (エーザイ株式会社) 2001.05.17 & EP 1229328 A & US 7070924 A	1-8									
A	JP 03-257367 A (森永製菓株式会社) 1991.11.15 (ファミリー無し)	1-8									
A	JP 2003-28860 A (エーザイ株式会社) 2003.01.29 (ファミリー無し)	1-8									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 02.08.2006		国際調査報告の発送日 15.08.2006									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 加々美 一恵	2 J   9408								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/308079

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 98/02579 A (Emory University) 1998.01.22 (ファミリー無し)	1-8

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),  
EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,  
BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,  
CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L  
R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY  
,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	细胞色素c的免疫化学测量方法和测量试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2006112445A1</a>	公开(公告)日	2008-12-11
申请号	JP2007528145	申请日	2006-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	青山宗夫		
发明人	青山 宗夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/573 G01N33/5735 G01N2800/04 Y10S435/97 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/531.B		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	2005118192 2005-04-15 JP		
其他公开文献	JP4896022B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于精确测量体液，特别是血液中细胞色素c的量的免疫化学方法和用于测量的试剂盒。通过使抗体与细胞色素c在酸性范围内的缓冲溶液中反应，可以精确测量细胞色素c的量，而不受任何干扰性底物的影响。

2B5F8-27G9抗体  
pH 7.5

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	抗原2	抗原3	80.2	76.8	104.5%
123.3	抗原4	抗原4	761.5	715.1	106.5%
587.7	血清3	血清3	2.2	62.8	3.5%
842.5	血清2	血清2	0.3	15.4	1.9%
血清1	血清1	血清1	35.9	421.4	8.5%
0.3					
血清2					
0.6					
血清3					
2.3					

2B5F8-27G9抗体  
pH 4

チトクロムc定量値 (ng/ml)	抗原の組合せ		実測値 (C)	理論値 (D)=((A)+(B))/2	回収率 (C)/(D)
	(A)	(B)			
抗原1	抗原2	抗原3	81.8	75.7	108.1%
29.2	抗原4	抗原4	761.4	728.5	104.5%
122.1	血清3	血清3	101.7	93.8	108.5%
595.5	血清2	血清2	32.6	29.6	110.3%
861.5	血清1	血清1	468.7	440.3	106.5%
血清1					
19.1					
血清2					
29.9					
血清3					
65.4					

0 5 3】

施例2】こはく酸緩衝液を用いたヒト血清中のチトクロムc測定