

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/150804

発行日 平成24年12月10日 (2012.12.10)

(43) 国際公開日 平成22年12月29日 (2010.12.29)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
**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 18 頁)

出願番号	特願2011-519913 (P2011-519913)	(71) 出願人	507126487 公立大学法人奈良県立医科大学 奈良県橿原市四条町840
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/060616	(71) 出願人	000231394 アルフレッサファーマ株式会社 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号
(22) 国際出願日	平成22年6月23日 (2010.6.23)	(74) 代理人	100163647 弁理士 進藤 卓也
(31) 優先権主張番号	特願2009-151914 (P2009-151914)	(72) 発明者	大井 豪一 日本国奈良県橿原市四条町840 公立大 学法人奈良県立医科大学内
(32) 優先日	平成21年6月26日 (2009.6.26)	(72) 発明者	成瀬 勝彦 日本国奈良県橿原市四条町840 公立大 学法人奈良県立医科大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

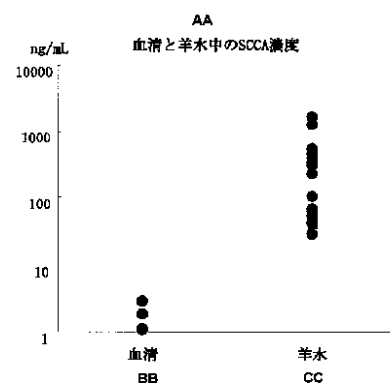
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 破水および羊水塞栓症の検査方法

(57) 【要約】

簡易な操作で迅速に検査可能な、高精度の破水および羊水塞栓症の検査方法を提供する。本発明の検査方法は、母体由来の生体試料中の扁平上皮癌関連抗原 (SCCA) の濃度を測定する工程を含む。SCCA を指標として用いることにより、簡易な操作で迅速に検査が可能でありかつ高精度な破水および羊水塞栓症の検査方法を提供することができる。

【図1】



AA SCCA CONCENTRATIONS IN SERUM AND AMNIONIC FLUID  
 BB SERUM  
 CC AMNIONIC FLUID

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

母体由来の生体試料中の扁平上皮癌関連抗原（SCCA）の濃度を測定する工程を含む、破水および羊水塞栓症の検査方法。

## 【請求項 2】

前記生体試料が、膣分泌液または血液である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 SCCA の濃度が、免疫学的に測定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 SCCA の濃度が、ラジオイムノアッセイ、ラテックス凝集法、EIA、ELISA、およびイムノクロマト法からなる群から選択される方法により測定される、請求項 3 に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

扁平上皮癌関連抗原（SCCA）を認識する抗体からなる、破水および/または羊水塞栓症の検査用試薬。

## 【請求項 6】

扁平上皮癌関連抗原（SCCA）を認識する抗体を含む、破水および/または羊水塞栓症の検査用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本発明は、扁平上皮癌関連抗原（SCCA）を指標とする、破水および羊水塞栓症の検査方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

前期破水（premature rupture of the membranes：PROM）は全妊娠の 5～10% に併発するといわれ、特に妊娠 37 週未満の preterm PROM は、早産の主要な原因のひとつとなっている。欧米などの先進国と同様に、日本においても新生児死亡およびハンディキャップ発生の最も大きな原因は早産である。早産のうち前期破水（PROM）および切迫早産によるものは約三分の一を占める。特に妊娠 28 週未満での早産は、胎児の肺が未発育・未成熟であり、感染防御能が未発達であるため、感染の早期進行と羊水量の減少とが予後不良の原因となっている。

30

## 【0003】

早産低出生体重児の予後は改善されてきたが、超低出生体重児では未だ問題が多い。日本産婦人科学会周産期委員会の報告（平成 12 年集計）では、出産体重 500g 以上 1000g 未満の周産期死亡率は 262.5 であり、出産体重 1000g 以上の周産期死亡率 6.5 の約 40 倍と高値である。また、新生児合併症については、重症の呼吸障害、脳室内出血、脳室周囲白質軟化症（PVL）、未熟網膜症、症候性 PDA、壊死性腸炎の頻度が高い。したがって、早産、特に妊娠 28 週未満の場合は、妊娠期間を延長し未熟性による要因を減少させることの意義は大きく、切迫早産や前期破水の治療が必要である。

40

## 【0004】

破水の発症には、子宮収縮に伴う物理的な力や局所炎症に伴う卵膜脆弱化などの複数の要因が関与している。前期破水は、大部分が子宮口付近の卵膜破綻による破水であり、高位の卵膜破綻による高位破水もある。子宮口付近の卵膜破綻は、子宮頸管炎や絨毛膜羊膜炎により増加した好中球より放出されるエラスターゼが卵膜のコラーゲンを分解することにより発生する。一方、高位の卵膜破綻は、胎便中のトリプシンが羊膜上皮細胞を破壊し卵膜のコラーゲンを分解することにより発生する。高位破水の場合、妊娠を持続させることは比較的容易であるが、子宮口付近の卵膜破綻は、上行性感染の波及が早産を加速させるため妊娠期間を延長することが難しく、特に妊娠中期の前期破水管理は重要である。

## 【0005】

50

破水診断は、膣鏡診により、子宮口から明らかな羊水流出が認められたり、後膣円蓋に羊水貯留が認められれば容易である。しかし、高位破水や子宮口からの流出量が極めて少ない場合などは、破水確認が難しい。羊水の確認方法としては、従来よりpH測定法、シダ状結晶証明法、胎児脂肪球証明法、羊膜腔内色素注入法などが知られている。pH測定法は簡便なため多用されているが、pH測定法の早産期の正診率は71～85%と限界がある。そのため、近年は、頸管腔分泌液中の顆粒球エラストラーゼ判定法、癌胎児性フィブロネクチン判定法、膣分泌液中のヒトインスリン様成長因子結合蛋白1型(IGFBP-1)判定法、膣分泌液中の $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)など、正診率の高い判定法が使用されている。中でもIGFBP-1は胎児の成長に重要な役割を果たすヒトインスリン様成長因子に結合するタンパク質のひとつで、子宮基底脱落膜より産生され、羊水中に高濃度で存在している。その濃度は、母体血清中と比較して非常に高いため、血液混入による影響をほとんど受けない。また、尿や精液中に含まれるIGFBP-1は検出感度以下であり、正常な膣分泌液中のIGFBP-1濃度は0～90ng/mLと低い。これに対して、羊水中には10～800 $\mu$ g/mLの濃度で存在するため、破水した場合には羊水由来のIGFBP-1が膣中に漏出し、膣分泌液中のIGFBP-1が上昇するので、これを検出することは、破水診断の指標となる。

10

#### 【0006】

しかしながら、上述のような破水診断キットでの有病正診率/無病正診率は、pH測定法で73.7%/72.4%、ヒト癌胎児性フィブロネクチンで84.2%/82.8%、IGFBP-1で94.7%/93.1%にすぎず、さらなる高感度診断キットの開発が望まれている。

20

#### 【0007】

また、発生頻度は低いですが、羊水成分が母体血中に流入することにより、致死的な羊水塞栓症が発症する。羊水塞栓症では、母体の肺循環系が閉塞し、凝固系を活性化して播種性血管内凝固症候群(DIC)を引き起こし、母体死亡率は80%に及ぶ(非特許文献1)。羊水塞栓症の確定診断は、一般には死後の肺剖検によることがほとんどである。肺血管腔内に存在する胎児成分や $\mu$ チンを染色し、母体肺中の胎児成分の存在が証明される。剖検による確定診断には、組織染色としてヘマトキシリン・エオジン染色、 $\mu$ チン染色、コトイディオ染色等が行われる(非特許文献2)。

30

#### 【0008】

羊水塞栓症の治癒率改善には生前診断が不可欠である。このような母体死危険因子のスクリーニングおよび高リスク妊娠の母体把握管理に有効であると考えられる上記母体血中の羊水成分の確認および測定法として、光学的手法を用いた光ファイバーセンサーによる羊水中胎便成分羊水混濁装置が開発された。しかし、これは大学病院レベルでの臨床応用に止まるにすぎない(非特許文献3～6)。また、母体血中の垂鉛コプロポルフィリンを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定する方法が報告されている(非特許文献7～8)。しかし、この方法はその操作が煩雑で時間のかかるものである。羊水塞栓症は、発症後、ショックから心停止へと急速に進行する症例が多く、1時間以内に半数が死亡するといわれるため、より簡易な操作で迅速に診断が可能でありかつ精度の高い羊水塞栓症の検査方法が求められる。

40

#### 【0009】

ところで、扁平上皮癌関連抗原(SCCA)は、肺癌、食道癌、皮膚癌、子宮体頸部癌など扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして広く臨床現場で使用され認知されているタンパク質である。SCCAは、染色体18q21.3上にタンデムに並んでいる二つの遺伝子(scca1遺伝子およびscca2遺伝子)にコードされているセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)ファミリーに属するプロテアーゼインヒビターである。以下、SCCA1あるいはSCCA2というときは、それぞれscca1遺伝子およびscca2遺伝子の発現産物をいう。

#### 【0010】

羊水中にSCCAが存在することは既に報告されている。非特許文献9には腫瘍マーカー

50

ーとしてのSCCA測定を目的に、SCCA1およびSCCA2に対するモノクローナル抗体を作製し、SCCA1とSCCA2とを鑑別測定するELISAが報告されている。生体試料として、唾液、羊水、血清、血漿および脳脊髄液を使用し、SCCA1およびSCCA2を鑑別測定した結果、血清および脳脊髄液中にはSCCA1およびSCCA2が共に存在しないこと、唾液中にSCCA1が存在すること、ならびに羊水中にはSCCA2はほとんど存在せずSCCA1が約10ng/mL~83ng/mL存在することが報告されている。

【0011】

また、気管支喘息の発作に伴ってSCCAの血中濃度が有意に高まるため、SCCAを気管支喘息発作の検査の指標として応用することも試みられている（特許文献1）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】特許第4185862号公報

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】高橋昌俊、日産婦関東連合地方部会会報、1991年、54巻、68-69頁

【非特許文献2】W.D.Rocheら、Obstet. Gynecol., 1974年、43巻、729-731頁

【非特許文献3】住本和博ら、周産期学シンポジウム、1988年、No.6、138頁

【非特許文献4】住本和博ら、産婦治療、1988年、56巻、345頁

20

【非特許文献5】寺尾俊彦ら、産婦人科の実際、1989年、38頁、347-352頁

【非特許文献6】K.Horiuchiら、Clin. Chem., 1991年、37巻、1173-1177頁

【非特許文献7】成瀬寛夫ら、日産婦誌、1990年、42巻、719-726頁

【非特許文献8】H.Naruseら、J. Perinat. Med., 1989年、17巻（Suppl.1）、104頁

【非特許文献9】S.Cataltepeら、Clinica Chimica Acta、2000年、295巻、107-127頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、簡易な操作で迅速に検査可能でありかつ高精度な破水および羊水塞栓症の検査方法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、破水および羊水塞栓症の検査方法を提供し、該方法は、母体由来の生体試料中の扁平上皮癌関連抗原（SCCA）の濃度を測定する工程を含む。

【0016】

1つの実施態様では、上記生体試料は、膣分泌液または血液である。

【0017】

1つの実施態様では、上記SCCAの濃度は、免疫学的に測定される。

【0018】

さらなる実施態様では、上記SCCAの濃度は、ラジオイムノアッセイ、ラテックス凝集法、EIA、ELISAおよびイムノクロマト法からなる群から選択される方法により測定される。

40

【0019】

本発明はまた、扁平上皮癌関連抗原（SCCA）を認識する抗体からなる、破水および/または羊水塞栓症の検査用試薬を提供する。

【0020】

本発明はさらに、扁平上皮癌関連抗原（SCCA）を認識する抗体を含む、破水および/または羊水塞栓症の検査用キットを提供する。

【発明の効果】

【0021】

50

本発明によれば、羊水中に高濃度に存在し、かつ正常な母体体液中にはほとんど存在しないタンパク質であるSCCAを指標として用いることにより、簡易な操作で迅速に検査可能でありかつ高精度な破水および羊水塞栓症の検査方法を提供することができる。母体由来の生体試料として腔分泌液を用いた場合には、羊水が腔中に漏出しているか否かを簡易な操作で迅速に精度良く確認することができ、血液混入の影響をほとんど受けないため、破水検査方法として優れる。また、生体試料として血液あるいは血液由来の生体試料を用いた場合には、母体の血液中に羊水が流入しているか否かを簡易な操作で迅速に精度良く確認することができるため、従来は死後剖検でしか診断できなかった羊水塞栓症の検査方法として非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の実施例における羊水および血清中のSCCA濃度の測定結果を示すグラフである。

【図2】本発明の実施例における羊水および血清中のIGFBP-1濃度の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、羊水中に高濃度存在し、かつ正常な母体体液中にはほとんど存在しないタンパク質である扁平上皮癌関連抗原(SCCA)を指標として用いることにより、簡易な操作で迅速に破水および羊水塞栓症検査を行うことができることを見出したことに基づく。

【0024】

SCCAをコードする遺伝子は2種類(scca1遺伝子およびscca2遺伝子)存在するが、本発明では、それらの発現産物であるSCCA1とSCCA2とを鑑別測定しなくてもよい。好ましくは、SCCA1およびSCCA2の両方を総合的に測定する。

【0025】

(生体試料)

本発明における生体試料としては、母体から採取された体液などである。本発明においては、生体試料として、採取された臨床サンプルをそのまま、あるいは簡易な調製処理のみで検査に用いることが可能であり、煩雑な前処理の必要がない。

【0026】

破水の検査の場合には、生体試料として母体由来の腔分泌液を用いる。腔分泌液としては、母体から採取された未処理の臨床サンプルをそのまま用いてもよく、あるいは母体の腔頸管などから綿棒などにて採取した腔分泌液を検体抽出用の任意のバッファーなどを用いて抽出して調製したサンプルを用いてもよい。

【0027】

羊水塞栓症の検査の場合には、生体試料として母体由来の血液を用いる。血液としては、母体から採血された血液をそのまま用いてもよく、あるいは採血後遠心分離などによって調製された血清または血漿を用いてもよい。

【0028】

(SCCAの測定)

本発明における指標タンパク質であるSCCAの濃度の測定には、生体試料中のSCCA濃度を測定することができる任意の方法を用いることができる。具体的には、SCCAに特異的な抗体を利用する免疫学的測定方法、例えば、ラジオイムノアッセイ、ラテックス凝集法、EIA、ELISA、イムノクロマト法などの種々の方法が用いられる。本発明においては、より簡易な操作で迅速に測定結果が得られる方法が好ましい。特に、羊水塞栓症は、発症後、1時間以内に半数が死亡するといわれるため、より迅速に測定可能な方法を用いる必要がある。煩雑なサンプル調製が不要であること、簡易な操作で迅速に測定結果が得られることなどから、イムノクロマト法が好ましく用いられる。

【0029】

上記免疫学的測定方法において用いられる、指標タンパク質であるSCCAに特異的に

10

20

30

40

50

結合する抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、当業者に周知の方法を用いて作成することができる。例えば、指標タンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、抗原（すなわち、SCCA）を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができ、あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髄腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

#### 【0030】

指標タンパク質であるSCCAの検出には、通常、これらの抗体を標識して用いる。標識方法としては、酵素標識、放射線標識、蛍光標識などが挙げられる。また、これらの抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質を標識して間接的に検出することもできる。

#### 【0031】

##### （破水検査）

本発明の検査方法によって破水検査を行う場合には、破水の発症が疑われる母体から採取された腔分泌液中のSCCA濃度を、上記の測定方法で測定する。正常な母体の腔分泌液中にはSCCAはほとんど存在しないため、破水していない場合には腔分泌液中にSCCAは検出されない。また、正常な母体の血液中のSCCA濃度は羊水中のSCCA濃度と比較して非常に低いため、腔分泌液中に血液が混入した場合であっても、その影響をほとんど受けない。破水した場合には、羊水が腔中に漏出し腔分泌液に混入するため、腔分泌液中に含まれる羊水中のSCCAが検出される。したがって、本発明の検査方法では、母体の腔分泌液中のSCCA濃度を測定することにより、腔分泌液中に羊水が含まれているかどうかを精度良く確認することができる。

#### 【0032】

##### （羊水塞栓症検査）

本発明の検査方法によって羊水塞栓症の検査を行う場合には、羊水塞栓症が疑われる母体から採取された血液中のSCCA濃度を、上記の測定方法で測定する。血液中にはSCCAはほとんど存在しないため、正常な母体の血液中にSCCAは検出されないが、血液中に羊水成分が流入した場合には、羊水中のSCCAが検出される。したがって、本発明の検査方法では、母体から採取された血液中のSCCA濃度を測定することにより、血液中に羊水成分が含まれているかどうかを精度良く確認することができる。

#### 【0033】

上記測定には、分光光度計、マイクロプレートリーダー、生化学自動分析装置などを利用できる。特に、本発明の方法を生化学自動分析装置での測定に適用することにより、多数の検体を短時間に測定することが可能である。

#### 【0034】

##### （検査用試薬および検査用キット）

本発明の検査用試薬は、SCCAを認識する抗体からなる、破水および羊水塞栓症の検査のための試薬である。本発明の試薬を構成する抗体は、測定方法に応じて適切な標識を結合することができ、あるいは、測定方法に応じて適切な支持体に固定化され得る。上記の試薬は、どのような形態で提供されてもよく、密封包装されて提供されることが好ましい。

#### 【0035】

また、本発明の検査用試薬は、上記抗体の他に、検査や保存に必要な付加的要素と組み合わせ検査用キットとすることもできる。上記キットは、検量線作成用の被測定物質の標準品、使用時に各物質を溶解して適切な濃度の溶液を調製するための緩衝液、使用説明書などを含んでいてもよい。これらの要素は、必要に応じて予め混合しておいてもよい。

#### 【0036】

10

20

30

40

50

本発明の検査用キットとしては、例えば、イムノクロマト法に用いる試験片が挙げられる。試験片は、例えば、メンブレン、コンジュゲートパッド、サンプルパッドおよび吸収パッドをバックグシート（基材）に立体的に張り合わせるにより作製できる。コンジュゲートパッドは、コンジュゲート（標識抗体など）を含ませた部材である。メンブレンは、例えば、テストラインとして抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体を、コントロールラインとして抗マウスIgG抗体を固定化することにより作製できる。サンプルパッドは、サンプル添加部として用いられる部材である。吸収パッドは、クロマト展開したサンプルを吸収させるための部材である。

【0037】

イムノクロマト法用SCCA測定試験片では、サンプル中にSCCAが存在する場合には、SCCAがコンジュゲートパッド中の抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体標識金コロイドと免疫学的抗原抗体反応により結合し、さらにこの複合体が毛細管現象によりメンブレン上を移動し、テストライン部位に固定化した抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体に捕捉される。この結果、テストライン部位に金コロイドの赤紫色の呈色が確認される。サンプル中にSCCAが存在しない場合には、SCCAと抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体標識金コロイドとの結合が生じないため、テストライン部位は呈色しない。

10

【0038】

一方、サンプル中のSCCAの存在の有無に関わらず、コンジュゲートパッド中の抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体標識金コロイドはメンブレン上を移動し、コントロールライン部位に固定化した抗マウスIgG抗体に捕捉される。この結果、コントロールライン部位に金コロイドの赤紫色の呈色が確認される。

20

【実施例】

【0039】

実施例1：妊産婦羊水および血清中のSCCAおよびIGFBP-1濃度の測定

妊産婦より採取し調製した羊水19検体、および血清7検体をサンプルとして、それぞれの検体中のSCCA濃度およびIGFBP-1濃度を測定した。羊水および血液は、インフォームドコンセントにより同意を得た妊産婦から採取した。羊水は、妊産婦から採取したものを希釈せずに用いた。血清は、妊産婦から採血した血液を遠心分離することによって調製した。

30

【0040】

SCCAの測定は、化学発光免疫測定法（CLIA）による「ARCHITECT SCC」試薬キットおよび「ARCHITECT アナライザー」装置（いずれもアボットジャパン株式会社製）を用いて、添付文書に従って行った。測定結果を表1および図1に示す。

【0041】

【表1】

	SCCA濃度 ng/mL	
	血清	羊水
平均値	1.34	351.4
最高値	2.9	1639
最低値	0.6	28.4
羊水/血清 比	262	

40

【0042】

表1および図1に示すように、羊水中のSCCA濃度は28.4 ng/mL ~ 1639 ng/mL、血清中のSCCA濃度は0.6 ng/mL ~ 2.9 ng/mLであった。すなわち、血清中のSCCA濃度は非常に低いのに対し、羊水中のSCCA濃度は非常に高

50

く、平均で血清中の262倍の濃度で存在していることが確認された。

【0043】

対照として、破水診断マーカーとして臨床現場で広く使用されているIGFBP-1の測定を行った。測定には「IGFBP-1 EIA Kit」(Mediagnost社製)を用い、添付文書に従って実施した。測定結果を表2および図2に示す。

【0044】

【表2】

	IGFBP-1濃度 $\mu\text{g/mL}$	
	血清	羊水
平均値	2.86	84.24
最高値	4.0	365.68
最低値	2.48	0.84
羊水/血清比	29	

10

【0045】

表2および図2に示すように、羊水中のIGFBP-1濃度は $0.84 \mu\text{g/mL} \sim 365.68 \mu\text{g/mL}$ 、血清中のIGFBP-1濃度は $2.48 \mu\text{g/mL} \sim 4 \mu\text{g/mL}$ であった。すなわち、羊水中のIGFBP-1濃度は、血清中のIGFBP-1濃度の平均29倍であることが確認された。

20

【0046】

血清中のSCCAの濃度とIGFBP-1の濃度とを比較すると、SCCAは $1.34 \text{ ng/mL}$ (7検体平均値)であるのに対し、IGFBP-1は $2.86 \mu\text{g/mL}$ (7検体平均値)であり、SCCAの方が低濃度であった。SCCAとIGFBP-1との羊水中濃度/血清中濃度比を比較すると、SCCAの羊水中濃度は血清中濃度の平均262倍、IGFBP-1の羊水中濃度は血清中濃度の平均29倍であり、SCCAの羊水中濃度/血清中濃度比は、IGFBP-1の約10倍であることが確認された。

【0047】

したがって、破水検査の指標としてSCCAを用いることにより、従来法であるIGFBP-1を用いる方法よりも血液混入による影響を受けず、高精度に破水を検出できることがわかった。さらに、SCCAは羊水塞栓症の指標として有用であることがわかった。

30

【0048】

実施例2：イムノクロマト法用SCCA測定試験片の作製

A．抗体固定化メンブレンの作製

横 $15 \text{ cm}$ ×縦 $25 \text{ mm}$ に裁断したイムノクロマト法用メンブレン(Millipore社製、HiFlow Plus HFB12002、製品番号：HF12002XSS)に、ヒトSCCAに対する抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製、SCCA1/2(B-9)、製品番号：sc28384) $0.2 \text{ mg/mL}$ を、メンブレンの下端より $11 \text{ mm}$ の位置に $1 \text{ mm}$ の幅で $15 \text{ cm}$ にわたってライン状に均一に塗布し、テストラインとした。テストラインからメンブレンの上端に向かって $8 \text{ mm}$ 離して平行に、抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体(Fitzerald社製、Goat anti Mouse IgG、製品番号：41-GM25) $0.2 \text{ mg/mL}$ を同様に塗布し、コントロールラインとした。抗体を塗布したメンブレンを乾燥後、室温にて30分間ブロッキングバッファー( $50 \text{ mM}$ ホウ酸、 $0.5\%$ BSA、 $\text{pH} 8.5$ )に浸漬し(ブロッキング)、ブロッキングしたメンブレンを洗浄安定化バッファー( $50 \text{ mM}$  Tris-HCl、 $0.05\%$ コール酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.5$ )に浸漬し、次いで乾燥させた。このようにして、抗体固定化メンブレンを作製した。

40

【0049】

B．コンジュゲートパッドの作製

95の蒸留水 $1 \text{ L}$ に、 $10\%$ 塩化金酸溶液 $2 \text{ mL}$ を攪拌しながら添加し、さらに $2\%$

50

クエン酸ナトリウム溶液 10 mL を添加して攪拌した。室温に冷却した後、0.1 M 炭酸カリウム溶液を加えて pH 7.1 に調整し、金コロイド溶液を得た。

【0050】

上記メンブレンに固定化した抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体とはエピトープが異なる2種類の抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体SCCA1 (Santa Cruz Biotechnology社製、SCCA1(8H11)、製品番号：sc-21767) およびSCCA2 (Santa Cruz Biotechnology社製、SCCA2(10C12)、製品番号：sc-21793) を、それぞれ抗体濃度が50 µg/mLとなるように0.05%アジ化ナトリウムを含む10 mM HEPES (pH 7.1) で希釈した。

【0051】

2種類の抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体SCCA1およびSCCA2の希釈液0.1 mLを、それぞれ上記で得た金コロイド溶液1 mLに混合し、これを冷蔵下で2時間攪拌した。次いで、ブロッキングバッファー(10 mM HEPES、0.5% BSA、5.46% マンニトール、pH 7.1) 0.1 mLを添加し、これを37℃にて90分間攪拌した後、遠心分離により上清を除去した。次いで、得られた抗SCCAモノクローナル抗体結合金コロイドの沈殿を金コロイド塗布バッファー(20 mM Tris-HCl、5% スクロース、0.05% PEG、pH 8.0) 1.0 mLの添加により分散させ、抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体が金コロイド粒子に結合した金コロイド標識抗体の溶液を2種類得た。得られた2種類の抗ヒトSCCAマウスモノクローナル抗体結合金コロイド標識抗体溶液を、SCCA1：SCCA2=5：1の割合で混合した。次いで、横15 cm×縦8 mmに裁断したグラスファイバ-パッド(Millipore社製、Glass Fiber Conjugate Pad、製品番号：GFPC203000)に、上記混合した金コロイド標識抗体溶液0.8 mLを均一に塗布し、このパッドを真空乾燥機にて乾燥させた。このようにして、コンジュゲートパッドを作製した。

【0052】

C. イムノクロマト法用SCCA測定試験片の作製

上記A. で作製した抗体固定化メンブレン上に上記B. で作製したコンジュゲートパッド、サンプルパッド(Millipore社製、Glass Fiber Conjugate Pad、製品番号：GFPC203000) および吸収パッド(Millipore社製、Cellrose Fiber Sample Pad、製品番号：CFSP223000) をバックシート(Adhesives Research社製、ARcare9020 プレカットプラスチックバックシート、製品番号：301902000010) に立体的に張り合わせて、0.5 cm幅に裁断し、イムノクロマト法用SCCA測定試験片を作製した。

【0053】

実施例3：イムノクロマト法用SCCA測定試験片による妊産婦羊水中のSCCAの測定

妊産婦より採取し調製した羊水10検体をサンプルとして、実施例2で作製したイムノクロマト法用SCCA測定試験片を用いて、検体中のSCCAの測定を試みた。妊産婦より採取した羊水は、PBSでそれぞれ10倍に希釈して用いた。ブランクとして、PBSのみを用いた。

【0054】

サンプル120 µLを、イムノクロマト法用SCCA測定試験片のサンプル添加部に滴下し、クロマト展開させた。サンプル滴下5分後および10分後のテストライン部位およびコントロールライン部位における赤紫色の呈色の有無および呈色度合いを、肉眼で観察した。結果を表3に示す。なお、評価基準は、以下の通りである。

- : ライン呈色無し
- +<sup>W</sup> : 微弱ライン呈色有り
- + : 明確ライン呈色有り

【0055】

10

20

30

40

【表 3】

検体No.	SCCA濃度 (ng/mL)	イムノクロマト結果			
		テストライン部位		コントロールライン部位	
		5分後	10分後	5分後	10分後
ブランク	0	－	－	＋	＋
1	7.2	－	－	＋	＋
2	70.4	＋	＋	＋	＋
3	189.8	＋	＋	＋	＋
4	114.9	＋	＋	＋	＋
5	24.6	＋ <sup>w</sup>	＋	＋	＋
6	89.8	＋	＋	＋	＋
7	269.0	＋	＋	＋	＋
8	92.0	＋ <sup>w</sup>	＋	＋	＋
9	257.0	＋	＋	＋	＋
10	43.8	＋ <sup>w</sup>	＋	＋	＋

10

## 【 0 0 5 6 】

20

上記の羊水 10 検体をサンプルとして、実施例 1 と同様にして、検体中の SCCA 濃度を測定した。測定結果を表 3 に示す。

## 【 0 0 5 7 】

表 3 に示すように、検体 No. 1 を除くすべての検体においてテストライン部位において赤紫色の呈色が認められ、SCCA が測定されたことが確認できた。検体 No. 1 はテストライン部位の呈色が認められなかったが、これは羊水中の SCCA が低濃度であったためと考えられる。

## 【 0 0 5 8 】

したがって、羊水中の SCCA の測定方法としてイムノクロマト法が有用であることがわかった。

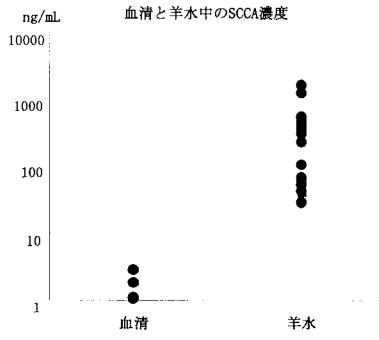
30

## 【 産業上の利用可能性 】

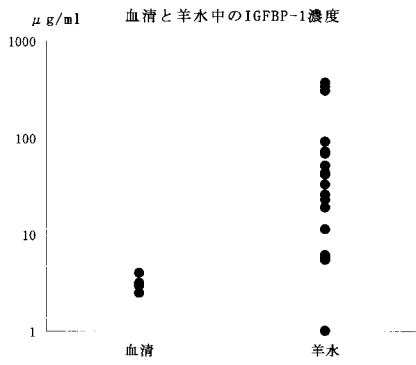
## 【 0 0 5 9 】

本発明によれば、母体体液中の SCCA を指標として用いることにより、破水および羊水塞栓症を、簡易な操作で迅速にかつ高精度に検査することができる。したがって、本発明は、妊産婦に対して早期により適切な処置を施すために非常に有用である。

【 図 1 】



【 図 2 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/060616
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, G01N33/574  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kaoru TAKEUCHI et al., "Yosui Sokusensho no 1 Rei", Tottori Sekijuji Ishi, 2003, vol.12, pages 17 to 20	1-6
Y	Hidekazu OI et al., "Yosui Sokusen", The World of Obstetrics & Gynecology, 2001, vol.53, no.1, pages 45 to 49	1-6
Y	Goichi YONEYAMA et al., "Yosui Sensokusho 1 Bokenrei no Byorigakuteki Kosatsu", Japan Society of Obstetrics and Gynecology Tokyo Chihobukai Kaishi, 1987, vol.36, no.2, pages 232 to 235	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 09 July, 2010 (09.07.10)		Date of mailing of the international search report 20 July, 2010 (20.07.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060616

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shugo NAWATA et al., "Shikyu Keibu Henpei Johigan kara no SCC Kogen Bunpitsu", The World of Obstetrics & Gynecology, 2000, vol.52, no.7, pages 589 to 592	1-6
A	Ikuno KAWABATA et al., "Seppaku Sozan·Hasui no Shindan", Clinical testing, 2009.04, vol.53, no.4, pages 441 to 444	1-6
A	JP 8-508015 A (VOROTELIAK, Victor), 27 August 1996 (27.08.1996), entire text; all drawings	1-6
A	Sule Cataltepe et al., Development of specific monoclonal antibodies and a sensitive discriminatory immunoassay for the circulating tumor markers SCCA1 and SCCA2, Clinica Chimica Acta, 2000, Volume 295, Issues 1-2, pp. 107-127	1-6
A	JP 5-203644 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 August 1993 (10.08.1993), entire text; all drawings	1-6
A	WO 2008/063928 A2 (PROTEOGENIX, INC.), 29 May 2008 (29.05.2008), entire text; all drawings	1-6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2010/060616

JP 8-508015 A	1996.08.27	AT 226959 T	2002.11.15
		AU 685096 B2	1998.01.15
		AU 6370694 A	1994.10.11
		EP 689552 A1	1996.01.03
		EP 689552 A4	1997.07.02
		EP 689552 B1	2002.10.30
		JP 3441076 B2	2003.08.25
		US 5783396 A	1998.07.21
		WO 94/21687 A1	1994.09.29
JP 5-203644 A	1993.08.10	(Family: none)	
WO 2008/063928 A2	2008.05.29	AT 423322 T	2009.03.15
		AU 2004225527 A1	2004.10.14
		AU 2004225527 B2	2009.10.29
		AU 2007324014 A1	2008.05.29
		AU 2010200352 A1	2010.02.18
		CA 2560972 A1	2004.10.14
		CA 2667357 A1	2008.05.29
		CN 1795387 A	2006.06.28
		CN 101611319 A	2009.12.23
		DK 1618388 T3	2009.05.18
		EP 1618388 A2	2006.01.25
		EP 1618388 B1	2009.02.18
		EP 2088433 A1	2009.08.12
		EP 2092344 A2	2009.08.26
		ES 2322593 T3	2009.06.23
		JP 2006-524331 A	2006.10.26
		JP 2010-509596 A	2010.03.25
		MX PA05010325 A	2006.03.17
		MX 2009004774 A	2009.05.21
		US 2004/197930 A1	2004.10.07
		US 7191068 B2	2007.03.13
		US 2007/161125 A1	2007.07.12
		US 2008/299594 A1	2008.12.04
		US 2009/055099 A1	2009.02.26
		WO 2004/088324 A2	2004.10.14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/060616									
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, G01N33/574(2006.01)n											
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, G01N33/574											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <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>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010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	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/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	竹内 薫 他7名, 羊水塞栓症の1例, 鳥取赤十字医誌, 2003, 第12巻, 第17-20頁	1-6									
Y	大井 豪一 他1名, 羊水塞栓, 産婦人科の世界, 2001, 第53巻, 第1号, 第45-49頁	1-6									
Y	米山 剛一 他6名, 羊水栓塞症1剖検例の病理学的考察, 日本産婦人科学会東京地方部会会誌, 1987, 第36巻, 第2号, 第232-235頁	1-6									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input checked="" 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 09.07.2010		国際調査報告の発送日 20.07.2010									
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) 廣田 健介	2J 3807								
		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 1 0 / 0 6 0 6 1 6
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	縄田 修吾 他2名, 子宮頸部扁平上皮癌からのSCC抗原分泌, 産婦人科の世界, 2000, 第52巻、第7号, 第589-592頁	1-6
A	川端 伊久乃 他1名, 切迫早産・破水の診断, 臨床検査, 2009.04, 第53巻、第4号, 第441-444頁	1-6
A	JP 8-508015 A (ボロテリアク, ビクター) 1996.08.27、全文、全図	1-6
A	Sule Cataltepe et al., Development of specific monoclonal antibodies and a sensitive discriminatory immunoassay for the circulating tumor markers SCCA1 and SCCA2, Clinica Chimica Acta, 2000, Volume 295, Issues 1-2, pp. 107-127	1-6
A	JP 5-203644 A (大塚製薬株式会社) 1993.08.10、全文、全図	1-6
A	WO 2008/063928 A2 (PROTEOGENIX, INC.) 2008.05.29、全文、全図	1-6

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2010/060616

JP 8-508015 A	1996. 08. 27	AT 226959 T	2002. 11. 15
		AU 685096 B2	1998. 01. 15
		AU 6370694 A	1994. 10. 11
		EP 689552 A1	1996. 01. 03
		EP 689552 A4	1997. 07. 02
		EP 689552 B1	2002. 10. 30
		JP 3441076 B2	2003. 08. 25
		US 5783396 A	1998. 07. 21
		WO 94/21687 A1	1994. 09. 29
-----	-----	-----	-----
JP 5-203644 A	1993. 08. 10	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
WO 2008/063928 A2	2008. 05. 29	AT 423322 T	2009. 03. 15
		AU 2004225527 A1	2004. 10. 14
		AU 2004225527 B2	2009. 10. 29
		AU 2007324014 A1	2008. 05. 29
		AU 2010200352 A1	2010. 02. 18
		CA 2560972 A1	2004. 10. 14
		CA 2667357 A1	2008. 05. 29
		CN 1795387 A	2006. 06. 28
		CN 101611319 A	2009. 12. 23
		DK 1618388 T3	2009. 05. 18
		EP 1618388 A2	2006. 01. 25
		EP 1618388 B1	2009. 02. 18
		EP 2088433 A1	2009. 08. 12
		EP 2092344 A2	2009. 08. 26
		ES 2322593 T3	2009. 06. 23
		JP 2006-524331 A	2006. 10. 26
		JP 2010-509596 A	2010. 03. 25
		MX PA05010325 A	2006. 03. 17
		MX 2009004774 A	2009. 05. 21
		US 2004/197930 A1	2004. 10. 07
		US 7191068 B2	2007. 03. 13
		US 2007/161125 A1	2007. 07. 12
		US 2008/299594 A1	2008. 12. 04
		US 2009/055099 A1	2009. 02. 26
		WO 2004/088324 A2	2004. 10. 14
-----	-----	-----	-----

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 小林 浩

日本国奈良県橿原市四条町 8 4 0 公立大学法人奈良県立医科大学内

(72) 発明者 小坂 美恵子

日本国大阪府茨木市庄二丁目 2 4 番 3 号 アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内

(72) 発明者 田口 宏美

日本国大阪府茨木市庄二丁目 2 4 番 3 号 アルフレッサファーマ株式会社診断薬研究開発部内

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) 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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 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)	测试破裂和羊水栓塞的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2010150804A1</a>	公开(公告)日	2012-12-10
申请号	JP2011519913	申请日	2010-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	公立大学法人奈良県立医科大学		
申请(专利权)人(译)	公立大学法人奈良県立医科大学 Alfresa制药社		
[标]发明人	大井豪一 成瀬勝彦 小林浩 小坂美惠子 田口宏美		
发明人	大井 豪一 成瀬 勝彦 小林 浩 小坂 美惠子 田口 宏美		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	新藤拓也		
优先权	2009151914 2009-06-26 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

(ZH) 提供了一种高度准确的水破裂和羊水栓塞检查方法，可以通过简单的操作对其进行快速检查。本发明的测试方法包括测量源自母亲的生物学样品中的鳞状细胞癌相关抗原 (SCCA) 的浓度的步骤。通过使用 SCCA 作为指标，可以提供用于水和羊水栓塞破裂的高精度检查方法，从而能够以简单的操作进行快速检查。

