

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-508836

(P2021-508836A)

(43) 公表日 令和3年3月11日 (2021.3.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2020-555001 (P2020-555001)	(71) 出願人	520223457
(86) (22) 出願日	平成30年12月21日 (2018.12.21)		スゲンテック, インク.
(85) 翻訳文提出日	令和2年8月5日 (2020.8.5)		SUGENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/KR2018/016434		大韓民国 34025 テジョン ユソン
(87) 国際公開番号	W02019/125034		ーグ テクノ2ーロ 187 #216
(87) 国際公開日	令和1年6月27日 (2019.6.27)	(74) 代理人	100107984
(31) 優先権主張番号	10-2017-0178159		弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成29年12月22日 (2017.12.22)	(74) 代理人	100182305
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		弁理士 廣田 鉄平
		(74) 代理人	100102255
			弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真

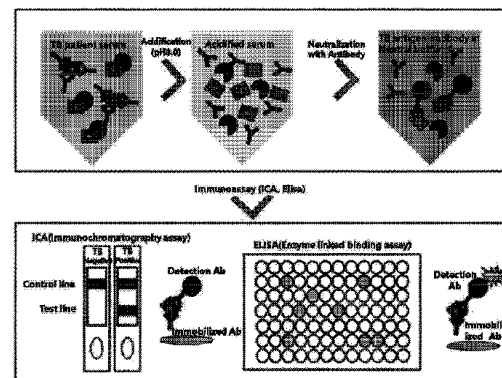
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結核診断方法

(57) 【要約】

本発明の結核診断方法は、被検体のサンプルに酸性物質を処理して結核抗原複合体から抗原を解離する前処理過程によりサンプル内の遊離結核抗原を増加させることで結核抗原と検出抗体の反応性を向上させることができ、結核の臨床現場即時検査が可能であり、迅速で簡単な検出方法として臨床現場即時検査にすぐ活用することができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体から採取したサンプルに含まれた結核抗原複合体から抗原を解離するために酸性物質を処理するステップと、

解離した抗原を含むサンプルまたは解離した抗原を中和するために中和試薬を処理するステップと、

解離した抗原に特異的に結合可能な抗体を処理するステップとを含む、結核診断方法。

【請求項 2】

前記被検体から採取したサンプルは、血液（全血、血漿、血清）、尿、喀痰、唾液、関節液、口腔粘膜液（oral mucosal transudate）および脳下垂体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 3】

前記抗原は、M p t 6 4、E S A T 6（the 6 - kDa early secreted antigenic target）、C F P 1 0（the 1 0 - kDa culture filtrate protein）、A g 8 5（the antigen 8 5 complex）、A g 8 5 A、A g 8 5 B、A g 8 5 C、H s p X、L A M および 3 8 k D a タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 4】

前記酸性物質は、グリシンバッファー（glycine buffer）、クエン酸塩バッファー（citrate buffer）および酢酸塩バッファー（acetate buffer）からなる群から選択される、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 5】

前記酸性物質の pH は、2. 0 ～ 4. 0 である、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 6】

前記中和試薬を処理するステップは、塩基性バッファー溶液または塩基性バッファー乾燥パッドを使用して行われる、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 7】

前記抗体を処理するステップは、抗体 - 標識体接合体が処理された乾燥パッドを使用して行われる、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 8】

前記中和試薬を処理するステップおよび前記抗体を処理するステップは、塩基性バッファー溶液に抗体 - 標識体接合体が添加された溶液；または塩基性バッファー溶液に抗体 - 標識体接合体が添加された溶液を凍結乾燥した固相物を使用して同時に行われる、請求項 1 に記載の結核診断方法。

【請求項 9】

被検体から採取したサンプルに含まれた結核抗原複合体から抗原を解離するための酸性試薬と、

解離された抗原を中和するための中和試薬と、

抗体が固定化された固相体（solid phase）とを含む、結核検査用キット。

【請求項 10】

前記キットは、免疫クロマトグラフィキットまたは E L I S A（enzyme - linked immunosorbent assay）キットである、請求項 9 に記載の結核検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、結核にかかったか否かを診断することができる結核遊離型抗原の比率を増加させることで、結核の迅速な臨床現場即時検査が可能な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

結核菌（mycobacterium tuberculosis）の感染による感染症である結核は、世界的に有病率が高く、死亡率も高い疾病と知られている。結核を発病初期に診断して治療できな

10

20

30

40

50

った場合には死亡に至る可能性が高く、様々な結核診断方法に関する研究が必要である。

【0003】

結核の診断方法としては様々な方法が知られている。ツベルクリン皮膚反応検査 (tuberculin skin test、T S T) は、高い感受度を有し且つ安価であるものの、特異性が低くて結核診断の信頼度が低いという欠点がある。結核菌の培養方法は、信頼度が最も高い検索方法であるが、結核菌を分離および培養するため危険性が高く、培養期間が長くて、診断結果を得るまで非常に長い時間がかかるという欠点がある。最近、液体培地を利用して培養期間を短縮する方法が導入されているが、非結核性抗酸菌との鑑別のためのさらなる確定診断テストが必要であるという問題がある。核酸増幅 (nucleic acid amplification) 法は、迅速で高い感受度を示し、薬剤耐性も区別可能であるが、高価な装置と人手が必要となるため、結核診断製品のニーズが高い低所得国での使用は難しいという問題がある。

10

【0004】

結核の迅速な診断および治療のためには、臨床現場即時検査 (point of care test、P O C T) が可能な結核診断方法が必要である。結核の臨床現場即時検査方法の一つである顕微鏡を利用した塗抹染色は、訓練された専門家と実験室が必要であり、感受度が低くて、診断の正確性が低い。血清学的結核診断方法は、患者の血液や血清を採取し、結核菌の感染によって生成された抗体を診断する方法であり、現在、迅速で安価な抗体診断製品が商業化しており、数分以内に結果の確認が可能で、専門家を必要としないという利点があるが、活動性結核と潜伏性結核の区別が難しく感受度が非常に低い。結核菌の抗原を介する診断方法は、喀痰、血清、尿や脳下垂体にある結核菌抗原検出により結核を診断する方法であって、様々な製品があるが、結核菌の培養が必要であったり、正確度、感受度などが低いことがある。結核菌抗原検出による結核診断方法の例としては、韓国登録特許第 10 - 1524109 号などが挙げられる。

20

【0005】

本発明は、かかる結核の診断方法の問題を解決すべく、結核にかかった患者に形成された抗原複合体を簡単な方法で解離し、抗原複合体の解離によって増加した遊離型抗原を利用して、簡単且つ迅速に結核臨床現場即時検査が可能な方法を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0006】

【特許文献 1】韓国登録特許第 10 - 1524109 号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、結核の臨床現場即時検査のために被検者から採取した試料に含まれた抗原複合体から抗原を解離して遊離型抗原を増加させ、増加した遊離型抗原を利用して結核の臨床現場即時検査が可能な方法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】

【0008】

40

本発明は、被検体から採取したサンプルに酸性物質を処理した後、結核菌の分泌抗原に対する抗体を処理する結核診断方法を提供する。

【0009】

本発明は、被検体から採取したサンプルに含まれた結核抗原複合体から抗原を解離するための酸性試薬、解離し抗原を中和するための中和試薬および抗体が固定化された固相体 (solid phase) を含む結核検査用キットを提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、高い正確度および感受度を有する結核の臨床現場即時検査方法を提供することができる。本発明の結核診断方法は、簡単且つ迅速で、臨床現場即時検査にすぐ適用す

50

ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明の結核診断方法の過程を示す図である（TB patient serum；結核患者の血清）。

【図2】本発明の一実施形態で使用した免疫クロマトグラフィストリップ（Immunochromatography strip）のラミネーション構造を示す図である。

【図3】本発明の結核診断方法による結核診断結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

10

以下、本発明について具体的に説明する。本明細書で使用される用語は、別に定義しない場合、当該分野において通常の知識を有する者が一般的に理解している内容に解釈すべきである。本明細書の図面および実施例は、通常の技術者が本発明を容易に理解し実施するためのものであって、図面および実施例で発明の要旨を不明瞭にし得る内容は省略可能であり、本発明は図面および実施例に限定されるものではない。

【0013】

本発明は、結核を臨床現場即時検査することができる方法に関し、被検体から採取したサンプルに酸性物質を処理した後、結核菌の分泌抗原に対する抗体を処理する結核診断方法または結核診断のための情報を提供する方法を提供することができる。

【0014】

20

具体的には、本発明は、被検者のサンプル（試料）を採取するステップと、サンプルに酸性物質を処理するステップと、サンプルを中和するステップと、結核菌特異抗原に対する抗体を処理するステップとを含む結核診断方法を提供することができる。

【0015】

本発明において、被検者は、結核にかかっているか感染の可能性があるヒトおよび動物を含み、結核を診断するための対象の全体を意味し得る。

【0016】

本発明において、被検者のサンプル（または試料）は、血液（全血、血漿、血清）、尿、喀痰、唾液、関節液、口腔粘膜液（oral mucosal transudate）および脳下垂体からなる群から選択される一つ以上が好ましいが、これに制限されるものではない。被検者のサンプルは、結核菌によって生成される結核菌抗原複合体が存在し得るサンプルをいずれも含むことができる。

30

【0017】

本発明において、酸性物質は、被検者のサンプルに含まれている結核菌抗原複合体から結核菌抗原を解離するための物質全般を含むことができる。酸性物質は、グリシンバッファー（glycine buffer）、クエン酸塩バッファー（citrate buffer）、および酢酸塩バッファー（acetate buffer）からなる群から選択される一つ以上であり、グリシンバッファーが好ましいが、これに制限されるものではない。結核菌抗原複合体から結核菌抗原を解離することができる酸性物質であれば、特に制限されず使用可能である。本発明において、結核菌抗原複合体は、結核菌抗原が他の生体分子、化合物または人工物質と結合して形成され得る複合体を意味し得る。例えば、抗原 - 抗原複合体や抗原 - 抗体複合体が代表的であるが、これに制限されるものではない。

40

【0018】

本発明において、酸性物質のpHは、1.0～6.0、1.0～5.5、1.0～5.0、1.0～4.5、1.0～4.0、2.0～6.0、2.0～5.5、2.0～5.0、2.0～4.5、好ましくは、2.0～4.0である。本発明において、酸性物質の濃度は、0.05～2.0M、0.05～1.5M、0.05～1.0M、0.05～0.5M、0.05～0.1M、0.1～2M、0.1～1.5M、0.1～1.0M、0.1～0.9M、0.1～0.8M、0.1～0.7M、0.1～0.6M、0.1～0.5M、好ましくは、0.05～2.0である。抗原複合体の種類によって抗原 - 抗原ま

50

たは抗原 - 抗体の結合強度が異なり得、酸性物質の濃度は、使用する中和試薬の種類によって異なり得る。

【0019】

抗原 - 抗原複合体の例として、A g 8 5 A、A g 8 5 BおよびA g 8 5 CのようなA g 8 5 複合体 (A g 8 5 complex) があり、A g 8 5 複合体は、宿主細胞 (host cell) のフィブロネクチン (fibronectin) およびエラスチン (Elastin) タンパク質と結合して結核菌の感染活動に寄与すると知られている。抗原 - 抗原複合体の他の例として、C F P - 1 0とE S A T 6は、R D 1 遺伝子とともに発現するC F P - 1 0およびE S A T 6 タンパク質であり、これらがヘテロダイマー (heterodimer) をなして形成されたC F P 1 0 / E S A T 6 が挙げられ、C F P 1 0 / E S A T 6 は、結核菌の病原性に寄与すると知られている。

10

【0020】

抗原 - 抗体複合体は、結核患者の血液のような体液で形成される免疫複合体 (immune complex) であり、結核菌が分泌する分泌抗原に特異的なI g G、I g A、I g Mなどの発現によって形成される複合体を含むことができる。

【0021】

本発明において、結核菌抗原複合体から解離する結核菌分泌抗原は、M p t 6 4、E s a t 6 (the 6 - kDa early secreted antigenic target)、C f p 1 0 (the 1 0 - kDa culture filtrate protein)、H s p X (1 4 kDa)、3 8 k D a タンパク質 (3 8 kDa protein)、L A MおよびA g 8 5 (the antigen 8 5 complex) からなる群から選択される一つ以上であってもよく、これに制限されるものではない。

20

【0022】

本発明において、結核菌抗原特異抗体は、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - C F P 1 0 antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - A g 8 5 A antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - A g 8 5 B antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - A g 8 5 C antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - E S A T 6 antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - H s p X (1 4 kDa) antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - M p t 6 4 antibody、Monoclonal (またはpolyclonal) anti - 3 8 kDa antibodyおよびMonoclonal (またはpolyclonal) anti - L A M antibodyからなる群から選択される一つ以上であってもよく、これに制限されるものではない。

30

【0023】

本発明の結核診断方法は、より具体的には、以下のような方法からなることができる。

【0024】

本発明の結核診断方法は、被検体からサンプルを採取するステップと、サンプルに含まれた結核抗原複合体から抗原を解離するために酸性物質を処理するステップと、解離した抗原を含むサンプルまたは解離した抗原を中和するために中和試薬を処理するステップと、解離した抗原に特異的に結合可能な抗体を処理するステップとを含む方法であり得る。

【0025】

被検体からサンプルを採取するステップは、サンプルの種類 (喀痰、尿、血液など) に応じて公知の検出方法により行われてもよく、特に制限されるものではない。

40

【0026】

被検体から採取したサンプルには、結核菌抗原によって形成された抗原複合体が存在することがあり、抗原複合体から抗原を解離するために、酸性物質を処理するステップを行う。酸性物質をサンプルに処理すると、抗原複合体から抗原が解離し、サンプルに遊離型抗原 (free antigen) が増加する。遊離型抗原の増加に伴い、以降処理される結核菌抗原に特異的な抗体による抗原 - 抗体反応も増加し、結核診断の正確性および敏感度が向上することができる。

【0027】

被検体から採取したサンプルに酸性物質を処理した後、中和ステップを経るが、酸性のサンプルまたはサンプルに含まれた抗原を中和する。中和ステップは、遊離型抗原と抗体

50

を反応させるために適した環境を提供するために必要である。中和のための中和試薬は、塩基性物質であれば特に制限されず、先に使用した酸性物質、抗原の種類、以降処理する抗体の種類などによって適宜使用することができる。中和試薬は、例えば、TRIS (tris - [hydroxymethyl] - aminomethane)、カーボネート (carbonate) およびボレート (borate) からなる群から選択される一つ以上を使用することができるが、これに制限されるものではない。サンプルと中和試薬は、1:1~1:10体積比で反応させることが好ましいが、これに制限されるものではなく、使用試薬とサンプルの酸性程度によって適宜調節することができる。

【0028】

本発明において、中和試薬のpHは、8.0~10.5、8.0~11.0、9.0~10.0、9.0~10.5、9.0~11.0、好ましくは、8.0~10.0である。

【0029】

本発明において、中和試薬の濃度は、0.02~0.5M、0.02~0.4M、0.02~0.3M、0.02~0.2M、0.03~0.5M、0.03~0.4M、0.03~0.3M、0.03~0.2M、0.04~0.5M、0.04~0.4M、0.04~0.3M、0.04~0.2M、0.05~0.5M、0.05~0.4M、0.05~0.3M、0.05~0.2M、0.06~0.5M、0.06~0.4M、0.06~0.3M、0.06~0.2M、0.07~0.5M、0.07~0.4M、0.07~0.3M、0.07~0.2M、0.08~0.5M、0.08~0.4M、0.08~0.3M、0.08~0.2M、0.09~0.5M、0.09~0.4M、0.09~0.3M、0.09~0.2M、0.1~0.5M、0.1~0.4M、0.1~0.3M、0.1~0.2Mである。中和試薬の濃度は、使用する酸性物質および結核抗原複合体の種類によって異なり得る。

【0030】

本発明の一実施形態によると、結核抗原のうちAg85を検出するために酸性物質として0.05~2.0Mのグリシンを処理するときに、中和試薬として0.1~0.5Mのトリス (TRIS) を処理すると、Ag85の検出効果が著しく上昇することができる。本発明の他の一実施形態によると、結核抗原のうちCFP10を検出するために酸性物質として0.05~1.0Mのグリシンを処理するときに、中和試薬として0.02~0.2Mのトリス (TRIS) を処理すると、CFP10の検出効果が著しく上昇することができる。本発明のさらに他の一実施形態によると、結核抗原のうちESAT6を検出するために酸性物質として0.05~1.0Mのグリシンを処理するときに、中和試薬として0.02~0.2Mのトリス (TRIS) を処理すると、ESAT6の検出効果が著しく上昇することができる。

【0031】

中和ステップの後または中和試薬処理とともにサンプルに抗体を処理し、サンプルに含まれた遊離型抗原を含む結核菌抗原と抗原-抗体反応を誘導することができる。抗体の検出対象である結核菌抗原の種類に応じて適宜選択することができ、特に制限されるものではない。抗体は、抗原の検出のための検出抗体 (detection antibody) として抗原と複合体をなす他のタンパク質と競争反応を誘導する。抗体は、標識体 (indicator) が結合した標識抗体 (labeled antibody) が好ましいが、これに制限されるものではない。標識抗体は、抗体-標識体接合体 (antibody-indicator conjugant) と表記することができる。標識体は、金ナノ粒子、ペルオキシダーゼ (peroxidase) といった酵素、蛍光物質 (fluorescent substance)、ラテックスビーズ (latex bead)、セルロースナノビーズといった様々な染色物質を使用することができるが、これに制限されるものではない。

【0032】

抗体処理の後、サンプルの抗原と抗体が結合したものを検出するために、免疫検出ステップを行うことができる。免疫検出のための方法は、特に制限されず、公知の様々な免疫検出方法を使用して抗体と結核菌抗原との結合によって結核にかかったか否かを診断する

ことができる。本発明の一実施形態によると、中和バッファー (neutralization buffer) の中の抗原 - 検出抗体を免疫クロマトグラフィ (immunochromatography) やマイクロプレート (microplate) に固定化された他の抗体 (immobilized antibody) と反応させ、洗浄および発色反応により結核にかかったか否かを最終的に確認することができる。

【0033】

本発明は、以上の結核診断方法を行うことができ、結核の臨床現場即時検査に使用することができる結核診断用キットを提供することができる。

【0034】

本発明の結核診断用キットは、被検体から採取したサンプルに含まれた結核抗原複合体から抗原を解離するための酸性試薬と、解離された抗原を中和するための中和試薬と、抗体が固定化された固相体 (solid phase) とを含むことができる。

10

【0035】

本発明において、結核診断用キットは、抗体が固定化された固相体や抗原 - 抗体反応のために使用する物質である抗体、酵素、標識物質 (放射能物質、蛍光物質など) などの種類に応じて、免疫クロマトグラフィキット、ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) キットまたは競合アッセイ (competition assay) キットとして作製することができる。

【0036】

本発明の結核診断用キットは、必要に応じて、結核抗原に特異的であるか固定化した抗体と結合することができる抗体をさらに含むことができる。

20

【0037】

以下、本発明を実施するための実施例について説明する。実施例は、本発明を実施するための一つの例示に相当するものであって、本発明が実施例によって限定して解釈されることはない。

【0038】

[実施例1]

(1) 免疫クロマトグラフィ法を利用した結核診断

結核にかかった被検体から採取した血清または血漿サンプルを、酸性物質である pH 2.0 ~ 4.0 の 1.0 M グリシン (glycine) に 1 / 10 (サンプル / 酸性物質) の体積比で混合した後、30分以内に前処理して反応させた。

30

【0039】

グリシンに反応させたサンプルに含まれた遊離型抗原検出による結核診断のために、免疫クロマトグラフィテスト装置を以下のように製造した。

【0040】

- 抗体固定化: NCメンブレン上に抗体をライン状に分注して乾燥し、固定化した。

【0041】

- 中和パッドの構成: pH 8.0 の 100 mM Tris - HCl、0.5 ~ 2.0 % カゼイン (casein)、0.5 ~ 2 % 界面活性剤 (Tween 20、Triton X - 100)、20 ~ 500 mM NaCl を処理したバッファーを製造し、ガラス繊維 (glass fiber) に浸漬して乾燥し、中和パッドを構成した。

40

【0042】

- 中和バッファー: pH 8.0 以上の 100 mM Tris - HCl、0.5 ~ 2.0 % カゼイン (casein)、0.5 ~ 2 % 界面活性剤 (Tween 20、Triton X - 100)、20 ~ 500 mM NaCl を処理したバッファーを製造した。

【0043】

- 抗体 - 金接合体 (gold - antibody conjugate) の製造: 40 ~ 60 nm サイズの金コロイド (colloidal gold) にマウス由来抗結核抗原モノクローナル抗体を 1 ~ 10 μ g / ml で反応させ、ブロッキング試薬 (blocking agent) としてカゼインや牛血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA) を 0.1 ~ 1.0 % で処理した後、洗浄し、精製された抗結核抗体 - 金接合体を得た。

50

【0044】

- 接合体パッド (conjugate pad) の製造：抗結核抗体 - 金接合体をスクロース (sucrose) と BSA が添加されたリン酸緩衝液 (phosphate buffer) に適正濃度で処理し、0.45 μm フィルタで濾過した後、接合体パッドに浸漬し、乾燥してパッドを構成した。

【0045】

- 免疫クロマトグラフィストリップの製造：抗体固定化 NC メンブレン、中和パッド、抗体 - 金接合体が処理された接合体パッドを使用し、図 2 のように免疫クロマトグラフィストリップを製造した。

【0046】

(2) 免疫クロマトグラフィ法を利用した結核診断

結核にかかった被検体から採取した血清または血漿サンプルを酸性物質である pH 2.0 ~ 4.0 の 1.0 M グリシン (glycine) に 1 / 10 (サンプル / 酸性物質) の体積比で混合した後、30 分以内に前処理して反応させた。

【0047】

グリシンに反応させたサンプルに含まれた遊離型抗原検出による結核診断のために、免疫クロマトグラフィテスト装置を以下のように製造した。

【0048】

- 抗体固定化：NC メンブレン上に抗体をライン状に分注して乾燥し、固定化した。

【0049】

- 中和抗体：pH 8.0 の 100 mM Tris - HCl、0.5 ~ 2.0 % カゼイン (casein)、0.5 ~ 2 % 界面活性剤 (Tween 20、Triton X - 100)、20 ~ 500 mM NaCl を処理したバッファーを製造し、40 ~ 60 nm サイズの金コロイド (colloidal gold) にマウス由来抗結核抗原モノクローナル抗体を 1 ~ 10 μg / ml で反応させ、ブロッキング試薬 (blocking agent) としてカゼインや牛血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA) を 0.1 ~ 1.0 % で処理した後、洗浄し、精製された抗結核抗体 - 金接合体を添加した後、安定剤として PEG、デキストラン (dextran)、PVA、スクロース (sucrose)、トレハロース (trehalose)、マンニトール (mannitol) などの成分を適量追加した。このように液状の中和抗体またはこれをさらに 16 ~ 48 時間凍結乾燥を行って乾燥した中和抗体を製造した。

【0050】

- 免疫クロマトグラフィストリップの製造：抗体固定化 NC メンブレンおよびクロマトグラフィのためのガラス繊維 (Glass fiber) またはセルロースパッド (cellulose Pad) 類を使用し、図 2 と同一の構造の免疫クロマトグラフィストリップを製造した。

【0051】

以上で製造した免疫クロマトグラフィストリップにグリシンで前処理した被検体のサンプル自体または前処理した被検体のサンプルと中和バッファーまたは前処理した被検体のサンプルと中和抗体を適正の比率で混合して処理し、結核抗原検出の結果を確認した (図 3)。

【0052】

結核抗原である CFP - 10 検出のために、抗体として抗 CFP - 10 抗体を使用した。

【0053】

結核抗原検出の結果、グリシンで前処理したサンプルの場合、免疫クロマトグラフィストリップの検査線の位置で明らかなバンドが示され、結核抗原が検出されることを確認することができた。しかし、グリシンで前処理していないサンプルの場合、検査線の位置でバンドがほとんど示されず、結核抗原の検出程度が非常に低かった。

【0054】

結核抗原として、Ag 85 検出のために抗 Ag 85 抗体を使用した場合 (実施例 2 ~ 4 参照) にもグリシンで前処理したサンプルの場合、免疫クロマトグラフィストリップの検査線の位置で明らかなバンドが示され、結核抗原が検出されたことを確認することがで

10

20

30

40

50

きたが、グリシンで前処理していないサンプルの場合、検査線の位置でバンドがほとんど示されず、結核抗原の検出程度が非常に低かった。

【0055】

かかる結果は、一般的な抗原 - 抗体反応では結核にかかったか否かの正確な判別が難しい患者（結核抗原複合体によって検出抗原が十分でない患者など）であっても、本発明の結核診断方法では正確な診断が可能であることを示す。

【0056】

また、免疫クロマトグラフィストリップは、簡単に製造することができ、製造コストも低く、臨床現場即時検査に本発明の結核診断方法をすぐ適用し、活用することができる。

【0057】

〔実施例2～実施例34〕

実施例1のような方法で結核抗原検出を実施した。使用した酸性物質、中和試薬、抗体および検出有無は、以下の〔表1〕、〔表2〕、〔表3〕、〔表4〕に示した。

【0058】

検出有無は、計20個の免疫クロマトグラフィストリップで検査線に示されたバンド（結核抗原複合体で解離された結核抗原と使用抗体の結合によって表示）の数により確認し、以下の式によって計算した結果、60%以上の場合、検出強度を高いとし、20%以上60%未満の場合、検出強度は低いとし、20%未満の場合、未検出とした。

【0059】

検出強度＝〔検査線にバンドが示された免疫クロマトグラフィストリップの数／総免疫クロマトグラフィストリップの数〕×100

（臨床現場即時検査に使用するためには、肉眼ですぐ判別することができるか否かが重要であるため、検査線のバンドが示されるか否かは肉眼で判別した。）

【0060】

10

20

【表 1】

	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10
サンプル 採取部位	血清 (1 0) 血 漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)
酸 性 物 質	種 類	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	濃 度	0 . 0 5M	0 . 1 M	0 . 5 M	0 . 5 M	1 M	1 M	1 . 5M	2M
	pH	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0
中 和 試 薬	種 類	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
	濃 度	0 . 0 5M	0 . 0 5M	0 . 1M	0 . 2M	0 . 1M	0 . 2M	0 . 3M	0 . 5M
	pH	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0
酸性物質 ／中和試 薬の 反 応 比 (v/v)	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
抗体	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B	抗 - A g 8 5B
検出強度	未検出	低い	高い	高い	高い	高い	高い	高い	低い

【 0 0 6 1 】

〔表 1〕の結果によると、Glycineの濃度が 0 . 5 ～ 2 . 0 M、TRISの濃度範囲が 0 . 1 ～ 0 . 5 Mであるときに、結核 - 抗原複合体で A g 8 5 B の効果的な解離および検出が可能であることを確認することができた。

【 0 0 6 2 】

【表 2】

	実施例 1 1	実施例 1 2	実施例 1 3	実施例 1 4	実施例 1 5	実施例 1 6	実施例 1 7	実施例 1 8	実施例 1 9
サンプル 採取部位	血清 (1 0) 血 漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)
酸 性 物 質	種 類	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	濃 度	0 . 0 2M	0 . 0 5M	0 . 0 5M	0 . 1 M	0 . 1 M	0 . 5 M	1 M	2M
	pH	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0
中 和 試 薬	種 類	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
	濃 度	0 . 0 1M	0 . 0 1M	0 . 0 2M	0 . 0 2M	0 . 0 5M	0 . 1M	0 . 2M	0 . 4M
	pH	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0
酸性物質 ／中和試 薬の 反 応 比 (v／v)	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
抗体	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0	抗 - CFP 1 0
検出強度	未検出	低い	高い	高い	高い	高い	高い	低い	未検出

【 0 0 6 3 】

〔表 2〕の結果によると、Glycineの濃度が 0 . 0 5 ～ 1 . 0 M、TRISの濃度範囲が 0 . 0 2 ～ 0 . 2 Mであるときに、結核 - 抗原複合体で C F P 1 0 の効果的な解離および検出が可能であることを確認することができた。

10

20

30

40

【表 3】

	実施例 2 0	実施例 2 1	実施例 2 2	実施例 2 3	実施例 2 4	実施例 2 5	実施例 2 6	実施例 2 7	実施例 2 8
サンプル 採取部位	血清 (1 0) 血 漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)
酸 性 物 質	種 類	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	濃 度	0 . 0 2M	0 . 0 5M	0 . 0 5M	0 . 1 M	0 . 1 M	0 . 5 M	1 M	2M
	pH	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0	3 . 0
中 和 試 薬	種 類	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
	濃 度	0 . 0 1M	0 . 0 1M	0 . 0 2M	0 . 0 2M	0 . 0 5M	0 . 1M	0 . 2M	0 . 4M
	pH	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0	9 . 0
酸性物質 ／中和試 薬の 反応比 (v ／v)	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
抗体	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6	抗 - ESAT 6
検出強度	未検出	低い	高い	高い	高い	高い	高い	低い	未検出

【 0 0 6 4 】

〔表 3〕の結果によると、Glycineの濃度が 0 . 0 5 ～ 1 . 0 M、TRISの濃度範囲が 0 . 0 2 ～ 0 . 2 Mであるときに、結核 - 抗原複合体で E S A T 6 の効果的な解離および検出が可能であることを確認することができた。

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

【表 4】

		実施例 2 9	実施例 3 0	実施例 3 1	実施例 3 2	実施例 3 3	実施例 3 4
サンプル採取部位		血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)	血清 (1 0) 血漿 (1 0)
酸性物質	種類	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	濃度	0. 1 M	0. 1 M	0. 1 M	0. 1 M	0. 1 M	0. 1 M
	pH	3. 0	3. 0	3. 0	3. 0	3. 0	3. 0
中和試薬	種類	Borate	Carbonate	Borate	Carbonate	Borate	Carbonate
	濃度	0. 0 5 M	0. 0 5 M	0. 0 5 M	0. 0 5 M	0. 0 5 M	0. 0 5 M
	pH	9. 0	9. 0	9. 0	9. 0	9. 0	9. 0
酸性物質／中和試薬の反応比 (v／v)		1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
抗体		抗 - A g 8 5 B	抗 - A g 8 5 B	抗 - C F P 1 0	抗 - C F P 1 0	抗 - E S A T 6	抗 - E S A T 6
検出強度		高い	高い	高い	高い	高い	高い

10

20

30

【 0 0 6 6 】

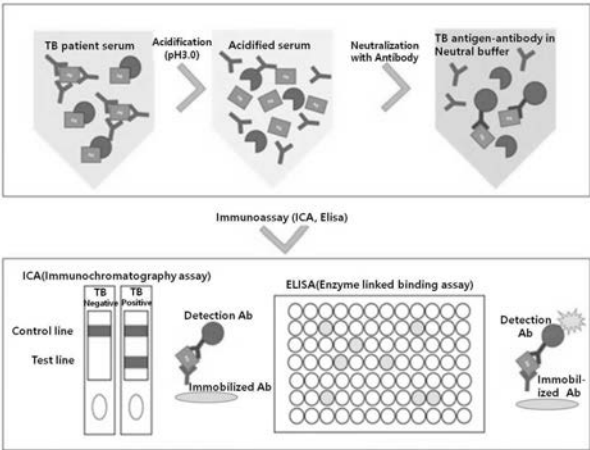
〔表 4〕の結果によると、中和試薬としてBorateおよびCarbonateを使用したときにも、結核抗原複合体からA g 8 5 B、C F P 1 0およびE S A T 6の効果的な解離および検出が可能であることを確認することができた。

【 0 0 6 7 】

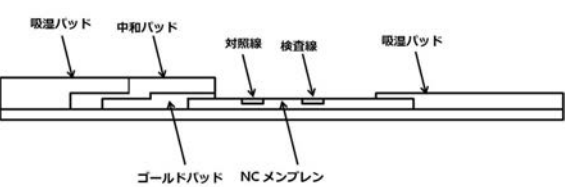
以上の結果から、酸性物質の処理および中和試薬の処理により、結核抗原複合体から結核抗原 (C F P 1 0、A g 8 5、E S A T 6) の効果的な解離および検出が可能であることを確認することができた。

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

	結核患者のサンプル	正常な人のサンプル
グリシン前処理		
グリシン前処理せず		

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/016434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/569(2006.01)i, G01N 1/40(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) G01N 33/569; G01N 33/53; G01N 33/537; G01N 33/576; G01N 1/40 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: tuberculosis, diagnosis, antigen, complex, dissociating, acidity, neutralization, antibody		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KHOMENKO, A. G. et al., "Serodiagnosis of Tuberculosis: Detection of Mycobacterial Antibodies and Antigens", Tubercle and Lung Disease, 1996, vol. 77, pages 510-515 See abstract; and pages 512-514.	1-10
A	BOLLINGER, R. C., Jr. et al., "Acid Dissociation Increases the Sensitivity of p24 Antigen Detection for the Evaluation of Antiviral Therapy and Disease Progression in Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus-infected Persons", The Journal of Infectious Diseases, 1992, vol. 165, pages 913-916 See the entire document.	1-10
A	BEALL, M. J. et al., "Validation of Immune Complex Dissociation Methods for Use with Heartworm Antigen Tests", Parasites & Vectors, 09 November 2017, vol. 10(Suppl. 2), 481, pages 115-121 See the entire document.	1-10
A	IMAZ, M. S. et al., "Serodiagnosis of Tuberculosis: Specific Detection of Free and Complex-dissociated Antibodies Anti-mycobacterium Tuberculosis Recombinant Antigens", The Brazilian Journal of Infectious Diseases, June 2008, vol. 12, pages 234-244 See the entire document.	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 "I" 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 29 MARCH 2019 (29.03.2019)		Date of mailing of the international search report 29 MARCH 2019 (29.03.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/016434

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-520124 A (ABBOTT LABORATORIES) 14 July 2011 See the entire document.	1-10
A	KR 10-0326619 B1 (AKZO NOBEL N.V.) 20 June 2002 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2011-0057174 A (INSTITUT PASTEUR) 31 May 2011 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2017-0011200 A (KOREAN NATIONAL TUBERCULOSIS ASSOCIATION) 02 February 2017 See the entire document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016434

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2011-520124 A	14/07/2011	EP 2286225 A1	23/02/2011
		US 2009-0280474 A1	12/11/2009
		WO 2009-137559 A1	12/11/2009
KR 10-0326619 B1	20/06/2002	CA 2109855 A1	26/05/1994
		EP 0599417 A2	01/06/1994
		EP 0599417 B1	28/08/2002
		JP 06-242112 A	02/09/1994
		JP 3398199 B2	21/04/2003
		KR 10-1994-0011950 A	22/06/1994
		US 5384240 A	24/01/1995
KR 10-2011-0057174 A	31/05/2011	CA 2735239 A1	18/03/2010
		CA 2735239 C	04/10/2016
		CN 102209897 A	05/10/2011
		CN 102209897 B	29/04/2015
		DK 2329266 T3	18/07/2016
		EP 2329266 A1	08/06/2011
		EP 2329266 B1	30/03/2016
		ES 2573943 T3	13/06/2016
		JP 2012-502292 A	26/01/2012
		JP 2015-034828 A	19/02/2015
		JP 5710482 B2	30/04/2015
		JP 6138101 B2	31/05/2017
		KR 10-1651304 B1	25/08/2016
		PT 2329266 E	07/06/2016
		US 0012655 B2	03/07/2018
		US 2010-0158912 A1	24/06/2010
		US 2011-0229474 A1	22/09/2011
		US 2014-0106334 A1	17/04/2014
		US 2014-0120525 A1	01/05/2014
		US 2015-0056610 A1	26/02/2015
		US 8450076 B2	28/05/2013
		US 8603766 B2	10/12/2013
		US 8906634 B2	09/12/2014
		US 9164103 B2	20/10/2015
		WO 2010-029164 A1	18/03/2010
KR 10-2017-0011200 A	02/02/2017	NONE	

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2018/016434
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/569(2006.01)i, G01N 1/40(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/569; G01N 33/53; G01N 33/537; G01N 33/576; G01N 1/40 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 결핵, 진단, 항원, 복합체, 해리, 산성, 중화, 항체		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KHOMENKO, A. G. 등, 'Serodiagnosis of tuberculosis: Detection of mycobacterial antibodies and antigens', Tubercle and Lung Disease, 1996, 77권, 페이지 510-515 초록: 및 페이지 512-514 참조.	1-10
A	BOLLINGER, JR., R. C. 등, 'Acid dissociation increases the sensitivity of p24 antigen detection for the evaluation of antiviral therapy and disease progression in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected persons', The Journal of Infectious Diseases, 1992, 165권, 페이지 913-916 전체 문헌 참조.	1-10
A	BEALL, M. J. 등, 'Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests', Parasites & Vectors, 2017.11.09, 10권(Suppl 2), 481, 페이지 115-121 전체 문헌 참조.	1-10
A	IMAZ, M. S. 등, 'Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens', The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2008.06., 12권, 페이지 234-244 전체 문헌 참조.	1-10
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "B" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2019년 03월 29일 (29.03.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 03월 29일 (29.03.2019)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2018/016434

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2011-520124 A (ABBOTT LABORATORIES) 2011.07.14 전체 문헌 참조.	1-10
A	KR 10-0326619 B1 (약조 노벨 엔.브이.) 2002.06.20 전체 문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2011-0057174 A (앵스티미 파스티르) 2011.05.31 전체 문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2017-0011200 A (사단법인대한결핵협회) 2017.02.02 전체 문헌 참조.	1-10

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지의 계속) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016434

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2011-520124 A	2011/07/14	EP 2286225 A1 US 2009-0280474 A1 WO 2009-137559 A1	2011/02/23 2009/11/12 2009/11/12
KR 10-0326619 B1	2002/06/20	CA 2109855 A1 EP 0599417 A2 EP 0599417 B1 JP 06-242112 A JP 3398199 B2 KR 10-1994-0011950 A US 5384240 A	1994/05/26 1994/06/01 2002/08/28 1994/09/02 2003/04/21 1994/06/22 1995/01/24
KR 10-2011-0057174 A	2011/05/31	CA 2735239 A1 CA 2735239 C CN 102209897 A CN 102209897 B DK 2329266 T3 EP 2329266 A1 EP 2329266 B1 ES 2573943 T3 JP 2012-502292 A JP 2015-034828 A JP 5710482 B2 JP 6138101 B2 KR 10-1651304 B1 PT 2329266 E US 0012655 B2 US 2010-0158912 A1 US 2011-0229474 A1 US 2014-0106334 A1 US 2014-0120525 A1 US 2015-0056610 A1 US 8450076 B2 US 8603766 B2 US 8906634 B2 US 9164103 B2 WO 2010-029164 A1	2010/03/18 2016/10/04 2011/10/05 2015/04/29 2016/07/18 2011/06/08 2016/03/30 2016/06/13 2012/01/26 2015/02/19 2015/04/30 2017/05/31 2016/08/25 2016/06/07 2018/07/03 2010/06/24 2011/09/22 2014/04/17 2014/05/01 2015/02/26 2013/05/28 2013/12/10 2014/12/09 2015/10/20 2010/03/18
KR 10-2017-0011200 A	2017/02/02	없음	

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100221958

弁理士 篠田 真希恵

(72)発明者 キム ウンキュン

大韓民国 3 4 1 1 9 テジョン ユソング カジョンロー 6 3 # 1 0 3-1 2 0 2

(72)発明者 イ スンヒ

大韓民国 3 4 0 2 2 テジョン ユソング ベウルロー 2 4 # 3 0 5-1 4 0 3

(72)発明者 ユ スンバム

大韓民国 3 5 2 6 3 テジョン ソグ 9 0 ボンギル ムンジョンロー 6 0 # 1 0 5-6 0 5

(72)発明者 ソン ミージン

大韓民国 3 4 0 7 6 テジョン ユソング ジジョクロー 3 6 2 # 3 1 1-5 0 4

(72)発明者 キム ファジュン

大韓民国 3 4 9 6 2 テジョン ジュング ソムロー 9 6 # 2 0 8-2 1 0 4

(72)発明者 キム パウル

大韓民国 3 4 3 2 9 テジョン テドクグ 4 ボンギル ドガンブクロー 1 5 7 # 3 0 1