

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/114337

発行日 平成21年8月20日 (2009. 8. 20)

(43) 国際公開日 平成19年10月11日 (2007. 10. 11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D	
GO 1 N 33/577 (2006. 01)	GO 1 N 33/577 B	
GO 1 N 33/545 (2006. 01)	GO 1 N 33/545 B	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

出願番号 特願2008-508654 (P2008-508654)	(71) 出願人 000226862 日水製薬株式会社 東京都台東区上野三丁目23番9号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/057100	
(22) 国際出願日 平成19年3月30日 (2007. 3. 30)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-100871 (P2006-100871)	(74) 代理人 100099139 弁理士 光来出 良彦
(32) 優先日 平成18年3月31日 (2006. 3. 31)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 松林 直 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究所内
	(72) 発明者 照沼 育男 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究所内
	(72) 発明者 高野 昭紀 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究所内

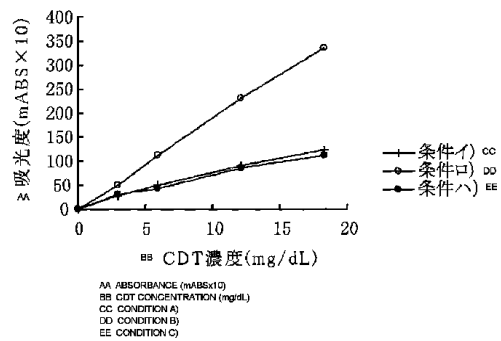
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫凝集反応試薬キット及び抗原の測定方法

(57) 【要約】

エピトープの数が少ない場合や異なるエピトープが近接し立体障害等で抗体との反応効率が悪いときに、検体中の抗原を効率的に検体の前処理無しで直接測定できる方法を提供する。

認識するエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体を一種類ずつ別々のラテックスに感作し、検体と一つのモノクローナル抗体感作ラテックス試薬を反応させた後、その反応液中にさらにもう一つのモノクローナル抗体感作ラテックス試薬を反応させることにより、抗原を検体前処理なしに、直接効率よく高感度に測定することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

認識するエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体が該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を含む免疫凝集反応試薬キットであって、

該二種類の感作された担体粒子は、目的の抗原を含む検体に対して同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の種類のモノクローナル抗体が感作された担体粒子の反応順序を特定した場合、凝集反応が増大する性質を有し、

該二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されていることを特徴とする免疫凝集反応試薬キット。

【請求項 2】

前記モノクローナル抗体が感作された担体粒子がラテックス粒子である請求項 1 記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項 3】

前記担体粒子の粒径が 0.05 μm 以上 1 μm 未満である請求項 1 記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体が認識する抗原は、CDT である請求項 1 記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項 5】

ハイブリドーマ NC DT 503 (FERM P - 20844) の産生する抗 CDT マウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、ハイブリドーマ NC DT 077 (FERM P - 20843) の産生する抗 CDT マウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬として組み合わせたことを特徴とする請求項 1 記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項 6】

前記担体粒子は、ラテックス粒子である請求項 1 に記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載の免疫凝集反応試薬キットを用意し、

抗原を含むと疑われる検体に対して、一方の種類の試薬を反応させた後、その反応液に他方の種類の試薬を反応させることにより凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することを特徴とする抗原の測定方法。

【請求項 8】

自動分析装置又は用手法により行う請求項 7 記載の抗原の測定方法。

【請求項 9】

前記反応液の担体粒子濃度が 0.02 質量% 以上 0.25 質量% 以下である請求項 7 記載の抗原の測定方法

【請求項 10】

前記反応液のモノクローナル抗体濃度が 0.03 mg/mL 以上 0.09 mg/mL 以下である請求項 7 記載の抗原の測定方法。

【請求項 11】

前記反応液の pH が 6.8 以上 8.5 以下である請求項 7 記載の抗原の測定方法。

【請求項 12】

前記抗原が CDT である請求項 7 記載の抗原の測定方法。

【請求項 13】

CDT を含むと疑われる検体に対して、ハイブリドーマ NC DT 503 (FERM P - 20844) の産生する抗 CDT マウスモノクローナル抗体 1 を感作した担体粒子を含む試薬を反応させた後、その反応液にハイブリドーマ NC DT 077 (FERM P - 20843) の産生する抗 CDT マウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を反応させることにより凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することを特徴とする抗原の測定方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記凝集の変化量は、吸光度の変化量である請求項 7 又は 13 記載の抗原の測定方法。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の抗原の測定方法に用いられるハイブリドーマ NC DT 077 (FERM P - 20843) の産生する抗 CD T マウスモノクローナル抗体。

【請求項 16】

前記モノクローナル抗体が次の P1 - P6 のペプチド領域に対して反応性を有しないか又は実質的に反応性を有しない請求項 15 記載の抗 CD T マウスモノクローナル抗体。

P1 : V L A E N Y N K S D N C E

P2 : Q H L F G S N V T D C S G

P3 : V V A R S M G G K E D L I W E L L

P4 : I A K I M N G E A D A M S L

P5 : Y E K Y L G E E Y V K A V

P6 : S K L S M G S G L N L S E P N

10

【請求項 17】

ハイブリドーマ NC DT 077 (FERM P - 20843)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、認識するエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体を利用し、検体中の目的とする抗原を簡単な操作で、感度よく測定することのできる免疫凝集反応試薬キット、及び抗原の測定方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

抗原抗体反応を利用する免疫測定法は、各種内分泌疾患の臨床診断等において極めて重要であり、従来種々の免疫測定法が知られている。

【0003】

その中でも、抗体を感作させた担体からなる免疫凝集反応試薬を用いた検体中の抗原の測定方法として、被検物質中の抗原と該免疫凝集反応試薬を反応させ、この抗原 - 抗体反応により生成した凝集塊について、該試薬添加後の吸光度変化量として測定し、同様に操作した既知濃度の標準血清の吸光度変化量と比較して目的の抗原濃度を求める測定方法が知られている。

30

【0004】

抗体をラテックス等の担体に感作する場合、それぞれの抗体を別々の担体に感作し、この感作したそれぞれの担体を適当な割合で混合し一つの免疫凝集反応試薬としていた(特許文献 1: 特公平 3 - 40341 号公報)。

【0005】

しかし、前記の混合した免疫凝集反応試薬では、抗原中においてエピトープの数が少ない場合や、抗原中に異なるエピトープが近接しているため立体障害等で抗体との反応効率が悪い場合は、十分量のラテックス凝集塊を生成せず、そのため目的とする吸光度が得られず再現性が悪く精度よく測定できない場合があった。

40

【0006】

このような場合、競合法の反応原理を利用し測定試薬を提供する場合があるが、競合法は一般的に測定範囲が狭く、低濃度側及び高濃度側での再現性が悪く精度よく測定する試薬として好ましくはない。

【0007】

一方、アルコール中毒患者を同定するための方法として、炭水化物(糖鎖)欠失トランスフェリン(略語: CD T)を測定する方法が注目されている。アジアロ、モノシアロ及びジシアロトランスフェリンは、炭水化物(糖鎖)欠失トランスフェリン(略語: CD T)と呼ばれている。CD T は、アルコール消費、特に慢性アルコール消費を検出およびモ

50

ニターするための有効なマーカーであることが見出されている。

【 0 0 0 8 】

C D T の免疫学的検査法として W O 9 6 / 2 6 4 4 4 (特許文献 2) および Heil et al, Anaesthetist, 43, 447-453, (1994) (非特許文献 1) 等が報告されている。これらの手法では、希釈血清サンプルをアニオン性イオン交換樹脂に通し、正常なトランスフェリンイソ型を樹脂に保持させる一方、C D T 分画の通過を可能にしている。この溶出液の C D T 含量は、免疫比濁法 (immunoturbidimetric assay) 等によって測定される。その他、高速液体クロマト法により C D T を定量する方法も W O 9 5 / 0 4 9 3 2 (特許文献 3) により知られている。

【 0 0 0 9 】

前記アルコール中毒患者の従来検査手法の全ては、イオン交換樹脂或いは高速液体クロマト法を適用する等比較的複雑な手順に基づくものであった。

【 0 0 1 0 】

一方、Makhloufらは、C D T のみを直接測定するために、C D T に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。彼らは、トランスフェリンの糖鎖が結合している 4 1 3 番目と 6 1 1 番目のアスパラギンを中心として前後 6 個のアミノ酸の合成ペプチドを免疫原として抗体を作製し、その抗体を C D T 測定のための免疫測定法に応用することを考えた (W O 9 3 / 0 6 1 3 3 : 特許文献 4) 。

【 0 0 1 1 】

これに対して、ER.Trimbleらは、Makhloufらの手法による、合成ペプチドを免疫原として作製したモノクローナル抗体は C D T には反応しなかったことからそのエピトープはトランスフェリン分子内に隠匿されており検出に応用できないと述べた (Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998) : 非特許文献 2) 。

【 0 0 1 2 】

一方、特開 2 0 0 4 - 0 5 1 6 3 3 (特許文献 5) には、C D T と水溶液中で選択的に結合し、C D T を固相に結合させる必要がない抗体に関して記載されている。該抗体は、遺伝子組み換え手法により得たりコンビナント非糖化トランスフェリンを免疫原に使用し、或いは、酵素による脱糖化反応して非糖化トランスフェリンとしたものを免疫原として使用して、得た抗体である。即ち、人為的に作製した C D T を免疫原に使用して得られた抗体である。

【 0 0 1 3 】

現在市販されている C D T 測定試薬には、カラム法ではウサギポリクローナル抗体が使用されているため、C D T の測定には検体への鉄飽和とカラムによる C D T の分離が必要であり、操作が煩雑であった。また、高速液体クロマト法による C D T の測定は 1 検体あたりに要する時間が長く、多検体処理には不向きであった。

【 0 0 1 4 】

近年、C D T (糖鎖欠損トランスフェリン) を測定するために、検体の前処理 (検体の鉄飽和及びカラム分離) を必要としない試薬が提供されたが (非特許文献 : D.Kraul et al, Clinical Chemistry, vol.51, No.6 96 B-149 (2005) (2005 AACC Annual meeting 要旨集))、測定原理が競合法で、測定範囲が狭く、低濃度側及び高濃度側での再現性が悪く精度よく測定する試薬としては好ましくはない。

【 0 0 1 5 】

また、上記の C D T 測定試薬は、専用試薬のため適用可能な分析装置に限られており、汎用の自動分析装置に適用し難い。

【 0 0 1 6 】

【 特許文献 1 】 特公平 3 - 4 0 3 4 1 号公報

【 特許文献 2 】 W O 9 6 / 2 6 4 4 4

【 特許文献 3 】 W O 9 5 / 0 4 9 3 2

【 特許文献 4 】 W O 9 3 / 0 6 1 3 3

【 特許文献 5 】 特開 2 0 0 4 - 0 5 1 6 3 3

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Heil et al, Anaesthesist, 43, 447-453, (1994)

【非特許文献2】Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998)

【非特許文献3】D.Kraul et al, Clinical Chemistry, vol.51, No.6 96 B-149 (2005)
(2005 AACC Annual meeting 要旨集)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明者らは、鋭意研究の結果、未変性で天然のCDTを調製し、該CDTの構造を認識するモノクローナル抗CDT抗体を複数種類取得した。しかしながら、前記従来の免疫凝集試薬による測定法を適用した場合には、凝集反応はうまく行われなことを確認した。即ち、それぞれのモノクローナル抗CDT抗体を別々の担体に感作し、この感作したそれぞれの担体を適当な割合で混合し一つの免疫凝集反応試薬として用いて、検体に対して免疫凝集反応を行わせても、凝集反応はうまく行われなかった。

10

【0018】

そこで、本発明は、検体の前処理を必要とせず、経済的コストの低下につながる汎用の自動分析装置でも測定可能であり、測定精度の向上や測定範囲の拡大を目指した免疫凝集反応による抗原の測定方法と該測定方法に用いた免疫凝集反応試薬キットを提供することを課題とする。さらに本発明は、前記課題に加えて、検体中のCDTに対して、効率のよい免疫凝集反応によりCDT量の測定を行うことができる免疫凝集反応試薬キット、該免疫凝集反応試薬キットに用いられるモノクローナル抗CDT抗体、該免疫凝集反応試薬キットを用いたCDTの測定方法を提供することを課題とする。

20

【0019】

また、免疫凝集反応試薬キットに用いられる抗体として、体液中のCDTを前処理することなく測定できることが望ましく、そのためには天然のCDTの構造を認識する抗体を取得する必要がある。

【0020】

一方、上述したように糖鎖欠失部位の近傍の領域は、ER.Trimbleらの報告(非特許文献7)からも理解されるように、CDT分子内に隠匿されている可能性があり、トランスフェリン分子内のジスルフィド結合数の多さからも強固な立体構造を形成しており、糖鎖欠失部位の近傍のエピトープを認識する抗体の取得は困難であると想定される。

30

【0021】

また、免疫抗原として人為的に作製したCDTは、天然のCDTとは大きく異なるという問題がある。例えば、前記特許文献4の遺伝子組換え体の場合、ジスルフィド結合を含むためタンパク質の立体構造が不完全になり易く、また、酵素による脱糖化物の場合、調製の際に変性処理が必要である。さらに遺伝子組換え体と脱糖化物はアミノ酸の置換を生じるという問題がある。

【0022】

また、体液中から天然のCDTを精製するための方法として、一般的には抗トランスフェリン抗体が結合したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーが使用される。しかしながら、この方法はカラム中の抗トランスフェリン抗体にトランスフェリンを結合させた後に、この抗原抗体複合体を酸性条件で変性させることによりCDTを含むトランスフェリンを溶出させて精製する方法がある。しかしながら、該方法により得られるCDTは変性している可能性が高いので、免疫原としては好ましくない。

40

【0023】

本発明はかかる問題点を鑑みて、体液中のCDTに対して反応しないような抗体を生ずる恐れのある、人為的に作製したCDTを免疫原に使用することなく、天然のCDTと選択的に結合し、しかも免疫凝集反応を利用した測定に適用できる抗CDT抗体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】

【0024】

50

前記した課題を解決するための本発明の免疫凝集反応試薬キットは、認識するエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体が該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を含む免疫凝集反応試薬であって、該二種類の感作された担体粒子は、目的の抗原を含む検体に対して同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の種類のモノクローナル抗体が感作された担体粒子の反応順序を特定した場合、凝集反応が増大する性質を有し、該二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されていることを特徴とする。

【0025】

本発明の抗原の測定方法は、前記の免疫凝集反応試薬キットを用意し、抗原を含むと疑われる検体に対して、一方の種類の試薬を反応させた後、その反応液に他方の種類の試薬を反応させることにより、凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することを特徴とする。

10

【0026】

本発明の免疫凝集反応試薬キットに使用されるモノクローナル抗体はマウス由来のものを用いることができる。本発明のキットは動物種に関係なく、認識するエピトープの異なる二種類以上のモノクローナル抗体を用いることができる。

【0027】

また、認識するエピトープが異なるモノクローナル抗体は、二種類以上でも使用することができ、一方の試薬に、二種類以上のモノクローナル抗体が感作された担体粒子、或いはエピトープが異なる二種類のモノクローナル抗体が、該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を混合されたものを使用し、他方の試薬にさらに別のエピトープのモノクローナル抗体が感作されてなる担体粒子を含むものを使用してもよい。

20

【0028】

本発明の抗原の測定方法、特に好適な抗原はCDTである。CDTを測定する方法に用いられる特に好ましい免疫凝集試薬キットは、特許生物寄託センター（IPOD）に寄託したハイブリドーマNCDT503（受託日：平成18年3月14日、受託番号：FERM P-20844）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、特許生物寄託センター（IPOD）に寄託したハイブリドーマNCDT077（受託日：平成18年3月14日、受託番号：FERM P-20843）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬として組み合わせたキットである。

30

【0029】

該キットを用いた抗原の測定方法は、CDTを含むと疑われる検体に対して、ハイブリドーマNCDT503（受託番号：FERM P-20844）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体1を感作した担体粒子を含む試薬を反応させた後、その反応液にハイブリドーマNCDT077（受託番号：FERM P-20843）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を反応させることにより、凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することを特徴とする。前記反応液中のpHが6.8以上8.5以下であることが好ましい。

【0030】

本発明の抗原の測定方法は、自動分析装置又は用手法の何れでも行うことができる。汎用の自動分析装置として、三試薬系の分析が可能な分析装置であれば本試薬キットの適用は可能である。例えば、日立製の自動分析装置の7070形や7170形等は三試薬系の分析が可能である。

40

【0031】

本発明の免疫凝集反応試薬キットを構成する試薬に好適に使用できる担体は、通常の免疫凝集反応試薬に用いられる不溶性担体微粒子であればいずれも使用可能であるが、例示すれば、ポリスチレン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル(メタ)アクリレート共重合体、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニル-ア

50

クリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどのラテックス等の有機高分子物質の微粒子、物理吸着用やカルボキシル基を介した化学結合用といった処理加工を施したラテックス、あるいはシリカ、シリカ-アルミナ、アルミナの様な無機酸化物又は該無機酸化物等にシランカップリング処理等を施し、官能基を導入した無機粒子、金属コロイド粒子、ヒトO型血球、ヒツジ赤血球等の生物由来の粒子、リボソーム等が挙げられるが、これらに限定するものではない。なかでもラテックス粒子は人工担体であり、目的に応じて担体表面を化学的処理しやすいこと、また非特異反応が起こりにくいことなどの点から特に好ましく用いられる。そのなかで、種々の変性ラテックスや磁性ラテックス等も必要に応じて使用できる。

【0032】

上記担体の粒径も特に限定されるものではないが、抗原抗体反応後の凝集の起こり易さや凝集の判別のし易さ等の観点から平均粒径が0.05 μ m以上1 μ m未満、好ましくは、0.1 μ m以上0.5 μ m未満、最も好ましくは、0.1 μ m以上0.2 μ m未満である担体粒子を用いることが好適である。

【0033】

また担体の使用量は、抗体や抗原の種類によって適宜決定すればよいが、担持効率や操作性の観点から、測定時の溶液中の担体粒子濃度が0.02質量%以上0.25質量%以下、好ましくは0.02質量%以上0.17質量%以下、最も好ましくは0.04質量%以上0.13質量%以下であることが好適である。本発明で使用するモノクローナル抗体の濃度は0.03mg/mL以上0.09mg/mL以下、好ましくは0.03mg/mL以上0.07mg/mL以下、最も好ましくは0.05mg/mL以上0.07mg/mL以下とする。

【0034】

測定に用いる緩衝液は、Trisの他pH範囲が6.8から8.5である緩衝剤であれば用いることができ、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS等も使用することができる。

【発明の効果】

【0035】

従来法である、認識するエピトープの種類異なる抗体を種類毎に別々の担体に感作し、この感作したそれぞれの担体を適当な割合で混合した免疫凝集反応試薬を用いて免疫凝集反応を行わせても、抗原中においてエピトープの数が少ない場合や、異なるエピトープが近接しているため立体障害等の原因で、十分量のラテックス凝集塊を生成せず、そのため目的とする吸光度が得られないような場合でも、本発明の二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されているキットを用い、抗原を含むと疑われる検体に対して、一方の種類の試薬を反応させた後、その反応液に他方の種類の試薬を反応させることにより凝集を生じることができ、大きな吸光度変化を得ることができるので検体中の抗原の測定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】陰イオン交換クロマトグラフィーによるCDT分画溶出プロファイルを示すグラフである。

【図2】図1の溶出プロファイルに示した各分画のSDS-PAGE及び等電点電気泳動の写真である。

【図3】抗トランスフェリンポリクローナル抗体と組み合わせたサンドイッチELISAによる相関性試験を示すグラフである。

【図4】イ) 2種のラテックス試薬を混合して用いた場合、ロ) 先にラテックス試薬1を反応させ、次いでラテックス試薬2を反応させた場合、ハ) 先にラテックス試薬2を反応させ、次いでラテックス試薬1を反応させた場合のCDT濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

10

20

30

40

50

【図5】ラテックスの粒径を変えた場合のCDT濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図6】反応液中のラテックス濃度を変えた場合のCDT濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図7】反応液中のモノクローナル抗体濃度を変えた場合のCDT濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図8】使用可能なpHの範囲についてCDT濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

【図9】精製CDT分画による120mg/dLまでの抗原過剰の測定結果についてCDT濃度に対する吸光度の関係を表すグラフである。

10

【実施例】

【0037】

次の実施例により本発明を更に詳細且つ具体的に説明する。但し、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

以下の実施例は、認識するエピトープが異なる二種類の抗CDTマウスモノクローナル抗体を別々のラテックスにそれぞれ感作し、カラム等の検体の前処理が不要な汎用自動分析装置に適用可能な三試薬系のCDT測定試薬を構築して免疫測定を実施したものである。

【0038】

[実施例1]：未変性で天然のCDT分画の調製

CDT高値ヒト血清10mLに鉄飽和溶液(0.5M NaHCO₃ 250μLと10mM FeCl₃ 180μL)を加え、4℃で一時間インキュベート後、脱脂溶液(100g/L デキストラン硫酸 100μLと1M CaCl₂ 500μL)を加えた溶液の上清を回収した。さらにブルーセファロースカラム(Blue Sepharose 6 Fast Flow：商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いてアルブミンを除去し、次いで、Protein Gカラム(Hi Trap Protein G HP：商品名：GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いてグロブリンを除去することにより、トランスフェリン以外のタンパク質を除去した後、陰イオン交換カラム(Mono Q HR 5/5：商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いて未変性のジシアロトランスフェリンとアシアロトランスフェリンを含むCDT分画を調製した。

20

30

【0039】

図1は陰イオン交換クロマトグラフィーによるCDT分画溶出プロファイルを示すグラフである。図1における矢印Aは波長280nmの吸光度曲線を示す。矢印Bは波長460nmの吸光度曲線を示す。図1の溶出プロファイルに示した各分画のSDS-PAGE(NuPAGE gel：商品名、インビトロジェン株式会社製)及び等電点電気泳動についての銀染色とウエスタンブロットの写真を図2に示す。図2に示すようにトランスフェリンの糖鎖の量に応じた5種のアイソフォームとしてテトラシアロ、トリシアロ、ジシアロ、モノシアロおよびアシアロトランスフェリンを未変性で高純度に調製することができたことがわかる。

【0040】

[実施例2]：ハイブリドーマの調製

前記実施例1で得られたジシアロトランスフェリンとアシアロトランスフェリンを含む分画をCDT抗原として用いた。該抗原を濃度0.5mg/mLの抗原溶液に調製した。該抗原溶液500μLにアジュバンド500μL(Titer Max Gold：商品名、Titer Max Co.製)を混和して乳化させ、5週齢のBALB/cマウスの皮下に免疫した。追加免疫として同様に調製したものを2週おきに3回繰り返した。その間免疫時に採血をして抗原に対する血中の抗体活性を測定した。最終免疫から14日後に100μLの抗原溶液を腹腔内に投与し、3日後、脾臓を摘出した。脾細胞はマウスミエローマ細胞(P3x63Ag8.653)とポリエチレングリコール4000(商品名、メルク社製)の存在下で2日間反応させることにより融合させた。融合後、HAT選択培

40

50

地に懸濁して96ウェルの培養プレートに分注し、37のCO₂インキュベーターで培養し、ハイブリドーマを調製した。

【0041】

[実施例3]：C D T分画に対する抗体産生ハイブリドーマの選抜

前記実施例2で得られたハイブリドーマについて、本発明の抗体産生ハイブリドーマの選抜はサンドイッチELISAにより行った。96ウェルのマイクロプレートにPBSで10μg/mLに調製した抗マウス抗体を1ウェル当たりそれぞれ50μL加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%BSA-PBSでブロッキングを行いスクリーニング用のプレートとした。ハイブリドーマの増殖の認められたウェルの培養上清50μLをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05%Tween-PBS)で洗浄後、前記実施例1に記載したC D T分画を室温で1時間反応させ、同様に洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体50μLを加え、室温で1時間反応させた。なお、該アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体は、抗トランスフェリンポリクローナル抗体(株式会社シバヤギ製)にアルカリフォスファターゼ(ロシュ社製)を過ヨウ素酸法で結合させることにより調製したものを使用した。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、該C D T分画に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマNC D T 0 7 7及びNC D T 5 0 3を選抜した。

10

【0042】

[実施例4]：C D T分画に対する抗体産生ハイブリドーマのクローニング

前記実施例3で選抜した各ハイブリドーマを限界希釈法により、クローニングを二回実施し、樹立株を得た。得られたハイブリドーマNC D T 0 7 7は特許生物寄託センター(IPOD)に寄託し(受託日:平成18年3月14日、受託番号:FERM P-20843)、ハイブリドーマNC D T 5 0 3は特許生物寄託センター(IPOD)に寄託した(受託日:平成18年3月14日、受託番号:FERM P-20844)。

20

【0043】

[実施例5]：抗体の調製

前記実施例4で得られた各樹立株について、C D T分画に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、モノクローナル抗体の大量産生のためマウス腹腔内にて増殖させた。こうして得られたマウス腹水中のモノクローナル抗体は、プロテインGカラム(GE社製)を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

30

【0044】

[実施例6]：抗体のサブクラスの決定

前記実施例3で得られたハイブリドーマNC D T 0 7 7の産生するモノクローナル抗C D T抗体のサブクラスはIsosstrip(登録商標、ロシュ社製)を使用して、IgG2a()と決定した。同様にしてハイブリドーマNC D T 5 0 3の産生するモノクローナル抗C D T抗体のサブクラスは、IgG1()と決定した。

【0045】

[実施例7]：サンドイッチELISAを用いた抗体の特異性の確認

前記実施例5で調製したモノクローナル抗体(ハイブリドーマNC D T 0 7 7産生抗体及びハイブリドーマNC D T 5 0 3産生抗体)についてサンドイッチELISAを用いて、前記実施例1で調製したトランスフェリンアイソフォームに対する特異性の確認を行った。96ウェルのマイクロプレートにPBSで10μg/mLに調製した抗体を1ウェル当たりそれぞれ50μL加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%BSA-PBSでブロッキングを行った。その後、前記実施例1で調製したトランスフェリンアイソフォーム50μLをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05%Tween-PBS)で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体(前記実施例3で調製したものと同一)50μLを加え、室温で1時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-

40

50

King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、トランスフェリンアイソフォームに対する反応の強さを比較することで抗体の特異性を確認した。その結果を下記の表1に示す。

【0046】

【表1】

ハイブリドーマ (抗体)番号	490nmのOD (吸光度)		
	アジアロ トランスフェリン (200ng/ml)	ジシアロ トランスフェリン (200ng/ml)	テトラシアロ トランスフェリン (200ng/ml)
NCDT077	2.902	2.889	0.421
NCDT503	2.124	1.946	0.034

10

【0047】

表1に示すようにハイブリドーマNCDT077産生抗体及びハイブリドーマNCDT503産生抗体は溶液中の天然のCDT分画(アジアロトランスフェリンとジシアロトランスフェリン)に特異的に反応したが、CDT以外のトランスフェリンであるテトラシアロトランスフェリンに対して反応しなかった。

20

【0048】

[実施例8]: 抗トランスフェリンポリクローナル抗体と組み合わせたサンドイッチELISAを用いた相関性試験

前記実施例5で調製したモノクローナル抗体(ハイブリドーマNCDT077産生抗体及びハイブリドーマNCDT503産生抗体)を用い、サンドイッチELISA法で、健常者とアルコール中毒患者の血清合計32検体を測定した。対照試験としてバイオラッド社製の試薬を用いて測定した。該対照試験は、カラムを用いたトランスフェリン中の%CDTを測定する方法であり、カラムでの分離前の総トランスフェリンの量と、分離後のCDTの量を測定し、検体中のCDT濃度と%CDT(総トランスフェリンに対するCDTの割合)を算出した。

30

【0049】

前記サンドイッチELISAによる測定は96ウェルのマイクロプレートにPBSで10µg/mlに調製した抗体を1ウェル当たりそれぞれ50µL加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%BSA-PBSでブロッキングを行った。その後、健常者とアルコール中毒患者の各血清50µLをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05%Tween-PBS)で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体(前記実施例3で調製したものと同一)50µLを加え、室温で1時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、対照試験測定値との相関性を確認した。その結果を図3に示す。

40

【0050】

図3に示したように未変性で天然のCDT分画を免疫原にして得られた、ハイブリドーマNCDT077産生抗体及びハイブリドーマNCDT503産生抗体は対照試験CDT濃度と良好な相関を示した。したがって、ハイブリドーマNCDT077産生抗体及びハイブリドーマNCDT503産生抗体は、検体中のCDT濃度に応じて吸光度が相関しているため、吸光度の値を測定することにより、検体中のCDT濃度を定量することができる。

【0051】

50

【実施例 9】：抗体の抗原認識部位の確認

前記実施例 5 で調製した各モノクローナル抗体（ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体）の反応性を次のようにして調べた。下記の P 1 - P 6 に示す 6 種類のアミノ酸配列のペプチドを E L I S A プレートに結合させた後、10 μg / mL に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 50 μL 加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液（0.05% Tween - P B S）で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス I g G 抗体（Goat F(ab') Anti-Mouse Ig' s, Alkaline Phosphatase Conjugate AM14405: 商品名、BIOSOURCE 社製）50 μL を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性を K i n d - K i n g 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定した。

10

【0052】

P 1 - P 6 のペプチド配列において下線部は、特許文献 3 又は特許文献 4 の抗体認識部位を示す。その結果を下記の表 2 に示す。

P 1 V L A E N Y N K S D N C E (配列番号 1)
 P 2 Q H L F G S N V T D C S G (配列番号 2)
 P 3 V V A R S M G G K E D L I W E L L (配列番号 3)
 P 4 I A K I M N G E A D A M S L (配列番号 4)
 P 5 Y E K Y L G E E Y V K A V (配列番号 5)
 P 6 S K L S M G S G L N L S E P N (配列番号 6)

【0053】

【表 2】

20

ハイブリドーマ (抗体)番号	490nmのOD (吸光度)					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
NCDT077	0.026	0.024	0.023	0.013	0.018	0.015
NCDT503	0.024	0.027	0.027	0.017	0.020	0.019

30

【0054】

表 2 によれば、各モノクローナル抗体（ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体及びハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体）は、P 1 - P 6（特許文献 3 又は特許文献 4 の抗体の認識部位を含むペプチド）に対して認識しないことがわかる。

【0055】

次に前記実施例 5 で調製した抗体の抗原認識部位を調べるために、最初に抗原タンパク質の一次構造への反応性について次のようにして確認した。即ち、C D T 抗原を E L I S A プレート（イモビライザーアミノ：商品名、ヌンク社製）に共有結合させた後、4 M 尿素による変性、0.1 M D T T で還元処理を行ったウェルに 10 μg / mL に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 50 μL 加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液（0.05% Tween - P B S）で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体（前記実施例 3 で調製したものと同一）50 μL を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性を K i n d - K i n g 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定し、タンパク質の一次構造を認識するかを確認した。その結果を下記の表 3 に示す。

40

【0056】

【表 3】

ハイブリドーマ (抗体)番号	490nmのOD (吸光度)	
	未処理 CDT抗原	尿素・還元処理 CDT抗原
NCDT077	3.693	0.132
NCDT503	3.484	0.038

10

【0057】

表3に示すようにハイブリドーマNCDT077産生抗体及びハイブリドーマNCDT503産生抗体は、CDT抗原を変性・還元処理した一次構造に対して反応しないことがわかる。また、これらの抗体はCDT抗原の一次構造を認識しておらず、立体構造を認識していることがわかる。

【0058】

[実施例10] 各モノクローナル抗体が認識するエピトープ相違の確認

前記実施例5で調製したモノクローナル抗体(ハイブリドーマNCDT077産生抗体及びハイブリドーマNCDT503産生抗体)の抗原認識部位の違いを調べるために、各抗体を組み合わせたサンドイッチELISAにより確認した。最初に96ウェルのマイクロプレートにPBSで10µg/mLに調製した一方の抗体を1ウェル当たりそれぞれ50µL加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%BSA-PBSでブロッキングを行った。その後、50倍に希釈したアルコール中毒者の血清50µLをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05%Tween-PBS)で洗浄後、他方の抗体をビオチン標識したものを50µL加え、室温で1時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン50µLを加え、室温で30分反応させ、洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmのODを測定した。その結果を表4に示す。

20

30

【0059】

【表 4】

		固相化側抗体	
		NCDT 077	NCDT 503
検出側抗体	NCDT 077	0.069	1.504
	NCDT 503	1.882	0.152

40

【0060】

表4に示したモノクローナル抗体の組合せパターンによる反応結果によれば、同じモノクローナル抗体の組み合わせでは反応せず、異なるモノクローナル抗体の組み合わせでは反応がみられることが判る。

【0061】

50

[実施例 1 1] : ラテックス試薬 1、2 の調製

粒径が 0 . 1 3 μm の 1 0 % ラテックス溶液 1 0 0 μL を 1 . 5 mL 遠心チューブに分注し、感作緩衝液 8 2 5 μL を加えて希釈した後、1 0 mg / mL に調整した抗 C D T マウスモノクローナル抗体 1 (ハイブリドーマ N C D T 5 0 3 産生抗体) を 7 5 μL 添加して直ちに攪拌混合し、冷所で 2 時間転倒混和して感作を行った。感作の後ブロッキング緩衝液を 1 0 0 μL 添加して 2 分間のソニケーションを行ってラテックスを分散させ、3 7 で 1 時間反応させてブロッキングを行った。ブロッキング終了後、遠心して上清の未反応成分を除去し、沈渣に保存緩衝液 1 mL を加えてソニケーションを行ってラテックスを分散させ、7 0 0 nm の吸光度が 0 . 8 Abs となるように希釈してラテックス試薬 1 を調製した。同様の操作で抗 C D T マウスモノクローナル抗体 2 (ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体) を感作させたラテックス試薬 2 を調製した。

10

【 0 0 6 2 】

< 感作緩衝液組成 >

1 0 mM T E S $\text{pH} 7 . 5$
 1 5 0 mM 塩化ナトリウム
 0 . 0 9 5 質量% アジ化ナトリウム

【 0 0 6 3 】

< ブロッキング緩衝液組成 >

1 0 mM T E S $\text{pH} 7 . 5$
 1 0 % ウシ血清アルブミン
 0 . 0 9 5 質量% アジ化ナトリウム

20

【 0 0 6 4 】

< 保存緩衝液組成 >

1 0 mM T r i s $\text{pH} 8 . 0$
 2 0 質量% グリセロール
 0 . 1 質量% ウシ血清アルブミン
 0 . 0 9 5 質量% アジ化ナトリウム

[実施例 1 2] : ラテックス試薬の反応性

測定には、第 1 試薬、第 2 試薬、第 3 試薬からなる試薬系による測定が可能な日立 7 1 7 0 型自動分析装置を使用し、第 1 試薬として下記組成の緩衝液を用い、第 2 試薬、第 3 試薬として前記実施例 1 1 で調製したラテックス試薬 1、2 を下記のイ) 口) 八) の 3 種類の条件で使用して測定を行った。

30

【 0 0 6 5 】

具体的な操作方法としては、自動分析装置の反応セルに検体 5 μL が分注され、その後下記組成の第 1 試薬 1 0 0 μL が分注され、さらに第 2 試薬 5 0 μL が分注されて検体中の C D T と第 2 試薬のラテックス試薬が反応した。その後、下記組成の第 3 試薬 5 0 μL が分注されると、C D T とラテックス試薬の凝集塊が成長するため吸光度が増加するので、第 3 試薬添加直後からの吸光度の変化量を測定した。

【 0 0 6 6 】

下記のイ) の条件では第 2 試薬を用いずにラテックス試薬 1 および 2 を等量混合したものを第 3 試薬として 1 0 0 μL 添加した。第 1 試薬および測定試料は共に共通で、出力は K - f a c t o r 法による吸光度で行った。測定結果を C D T 濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図 4 に示す。図 4 によれば、今回使用した抗体の組み合わせでは、下記の口) の条件が最も感度良く測定できることが判る。

40

【 0 0 6 7 】

< 第 1 試薬組成 >

1 0 mM T E S $\text{pH} 7 . 5$
 1 5 0 mM 塩化ナトリウム
 0 . 0 9 5 % アジ化ナトリウム

【 0 0 6 8 】

50

< 測定試料 >

ヒト血清からイオン交換カラムにより精製したCDT分画を生理食塩水で希釈した0、3、6、12および18mg/dLの溶液。

< 測定条件 >

イ) 2種のラテックス試薬を混合して用いた場合

検体量 5 μ L
 第1試薬 100 μ L
 第2試薬 0 μ L
 第3試薬 100 μ L ラテックス試薬1および2を等量混合したもの
 測定波長 主波長570nm、副波長800nm
 測光ポイント 19 - 34

10

【0069】

ロ) 先にラテックス試薬1を反応させ、次いでラテックス試薬2を反応させた場合

検体量 5 μ L
 第1試薬 100 μ L
 第2試薬 50 μ L ラテックス試薬1
 第3試薬 50 μ L ラテックス試薬2
 測定波長 主波長570nm、副波長800nm
 測光ポイント 19 - 34

20

【0070】

ハ) 先にラテックス試薬2を反応させ、次いでラテックス試薬1を反応させた場合

検体量 5 μ L
 第1試薬 100 μ L
 第2試薬 50 μ L ラテックス試薬2
 第3試薬 50 μ L ラテックス試薬1
 測定波長 主波長570nm、副波長800nm
 測光ポイント 19 - 34

【0071】

[実施例13] : 使用可能なラテックスの粒径の範囲

前記実施例11と同様の感作方法で抗CDTマウスモノクローナル抗体2(ハイブリドーマNCDT077産生抗体)を粒径0.09 μ m、0.13 μ m、0.15 μ m、0.20 μ m、0.34 μ m、0.46 μ mのラテックスに感作することにより粒径の異なるラテックス試薬を調製した。試薬の希釈倍率は前記実施例11における粒径0.13 μ mの場合と同じ希釈倍率を他の粒径にも適用した。測定試料は生理食塩水で希釈した0、5、10、15、20、25、30、35、40mg/dLのCDT溶液とし、調製した粒径の異なるラテックス試薬を前記実施例12のロ)の条件で測定した。測定結果をCDT濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図5に示す。図5によれば0.09 μ mから0.46 μ mの間の粒径はCDT濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、該粒径範囲で使用可能であることが判る。

30

【0072】

[実施例14] : 使用可能なラテックス濃度の範囲

前記実施例11で調製したラテックス試薬2の濃度を変化させ、反応液中のラテックス濃度を0.01%、0.02%、0.04%、0.07%、0.13%、0.17%、0.25%、0.5%とした場合の吸光度を前記実施例12のロ)の条件および前記実施例13の評価試料で測定した。測定結果をCDT濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図6に示す。図6は反応液中のラテックス濃度を変えた場合の感度を示すグラフである。図6によれば、吸反応液中のラテックス濃度が0.01%では測定に十分な感度が得られず、0.5%では吸光度が減少したが、0.02%から0.25%の間ではCDT濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、使用可能であることが判る。0.5%の吸光度の低下の理由は強い凝集のため主波長は0濃度で頭打ちし、副波長が濃度に応じて上昇する

40

50

ためと考えられる。

【 0 0 7 3 】

[実施例 1 5] : 使用可能なモノクローナル抗体濃度の範囲

前記実施例 1 1 と同様の感作方法で抗 C D T マウスモノクローナル抗体 2 (ハイブリドーマ N C D T 0 7 7 産生抗体) の感作時濃度を変化させ、溶液中の抗体濃度として 0 . 0 2 m g / m L、0 . 0 3 m g / m L、0 . 0 5 m g / m L、0 . 0 6 m g / m L、0 . 0 7 m g / m L、0 . 0 8 m g / m L、0 . 0 9 m g / m L とした場合の吸光度を前記実施例 1 2 の口) の条件および前記実施例 1 3 の評価試料で測定した。測定結果を C D T 濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図 7 に示す。図 7 によれば、反応液中の抗体濃度が 0 . 0 2 m g / m L では測定に十分な感度が得られなかったが、0 . 0 3 m g / m L から 0 . 0 9 m g / m L の間では C D T 濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、使用可能であることが判る。

10

【 0 0 7 4 】

[実施例 1 6] : 使用可能な p H の範囲

前記実施例 1 2 で調製した第 1 試薬のほかに p H の異なる緩衝液を調製し、前記実施例 1 2 の口) の条件および前記実施例 1 3 の評価試料で反応液中の p H と吸光度を測定した。測定結果を C D T 濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図 8 に示す。図 8 によれば、p H 6 . 5 以下ではブランク反応の異常が見られ、p H 9 . 6 では測定に十分な感度が得られなかったが、p H 6 . 8 から p H 8 . 5 の範囲では C D T 濃度に依存した吸光度の上昇が確認され、該 p H 範囲で使用可能であることが判る。

20

【 0 0 7 5 】

[実施例 1 7] : 測定試薬性能

前記実施例 1 2 の口) の条件で、2 0 回連続測定した生理食塩水の吸光度を、5 m g / d L の C D T 溶液から C D T 濃度に換算し、0 濃度の平均値 + 3 S D により最小検出限界を算出した結果を表 5 に、4 濃度の試料を 1 0 回測定した場合の同時再現性を表 6 に、精製 C D T 分画による 1 2 0 m g / d L までの抗原過剰の測定結果を C D T 濃度に対する吸光度の関係を示すグラフとして図 9 にそれぞれ示す。この方法により算出された最小検出限界は、想定される健常人検体に含まれる C D T 濃度よりも十分に小さい数値であり、同時再現性、測定範囲等も測定試薬として十分な性能を有しているといえる。

【 0 0 7 6 】

30

【表 5】

No.	生理食塩水測定値
1	0.0
2	-0.1
3	-0.4
4	0.0
5	0.4
6	0.2
7	-0.1
8	0.1
9	-0.2
10	-0.1
11	0.4
12	0.2
13	-0.2
14	-0.4
15	0.1
16	-0.5
17	-0.1
18	-0.1
19	0.2
20	-0.4
平均值	-0.05
S D	0.25
平均值 + 3 S D	0.715

10

20

30

【 0 0 7 7 】

【表 6】

No.	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
1	1.6	6.3	15.6	27.6
2	1.5	6.5	15.8	27.9
3	1.9	6.1	15.6	27.9
4	1.6	6.2	15.6	27.6
5	1.6	6.2	15.8	27.8
6	1.7	6.1	15.3	27.8
7	1.6	6.2	15.4	27.6
8	1.5	6.3	15.0	27.8
10	1.5	6.1	15.1	27.9
平均値	1.6	6.22	15.48	27.75
S D	0.125	0.123	0.274	0.135
C V	7.8%	2.0%	1.8%	0.5%

10

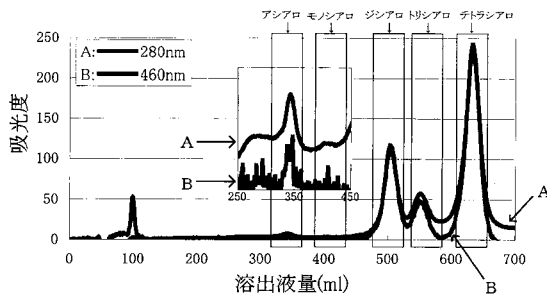
【産業上の利用可能性】

20

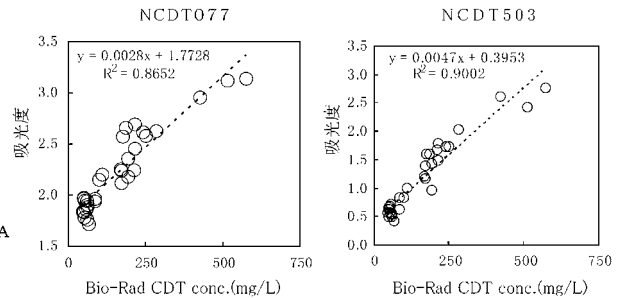
【0078】

本発明によりエピトープが近接し立体障害等で抗体との反応効率が悪い場合でも、目的物を効率的に測定することができる。同時に特異的な反応が行われるため、検体の前処理を必要としない簡便で高感度な免疫測定法に利用できる。本発明の測定方法は、CDTの測定に特に適している。

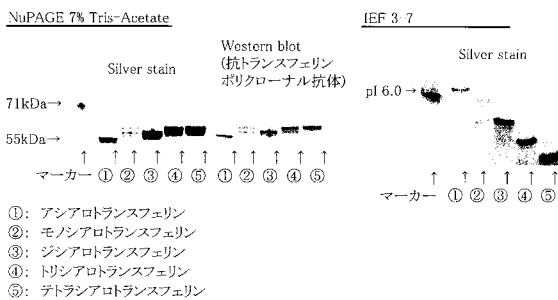
【図 1】



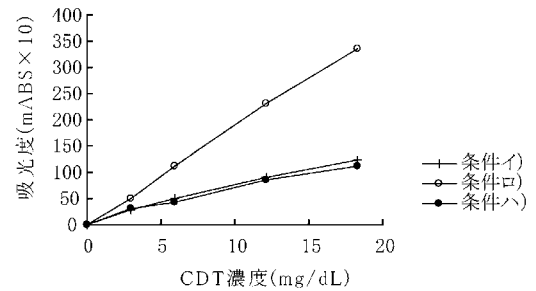
【図 3】



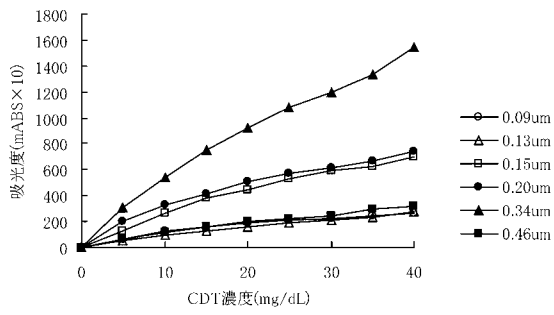
【図 2】



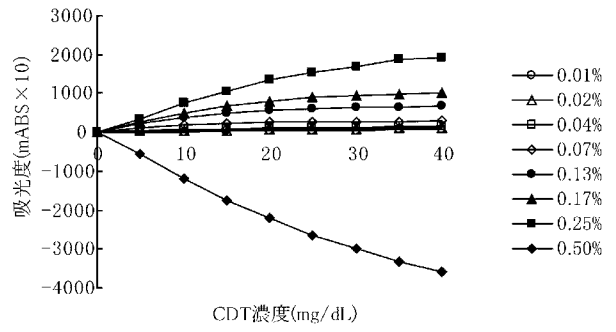
【図 4】



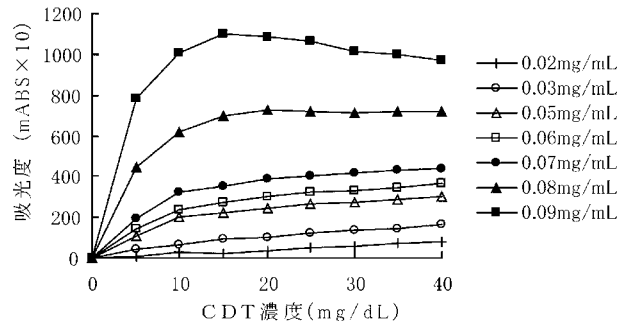
【 図 5 】



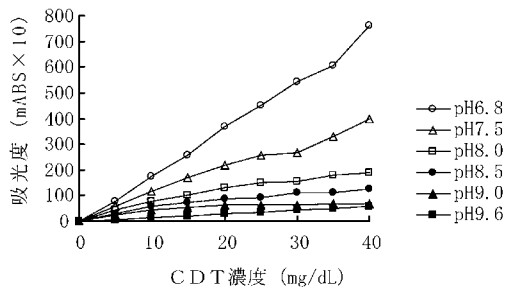
【 図 6 】



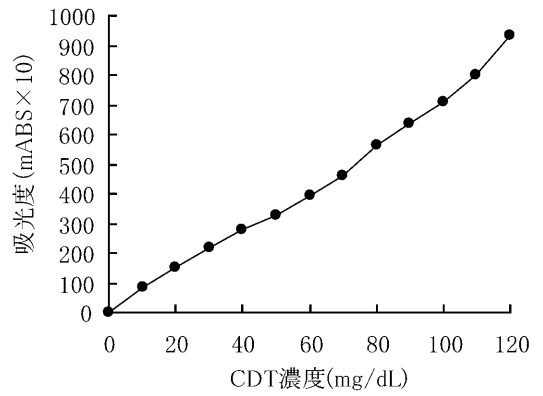
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2007114337000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月10日(2007.8.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

認識するエピトープが異なる二種類の抗CDTモノクローナル抗体が該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を含む免疫凝集反応試薬キットであって、

該二種類の感作された担体粒子は、目的のCDT抗原を含む検体に対して同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の種類の抗CDTモノクローナル抗体が感作された担体粒子の反応順序を特定した場合、凝集反応が増大する性質を有し、

該二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されていることを特徴とするCDTを測定するための免疫凝集反応試薬キット。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

ハイブリドーマNCDT503(FERM P-20844)の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、ハイブリドーマNCDT077(FERM P-20843)の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬として組み合わせたことを特徴とする請求項1記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

(削除)

【請求項10】

(削除)

【請求項11】

(削除)

【請求項12】

(削除)

【請求項13】

(削除)

【請求項14】

(削除)

【請求項15】

(削除)

【請求項16】

請求項5に記載の免疫凝集反応試薬キットに用いられるハイブリドーマNCDT077 (FERM P-20843)の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体であって、次のP1 - P6のペプチド領域に対して反応性を有しないか又は実質的に反応性を有しない抗CDTマウスモノクローナル抗体。

P1: VLAENYNKSDNCE
 P2: QHLFGSNVTDCSG
 P3: VVARSMGGKEDLIWELL
 P4: IAKIMNGEADAMSL
 P5: YEKYLGE EYVKAV
 P6: SKLSMGSGLNLSEPN

【手続補正書】

【提出日】平成20年9月16日(2008.9.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

認識するエピトープが異なる二種類の抗CDTモノクローナル抗体が該抗体の種類毎に分けられた担体粒子に感作されてなる二種類の担体粒子を含む免疫凝集反応試薬キットであって、

該二種類の感作された担体粒子は、目的のCDT抗原を含む検体に対して同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の種類の抗CDTモノクローナル抗体が感作された担体粒子の反応順序を特定した場合、凝集反応が増大する性質を有し、

該二種類の感作された担体粒子は互いに独立した状態で保存されていることを特徴とするCDTを測定するための免疫凝集反応試薬キット。

【請求項2】

ハイブリドーマNCDT503 (FERM BP-10816)の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、ハイブリドーマNCDT077 (FERM BP-10815)の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬として組み合わせたことを特徴とする請求項1記載の免疫凝集反応試薬キット。

【請求項3】

請求項2に記載の免疫凝集反応試薬キットに用いられるハイブリドーマNCDT077 (FERM BP-10815)の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体であって、次のP1 - P6のペプチド領域に対して反応性を有しないか又は実質的に反応性を有しない抗CDTマウスモノクローナル抗体。

P1: VLAENYNKSDNCE
 P2: QHLFGSNVTDCSG
 P3: VVARSMGGKEDLIWELL
 P4: IAKIMNGEADAMSL
 P5: YEKYLGE EYVKAV
 P6: SKLSMGSGLNLSEPN

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

一方、上述したように糖鎖欠失部位の近傍の領域は、ER.Trimbleらの報告（非特許文献2）からも理解されるように、CDT分子内に隠匿されている可能性があり、トランスフェリン分子内のジスルフィド結合数の多さからも強固な立体構造を形成しており、糖鎖欠失部位の近傍のエピトープを認識する抗体の取得は困難であると想定される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

また、体液中から天然のCDTを精製するための方法として、一般的には抗トランスフェリン抗体が結合したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーが使用される。この方法はカラム中の抗トランスフェリン抗体にトランスフェリンを結合させた後に、この抗原抗体複合体を酸性条件で変性させることによりCDTを含むトランスフェリンを溶出させて精製する方法である。しかしながら、該方法により得られるCDTは変性している可能性が高いので、免疫原としては好ましくない。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

本発明の抗原の測定方法、特に好適な抗原はCDTである。CDTを測定する方法に用いられる特に好ましい免疫凝集試薬キットは、国際寄託当局である独立行政法人産業技術研究所 特許生物寄託センター（IPOD、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託したハイブリドーマNC DT 503（受託日：平成18年3月14日、受託番号：FERM P - 20844）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を最初に反応させる試薬とし、特許生物寄託センター（IPOD、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託したハイブリドーマNC DT 077（受託日：平成18年3月14日、受託番号：FERM P - 20843）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を次に反応させる試薬として組み合わせたキットである。

上記ハイブリドーマNC DT 503は、該国際寄託当局に平成18年3月14日にFERM P - 20844として原寄託され、該原寄託から平成19年4月16日にFERM BP - 10816としてブタベスト条約に基づく寄託へ移管された。

上記ハイブリドーマNC DT 077は、該国際寄託当局に平成18年3月14日にFERM P - 20843として原寄託され、該原寄託から平成19年4月16日にFERM BP - 10815としてブタベスト条約に基づく寄託へ移管された。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

該キットを用いた抗原の測定方法は、CDTを含むと疑われる検体に対して、ハイブリドーマNC DT 503（受託番号：FERM BP - 10816）の産生する抗CDTマウスモノクローナル抗体1を感作した担体粒子を含む試薬を反応させた後、その反応液にハイブリドーマNC DT 077（受託番号：FERM BP - 10815）の産生する抗

C D Tマウスモノクローナル抗体を感作した担体粒子を含む試薬を反応させることにより、凝集を生じさせ、凝集の変化量を測定することを特徴とする。前記反応液中のpHが6.8以上8.5以下であることが好ましい。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

[実施例4]：C D T分画に対する抗体産生ハイブリドーマのクローニング

前記実施例3で選抜した各ハイブリドーマを限界希釈法により、クローニングを二回実施し、樹立株を得た。得られたハイブリドーマNC DT 077は特許生物寄託センター（I P O D）に寄託し（受託日：平成18年3月14日、受託番号：F E R M P - 20843（F E R M B P - 10815））、ハイブリドーマNC DT 503は特許生物寄託センター（I P O D）に寄託した（受託日：平成18年3月14日、受託番号：F E R M P - 20844（F E R M B P - 10816））。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/057100
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(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) G01N33/543, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08 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 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2005-326150 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 24 November, 2005 (24.11.05), Full text (Family: none)	1-3, 6-11 4, 5, 12-17
X Y A	JP 10-26621 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 27 January, 1998 (27.01.98), Full text & US 2001/0007774 A1 & EP 818680 A1 & DE 69731999 T	1, 2, 3, 6-11 4, 12, 15-17 5, 13, 14
Y	WO 2002/079782 A1 (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.), 10 October, 2002 (10.10.02), Full text & US 2004/0091940 A1 & EP 1385001 A1	1-4, 6-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 June, 2007 (19.06.07)		Date of mailing of the international search report 26 June, 2007 (26.06.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Toshimi OTSUKA et al., "Hi-alcohol-sei Shibokan'en to Alcohol-sei Kan'en ni Okeru Kesseigakuteki Narabini Men'eki Soshiki Kagakuteki Sai no Kento", Journal of Kanazawa Medical University, Vol.29, No.3, 2004, pages 139 to 146	15-17
Y		4, 12
A		5, 13, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057100

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical feature of the invention according to claim 1 resides in an immune agglutination reaction reagent kit comprising two kinds of reagents which undergo a weak agglutination reaction in the case of reacting simultaneously but show an enhanced agglutination reaction in the case of reacting in a definite order.

On the other hand, the technical feature of the invention according to claim 13 resides in a method of assaying an antigen against a specimen likely containing CDT which comprises reacting the specimen with a reagent having been sensitized with an antibody produced by a hybridoma NCDT5 03 (FERMP-20844) and then reacting with another reagent having been (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057100

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

sensitized with an antibody produced by a hybridoma NCDT077 (FERM P-20843). Since the properties of these two antibodies relating to agglutination reaction are unknown, it does not appear that there are one or more of the same or corresponding special technical features common to claims 1 and 13.

The technical feature of the invention according to claim 17 resides in a hybridoma NCDT077 (FERM P-20843) and it does not appear that there are one or more of the same or corresponding special technical features common to claims 1 and 17.

Such being the case, the inventions according to claims 1, 13 and 17, which are independent claims, do not comply with the requirement of unity of invention.

As the results of the search, it has been clarified that the invention as set forth in claim 1 is not novel because of having been disclosed in document JP 2005-326150 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 24 November, 2005 (24.11.05).

Thus, the invention as set forth in claim 1 has no special technical feature making a contribution over prior art and the inventions according to claims 1 to 12 have no special technical feature in common and, therefore, do not fulfill the requirement of unity of invention.

Such being the case, the present international application has six invention groups as follows.

1. Claims 1, 2 and 6 (having a special technical feature in carrier particles being latex particles).
2. Claim 3 (having a special technical feature in the size of carrier particles).
3. Claim 4 (having a special technical feature in the kind of an antigen).
4. Claim 5 (having a special technical feature in the kind of a specified antibody).
5. Claims 7 to 12 (having a special technical feature in an assay method with the use of a kit as set forth in claim 1).
6. Claims 13 to 17 (having a special technical feature in a hybridoma NCDT077 (FERM P-20843)).

(No continuation.)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 7 1 0 0									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(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. G01N33/543, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08											
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 style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">日本国実用新案公報</td> <td style="width: 50%;">1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007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	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X A	JP 2005-326150 A (栄研化学株式会社) 2005.11.24, 全文 (ファミリーなし)	1-3, 6-11 4, 5, 12-17									
X Y A	JP 10-26621 A (第一化学薬品株式会社) 1998.01.27, 全文 & US 2001/0007774 A1 & EP 818680 A1 & DE 69731999 T	1, 2, 3, 6-11 4, 12, 15-17 5, 13, 14									
Y	WO 2002/079782 A1 (株式会社三菱化学ヤトロン) 2002.10.10, 全文 & US 2004/0091940 A1 & EP 1385001 A1	1-4, 6-12									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		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 19.06.2007		国際調査報告の発送日 26.06.2007									
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) 吉田 佳代子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 9 5 1 6								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/057100

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
X Y A	大塚俊美 他, 非アルコール性脂肪肝炎とアルコール性肝炎における血清学的ならびに免疫組織化学的差違の検討, 金沢医科大学雑誌, VOL. 29, NO. 3, 2004, P. 139-146	15-17 4, 12 5, 13, 14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2007/057100

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
- 2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
- 3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に係る発明は、同時に反応させた場合には凝集反応が弱く、特定の順序で反応させた場合には凝集反応が増大する性質を有する二種類の試薬からなる免疫凝集反応試薬キットを技術的特徴とするものである。

一方、請求の範囲13に係る発明は、CDTを含むと疑われる検体に対する抗原の測定方法に関し、ハイブリドーマNCDT503 (FERM P-20844)の産生する抗体を感作した試薬を反応させた後、ハイブリドーマNCDT077 (FERM P-20843)の産生する抗体を感作した試薬を反応させる方法を技術的特徴とするものであるが、前記二種類の抗体の凝集反応に関する性質は不明であるため、請求の範囲1及び13の間には、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴が存在するとはいえない。

(続葉頁有り)

- 1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
- 4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/057100

第III欄の続き

また、請求の範囲17に係る発明は、ハイブリドーマNCDT077 (FERM P-20843)を技術的特徴とするものであり、請求の範囲1及び17の間には、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴が存在するとはいえない。

したがって、独立請求の範囲1、13及び17に係る発明は、発明の単一性を満たさない。

さらに、請求の範囲1に記載された発明は、調査の結果、文献JP2005-326150A (栄研化学株式会社)、2005.11.24に開示されており、新規でないことが明らかとなった。

したがって、請求の範囲1に記載された発明は、先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴がないため、請求の範囲1-12に係る発明は、共通する特別な技術的特徴を有さず、発明の単一性を満たさない。

したがって、この国際出願の発明の数は以下のとおり6である。

1. 請求の範囲1、2及び6 (担体粒子がラテックス粒子である点に特別な技術的特徴を有する。)
2. 請求の範囲3 (担体粒子の大きさに特別な技術的特徴を有する。)
3. 請求の範囲4 (抗原の種類に特別な技術的特徴を有する。)
4. 請求の範囲5 (特定された抗体の種類に特別な技術的特徴を有する。)
5. 請求の範囲7-12 (請求の範囲1に記載されたキットを用いた測定方法に特別な技術的特徴を有する。)
6. 請求の範囲13-17 (ハイブリドーマNCDT077 (FERM P-20843)に特別な技術的特徴を有する。)

(続葉頁無し)

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,MT,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,BH,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,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,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)	免疫凝集试剂盒和抗原测定方法		
公开(公告)号	JPWO2007114337A1	公开(公告)日	2009-08-20
申请号	JP2008508654	申请日	2007-03-30
申请(专利权)人(译)	日水制药有限公司		
[标]发明人	松林直 照沼育男 高野昭紀		
发明人	松林 直 照沼 育男 高野 昭紀		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/545 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/577.B G01N33/545.B G01N33/53.D		
优先权	2006100871 2006-03-31 JP		
其他公开文献	JP5199067B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在提供一种方法，通过该方法可以在表位数量少或表位接近而与抗体反应的情况下直接测定样品中的抗原而无需预处理样品。由于位阻等原因，仅以低效率进行操作。不同的乳胶分别用识别不同表位的两种单克隆抗体敏化。在使样品与已经被一种单克隆抗体敏化的乳胶试剂反应之后，使所得的液体反应混合物与已经被另一种单克隆抗体敏化的乳胶试剂进一步反应。因此，无需预处理样品就可以直接，高效和高灵敏度地测定抗原。

