

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/013525

発行日 平成24年1月5日(2012.1.5)

(43) 国際公開日 平成22年2月4日(2010.2.4)

(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 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
	GO 1 N 33/545	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2010-522647 (P2010-522647)	(71) 出願人	000003975 日東紡績株式会社 福島県福島市郷野目字東1番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/058973		
(22) 国際出願日	平成21年5月14日(2009.5.14)	(71) 出願人	504180239 国立大学法人信州大学 長野県松本市旭三丁目1番1号
(31) 優先権主張番号	特願2008-197156 (P2008-197156)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(32) 優先日	平成20年7月31日(2008.7.31)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合体の測定方法およびそれに用いるキット

(57) 【要約】

物質 A と物質 B との複合体 A B を含む可能性のある試料中の複合体 A B のレベルを測定する際に、試薬として、物質 A に対する特異的結合パートナー C を含む試薬、物質 B に対する特異的結合パートナー D を含む試薬、物質 A 又はその類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子を含む試薬、および、物質 A に対する特異的結合パートナー C と物質 B に対する特異的結合パートナー D とを含む試薬を用いて、競合的均一系凝集測定法により複合体を測定することにより、試料中の複合体を簡単に測定でき、また、汎用型の生化学自動分析装置に適用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

物質 A と物質 B との複合体 A B を含む可能性のある試料中の複合体 A B のレベルを測定する方法であって、

i) 該試料と、物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 A 又はその類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー C と、試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A および該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー C と該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との凝集の度合いから、該試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A のレベル P を測定し、かつ、

i i) 該試料と、物質 B に対する特異的結合パートナー D と、物質 A 又その類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー D と、試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B および該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー D と該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との凝集の度合いから、該試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B のレベル Q を測定し、かつ、

i i i) 該試料と、物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 B に対する特異的結合パートナー D と、物質 A 又その類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー C と、試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A および該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との間、かつ、該特異的結合パートナー D と、試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B および該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー C と該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との凝集の度合と、該特異的結合パートナー D と該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との凝集の度合の和からレベル R を測定し、かつ、

i v) $= P + Q - R$ により複合体 A B のレベル を求めることを特徴とする試料中の複合体 A B の測定方法。

【請求項 2】

特異的結合パートナーが抗体である、請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】

物質 A と物質 B が互いに異なる蛋白質である、請求項 2 記載の測定方法。

【請求項 4】

微細粒子がラテックス粒子である、請求項 1 から 3 に記載のいずれかの測定方法。

【請求項 5】

凝集の度合いを波長 340 ~ 940 nm のいずれかの吸光度で測定する、請求項 4 に記載の測定方法。

【請求項 6】

試料が生体試料である、請求項 1 から 5 に記載のいずれかの測定方法。

【請求項 7】

物質 A が I g A であり、物質 B がアルブミンであり、特異的結合パートナー C が I g A に対する抗体であり、特異的結合パートナー D がアルブミンに対する抗体であり、複合体 A B が I g A - アルブミン複合体であり、かつ、特異的結合反応が抗原抗体反応である、請求項 1 から 6 に記載のいずれかの測定方法。

【請求項 8】

試料中の I g A - アルブミン複合体を I g A に対する抗体とアルブミンに対する抗体を用いて免疫測定法により測定することを特徴とする、I g A - アルブミン複合体の測定方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

請求項 7 または 8 に記載の I g A - アルブミン複合体の測定方法により、ヒト由来生体試料中の I g A - アルブミン複合体のレベルを測定し、そのレベルから I g A 型 M 蛋白血症を判定する方法。

【請求項 10】

試料中の物質 A と物質 B との複合体 A B のレベルを測定するためのキットであって、
 i) 物質 A 又はその類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子を含む試薬、
 i i - A) 物質 A に対する特異的結合パートナー C を含む試薬、
 i i - B) 物質 B に対する特異的結合パートナー D を含む試薬、及び
 i i - C) 物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 B に対する特異的結合パートナー D とを含む試薬、
 から構成される、試料中の複合体 A B のレベルを測定するためのキット。

10

【請求項 11】

物質 A が I g A、かつ、物質 B がアルブミン、かつ、複合体 A B が I g A - アルブミン複合体である、請求項 10 記載のキット。

【請求項 12】

物質 A と物質 B との複合体 A B を含む可能性のある試料中の複合体 A B のレベルを測定する方法であって、

i) 該試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A のレベル P を測定し、かつ

i i) 該試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B のレベル Q を測定し、かつ

20

i i i) 該試料と、物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 B に対する特異的結合パートナー D と、物質 A 又その類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー C と、試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A および該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との間、かつ、該特異的結合パートナー D と、試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B および該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー C と該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との凝集の度合と、該特異的結合パートナー D と該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との凝集の度合との和から得られるレベル R を測定し、かつ、

30

i v) $= P + Q - R$ により複合体 A B のレベル を求める、
 ことを特徴とする試料中の複合体 A B の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の複合体の測定方法およびそれに用いるキットに関する。更に詳細には、本発明は、試料中の複合体の競合的均一系凝集測定法による測定方法であって、試料中に存在する I g A - アルブミン複合体のような 2 つの異なる物質の複合体の測定に適した複合体の測定方法およびそれに用いるキットに関する。

【背景技術】

40

【0002】

血液試料には、2 つの異なる物質が結合された複合体として存在しているものが数多くある。そのような複合体としては、トランスフェリン - トランスフェリンレセプター複合体、トロンビン - アンチトロンビン複合体、第 V I I a 因子 - アンチトロンビン複合体、酸化 L D L - C R P 複合体、P S A - 2 - マクログロブリン複合体、P S A - アンチキモトリプシン複合体、酸化 L D L - 1 - アンチトリプシン複合体、プロテイン C インヒビター - プロテアーゼ複合体、プラスミン - 2 - プラスミンインヒビター複合体、P S A - プロテイン C インヒビター複合体、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター - 組織プラスミノゲンアクチベーター複合体、ハプトグロビン - ヘモグロビン複合体、トランスサイレチン - レチノールバイディングプロテイン複合体等が知られている。

50

【 0 0 0 3 】

これらの複合体、すなわち、物質 A と物質 B との複合体を判別もしくは、レベルを測定する方法としては、例えば、以下のような方法が知られている。第一の方法は、電気泳動を用いる方法である（特許文献 1）。第二の方法は、物質 A に対する抗体と物質 B に対する抗体のいずれか一方の抗体を固相に結合させた固相抗体に、試料中のその複合体を接触させ、同時に固相に固定されていない他方の抗体を用いた標識抗体を作用させて、その複合体を測定する方法である（特許文献 2）。第三の方法は、その複合体に対する特異的な抗体でその個々の遊離成分には親和性の少ない抗体を用いて種々の免疫測定法により複合体を測定する方法である（特許文献 3）。しかし、第一の方法は、感度と定量性が低く測定操作も煩雑であるという欠点がある。第二の方法は、固相を用いる方法のため汎用型の生化学自動分析装置では測定できず、洗浄操作、反応時間等に時間がかかるという問題がある。第三の方法は、その複合体に抗体を作成するための抗原や特異性のある抗体が入手しにくい場合もあり、また、特異性の問題から正確に複合体を測定しにくいという問題があった。したがって、均一系において、試薬が入手しやすく、生化学自動分析装置に適用する簡便な複合体の測定方法の開発が望まれている。

10

一方、最近、複合体として I g A - アルブミン複合体が 5 人の I g A 型 M 蛋白血症の患者から単離され、その複合体をウェスタンブロットにて存在を確認したという報告がある（非特許文献 1）が、そのレベルを簡単に測定する方法は知られていない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

20

【 0 0 0 4 】

【 特許文献 1 】 特開平 2 - 1 1 4 1 8 1 号公報

【 特許文献 2 】 特開平 2 - 1 9 3 0 7 1 号公報

【 特許文献 3 】 特開平 5 - 2 0 7 8 9 3 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 非特許文献 1 】 Fujitara, J Electrophoresis, 50 巻, 19 頁, 2006 年

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

30

【 0 0 0 6 】

したがって、本発明の目的は、特に均一系において、試薬が入手しやすく、生化学自動分析装置に適用できる簡便な複合体の測定方法およびそれに用いるキットを提供することである。また、本発明の目的は、複合体として I g A - アルブミン複合体のレベルを簡単に測定できる方法を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

そのような状況下、これらの問題を解決するため、本発明者らは、I g A - アルブミン複合体等の物質 A と物質 B との複合体のレベルを簡単に測定できる方法を検討した。その結果、2 種類の物質を担持させたラテックス試薬を開発し、それを用いて、さらに物質 A に対する抗体等の特異的結合パートナーを含む試薬、物質 B に対する抗体等の特異的結合パートナーを含む試薬、物質 A に対する特異的結合パートナーと物質 B に対する特異的結合パートナーとを含む試薬の 3 種類の試薬を組み合わせる 3 回の競合的均一系凝集測定法を行い、3 回の測定で得られる値から、目的の複合体のレベルを自動分析装置で測定できることを発見した。同時にこの方法により、複合体の I g A - アルブミン複合体のレベルを簡単に測定できることを見出した。本発明はかかる経過により達成されたものである。

40

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は、物質 A と物質 B との複合体 A B を含む可能性のある試料中の複合体 A B のレベルを測定する方法であって、

i) 該試料と、物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 A 又はその類似物と物

50

質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー C と、試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A および該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー C と該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との凝集の度合いから、該試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A のレベル P を測定し、かつ、

i i) 該試料と、物質 B に対する特異的結合パートナー D と、物質 A 又その類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー D と、試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B および該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー D と該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との凝集の度合いから、該試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B のレベル Q を測定し、かつ、

i i i) 該試料と、物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 B に対する特異的結合パートナー D と、物質 A 又その類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー C と、試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A および該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との間、かつ、該特異的結合パートナー D と、試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B および該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー C と該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との凝集の度合と、該特異的結合パートナー D と該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との凝集の度合の和からレベル R を測定し、かつ、

i v) $= P + Q - R$ により複合体 A B のレベル を求めることを特徴とする試料中の複合体 A B の測定方法である。

【 0 0 0 9 】

さらに本発明は、試料中の物質 A と物質 B との複合体 A B のレベルを測定するためのキットであって、

i) 物質 A 又はその類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子を含む試薬、
 i i - A) 物質 A に対する特異的結合パートナー C を含む試薬、
 i i - B) 物質 B に対する特異的結合パートナー D を含む試薬、及び
 i i - C) 物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 B に対する特異的結合パートナー D とを含む試薬、
 から構成される、試料中の複合体 A B のレベルを測定するためのキットである。

【 0 0 1 0 】

さらに本発明は、物質 A と物質 B との複合体 A B を含む可能性のある試料中の複合体 A B のレベルを測定する方法であって、

i) 該試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A のレベル P を測定し、かつ

i i) 該試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B のレベル Q を測定し、かつ

i i i) 該試料と、物質 A に対する特異的結合パートナー C と、物質 B に対する特異的結合パートナー D と、物質 A 又その類似物と物質 B 又はその類似物とを担持した微細粒子とを、混合して、該特異的結合パートナー C と、試料中の複合体 A B における物質 A および遊離の形態にある物質 A および該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との間、かつ、該特異的結合パートナー D と、試料中の複合体 A B における物質 B および遊離の形態にある物質 B および該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との間で特異的結合反応を競合させて、該特異的結合パートナー C と該微細粒子に担持された物質 A 又はその類似物との凝集の度合と、該特異的結合パートナー D と該微細粒子に担持された物質 B 又はその類似物との凝集の度合との和からレベル R を測定し、かつ、

i v) $= P + Q - R$ により複合体 A B のレベル を求める、

ことを特徴とする試料中の複合体 A B の測定方法である。

【 0 0 1 1 】

さらに本発明は、試料中の I g A - アルブミン複合体を I g A に対する抗体とアルブミンに対する抗体を用いて免疫測定法により測定することを特徴とする、I g A - アルブミン複合体の測定方法である。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 2 】

本発明の方法およびキットにより、入手しやすい試薬を用いて簡便に試料中の複合体を測定できる。また、この方法およびキットは、汎用型の生化学自動分析装置に適用できるので、多試料中の目的の複合体を短時間で簡便に測定できる。また、複合体として I g A - アルブミン複合体のレベルを簡単に測定できる。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 実施例 1 において、第一試薬および第二試薬 - A を用いて、標準試料を測定した際の吸光度変化量を示す。

【 図 2 】 実施例 1 において、第一試薬および第二試薬 - B を用いて、標準試料を測定した際の吸光度変化量を示す。

【 図 3 】 実施例 1 において、第一試薬および第二試薬 - C を用いて、標準試料を測定した際の吸光度変化量を示す。

【 図 4 】 実施例 1 において、第一試薬および第二試薬 - A を用いて、試料中の I g A を測定した結果と、従来免疫比濁法 (T I A 法) を用いて試料中の I g A を測定した結果との相関性を示す。

20

【 図 5 】 実施例 1 において、第一試薬および第二試薬 - B を用いて、試料中のアルブミンを測定した結果と、従来免疫比濁法 (T I A 法) を用いて試料中のアルブミンを測定した結果との相関性を示す。

【 図 6 】 実施例 1 において、I g A - アルブミン複合体を含まない血清、及び I g A - アルブミン複合体を含む検体について、[第二試薬 - A から算出された値 + 第二試薬 - B から算出された値] (X) と [第二試薬 - C から算出された値] (Y) の相関性を示す。

【 図 7 】 実施例 1 において、I g A - アルブミン複合体を含まない血清について、[第二試薬 - A から算出された値 + 第二試薬 - B から算出された値] (X) と [第二試薬 - C から算出された値] (Y) の相関性を示す。

30

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

本発明は、競合的均一系免疫凝集測定法等の競合的均一系凝集測定法で、反応試薬および生成物のうちの、1 個のみが濁りを有し、他の成分が水に溶解するということに基づいて試料中の物質を測定できるということを応用している。

本明細書において、競合的均一系免疫凝集測定法とは、測定すべき抗原を含む試料と、該抗原に対する抗体と、その抗体と結合可能な抗原を担持してある微細粒子とを混合し、該抗体と、試料中の抗原および微細粒子が担持した抗原との間で、抗原抗体反応を競合させて、微細粒子が担持した抗原と抗体との抗原抗体反応による凝集の度合いから、測定すべき抗原のレベルを定量する方法である。

40

本明細書において、競合的均一系凝集測定法とは、測定すべき物質を含む試料と、該物質に対する特異的結合パートナーと、その特異的結合パートナーと結合可能な物質を担持してある微細粒子とを混合し、該特異的結合パートナーと、試料中の物質および微細粒子が担持した物質との間で、特異的結合反応を競合させて、微細粒子が担持した物質と特異的結合パートナーとの特異的結合反応による凝集の度合いから、測定すべき物質のレベルを定量する方法である。

【 0 0 1 5 】

この競合的均一系凝集測定法の一般的な原理を、以下に例示して説明する。

まず、試料と試薬とを混合して反応させるものとして、(i) 試料中の測定しようとする

50

る物質、(ii)試薬としての、測定しようとする物質と同じ物質またはその類似物と微細粒子との結合体、(iii)試薬としての、測定しようとする物質に対する特異的結合パートナーを用いるが、これら(i)-(iii)の物質および試薬は、すべて水に可溶あるいは均一分散可能である。次いで、これらを混合して抗原抗体反応等の特異的結合反応をさせると、(iv)(ii)の結合体と(iii)の特異的結合パートナーとの結合物、および(v)(i)の物質と(iii)の特異的結合パートナーとの結合物の2つの特異的結合反応物が競合して生成する。(iv)の結合物は水に不溶性で濁りが生じるのに対し、(v)の結合物は水に可溶性である。従って、(iv)の結合物が多く形成されればされるほど、反応液の濁度(凝集の度合い)が増加する。

この競争反応では、(i)の物質は、(ii)の結合体と、限定量の(iii)の特異的結合パートナーに対して競争反応し、それによって、生じる不溶性の(iv)の結合物の量を減少させると同時に、反応溶液中の濁度を低下させる。そのため、試料中の測定しようとする物質が高濃度になればなるほど、反応液の濁りが小さくなる。従って、濁りの度合いから試料中の物質を測定することができる。

【0016】

この本発明に用いる競合的均一系免疫凝集測定法等の競合的均一系凝集測定法は、検量線が減衰曲線なので、通常の免疫凝集法等の均一系凝集測定法の弱点であるプロゾン現象が起こらないという長所を有する。

【0017】

本発明の複合体の測定法においては、例えば、上記原理中の(ii)の「試薬としての、測定しようとする物質と同じ物質またはその類似物と微細粒子との結合体」として「試薬としての、物質Aまたはその類似物、及び物質Bまたはその類似物が微細粒子に担持された結合体」を用いたことに特徴がある。本発明においては、好ましくは3度の競合的均一系凝集測定法を実施し、試料中の複合体ABにおける物質Aおよび遊離の形態にある物質AのレベルP、試料中の複合体ABにおける物質Bおよび遊離の形態にある物質BのレベルQ、また、レベルRを求める。この場合、3度の測定においては、上記原理中の(iii)の「試薬としての、測定しようとする物質に対する特異的結合パートナー」としては、それぞれ、「試薬としての、物質Aに対する特異的結合パートナー」、「試薬としての、物質Bに対する特異的結合パートナー」、「試薬としての、物質Aに対する特異的結合パートナーと物質Bに対する特異的結合パートナーの両方」を用いて行い、それぞれの凝集の度合いとしてレベルP、Q、Rを求める。最終的に、 $P + Q - R$ により複合体ABのレベルを求めて試料中の複合体ABのレベルを測定することができる。

【0018】

なお、本発明においては、物質AのレベルP、物質BのレベルQは、既知の方法により測定しても構わない。既知の方法としては、免疫比濁法(TIA法)、ラテックス免疫比濁法等を例示できる。

【0019】

本発明は、物質Aと物質Bとの複合体ABを含む可能性のある試料中の複合体ABのレベルを測定する方法である。

本発明において、複合体ABは、2つの異なる物質Aと物質Bとの複合体であれば特に限定しない。複合体としては、例えば、トランスフェリン-トランスフェリンレセプター複合体、トロンピン-アンチトロンピン複合体、第VIIa因子-アンチトロンピン複合体、酸化LDL-CRP複合体、PSA-2-マクログロブリン複合体、PSA-アンチキモトリプシン複合体、酸化LDL-1-アンチトリプシン複合体、プロテインCインヒビター-プロテアーゼ複合体、プラスミン-2-プラスミンインヒビター複合体、PSA-プロテインCインヒビター複合体、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-組織プラスミノゲンアクチベーター複合体、ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体、トランスサイレチン-レチノールバイディングプロテイン複合体、IgA-アルブミン複合体等が好適である。本発明においては、複合体を構成する2つの物質A、物質Bのうちのいずれかまたは両方がその複合体とは別な形、例えば、結合されていない遊離物質

10

20

30

40

50

として試料中に存在していても構わない。

【0020】

試料としては、複合体 A B が含む可能性のある試料であれば限定しないが、生体試料が好ましく、そのような試料として、血漿、血清、尿などが例示できる。

【0021】

本明細書において、物質 A に対する特異的結合パートナー C、物質 B に対する特異的結合パートナー D とは、それぞれ、複合体 A B における物質 A および遊離物質としての物質 A と特異的結合反応しうるもの、複合体 A B における物質 B および遊離物質としての物質 B と特異的結合反応しうるものであれば特に限定しないが、特異性と汎用性の点から、それぞれ、物質 A、物質 B に対する抗体が好適である。このような抗体とは、抗原、すなわち測定すべき物質に対する抗体であり、そのような抗体であれば抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれをも用いることができる。

物質がアビジン、ビオチン、ホルモン、ホルモンレセプターの場合、抗体以外の特異的結合パートナーとして、それぞれ、ビオチン、アビジン、ホルモンレセプター、ホルモン等を例示できる。

本明細書において、「物質 A 又はその類似物」における「類似物」とは、物質 A に対する特異的結合パートナーと特異的結合反応しうる物質であって物質 A 以外の物質であれば特に限定しないが、一般的には、物質 A と構造が類似しているものである。物質 A が蛋白質の場合、その蛋白質の構造中の一部のアミノ酸が欠損したり、付加したりした類似物で特異的結合パートナーと特異的結合反応しうるもの等を例示できる。

本明細書において、「物質 B 又はその類似物」における「類似物」とは、物質 B に対する特異的結合パートナーと特異的結合反応しうる物質であって物質 B 以外の物質であれば特に限定しないが、一般的には、物質 B と構造が類似しているものである。物質 B が蛋白質の場合、その蛋白質の構造中の一部のアミノ酸が欠損したり、付加したりした類似物で特異的結合パートナーと特異的結合反応しうるもの等を例示できる。

【0022】

本明細書において、特異的結合反応とは、特異的結合パートナーが抗体であるときは、抗原抗体反応であるが、その他としてアビジン - ビオチン結合反応、ホルモン - ホルモンレセプター結合反応を例示できる。

本明細書において、微細粒子とは、臨床検査の分野で用いられている免疫凝集反応に通常使用される微細粒子をそのまま使用することができる。最も一般的な微細粒子は、ラテックス粒子である。微細粒子は、例えば、粒径 10 ~ 500 nm のものが使用される。

本発明において、物質またはその類似物を微細粒子に担持しておく場合、担持の方法は、疎水性相互作用による物理的吸着法や共有結合法等の通常の担持する方法等の公知の担持法を用いることができる。

本発明においては、凝集の度合いを測定する方法としては、通常、生成する濁りを吸光度、好ましくは波長 340 ~ 940 nm のいずれかの吸光度で測定するのが好ましい。また、凝集の度合いを測定する方法としては、凝集塊を肉眼で観察したり、凝集をしなかった微細粒子を計数したりすることによっても実施することができる。それにより、該試料中の物質のレベルを測定できる。

【0023】

本明細書において、自動分析装置とは、試料に少なくとも 1 以上の液状試薬を自動的に加えて均一系で試料中の成分を凝集の度合いから測定できる装置であれば限定しないが、臨床検査分野で用いられる汎用型の生化学自動分析装置が好ましい。そのような装置として、例えば、日立 7180 型自動分析装置、7170S 型自動分析装置、7600 型自動分析装置、日本電子 BM2250 型自動分析装置、東芝 TBA - 200FR 型自動分析装置、オリンパス AU640 型自動分析装置、BECKMAN COULTER IMMAGE 800 等を例示することができる。

【0024】

本発明において、試料中の複合体 A B のレベルを測定するためには、例えば、i) 物質

10

20

30

40

50

A又はその類似物と物質B又はその類似物とを担持した微細粒子を含む試薬、i i - A) 物質Aに対する特異的結合パートナーCを含む試薬、i i - B) 物質Bに対する特異的結合パートナーDを含む試薬、i i - C) 物質Aに対する特異的結合パートナーCと、物質Bに対する特異的結合パートナーDとを含む試薬から構成される、試料中の複合体A Bのレベルを測定するためのキットを用いることができる。

【0025】

本発明の複合体A Bの測定法を実施するには、特異的結合パートナーとして抗体を用いることができる点から、物質Aと物質Bは、ともに蛋白質が好適である。その場合の具体的な方法として、例として、3種類の競合的均一系免疫比濁測定法を用いたI g A - アルブミン複合体の測定方法に関してさらに詳細に具体例を説明する(この場合に、物質Aと物質Bが、ともに蛋白質の場合は、以下のI g A、アルブミンをそれぞれ、物質A、物質Bとすればより一般的に説明になる)。

i) I g Aとアルブミンが感作されたラテックス粒子を含む試薬(物質A又その類似物と物質B又はその類似物とを担持した微細粒子を含む試薬) :

3 ~ 20 %濃度とした、表面にカルボキシル基を有する粒径10 ~ 500 nmのラテックス粒子溶液に、緩衝液で溶解した1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド(EDC)溶液1 mLを添加し、EDC添加ラテックス溶液を調製する。

次いで、I g A溶液をEDC添加ラテックス溶液に加え、0 ~ 40 ℃にて5分 ~ 10時間攪拌しラテックス粒子のカルボキシル基と、I g Aのアミノ基の縮合反応により結合させた後、アルブミン溶液を加えて反応を停止させる。その後、3,000 ~ 30,000 rpmで遠心分離を行い、上清を廃棄し沈殿物を回収する。この沈殿物に、アルブミン溶液を加え沈殿物を懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させた後、0 ~ 40 ℃で攪拌する。次いで、3,000 ~ 30,000 rpmで遠心分離を行い、得られた沈殿物に、緩衝液を加えて懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させI g A・アルブミン感作ラテックス粒子を得、これを緩衝液で希釈し第一試薬として用いる。

【0026】

i i - A) 抗I g A抗体含有試薬(物質Aに対する特異的結合パートナーCを含む試薬) :

抗ヒトI g Aヤギ血清等の抗I g A抗体に緩衝液を加え抗I g A抗体含有試薬溶液とし、それを第二試薬 - Aとして用いる。この抗I g A抗体は、I g A - アルブミン複合体におけるI g Aおよび遊離の形態にあるI g Aの両者に対して特異的結合反応しうるものである。

i i - B) 抗アルブミン抗体含有試薬(物質Bに対する特異的結合パートナーDを含む試薬) :

抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン等の抗アルブミン抗体に緩衝液を加え抗アルブミン抗体含有試薬とし、それを第二試薬 - Bとして用いる。この抗アルブミン抗体は、I g A - アルブミン複合体におけるアルブミンおよび遊離の形態にあるアルブミンの両者に対して特異的結合反応しうるものである。

i i - C) 抗I g A抗体と抗アルブミン抗体を含む試薬(物質Aに対する特異的結合パートナーCと、物質Bに対する特異的結合パートナーDとを含む試薬) :

上記した、抗ヒトI g Aヤギ血清等の抗I g A抗体と、抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン等の抗アルブミン抗体とを緩衝液で希釈し、混合抗血清溶液等の抗I g A抗体と抗アルブミン抗体を含む試薬とし、それを第二試薬 - Cとして用いる。

【0027】

I g A - アルブミン複合体の測定 :

I g A - アルブミン複合体の測定をするため、日立7180形等の汎用型の生化学自動分析装置を用い、試料2 ~ 20 μLに対し第一試薬50 ~ 200 μL、第二試薬(- A、B、及びCのいずれか)50 ~ 200 μLを反応させ、波長340 ~ 800 nmにて、例えば、16 - 34測光ポイント間(第二試薬添加直後から5分後に相当)における2ポイントエンド法による吸光度変化量を測定する。

試料を第一試薬と第二試薬 - A (抗 I g A 抗体) の組み合わせで反応させると、競合的均一系凝集測定法にて試料中の I g A - アルブミン複合体における I g A および遊離の形態にある I g A のレベル (P 値) を測定できる。試料を第一試薬と第二試薬 - B (抗アルブミン抗体) の組み合わせで反応させると、競合的均一系免疫凝集測定法にて試料中の I g A - アルブミン複合体におけるアルブミンおよび遊離の形態にあるアルブミンのレベル (Q 値) を測定できる。また、試料を第一試薬と第二試薬 - C (抗 I g A 抗体と抗アルブミン抗体) の組み合わせで反応させ、競合的均一系免疫凝集測定法にて測定できる値を R 値として求める。

P 値、Q 値、R 値の単位は、例えば、3 者が同一の単位であればよく、吸光度変化量そのものでもよく、検量線で mg / dL 等の重量濃度、 mmol / L 等のモル濃度に換算したものをを用いてもよい。この値から、 $P + Q - R$ を 値として求め、得られる値を I g A - アルブミン複合体のレベルとする。

【0028】

なお、I g A - アルブミン複合体は、上記のように3種類の競合的均一系免疫比濁測定法を用いて測定することが最も好ましいが、それ以外に、例えば、試料中の I g A - アルブミン複合体を I g A に対する抗体とアルブミンに対する抗体を用いた免疫測定法により測定できる。例えば、I g A に対する抗体とアルブミンに対する抗体のいずれか一方を固相に結合させた固相抗体に、試料中のその複合体を接触させ、同時に固相に固定されていない方の抗体を用いた標識抗体を作用させて、その複合体を測定する方法によっても測定できる。これらのような方法にて I g A - アルブミン複合体のレベルを測定し、I g A 型 M 蛋白血症の判定をすることができる。

【0029】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

ヒト血清中 I g A - アルブミン複合体のレベルの測定

1) ヒト I g A とヒトアルブミンが感作されたラテックス粒子 (以下、I g A ・アルブミン感作ラテックス粒子と記載することもある) の調製

ラテックス粒子へのヒト I g A およびヒトアルブミンの結合は以下のように行った。

2 - モルホリノエタンスルホン酸 1 水和物 (MES) 緩衝液で 11.76% 濃度とした、表面にカルボキシル基を有する粒径 108 nm のラテックス粒子溶液 8.5 mL に、MES 緩衝液で 400 mg / mL に調製した 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド (EDC) 溶液 1 mL を添加し EDC 添加ラテックス溶液を調製した。

次いで、それとは別に、正常ヒト血清より粗精製された、ヒト I g A (33 mg / mL) をトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) 緩衝液 - 1 で 0.3 mg / mL となるように希釈した。この溶液 100 mL を EDC 添加ラテックス溶液に加え、室温にて 1 時間攪拌しラテックス粒子のカルボキシル基と、I g A のアミノ基の縮合反応により結合させた後、ヒトアルブミン溶液を 50 mL 加えて反応を停止させた。その後、20,000 rpm で 1 時間遠心分離を行い、上清を廃棄し沈殿物を回収した。この沈殿物に、ヒトアルブミン溶液を 50 mL 加え沈殿物を懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させた後、室温で 1 時間攪拌した。次いで、20,000 rpm 遠心分離を行い得られた沈殿物に、Tris 緩衝液 - 2 100 mL 加えて懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させ 1% 濃度 I g A ・アルブミン感作ラテックス粒子を得た。

【0030】

2) ヒト I g A - アルブミン複合体測定用第一試薬の調製

I g A ・アルブミン感作ラテックス粒子を用いて、第一試薬を調製した。

第一試薬は、1% 濃度 I g A ・アルブミン感作ラテックス粒子 10 mL に Tris 緩衝液 - 2 を 90 mL を加えてラテックス 0.1% 濃度の溶液として用いた。

【0031】

10

20

30

40

50

3) ヒトIgA - アルブミン複合体測定用第二試薬の調製

抗ヒトIgAヤギ血清、抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン、及びこれら2つの血清を混合したものをを用いて、3種類の第二試薬を調製した。

第二試薬 - A (抗IgA抗体)は、抗ヒトIgAヤギ血清0.15mLにTris緩衝液 - 2 99.85mLを加え抗ヒトIgAヤギ血清0.15%濃度の溶液として用いた。

第二試薬 - B (抗アルブミン抗体)は、抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン1.1mLにTris緩衝液 - 2を98.9mL加え抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン1.1%濃度の溶液として用いた。

第二試薬 - C (抗IgA抗体と抗アルブミン抗体)は、抗ヒトIgAヤギ血清0.15mL、抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン1.1mLにTris緩衝液 - 2 98.75mLを加え抗ヒトIgAヤギ血清0.15%濃度、抗ヒトアルブミンヤギ血清 - フラクシオン1.1%濃度の混合抗血清溶液として用いた。

【0032】

これら調製した3種類の第二試薬に対して、おのこの第一試薬は、前述したラテックス溶液を共通して用いた。

試料を第一試薬と第二試薬 - A (抗IgA抗体)の組み合わせで反応させると、競合的均一系凝集測定法にて試料中のIgA (P値)を測定できる。試料を第一試薬と第二試薬 - B (抗アルブミン抗体)の組み合わせで反応させると、競合的均一系免疫凝集測定法にて試料中のアルブミン (Q値)を測定できる。また、試料を第一試薬と第二試薬 - C (抗IgA抗体と抗アルブミン抗体)の組み合わせで反応させ、競合的均一系免疫凝集測定法にて測定できる値をR値として求める。

【0033】

各試薬の組成は以下の通りである。

Tris緩衝液 - 1

Tris	50mM	pH 7.4
塩化ナトリウム	100mM	

ヒトアルブミン溶液

Tris	12.4mM	pH 7.5
尿素	20mM	
ヒトアルブミン (SCRIPPS社製)	10%	

Tris緩衝液 - 2

Tris	50mM	pH 7.4
塩化ナトリウム	100mM	
Triton - X 100	0.1%	

【0034】

4) 検量線の作成

標準試料は、ヒトIgA及びヒトアルブミン濃度既知の血清を、Tris緩衝液 - 2を用いて適宜希釈して使用した。また、第二試薬 - Cの標準試料濃度は、単一血清中で、濃度既知のIgA濃度とアルブミン濃度を加えたものとした。

ヒトIgA・アルブミン複合体の測定をするため、日立7180形自動分析装置を用い、試料12μLに対し第一試薬120μL、第二試薬(-A、B、及びCのいずれか)120μLを反応させ、波長570nmにて16-34測光ポイント間(第二試薬添加直後から5分後に相当)における2ポイントエンド法による吸光度変化量を測定した。

第一試薬は共通で用い、第二試薬 - A、B、及びC試薬を用いて、標準試料を測定した際の吸光度変化量をそれぞれ表1、2、3及び図1、2、3に示した。

【0035】

【表 1】

表 1 : 第二試薬 - A (抗 I g A 抗体) を用いて
標準試料を測定した際の吸光度変化量

血清 I g A 濃度 (m g / d L)	吸光度変化量 (OD × 1 0 0 0 0)
	主波長 5 7 0 n m、 副波長 8 0 0 n m
0 . 0 0	3 4 0 6
0 . 1 3	3 2 7 7
0 . 2 5	3 1 4 8
0 . 7 4	2 7 0 4
1 . 2 7	2 3 2 2
2 . 0 8	1 8 5 5

10

【 0 0 3 6 】

【表 2】

表 2 : 第二試薬 - B (抗アルブミン抗体) を用い
て標準試料を測定した際の吸光度変化量

血清アルブミン濃度 (m g / d L)	吸光度変化量 (OD × 1 0 0 0 0)
	主波長 5 7 0 n m、 副波長 8 0 0 n m
0 . 0 0	6 2 5 4
2 . 2 7	6 0 1 9
4 . 4 7	5 4 4 5
1 3 . 4 2	2 4 3 3
2 2 . 3 0	1 4 5 1
3 6 . 5 6	1 1 1 5

20

30

【 0 0 3 7 】

【表 3】

表 3：第二試薬 - C（抗 I g A 抗体と抗アルブミン抗体）
を用いて標準試料を測定した際の吸光度変化量

血清 I g A 濃度 + 血清アルブミン濃度 (mg/dL)	吸光度変化量 (OD×10000)
	主波長 570 nm、 副波長 800 nm
0.00	6400
2.40	6151
4.72	5626
14.16	2905
23.57	2080
38.64	1835

10

【0038】

表 1、2、3 及び図 1、2、3 に示したように、いずれの試薬においても、標準液中のヒト I g A 及びヒトアルブミンが増すにつれて競合反応により吸光度変化量が減少した。

このことは、第一試薬と第二試薬 - A、B、C との組み合わせにて、各吸光度変化量を求めることにより I g A、アルブミン、R 値を濃度としても求められることを示している。

20

【0039】

5) 第二試薬 - A、B を用いた I g A、アルブミンの測定の確認

第二試薬 - A、B を用いた試薬で、試料中の I g A、アルブミンを正確に測定できるかどうかを確認するため、これらの試薬と、免疫比濁法 (T I A 法) を用いた血清 I g A、及び血清アルブミン測定試薬との相関性の有無を検討した。

試料は、ウエスタンブロット法にて確認された I g A - アルブミン複合体を含まない血清を、T r i s 緩衝液 - 2 にて適宜希釈して使用した。測定値は、前述の標準試料を用い、日立 7180 形自動分析装置の多点検量線作成機能により求められた検量線から算出させた。測定試薬は本発明試薬の第一試薬、第二試薬 - A、B を用い、また対照試薬として市販 T I A 法の「N - アッセイ T I A I g A - R C」、「N - アッセイ T I A M i c r o A l b」(日東紡績)を用いた。

30

本発明試薬の測定パラメーターは前述した条件を使用し、T I A 法は指定されたパラメーター及び標準液を用いた。

本発明試薬との相関性の結果を図 4、図 5 に示す。ただし、試料は適宜希釈し測定しているため、値は希釈倍数を掛け直し表した。

【0040】

図 4、図 5 に示すように、T I A 法を X、本発明試薬を Y として相関性を確認した結果、第二試薬 - A では、 $Y = 1.006X + 10.65$ 相関係数 0.9962、第二試薬 - B では、 $Y = 0.9481X + 144.9$ 相関係数 0.9981 と共に良好な結果が得られた。T I A 法との相関性が確認されたことから、第二試薬 - A、B を用いた試薬では、血清 I g A 及び血清アルブミンを、共に正確に測定できていると言える。

40

【0041】

6) ヒト血清中 I g A - アルブミン複合体のレベル

測定試薬は、第一試薬及び、第二試薬 - A、B、C を用い、前述と同一の測定条件にて測定した。

試料は前述のものに加え、ウエスタンブロット法にて確認された I g A - アルブミン複合体を含む血清も T r i s 緩衝液 - 2 にて適宜希釈して使用した。

本発明試薬において、[第二試薬 - A から算出された値 + 第二試薬 - B から算出された

50

値] (X) と [第二試薬 - C から算出された値] (Y) の相関性を図 6、図 7 に示す。

図 6 は I g A - アルブミン複合体を含まない血清、及び I g A - アルブミン複合体を含む検体の全てを含む結果であり、図 7 は I g A - アルブミン複合体を含まない血清のみの相関図である。

【 0 0 4 2 】

相関性を確認したところ、I g A - アルブミン複合体を含まない血清のみ (図 7) においては $Y = 0.9962X - 29.91$ 相関係数 0.9963 と良好な結果が得られた。しかし、図 6 に示したように I g A - アルブミン複合体を含む血清は、複合体を含まない血清から得られた相関式から大きく乖離した結果となった。これは、I g A - アルブミン複合体を含む血清に、特異的に現れる傾向である。

ここで、[第二試薬 - A から測定された値] I g A のレベルを P、[第二試薬 - B から測定された値] アルブミンのレベルを Q、[第二試薬 - C から測定された値] を R とすると、I g A - アルブミン複合体を含まない場合は、 $= P + Q - R < 0$ の関係が成り立つ。一方、I g A - アルブミン複合体を含む場合は、 $= P + Q - R > 0$ の関係となる。表 4 に示したように、実際の血清を測定した結果から、複合体を含まない検体の α よりも、複合体を含む検体の α が有意に高くなっており、この関係式が成り立っていることが証明できる。

【 0 0 4 3 】

【表 4】

表 4

サンプル	P + Q (mg / d L)	R (mg / d L)	α
含まない 1	3 5 4 4	3 4 9 6	4 8
含まない 2	3 8 1 4	3 8 3 2	- 1 8
含まない 3	4 4 5 4	4 3 8 0	7 4
含まない 4	4 2 5 4	4 1 8 0	7 4
含まない 5	4 0 9 2	4 1 8 4	- 9 2
含む 1	3 6 4 1	3 0 1 4	6 2 7
含む 2	3 6 8 0	3 2 0 5	4 7 5
含む 3	2 9 2 8	2 3 5 4	5 7 4
含む 4	7 4 3 9	4 3 2 5	3 1 1 4
含む 5	4 8 9 7	3 7 2 1	1 1 7 6
含む 6	4 9 5 9	3 6 5 1	1 3 0 8
含む 7	5 5 9 5	3 9 4 1	1 6 5 4
含む 8	3 5 1 8	3 1 2 2	3 9 6
含む 9	3 6 7 1	3 0 7 3	5 9 8

【 0 0 4 4 】

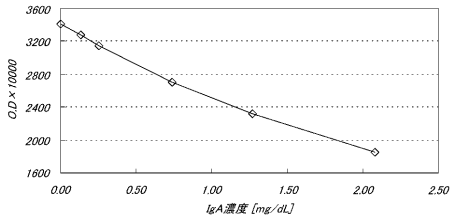
したがって、以上のことより本発明試薬は、共通の第一試薬と 3 種類の第二試薬を用いることで、網羅的かつ特異的にヒト血清中 I g A - アルブミン複合体のレベルを測定できることが判明した。また、I g A - アルブミン複合体のレベルを求めることにより、I g A 型 M 蛋白血症の患者を判定できることが判明した。

【産業上の利用可能性】

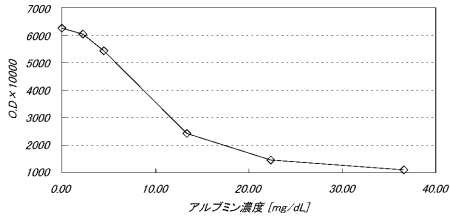
【 0 0 4 5 】

本発明の競合的均一系凝集測定法による複合体の測定法方法およびキットにより、入手しやすい試薬を用いて簡便に試料中の I g A - アルブミン複合体などの複合体のレベルを簡単に測定できる。また、この方法およびキットは、汎用型の生化学自動分析装置に適用できるので、多試料中の目的の複合体を短時間で簡便に測定できる。

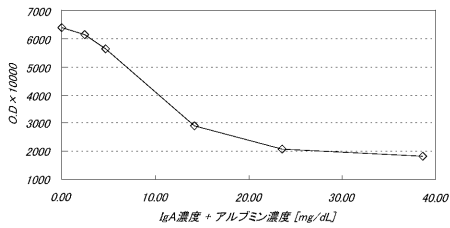
【 図 1 】



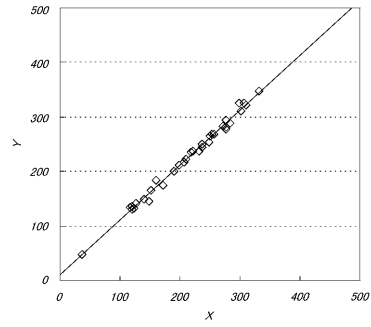
【 図 2 】



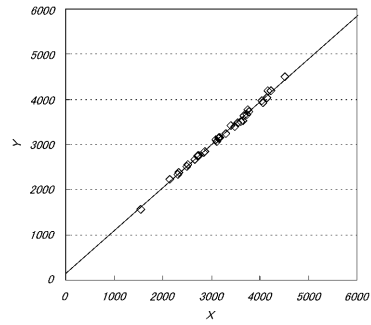
【 図 3 】



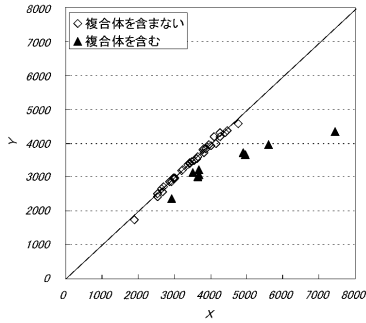
【 図 4 】



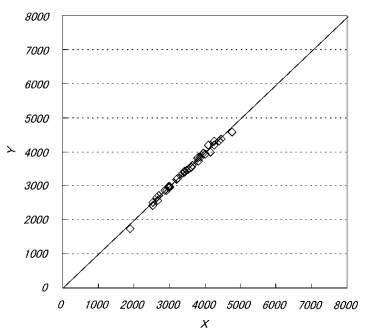
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/058973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N21/82(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/545(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, G01N21/82, G01N33/53, G01N33/545 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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Miyuki YAMAUCHI et al., "ELISA-ho ni yoru Iga -Albumin Fukugo Tairyo no Sokuteiho no Kakuritsu Oyobi sono Mondaiten", Dai 54 kai Japanese Society of Laboratory Medicine Gakujutsu Shukai Yokoshu, 31 October, 2007 (31.10.07), page 133, O-066	8,9/1-7, 10-12
Y/A	JP 02-193071 A (The Green Cross Corp.), 30 July, 1990 (30.07.90), Claims 1, 2 (Family: none)	8,9/1-7, 10-12
<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 15 June, 2009 (15.06.09)		Date of mailing of the international search report 23 June, 2009 (23.06.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/058973

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2005-520124 A (Oklahoma Medical Research Foundation), 07 July, 2005 (07.07.05), Claim 1 & US 2004/0197842 A1 & EP 1409713 A & WO 2003/004694 A1 & CA 2451378 A	8, 9/1-7, 10-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/058973									
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, G01N21/82(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/545(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, G01N21/82, G01N33/53, G01N33/545											
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>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009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	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y/A	山内みゆき 他, ELISA法によるIgA-アルブミン複合体量の測定法の確立およびその問題点, 第54回日本臨床検査医学会学術集会予稿集, 2007.10.31, 第133頁, O-066	8,9 /1-7, 10-12									
Y/A	JP 02-193071 A (株式会社ミドリ十字) 1990.07.30, 請求項1、2 (ファミリーなし)	8,9 /1-7, 10-12									
<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		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 15.06.2009		国際調査報告の発送日 23.06.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子	2J 3906								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 8 9 7 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	JP 2005-520124 A (オウクラホウマ、メディカル、リサーチ、ファ ウンデーション) 2005.07.07, 請求項 1 & US 2004/0197842 A1 & EP 1409713 A & WO 2003/004694 A1 & CA 2451378 A	8, 9 /1-7, 10-12

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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(74)代理人 100097870

弁理士 梶原 齋子

(74)代理人 100140556

弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719

弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258

弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969

弁理士 井上 洋一

(74)代理人 100132492

弁理士 弓削 麻理

(74)代理人 100163485

弁理士 渡邊 義敬

(74)代理人 100112243

弁理士 下村 克彦

(72)発明者 藤田 清貴

長野県松本市旭3丁目1番1号 国立大学法人信州大学 医学部 保健学科内

(72)発明者 小島 良

福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地 日東紡績株式会社 バイオケミカル研究所内

(72)発明者 佐藤 善郎

福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地 日東紡績株式会社 バイオケミカル研究所内

(72)発明者 佐藤 七月

福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地 日東紡績株式会社 バイオケミカル研究所内

(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)	测量复合物的方法和用于其的试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2010013525A1	公开(公告)日	2012-01-05
申请号	JP2010522647	申请日	2009-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社 国立大学法人信州大学		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社 国立大学法人信州大学		
[标]发明人	藤田清貴 小島良 佐藤善郎 佐藤七月		
发明人	藤田 清貴 小島 良 佐藤 善郎 佐藤 七月		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/536 G01N2333/765		
FI分类号	G01N33/543.581.A G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/545.B		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一 下村胜彦		
优先权	2008197156 2008-07-31 JP		
其他公开文献	JP5085736B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在测定可能包含由物质A和另一种物质B组成的复合物AB的样品中复合物AB的水平时，通过竞争性均质分析法，使用包括特指伴侣C的试剂，对复合物进行分析 与物质A结合，含有与物质B特异性结合的伴侣D的试剂，含有与物质A或其类似物和物质B或其类似物结合的细颗粒的试剂，以及与物质A和配对物D特异性结合的伴侣C的试剂 特异性结合物质B。因此，可以轻松的分析样品中的复合物。 以上方法适用于通用生化自动分析仪。

血清IgA濃度 (mg/dL)	吸光度变化量 (OD×10000)
	主波長570nm、 副波長800nm
0.00	3406
0.13	3277
0.25	3148
0.74	2704
1.27	2322
2.08	1855