

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2025年3月6日(06.03.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/047641 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2024/030136

(22) 国際出願日:

2024年8月26日(26.08.2024)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

63/534,585 2023年8月25日(25.08.2023) US

(71) 出願人: 積水メディカル株式会社 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 藤村 建午 (FUJIMURA Kengo); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 西澤 和純, 外 (NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT METHOD, REAGENT FOR IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT, SPECIMEN PRETREATMENT LIQUID FOR IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT, REAGENT KIT FOR IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT, AND NON-SPECIFIC REACTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 免疫学的測定方法、免疫学的測定用試薬、免疫学的測定用検体前処理液、及び免疫学的測定用試薬キット、非特異反応抑制剤

(57) Abstract: Provided is an immunological measurement method for measuring a substance to be measured in a sample, wherein an antigen-antibody reaction is performed at least once in the presence of an enzyme specifically decomposing immunoglobulin M, abbreviated as IgM.

(57) 要約: 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法において、IgMと略記されるイムノグロブリンMを特異的に分解する酵素の存在下で少なくとも1回以上抗原抗体反応を行う、免疫学的測定方法。



WO 2025/047641 A1

## 明 細 書

発明の名称：

免疫学的測定方法、免疫学的測定用試薬、免疫学的測定用検体前処理液、及び免疫学的測定用試薬キット、非特異反応抑制剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、免疫学的測定方法、免疫学的測定用試薬、免疫学的測定用検体前処理液、及び免疫学的測定用試薬キット、非特異反応抑制剤に関する。本願は、2023年8月25日に、米国に出願された仮出願63/534,585に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

### 背景技術

[0002] 診断薬分野における測定方法として、生体試料中に存在する測定対象物質を抗原抗体反応を利用して測定する免疫学的測定方法が挙げられる。免疫学的測定方法は抗原抗体反応を利用していることから、特異性が非常に高い測定方法である。

生体試料中には様々な物質が存在しており、測定対象物質以外の物質により非特異的な結合反応が生じたり、特異的な抗原抗体反応が妨げられることにより、測定誤差を生じる。このような現象を非特異反応といい、非特異反応を引き起こす原因となる物質を非特異因子などという。

非特異因子としては、異好性抗体やリウマチ因子（RF）の存在が明らかとなっている。異好性抗体とは、免疫学的測定方法の主反応を担う動物由来抗体に対して反応性を示すヒト抗体の総称であり、ヒト抗マウス免疫グロブリン抗体（HAMMA）が代表的なものとして知られている。リウマチ因子は、関節リウマチ等の膠原病、慢性感染症、肝疾患患者において高率で確認される糖タンパク質であり、動物由来抗体に対して反応性を示す特徴がHAMMAと共通しており、その実体はいずれもヒト免疫グロブリンGや免疫グロブリンM（以下、IgMと記載する。）であることが知られている（非特許文献1、2）。

[0003] 免疫学的測定方法において非特異反応を抑制する技術として、例えば特許文献1、2及び3が知られている。

特許文献1には、予め試料をヒトリウマチ因子の抗原結合部位（F a b）に結合能を有する十分量の動物由来抗体で処理することによりR Fに起因する非特異反応を抑制する方法が開示されている。このような動物由来抗体として、抗ヒト免疫グロブリンF a b抗体、抗ヒトI g G抗体（F a b特異的）、抗ヒトI g A抗体（F a b特異的）、及び抗ヒトI g M抗体（F a b特異的）が挙げられている。

特許文献2には、測定に用いる抗体と同種動物から調製したI g M型自然抗体に対するポリクローナル抗体を添加することにより、非特異反応を抑制する方法が開示されている。

特許文献3には、リウマチ因子のようにポリペプチド鎖同士がジスルフィド結合した構造を有する干渉物質による非特異反応を、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することで干渉物質を分解することにより、非特異反応を抑制する方法が開示されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0004] 特許文献1：特開平07-012818号公報

特許文献2：特開平11-287801号公報

特許文献3：特開平13-255325号公報

### 非特許文献

[0005] 非特許文献1：臨床化学；第23巻補冊175a-1～175a-10（1994）

非特許文献2：免疫検査学。窪田哲朗、藤田清貴、細井英司、梶原道子。医歯薬出版株式会社。P. 199

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 特許文献1に示される抗ヒトIgMポリクローナル抗体、抗ヒトIgGポリクローナル抗体及び抗ヒトIgAポリクローナル抗体は、現在さまざまな試薬で自然抗体やRFに起因する非特異反応を抑制するために実用化されているが、この方法では非特異反応を十分に抑制することができないことが明らかになった。
- [0007] 特許文献2に示されるIgM型自然抗体に対するポリクローナル抗体は測定に用いる抗体と同種の動物から調製される必要があり、調製方法や測定対象物質に対する抗体に制限があった。
- [0008] 特許文献3に示される、ポリペプチド鎖同士がジスルフィド結合した構造を有する干渉物質に起因した非特異反応を抑制するために用いられる還元剤は、種類や濃度によっては測定対象物質である抗原または抗体や、試薬成分に含まれる抗原または抗体のジスルフィド結合を切断する可能性があり、汎用性が低い。また、還元剤を用いる方法では、IgMのほかにIgGやIgAも分解される可能性があった。このため、特にヒトIgGを測定対象物質とする場合、この方法を使用することができなかった。
- [0009] 本発明の目的は、測定試料中に含まれるIgMに起因する非特異反応を抑制することが可能な免疫学的測定方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは上記課題を解決するために、様々な物質の非特異反応抑制効果を検討した結果、特異的にIgMを分解する酵素の存在下で抗原抗体反応を行うことにより非特異反応を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。具体的に本発明は以下の構成を有する。
- [0011] [1] 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法において、イムノグロブリンMを特異的に分解する酵素の存在下で少なくとも1回以上抗原抗体反応を行う、免疫学的測定方法。
- [2] 前記酵素がプロテアーゼである、[1]に記載の免疫学的測定方法。
- [3] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、[

[1] 又は [2] に記載の免疫学的測定方法。

[4] 前記酵素が、 $CH\mu 1$ から $CH\mu 4$ を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、[1]～[3]のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[5] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMを $F(a b')$ <sub>2</sub>断片とFc断片に分解する酵素である、[1]～[4]のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[6] 前記免疫学的測定方法がラテックス免疫比濁法である、[1]～[5]のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[7] 前記免疫学的測定方法において、前記測定対象物質が抗原又は抗体である、[1]～[6]のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[8] 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法に使用される試薬であって、IgMを特異的に分解する酵素を含む、免疫学的測定用試薬。

[9] 前記酵素がプロテアーゼである、[8]に記載の免疫学的測定用試薬。

[10] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、[8]または[9]に記載の免疫学的測定用試薬。

[11] 前記酵素が、 $CH\mu 1$ から $CH\mu 4$ を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、[8]～[10]のいずれかに記載の免疫学的測定用試薬。

[12] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMを $F(a b')$ <sub>2</sub>断片とFc断片に分解する酵素である、[8]～[11]のいずれかに記載の免疫学的測定用試薬。

[13] 前記免疫学的測定用試薬はラテックス免疫比濁法で用いるための試薬である、[8]～[12]のいずれかに記載の免疫学的測定用試薬。

[14] 前記免疫学的測定方法において、前記測定対象物質が抗原又は抗体である、[8]～[13]のいずれかに記載の免疫学的測定用試薬。

[15] IgMを特異的に分解する酵素を含む、免疫学的測定用検体前処理液。

[16] 前記酵素がプロテアーゼである、[15]に記載の免疫学的測定用検体前処理液。

[17] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、[15]または[16]に記載の免疫学的測定用検体前処理液。

[18] 前記酵素が、CH $\mu$ 1からCH $\mu$ 4を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、[15]～[17]のいずれかに記載の免疫学的測定用検体前処理液。

[19] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMをF(ab')<sub>2</sub>断片とFc断片に分解する酵素である、[15]～[18]のいずれかに記載の免疫学的測定用検体前処理液。

[20] 前記免疫学的測定用検体前処理液はラテックス免疫比濁法で用いるための薬液である、[15]～[19]のいずれかに記載の免疫学的測定用検体前処理液。

[21] 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法に使用される試薬キットであって、IgMを特異的に分解する酵素を含む、免疫学的測定用試薬キット。

[22] 前記酵素がプロテアーゼである、[21]に記載の免疫学的測定用試薬キット。

[23] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、[21]または[22]に記載の免疫学的測定用試薬キット。

[24] 前記酵素が、CH $\mu$ 1からCH $\mu$ 4を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、[22]または[23]に記載の免疫学的測定用試薬キット。

[25] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMをF(ab')<sub>2</sub>断片とFc断片に分解する酵素である、[22]～[24]のいずれかに記載の免疫学的測定用試薬キット。

[26] IgMを特異的に分解する酵素を含む、非特異反応抑制剤。

## 発明の効果

[0012] 本発明によれば、測定試料中に含まれる I g M に起因する非特異反応を抑制することが可能な免疫学的測定方法を提供できる。

[0013] 本発明の免疫学的測定方法では、従来の非特異反応抑制剤を用いても抑制できなかった非特異反応を抑制できる。この結果、測定対象物質の正確な測定をすることが可能となった。

### 発明を実施するための形態

[0014] [免疫学的測定方法]

本発明の免疫学的測定方法は、試料中の測定対象物質を免疫学的に測定する方法において、I g M を特異的に分解する酵素の存在下で少なくとも1回以上抗原抗体反応を行うことを特徴とする方法である。換言すれば、非特異反応抑制剤として、I g M を特異的に分解する酵素を試料と反応させ、その酵素の存在下で、試料中の測定対象物質を特異的結合パートナーを用いて免疫学的に測定する方法である。

[0015] 本発明の免疫学的測定方法の一態様は、免疫学的測定方法において、I g M を特異的に分解する酵素の存在下で少なくとも1回以上抗原抗体反応を行い、この際、反応液中における非特異反応を抑制する、非特異反応抑制方法である。

[0016] 免疫学的測定方法は、ホモジーニアス法とヘテロジーニアス法に大別される。

[0017] ホモジーニアス法は、試料と試薬液の混和溶液（反応液）中で測定対象物質と特異的結合パートナーとの間で生じる結合反応を、B/F（結合/非結合）分離を行うことなく特異的に検出する測定法である。ヘテロジーニアス法は、B/F分離操作を行い、結合反応に関与しなかった余剰成分を洗浄・除去した後、結合反応を進行させて測定対象物質を検出する測定法である。

[0018] ヘテロジーニアス法は、洗浄工程を経るため、工程が多く測定に時間を要するという課題がある一方、非特異反応物質による影響を比較的受けにくいという利点がある。これに対してホモジーニアス法は、洗浄工程を経ないため、非特異反応の影響を受けやすいという課題がある一方、工程が少なく簡

便であり、測定に要する時間も短いため、臨床診断の分野で広く求められている方法である。

[0019] ホモジーニアス法としては、免疫凝集法を利用した測定方法（ $I A$  :  $I m m u n o a g g l u t i n a t i o n a s s a y$ ）が挙げられ、例えば免疫比濁法（ $T I A$ ）、イムノクロマトグラフィー（ラテラルフロー式、フロースルー式）が挙げられる。 $T I A$ は、抗体などの特異的結合パートナーによるアナライト（測定対象物質）の架橋作用によって形成される免疫複合体の凝集度合いに基づいて、試料中のアナライトを定性もしくは定量的に検出する方法である。なかでも、凝集シグナルを増幅させるために不溶性担体としてラテックス粒子を用いたラテックス免疫比濁法（以下、 $L T I A$ ということがある。）は光学的な検出に適しており、自動化も容易なことから、さまざまな検査項目に適用されている汎用性の高い測定方法である。

[0020] ヘテロジーニアス法としては、ウエル状プレートを用いた $E L I S A$ 法、化学発光法などが挙げられる。

[0021] 本発明は、上記いずれの免疫学的測定方法にも利用することができるが、非特異反応の影響を比較的受けやすいホモジーニアス法が、より効果を楽しむことが期待できるため好ましく、ホモジーニアス法の中でもラテックス免疫比濁法が最も好ましい。

[0022] [ $I g M$ を特異的に分解する酵素]

本発明の一態様としては、 $I g M$ を特異的に分解する酵素を用いて免疫学的測定を行う方法、又は当該酵素を含む非特異反応抑制剤が挙げられる（以下、 $I g M$ を特異的に分解する酵素を $I g M$ 特異的分解酵素と略記することがある）。 $I g M$ 特異的分解酵素は、 $I g M$ を特異的に分解することができる酵素であれば良く、例えば、プロテアーゼが挙げられる。プロテアーゼの中でもプロテイナーゼ（エンドペプチダーゼ）、ペプチダーゼ（エキソペプチダーゼ）等が挙げられる。また、本発明において $I g M$ を分解する酵素は、 $C_H\mu 1$ から $C_H\mu 4$ を含む $I g M$ の定常領域（例えばヒトの $I g M$ の $S e r 1 2 4 \sim T y r 5 7 6$ の定常領域：配列番号1）の一部を切断する酵素で

あることが好ましく、 $F(a b')_2$ およびFc断片に分解できることがより好ましい。なお、IgM特異的分解酵素は、検体などの試料と接触させる時にIgMを特異的に分解できる機能を有していれば良く、その後の抗原抗体反応を実施する時点において、当該酵素は失活していても良い。

[0023] 本明細書において、抗体が抗原と「反応する」、抗体が抗原を「認識する」は、同義で用いられるが、これらの例示に限定されることはなく、最も広義に解釈する必要がある。抗体が抗原と「反応する」か否かの確認は、抗原固相化ELISA法、競合ELISA法、サンドイッチELISA法などにより行うことができるほか、表面プラズモン共鳴の原理を利用した方法（SPR法）などにより行うことができる。SPR法は、Biacore（登録商標）の名称で市販されている、装置、センサー及び試薬類を使用することができる。

[0024] 本明細書において、酵素がIgMを「分解する」、酵素がIgMと「反応する」、酵素がIgMを「消化する」は同義で用いられるが、これらの例示に限定されることはなく、酵素がIgMを「分解する」の意味を最も広義に解釈する必要がある。

[0025] 本発明におけるIgM特異的分解酵素は、IgMを特異的に分解する。IgM特異的分解酵素は、IgM以外のイムノグロブリン、例えばIgG、IgAと比べてIgMを効率的に分解することができる。このため、測定対象物質がIgGである場合であっても、測定対象物質に特異的に結合する結合パートナーがIgGである場合であっても、IgM特異的分解酵素は測定対象物質の特異的な測定に影響を及ぼさずに使用することができる。また、IgM特異的分解酵素は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ダチョウ、ブタ等の生物に由来するIgMを分解することができ、ヒトIgMを特異的に分解したい場合には、ヒトIgM特異的分解酵素を使用することが望ましい。

[0026] 本発明においてIgM特異的分解酵素が、IgMを特異的に分解するとは、例えばIgG又はIgMと酵素とをそれぞれ37℃で30分間から60分

間反応させた後、残存するIgMの量がIgGと比べて、50%以下、40%以下、又は30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下となる作用をいう。

[0027] 本発明において用いられるIgM特異的分解酵素としては、天然に存在する酵素であっても、遺伝子組換え技術によって作製された組換え酵素であっても、いずれのものであってもよい。天然に存在する酵素としては種々の細菌、真菌などが産生する酵素などが例示され、連鎖球菌、レジオネラ細菌、カンジダなどから生産される酵素が挙げられる。好ましくは、連鎖球菌 *Streptococcus suis* が生産する immunoglobulin M-degrading enzyme of *S. suis* (Ig<sub>D<sub>S<sub>S<sub>uis</sub></sub></sub>) (Seele et al, J. Bacteriol., 2013; 195, 930-940) 又は該酵素のアミノ酸変異体、IgMBRAZOR (Genovis社製) 又は該酵素のアミノ酸変異体などが挙げられる。また、上述の酵素は組換えタンパク質として生産された組換え酵素であってもよい。組換え酵素に人為的にアミノ酸残基置換を導入し、公知の種々のアッセイ系を利用したスクリーニングを行うことで、所望の酵素活性を有する組換え酵素改変体を作製することもできる(特開2019-506866, EP3148576)。従って、本発明では種々のIgM特異的分解酵素を用いて免疫学的測定方法における非特異反応抑制方法を実施したり、非特異反応抑制剤を作製したりすることができる。</sub>

[0028] 本発明において、IgMを特異的に分解する酵素を抗原抗体反応系内に存在させる方法としては、免疫学的測定用試薬の試薬構成の1つとして用いる方法、検体希釈液や検体抽出液、検体前処理液等に添加する方法が挙げられる。例えば、予めIgM特異的分解酵素を含んだ検体希釈液、検体抽出液、または検体前処理液を使用しても良く、IgM特異的分解酵素を検体希釈液、検体抽出液、または検体前処理液に添加して使用しても良い。なお、本明細書では検体希釈液や検体抽出液を含めて検体前処理液とする。

[0029] 抗原抗体反応系内とは、例えば免疫学的測定用試薬が液状試薬の場合は、

試料と液状免疫学的測定用試薬が混合され抗原抗体反応が行われる液相をいう。

[0030] 例えば、L T I A法の場合、試料を1 g M特異的分解酵素を含む免疫学的測定用試薬に混合しても良いし、試料を1 g M特異的分解酵素を含む検体前処理液とあらかじめ混合した後にL T I A測定試薬と混合しても良い。

[0031] E L I S A法の場合、試料を1 g M特異的分解酵素とあらかじめ混合した後にマイクロプレートに滴下しても良いし、試料を1 g M特異的分解酵素と検出用抗体を含む溶液と混合した後にマイクロプレートに滴下しても良い。

[0032] 化学発光法試薬の場合も、試料を1 g M特異的分解酵素を含む検体前処理液とあらかじめ混合した後に免疫学的測定用試薬と混合しても良いし、免疫学的測定用試薬（例えば、検出用抗体もしくは検出用抗原、磁性粒子を含む溶液）に1 g M特異的分解酵素が含まれていてもよい。

[0033] イムノクロマトグラフィー法などの固相で抗原抗体反応が行われる場合は、抗原抗体反応系内とは、液状試料と結合性パートナーの抗原抗体反応が行われる固相をいう。この場合、試料を1 g M特異的分解酵素を含む検体前処理液とあらかじめ混合した後にイムノクロマト試験片に滴下してもよいし、1 g M特異的分解酵素をサンプルパッド（試料供給部位）などの部材上に乾燥保持しておき、試料を滴下した際に1 g M特異的分解酵素が溶解されて固相を展開することで反応系に存在する状態になっても良い。

[0034] 本発明において、1 g M特異的分解酵素の濃度は、測定対象物質と特異的結合パートナーとの抗原抗体反応に強い影響を及ぼさず、所望の非特異反応抑制効果を発揮できる濃度であればよく、測定対象物質や試料の種類に応じて適宜当業者が設定できる。

[0035] 抗原抗体反応系内における1 g M特異的分解酵素の濃度としては、抗原抗体反応系の試薬構成によっても異なる。例えば検体前処理液に1 g M特異的分解酵素を添加する場合、検体10  $\mu$ Lに対して酵素を1~1000 U、好ましくは5~800 U、より好ましくは10~500 U、更に好ましくは20~300 U、最も好ましくは50~200 Uを添加することができる。ま

た、検体前処理液に I g M 特異的分解酵素を添加する場合、前処理液中の酵素の濃度は  $1 \sim 1000 \text{ U} / \mu\text{L}$ 、好ましくは  $5 \sim 800 \text{ U} / \mu\text{L}$ 、より好ましくは  $10 \sim 500 \text{ U} / \mu\text{L}$ 、更に好ましくは  $10 \sim 300 \text{ U} / \mu\text{L}$ 、最も好ましくは  $20 \sim 200 \text{ U} / \mu\text{L}$  を添加することができる。また、検体前処理液に I g M 特異的分解酵素を添加する場合、検体と検体前処理液の混合比は  $1 : 100 \sim 100 : 1$ 、好ましくは  $1 : 50 \sim 50 : 1$ 、更に好ましくは  $1 : 20 \sim 20 : 1$ 、最も好ましくは  $1 : 10 \sim 10 : 1$  とすることができる。

[0036] 本発明において、I g M 特異的分解酵素は単独で用いてもよいし、他の非特異反応抑制効果を持ったものと併用して使用してもよい。他の非特異反応抑制効果を持つものとしては、例えば抗 I g M 抗体、高分子化合物、特異抗体の L 鎖又は H 鎖のうち可変領域の一部あるいは全部を改変した改変抗体などが挙げられる。なお、他の非特異反応抑制効果を持ったものはここに挙げたものに限定されない。更に、抗 I g M 抗体と I g M 特異的分解酵素を併用する場合には、抗 I g M 抗体と当該酵素を直接的または間接的に結合した状態であってもよい。

[0037] 本発明の免疫学的測定用試薬中にあらかじめ I g M 特異的分解酵素を含有させる場合には、上記の反応系内における濃度になるようにあらかじめ前記測定試薬中に含有させることが好ましい。

[0038] [ラテックス免疫比濁法 (L T I A 法)]

本発明の免疫学的測定方法の 1 つである L T I A 法について説明する。L T I A 法により測定対象物質を測定する方法は、大きく二つに大別することができる。

[0039] 一つ目は、測定対象物質に対する特異的結合パートナーを固定化したラテックス粒子と、測定対象物質とを反応させ、サンドイッチ型の免疫複合体を形成させ、免疫複合体形成に伴う前記ラテックス粒子の凝集の程度から測定対象物質を測定する方法である。

[0040] 二つ目は、免疫学的測定用試薬中に複数の測定対象物質又はその類縁体 (

これらの断片を含む)を固定化した蛋白質等を添加しておき、これらと試料中の測定対象物質とを競合させて、前記試薬中に含まれる測定対象物質と測定対象物質に対する特異的結合パートナーを固定化したラテックス粒子との免疫複合体の形成を阻害し、免疫複合体の形成阻害に伴う前記ラテックス粒子の凝集阻害の程度から測定対象物質(例えば抗原など)を測定する方法である。

[0041] 測定対象物質と測定対象物質に対する特異的結合パートナーは、測定対象物質に特異的に結合できるものであればタンパク質、ペプチド、糖鎖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、核酸、低分子化合物、高分子化合物いずれのものでもよく、目的に応じて任意の物質を選択することができる。例えば、測定対象物質が抗原であれば、測定対象物質に対する特異的結合パートナーとしてポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(ハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体、遺伝子組換え抗体及び各抗体の機能性断片を含む)などいずれの抗体も選択することができる。測定対象物質が抗体であれば、測定対象物質に対する特異的結合パートナーとして天然及び組換え抗原などの抗原を選択することができる。

[0042] 本発明は上記いずれの方法にも用いることができ、具体的には、以下の工程が例示されるが、これに限定されない。

[0043] (1) 測定対象物質を含む試料と、 $1\text{ g M}$ 特異的分解酵素と、を溶液中で接触させる工程

[0044] (2) (1)の工程の後に、前記溶液中に測定対象物質に対する特異的結合パートナーを担持するラテックス粒子を添加する工程

[0045] (3) (2)の工程の後に、前記溶液中における前記ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に検出する工程

[0046] ここで、(3)の工程は、「(2)の工程の途中、あるいは(2)の工程の後に、洗浄・分離工程を経ることなく前記測定対象物質と前記ラテックス粒子の凝集反応を測定する工程」であることを意味する。

[0047] L T I A法は、生じた凝集の程度を光学的に観察することにより測定対象

物質を測定できる。光学的に観察する方法としては、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度を光学機器で測定する方法（エンドポイント法、レート法等）が挙げられる。試料を測定して得た吸光度等の測定値を、標準物質（測定対象物質の濃度が既知の試料）を測定して得た吸光度等の測定値と比較して、試料中に含まれていた測定対象物質の濃度（定量値）を算出する。なお、透過光又は散乱光などの吸光度等の測定は、1波長測定であっても、又は2波長測定（2つの波長による差又は比）であってもよい。測定波長は、500nmから900nmの中から選ばれるのが一般的である。

[0048] 本発明において、試料中の測定対象物質の測定は、用手法により行ってもよいし、又は測定装置等の装置を用いて行ってもよい。測定装置は、汎用自動分析装置であっても、専用の測定装置（専用機）であってもよい。また、この測定は、2ステップ法（2試薬法）等の複数の操作ステップにより行う方法によって実施することが好ましい。

[0049] [特異的結合パートナーを担持したラテックス粒子]

測定対象物質に対する特異的結合パートナーは、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法によりラテックス粒子に固定化して担持させることができる。物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、測定対象物質に対する特異的結合パートナーと、ラテックス粒子とを、緩衝液等の溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液等に溶解した測定対象物質に対する特異的結合パートナーを、担体に接触させたりすること等により行うことができる。また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用一」、臨床病理刊行会、1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質ⅠV」、東京化学同人、1991年発行等に記載の公知の方法に従い、測定対象物質に対する特異的結合パートナーと、担体とを、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、測定対象物質に対する特異的結合パートナーと、担体の、それぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基

、アルデヒド基又は水酸基等と前記の二価性の架橋試薬とを反応させること等により行うことができる。

[0050] ラテックス粒子を構成する合成高分子としては特に限定はないが、例えば、ポリスチレン、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、イタコン酸重合体、スチレン-親水性カルボキシモノマー共重合体：例えば、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-アクリル酸共重合体、スチレン-イタコン酸共重合体、ビニルナフタレン重合体等が挙げられる。その中で、好ましくはスチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-イタコン酸共重合体、スチレン及びスチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体である。好ましくは、スチレン及びスチレン-（メタ）アクリル酸共重合体である。

[0051] ラテックス粒子が担持する測定対象物質に対する特異的結合パートナーは、サンドイッチを形成するために複数種類であることが好ましい。測定対象物質に抗体認識部位が複数存在する場合は、特異的結合パートナーは一種類でもよい。例えば、特異的結合パートナーがモノクローナル抗体の場合には、認識部位の異なる複数のモノクローナル抗体を用いる。また、例えば、特異的結合パートナーがポリクローナル抗体の場合には、1種の抗血清由来のポリクローナル抗体でもよいし、複数種の抗血清由来のものでもよい。また、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組み合わせて用いてもよい。

[0052] ラテックス粒子の自然凝集や、非特異反応等を抑制するために処理を行う必要がある場合は、ラテックス粒子の表面に、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミン若しくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、担体のブロッキング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

[0053] [免疫学的測定用試薬]

本発明の免疫学的測定方法は、免疫学的測定用試薬を用いて行うことができる。前記免疫学的測定用試薬には、抗原抗体反応の主成分の他に、前述の1 g M特異的分解酵素を含むことを特徴とする。前記主成分としては、測定

対象物質に特異的な結合パートナーが挙げられ、他に、免疫学的測定用粒子、イムノクロマト試験片、マイクロプレートなどの不溶性担体等が挙げられる。

[0054] 本発明の免疫学的測定用試薬は、 $1\text{ g M}$ 特異的分解酵素が有する非特異反応抑制効果を妨げない範囲でバッファー、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、脂質、リン脂質、糖類、糖タンパク質、糖脂質、無機塩、高分子化合物、界面活性剤、その他の非特異反応抑制剤、防腐剤等を含んでいてもよい。試料のpH、イオン強度、浸透圧などを緩衝、調整する成分として、例えば、酢酸、クエン酸、リン酸、トリス、グリシン、ホウ酸、炭酸、フタル酸、コハク酸、マレイン酸、イミダゾールなどの緩衝液、及びグッドの緩衝液や、それらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などを含んでもよい。また免疫学的測定用粒子の凝集形成を増強する成分としてポリビニルピロリドン、リン脂質ポリマーなどの高分子を含んでもよい。

[0055]  $1\text{ g M}$ 特異的分解酵素の構成試薬中における濃度は、測定時である、試薬と試料の混合状態において前記抗原抗体反応系内の濃度に調整しうるような濃度で含まれていればよく、各試薬型により異なる。

[0056] [免疫学的測定用試薬キット]

本発明の免疫学的測定用試薬キットは、キット構成に少なくとも $1\text{ g M}$ 特異的分解酵素を含むことを特徴とする。従って本発明の試薬キットとしては、キットを構成する抗原抗体反応に関わる試薬のほか、検体希釈液、検体抽出液を含む検体前処理液など、これらのいずれか1つ、あるいは2つ以上に $1\text{ g M}$ 特異的分解酵素が含まれている。キットの構成は、上記のほかに、使用説明書、試料採取用具（採取ピペット、シリンジ、綿棒、ろ過フィルターなど）が挙げられる。

以下、各免疫学的測定方法を採用する試薬構成についてそれぞれ説明する。

[0057] [ラテックス免疫比濁法]

免疫学的測定法がラテックス免疫比濁法である場合の試薬（L T I A 試薬

) を例示するが、これに限定されない。

[0058] (1) 1 g M特異的分解酵素を含む第1試薬

(2) 測定対象物質に対する特異的結合パートナーを担持するラテックス粒子を含む第2試薬

[0059] 第1試薬は典型的には緩衝液を含み、1 g M特異的分解酵素の緩衝液中における濃度は、測定時である、試薬と試料の混合状態において前記好ましい酵素の濃度に調整しうるような濃度で含まれていればよく、各試薬型により異なる。前記酵素は第1試薬のほかに第2試薬に含まれていてもよい。

[0060] 本発明の一例のL T I A試薬において、一般的な第1試薬に含まれる1 g M特異的分解酵素の濃度としては、1~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは5~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは10~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは20~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるが、この濃度に限ることはない。

[0061] L T I A法に供する前に、検体に検体前処理液等を添加する場合、1 g M特異的分解酵素は検体前処理液に含まれていても良く、前記処理液中の前記酵素濃度は1~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは5~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは10~300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは20~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるが、この濃度に限ることはない。

[0062] (温度)

検体に対する1 g M特異的分解酵素の反応温度は、1 g M特異的分解酵素が失活せず、1 g Mを特異的に分解することができる温度であれば良く、0~50°Cの範囲、好ましくは10~40°C、さらに好ましくは20~40°Cであるが、この温度に限ることはない。

[0063] (反応時間)

検体に対する1 g M特異的分解酵素の反応時間は、1 g M特異的分解酵素を用いて1 g Mを特異的に十分に分解することができる反応時間であれば良く、30秒から24時間の範囲、好ましくは1分~120分であるが、この反応時間に限ることはない。

[0064] (pH)

1 g M特異的分解酵素を含む溶液のpHは、1 g M特異的分解酵素が十分に機能するpHであれば良く、pH 1～12の範囲、好ましくは3～10、さらに好ましくは5～9の範囲、最も好ましくは6～8の範囲であるが、このpHに限ることはない。

[0065] (免疫学的測定用粒子)

本発明に用いられる免疫学的測定用粒子は、上記のラテックス粒子以外にも測定対象物質に対して特異的な結合パートナーを担持できるものであれば公知の粒子を使用できる。例えば、金属コロイド、シリカ、カーボン、磁性粒子等の無機物粒子も、本発明の免疫学的測定用粒子として用いることができる。

[0066] 免疫学的測定用粒子のサイズは、使用する光学的測定法（例えば、透過光を測定する比濁法、散乱光を測定する比濁法など）を考慮し、所望の測定感度、測定範囲などが得られるよう、0.05～1 μmの範囲から適宜選択することができる。なお、自動分析装置における光学的測定においては平均粒子径0.1～0.4 μmが汎用されているが、これに限定されない。

[0067] [ELISA法]

ELISA法とは、種々の抗原抗体反応の組合せを利用し、最終的には酵素標識した抗原あるいは抗体を反応系に組込んで、酵素活性を検出する方法である。酵素活性の検出には、反応によって吸光スペクトルが変化する基質が用いられ、抗原抗体反応の組合せによって直接法、間接法、サンドイッチ法、競合法などが挙げられる。

[0068] 本発明の免疫学的測定方法がサンドイッチELISA法である場合の免疫学的測定用試薬を例示する。

[0069] (a) 測定対象物質と反応する抗体を固定化した不溶性担体

(b) 標識物質で標識され、測定対象物質と反応する抗体

[0070] (a) の不溶性担体としては、プレートが好ましく、標識物質は、適宜選択して使用できる。不溶性担体に固定化された抗体は、試料を含む溶液中の測定対象物質を捕捉し、不溶性担体上で複合体を形成する。標識物質で標識

された抗体は、前記捕捉された測定対象物質に結合して前述の複合体とサンドイッチを形成する。標識物質に応じた方法により標識物質の量を測定することにより、試料中の測定対象物質を測定することができる。抗体の不溶性担体への固定化の方法、抗体と標識物質との結合方法など、具体的な方法は、当業者に周知の方法を特に制限なく使用することができる。

[0071] ELISA法において、本発明のIgM特異的分解酵素は、例えば、検体前処理液等に添加したり、抗原抗体反応を行う溶液中に添加したりすることで、免疫反応系に存在させることができる。

[0072] [イムノクロマトグラフィー法]

本発明の免疫学的測定方法がイムノクロマトグラフィー法である場合の免疫学的測定用試薬の構成（試験片構成）について説明する。

イムノクロマト試験片；

特異的結合パートナーとして抗体を用いた場合、多孔性メンブレンなどのシート状の不溶性担体上に、試料を含む溶液の展開方向の順に「1. 試料供給部位」、「2. 標識抗体を保持する部位（標識抗体保持部位）」、「3. 標識抗体と測定対象物質により形成された複合体を捕捉するための抗体を固定化する部位（捕捉抗体部位）」を具備した試験片である。

イムノクロマトグラフィー法では、上記のような試験片を少なくとも含み、測定対象物質を含む試料を試料供給部位に所定量添加すると、試料は毛細管現象により標識抗体保持部位に侵入し、測定対象物質と標識抗体とが結合して複合体を形成する。前記複合体は、メンブレンを展開し、捕捉抗体部位に侵入すると、メンブレンに固定化された抗体（捕捉抗体）に捕捉され、捕捉抗体－測定対象物質－標識抗体の複合体が形成される。そして標識を任意の方法（例えば、金コロイドなど可視化可能な標識の場合にはその凝集像、酵素の場合には、基質を添加することによる発色反応）で検出することで、測定対象物質を検出することができる。

イムノクロマトグラフィー法において、本発明のIgM特異的分解酵素は、例えば、検体前処理液等に添加したり、試料供給部位や標識抗体保持部位

に含有させて乾燥保持させたりしておくことで、反応系内に存在させることができる。

[0073] [化学発光法]

抗原又は抗体を結合した磁性粒子と測定対象物質を反応させ複合体を形成した後、磁気により未反応物質を除去する。さらに標識抗体を含む試薬を添加し、磁気により未反応物質を除去した後、発光試薬を添加し発光量を測定する方法である。標識に酵素を用いた場合を化学発光酵素免疫測定法（CLEIA法：Chemiluminescent enzyme immunoassay）という。標識にルテニウムピリジン錯体等の金属錯体を用いて電気化学反応により発光強度を測定する場合を電気化学発光免疫測定法（ECLIA法：Electrochemiluminescence immunoassay）という。標識に化学発光性物質を用いた場合を化学発光免疫測定法（CLIA法：Chemiluminescent immunoassay）という。

[0074] 本発明の免疫学的測定方法がCLEIA法である場合の免疫学的測定用試薬を例示する。

- (a) 測定対象物質と反応する抗体（又は抗原）を固定化した磁性粒子
- (b) 酵素標識され、測定対象物質と反応する抗体（又は抗原）
- (c) 発光試薬

磁性粒子に固定化された抗体は、試料を含む溶液中の測定対象物質を捕捉し、複合体を形成する。酵素標識物質で標識された抗体は、前記捕捉された測定対象物質に結合して前述の複合体とサンドイッチを形成する。酵素標識物質と発光試薬を反応させて発光量を測定することにより、試料中の測定対象物質を測定することができる。

[0075] CLEIA法において、本発明のIgM特異的分解酵素は、例えば、検体前処理液等に添加したり、抗原抗体反応を行う溶液中に添加したりすることで、免疫反応系に存在させることができる。

[0076] [特異的結合パートナー]

本発明において、測定対象物質に対する特異的結合パートナーとしては、測定対象物質に特異的に結合可能な物質であればいかなるものでもよく、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、糖タンパク質、糖脂質、核酸、ハプテン、低分子化合物及び高分子化合物などが挙げられる。さらに、分子量の高低及び天然、合成といった由来に特に制限はないが、抗原抗体反応を利用する免疫学的測定方法に使用され得る抗体又は抗原が挙げられる。

[0077] 前記抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。より好ましくは、モノクローナル抗体である。

[0078] <試料>

本発明において測定対象物質を含む試料としては、例えばヒト又は動物の血液、血清、血漿、培養上清、尿、髄液、唾液、汗、腹水、鼻汁、便、又は細胞あるいは組織の抽出液等が挙げられる。測定対象物質を含む試料としては血液が最も好ましい。なお、一般的に血中に含まれるIgMの基準値は男性では33~190mg/dl、女性では46~260mg/dlであることが知られている。試料は「検体」と呼ばれることがある。

[0079] [測定対象物質]

本発明の免疫学的測定用試薬は、前記試料に含有される種々の物質を測定対象物質とすることができる。測定対象物質としては、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、糖タンパク質、糖脂質、核酸、ハプテンなどが挙げられるが、理論的に測定可能な物質であれば特に制限はない。例えばC反応性タンパク質(CRP)、リポ蛋白(a)(Lp(a))、マトリクスメタロプロテイナーゼ3(MMP3)、抗リン脂質抗体、IV型コラーゲン、prostate specific antigen(PSA)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、インスリン、アルブミン、シスタチンC、リウマチ因子(RF)、KL-6、プロカルシトニン(PCT)、フィブリン及びフィブリノーゲン分解産物(FDP)、Dダイマー、可溶性フィブリン(SF)、トロンビン-アンチトロンビンIII複合体(TAT)、トランスフェリン、ハプトグロビン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、 $\alpha$ 1-アシ

ドグリコプロテイン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン、ヘモペキシン、アンチトロンビン-111、 $\alpha$ -フェトプロテイン、癌胎児性抗原（CEA）、フェリチン、B型肝炎ウイルス外被s抗原（HBs-Ag）、抗B型肝炎ウイルス外被s抗体（Anti-HBs）、B型肝炎ウイルス外被e抗原（HBe-Ag）、抗B型肝炎ウイルス外被e抗原抗体（Anti-HBe）、抗B型肝炎ウイルスコア抗体（Anti-HBc）、重症急性呼吸器症候群ウイルス（SARS）、PAI-1、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、バルプロ酸、テオフィリン、thymus and activation-regulated chemokine（TARC）、可溶性インターロイキン-2受容体（sIL-2R）、肺サーファクタントプロテインD（SP-D）などが挙げられる。

[0080] 本発明において測定される測定対象物質としては、抗トレポネーマ（*Treponema Pallidum*）抗体、抗環状シトルリン化ペプチド（CCP）抗体、抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、肝炎、麻疹や白血病といったウイルスに対するIgGやIgAといった抗体類も挙げられる。特許文献3に記載の技術では、これらの抗体も還元剤によって分解される恐れがあった。一方、本発明におけるIgM特異的分解酵素はこれらの抗体を分解しない。このため、IgM特異的分解酵素は測定対象物質が抗体である場合に、特許文献3に記載の技術に対して特に有用である。

[0081] [非特異反応抑制剤]

本発明において、非特異反応を抑制するとは、生体試料中の上記の非特異反応を生じさせる因子（非特異因子、非特異原因物質、非特異反応物質ともいう）に作用し、抗原抗体反応以外の反応による測定への影響を抑制することをいう。したがって、本発明において、非特異反応抑制剤としての候補物質に非特異反応の抑制効果があるかどうかは、例えばB/F分離のある測定方法（洗浄工程があり、非特異反応物質による影響が生じにくい方法（実施例では、LBA法やCLEIA法））で測定した場合の測定値（以下、対照法測定値という）を基準に、候補物質添加有りの場合と無しの場合を比べて

対照法測定値に近づくかどうかによって判断することができる。すなわち、目的の測定方法において、候補物質を添加した場合の測定値が、候補物質を添加しなかった場合の測定値に比べて、対照法測定値に近い場合は、前記測定方法において、候補物質に非特異反応抑制効果があり、候補物質が非特異反応抑制剤になりうると判断することができる。

[0082] 本発明の非特異反応抑制剤は、生体試料中に含まれる何らかの成分により、測定対象物質を本来の含量よりも高い値と判定するいわゆる正の測定誤差を生じる因子や、本来の値よりも低い値と判定するいわゆる負の測定誤差を生じる因子のいずれも対象とする。このうち、HBR-1などの市販の非特異反応抑制剤によって抑制できないような非特異因子に対して特に効果を有する。また、いわゆる乖離検体と呼ばれる測定値が異常に高値化するような正の測定誤差、測定値が異常に低値化するような負の測定誤差を生じる非特異因子に対して効果を有する。本発明において、非特異反応を引き起こす原因物質として種々の原因物質が挙げられるが、少なくともイムノグロブリンM (IgM)の一部、全部又は一部、全部と類似する構造を有する原因物質をIgM特異的分解酵素で分解することが好ましい。この分解反応により、本発明の非特異反応抑制剤は当該原因物質由来の非特異反応を抑制することができる。

[0083] 本発明の非特異反応抑制剤は、上記のように判断される、試料に由来する非特異因子による反応を抑制可能な物質を含んでいればよく、少なくともIgM特異的分解酵素を有効成分として含む。本発明の非特異反応抑制剤は、上記の免疫学的測定用試薬にIgM特異的分解酵素を含む構成を、非特異反応抑制剤の構成として採用することができる。

[0084] 本発明の非特異反応抑制剤には、IgM特異的分解酵素の非特異反応抑制効果を妨げない範囲でバッファー、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、脂質、リン脂質、糖類、糖タンパク質、糖脂質、無機塩、高分子化合物、界面活性剤、その他の非特異反応抑制剤、防腐剤等を含有させてもよい。その他の非特異反応抑制剤としては非特異反応抑制効果を持っていれば良く、

抗 I g M 抗体、高分子化合物、特異抗体の L 鎖又は H 鎖のうち可変領域の一部あるいは全部を改変した改変抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。更に、抗 I g M 抗体と I g M 特異的分解酵素を併用する場合には、抗 I g M 抗体と当該酵素を直接的または間接的に結合した状態であってもよい。

[0085] [非特異反応抑制方法]

本発明の非特異反応抑制方法とは、I g M 特異的分解酵素の存在下で少なくとも1回以上抗原抗体反応を行うことにより、試料に起因する非特異反応を抑制する方法である。また、非特異反応の抑制方法とは測定誤差の低減方法と言い換えることもできる。

[0086] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 実施例

[0087] <L T I A 法における非特異反応抑制：P C T の測定>

試料（検体）に含まれるプロカルシトニン（P C T）の濃度を L T I A 法で次の通り測定した。

試料として、複数名（2名）のヒト血清検体1～2を用いた。検体1（対照検体）は、L T I A 法による測定値が L B A 法（L i q u i d - p h a s e B i n d i n g A s s a y）による測定値（参考例1）と近い値を示す試料である。検体2（乖離検体）は、非特異反応を呈し、L T I A 法による測定値が L B A 法による参考例1の測定値から大きく乖離する試料である。なお、各検体中の I g M の濃度は、検体1では 6 2 m g / d L、検体2では 8 8 m g / d L であった。

[0088] [参考例1] L B A 法による測定

1. 測定方法

1-1. 測定試薬

ミュータスワコー（登録商標）P C T ・ i 5 0（富士フイルム和光純薬株式会社）

## 1-2. 試料

検体 1 ~ 2

## 1-3. 測定手順

ミュータスワコー（登録商標） i 5 0（富士フィルム和光純薬株式会社）にて、前記測定試薬の添付文書に従い測定を行った。

## [0089] 2. 測定結果

測定結果を表 1 に示した。

本参考例 1 で示す L B A 法は、等速電気泳動による B / F 分離が行われる。このため、L B A 法は試料に由来する非特異反応の影響を受けにくい測定方法である。

## [0090] [比較例 1] L T I A 法による測定：試料に P B S 緩衝液添加（添加剤無し）

## 1. 測定方法

## 1-1. 測定試薬

以下の方法に従い、第 1 試薬と第 2 試薬を調製した。

## [0091] 第 1 試薬

以下の組成の第 1 試薬ベース液を調製した。

- ・ 1 0 0 m M B i s - T r i s - H C l ( p H 6 . 5 )
- ・ 6 0 0 m M N a C l
- ・ 0 . 2 % B S A

## [0092] 第 2 試薬

- ・ 5 m M M O P S - N a O H ( p H 7 . 0 )
- ・ 抗ヒト P C T モノクローナル抗体感作ラテックス（2 種類）

なお、抗ヒト P C T モノクローナル抗体は、市販の P C T 抗原を使用し、当業者周知の方法にて取得した。抗ヒト P C T モノクローナル抗体感作ラテックスは、特開 2 0 1 7 - 1 8 1 3 7 7 号公報に記載の方法を参考に調製した。すなわち、平均粒子径 0 . 3 μ m の 1 . 0 % ラテックス溶液（5 m M トリス緩衝液（以下、T r i s - H C l または単に T r i s という）（p H

8. 5) に当量の5 mM Tris-HCl (pH 8. 5) で0. 36 mg / mL に希釈した抗ヒトPCTモノクローナル抗体溶液を添加して攪拌した。その後等量の0. 5% BSA含有5 mM Tris-HCl (pH 8. 5) を添加して、攪拌し、抗ヒトPCTモノクローナル抗体感作ラテックス粒子溶液を作製した。当該ラテックス粒子溶液を、600 nmにおける吸光度が約5. 5 ODとなるよう5 mM MOPS-NaOH (pH 7. 0) で希釈し、第2試薬とした。

[0093] 1-2. 検体前処理液

PBS緩衝液 (pH 7. 4) を使用した。

[0094] 1-3. 試料

参考例1に記載の検体 (血清) 1~2に対し、検体前処理液であるPBS緩衝液を5:1の容量比で添加し、37°Cで30分間反応させた試料を測定した。

[0095] 1-4. 測定手順

各検体の試料、第1試薬及び第2試薬を混合して、日立3500形自動分析装置を用いて、試料中のPCT濃度を測定した。具体的には、試料12 µLに第1試薬120 µLを加えて37°Cで5分間保温した。その後、第2試薬40 µLを加えて攪拌した。凝集形成に伴う吸光度変化を、その後5分間にわたり、主波長570 nm、副波長800 nmで測定した。その吸光度変化量を濃度既知の標準物質を測定して得られる検量線にあてはめ、測定値を算出した。

[0096] [実施例1] L T I A法による測定: 試料に1 g M特異的分解酵素添加

1. 測定方法

検体前処理液に1 g M特異的分解酵素である、40 U / µLの1 g M B R A Z O R (G e n o v i s社製) を含むPBS緩衝液を使用したこと以外は、比較例1と同様の方法で測定した。

[0097] 2. 測定結果

測定結果を表1に示した。測定結果の数値の単位は、ng / mLである。

[0098] [表1]

	検体 番号	IgM濃度 mg/dL	参考例1	実施例1	比較例1
			LBA法	LTIA法	LTIA法
			-	IgM BRAZOR 添加	PBS 緩衝液添加
対照検体	1	62	5.06	5.10	5.04
乖離検体	2	88	0.10	0.02	1.68

[0099] (1) 対照検体1 (検体1) の測定結果について検証を行った。

対照検体1では、参考例1と、実施例1と、比較例1の測定値は概ね同等であった。本結果より、IgMBRAZORの添加は、非特異反応を呈しない検体の測定値に対して影響を与えないことが明らかになった。

[0100] (2) 乖離検体 (検体2) の測定結果について検証を行った。

検体2の測定値は、参考例1が0.10ng/mLであった。比較例1は1.68ng/mLとなり、参考例1の測定値に対して乖離した。一方、実施例1の測定値は0.02ng/mLとなり、参考例1に近づく傾向を示した。

以上より、免疫学的測定方法において、IgM特異的分解酵素を用いることにより、試料に由来する非特異反応を抑制することができた。

[0101] [比較例2] LTIA法による測定：試料にセミアルカリプロテアーゼ添加

検体前処理液として、プロテイナーゼ from *Aspergillus melleus*, 5G (Sigma-Aldrich社製) をPBS緩衝液で0.4mg/mLになるように希釈したものを使用した他は実施例1と同一の方法で測定を行った。測定結果を表2に示した。

[0102] [比較例3] LTIA法による測定：試料にセミアルカリプロテアーゼ添加

検体前処理液に含まれる、酵素の濃度を2.0mg/mLに変更した他は比較例2と同一の方法で測定を行った。測定結果を表2に示した。

[0103] [比較例4] LTIA法による測定：試料にProteinase K添加

使用する酵素をProteinase K, recombinant, PCR Grade, Lyophilizate from *Pich*

*ia pastoris* (Roche社製)に変更し、その濃度をPBS緩衝液で0.4 mg/mLになるように希釈したものを使用したほかは、比較例2と同一の方法で測定を行った。測定結果を表2に示した。

[0104] [比較例5] L T I A法による測定：試料にP r o t e i n a s e K添加検体前処理液に含まれる、酵素の濃度を2.0 mg/mLに変更した他は比較例4と同一の方法で測定を行った。測定結果を表2に示した。

表2に記載した測定結果の数値の単位は、ng/mLである。

[0105]

[表2]

	検体 番号	IgM濃度 mg/dL	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5
			LTIA法 IgM BRAZOR 添加	LTIA法 PBS 緩衝液 添加	LTIA法 セミアル カリプロテアーゼ 添加 0.4mg/mL	LTIA法 セミアル カリプロテアーゼ 添加 2.0mg/mL	LTIA法 Proteinase K 添加 0.4mg/mL	LTIA法 Proteinase K 添加 2.0mg/mL
対照検体	1	62	5.10	5.04	0.44	0.08	0.17	0.08
乖離検体	2	88	0.02	1.68	1.27	-	1.23	-

[0106] 対照検体1では、比較例2～5は実施例1と比較して測定値が著しく低下したことが分かる。特に酵素濃度が高い時に顕著に低下している。IgM特異的分解酵素とは異なる市販のプロテアーゼを用いることでプロテアーゼが対照検体中のPCT抗原を分解したため、測定値が顕著に低下したと考えら

れる。乖離検体 2 では、比較例 2、4 は実施例 1 と比較して測定値が高値である。IgM 特異的分解酵素とは異なる市販のプロテアーゼを用いても、乖離検体中の非特異原因物質を分解できず、測定値が高値に乖離したと考えられる。以上から、免疫学的測定方法において、IgM 特異的分解酵素を用いることにより、試料中の測定対象物質である PCT 抗原を分解することなく、試料に由来する非特異反応を抑制することができたと言える。

[0107] <L T I A 法における非特異反応抑制：s I L - 2 R の測定>

試料（検体）に含まれる可溶性インターロイキン 2 レセプター（s I L - 2 R）の濃度を L T I A 法で次の通り測定した。

試料として、複数名（3 名）のヒト血清検体 4 ~ 6 を用いた。検体 4（対照検体）は、L T I A 法による測定値が化学発光酵素免疫測定法（C L E I A 法）による測定値（参考例 2）と近い値を示す試料である。検体 5、6（乖離検体）は、非特異反応を呈し、L T I A 法による測定値が C L E I A 法による参考例 2 の測定値からそれぞれ大きく乖離する試料である。なお、各検体中の IgM の濃度は検体 4 では 7 6 m g / d L、検体 5 では 7 1 m g / d L、検体 6 では 5 3 2 m g / d L であった。

[0108] [参考例 2] C L E I A 法による測定

1. 測定方法

1 - 1. 測定試薬

ルミパルスプレスト（登録商標）I L - 2 R（富士レビオ株式会社）

1 - 2. 試料

検体 4 ~ 6

1 - 3. 測定手順

ルミパルス（登録商標）- L 2 4 0 0（富士レビオ株式会社）にて、前記測定試薬の添付文書に従い測定を行った。

[0109] 2. 測定結果

測定結果を表 3 に示した。

本参考例 2 で示す C L E I A 法は、B / F 分離操作を実施し、洗浄工程を

有する。このため、CLEIA法は試料に由来する非特異反応の影響を受けにくい測定方法である。

[0110] [比較例6] L T I A法による測定：試料にP B S緩衝液添加（添加剤無し）

1. 測定方法

1-1. 測定試薬

特開2017-181377記載の方法に従い、第1試薬と第2試薬を調製した。

1-2. 検体前処理液

P B S緩衝液（p H 7. 4）を使用した。

1-3. 試料

参考例2に記載の検体（血清）4～6に対し、検体前処理液であるP B S緩衝液を5：1の容量比で添加し、37℃で1時間反応させた試料を測定した。

1-4. 測定手順

各検体の試料、第1試薬及び第2試薬を混合して、日立7180形自動分析装置を用いて、試料中のs I L-2 R濃度を測定した。具体的には、試料5. 6 μ Lに第1試薬120 μ Lを加えて37℃で5分間保温した。その後、第2試薬40 μ Lを加えて攪拌した。凝集形成に伴う吸光度変化を、その後5分間にわたり、主波長570 nm、副波長800 nmで測定した。その吸光度変化量を濃度既知の標準物質を測定して得られる検量線にあてはめ、測定値を算出した。

[0111] 2. 測定結果

測定結果を表3に示した。測定結果の数値の単位は、U / m Lである。

[0112] [実施例2] L T I A法による測定：試料にI g M特異的分解酵素添加

検体前処理液として、40 U / μ LのI g M B R A Z O R（Genovis社製）を含むP B S緩衝液を使用した他は、比較例6と同一の方法で測定を行った。測定結果を表3に示した。

[0113] [表3]

	検体 番号	IgM 濃度 mg/dL	参考例2	実施例2	比較例6
			CLEIA法	LTIA法	LTIA法
			-	IgM BRAZOR 添加	PBS 緩衝液 添加
対照検体	4	76	1520	1464	1462
乖離検体	5	71	306	408	556
	6	532	591	830	905

[0114] 参考例2、実施例2及び比較例6の結果からIgM特異的分解酵素の非特異反応抑制効果について考察を行った。

(1) 対照検体（検体4）の測定結果について検証を行った。

対照検体では、参考例2と、実施例2と、比較例6の測定値は概ね同等であった。本結果より、IgMBRAZORの添加は、非特異反応を呈しない検体の測定値に対して影響を与えないことが明らかになった。

(2) 乖離検体（検体5、6）の測定結果について検証を行った。

検体5の測定値は、参考例2が306U/mLであった。比較例6は556U/mLとなり、参考例2の測定値に対して乖離した。一方、実施例2の測定値は408U/mLとなり、参考例2に近づく傾向を示した。

検体6についても同様の傾向が得られた。検体6の測定値は、参考例2が591U/mLであった。比較例6は905U/mLとなり、参考例2の測定値に対して乖離した。一方、実施例2の測定結果は830U/mLとなり、参考例2に近づく傾向を示した。

以上より、免疫学的測定方法において、IgM特異的分解酵素を用いることにより、試料に由来する非特異反応を抑制することができた。本試験で実施した乖離検体は、抗IgM抗体等の既存の非特異反応抑制剤では十分な抑制効果を得ることができなかつた検体であり、IgM特異的分解酵素を用いた本発明の非特異反応抑制方法によって初めて非特異反応を抑制することができた。

## 請求の範囲

- [請求項1] 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法において、イムノグロブリンMを特異的に分解する酵素の存在下で少なくとも1回以上抗原抗体反応を行う、免疫学的測定方法。
- [請求項2] 前記酵素がプロテアーゼである、請求項1に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項3] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、請求項2に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項4] 前記酵素が、 $CH\mu 1$ から $CH\mu 4$ を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、請求項1または2に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項5] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMを $F(a b')_2$ 断片とFc断片に分解する酵素である、請求項1または2に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項6] 前記免疫学的測定方法がラテックス免疫比濁法である、請求項1または2に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項7] 前記免疫学的測定方法において、前記測定対象物質が抗原又は抗体である、請求項6に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項8] 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法に使用される試薬であって、  
IgMを特異的に分解する酵素を含む、免疫学的測定用試薬。
- [請求項9] 前記酵素がプロテアーゼである、請求項8に記載の免疫学的測定用試薬。
- [請求項10] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、請求項9に記載の免疫学的測定用試薬。
- [請求項11] 前記酵素が、 $CH\mu 1$ から $CH\mu 4$ を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、請求項8または9に記載の免疫学的測定用試薬。
- [請求項12] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMを $F(a b')_2$ 断片とFc断片に分解する酵素である、請求項8または9に記載

の免疫学的測定用試薬。

- [請求項13] 前記免疫学的測定用試薬はラテックス免疫比濁法で用いるための試薬である、請求項8または9に記載の免疫学的測定用試薬。
- [請求項14] 前記免疫学的測定方法において、前記測定対象物質が抗原又は抗体である、請求項13に記載の免疫学的測定用試薬。
- [請求項15] IgMを特異的に分解する酵素を含む、免疫学的測定用検体前処理液。
- [請求項16] 前記酵素がプロテアーゼである、請求項15に記載の免疫学的測定用検体前処理液。
- [請求項17] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、請求項16に記載の免疫学的測定用検体前処理液。
- [請求項18] 前記酵素が、CH $\mu$ 1からCH $\mu$ 4を含むIgM定常領域の一部を切断する酵素である、請求項15または16に記載の免疫学的測定用検体前処理液。
- [請求項19] 前記酵素が、前記試料中のIgMに作用し、前記IgMをF(a b')<sub>2</sub>断片とFc断片に分解する酵素である、請求項15または16に記載の免疫学的測定用検体前処理液。
- [請求項20] 前記免疫学的測定用検体前処理液はラテックス免疫比濁法で用いるための薬液である、請求項15または16に記載の免疫学的測定用検体前処理液。
- [請求項21] 試料中の測定対象物質を測定する免疫学的測定方法に使用される試薬キットであって、IgMを特異的に分解する酵素を含む、免疫学的測定用試薬キット。
- [請求項22] 前記酵素がプロテアーゼである、請求項21に記載の免疫学的測定用試薬キット。
- [請求項23] 前記プロテアーゼがプロテイナーゼまたはペプチダーゼである、請求項22に記載の免疫学的測定用試薬キット。
- [請求項24] 前記酵素が、CH $\mu$ 1からCH $\mu$ 4を含むIgM定常領域の一部を切

断する酵素である、請求項 21 または 22 に記載の免疫学的測定用試薬キット。

[請求項25] 前記酵素が、前記試料中の I g M に作用し、前記 I g M を F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片と F c 断片に分解する酵素である、請求項 21 または 22 に記載の免疫学的測定用試薬キット。

[請求項26] I g M を特異的に分解する酵素を含む、非特異反応抑制剤。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/030136

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/531</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/543</i> (2006.01)i FI: G01N33/531 B; G01N33/543 581J		
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) G01N33/531; G01N33/543		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<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	JP 2001-255325 A (INTERNATL REAGENTS CORP.) 21 September 2001 (2001-09-21) paragraph [0004]	1-26
Y	JP 2-21548 B2 (INTAANASHONARU INST O SERYURA ANDO MOREKYURA PASUOROJI) 15 May 1990 (1990-05-15) page 3, left column, line 28 - page 4, right column, line 4, page 5, right column, lines 4-41	1-26
Y	JP 2019-506866 A (GENOVIS AB) 14 March 2019 (2019-03-14) paragraph [0008]	1-26
Y	SEELE Jana, Identification of a novel host-specific IgM protease in Streptococcus suis, J. Bacteriol., 14 December 2012, vol. 195, no. 5, pages 930-940 Abstract	1-26
A	JP 2006-112834 A (ABBOTT JAPAN CO., LTD.) 27 April 2006 (2006-04-27) paragraph [0031]	1-26
<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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>29 October 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 November 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/030136

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/118844 A1 (ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS KABUSHIKI KAISHA) 15 August 2013 (2013-08-15) paragraphs [0002], [0006], [0036], [0055], claims	1-26
A	WO 2018/203572 A1 (TANAKA KIKINZOKU KOGYO KK) 08 November 2018 (2018-11-08) abstract, paragraphs [0016], [0017]	1-26
A	JP 58-146855 A (INTANASHIYONARU INST OBU SERIYURA ANDO MOREKIYURA PASUOROJI) 01 September 1983 (1983-09-01) page 3, lower left column, line 15 - page 4, lower left column, line 7	1-26
A	JP 2010-19689 A (HOYA CORPORATION) 28 January 2010 (2010-01-28) abstract	1-26
A	WO 2009/025364 A1 (MITSUBISHI KAGAKU IATRON, INC.) 26 February 2009 (2009-02-26) claims	1-26
A	JP 3602135 B2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 15 December 2004 (2004-12-15) claims	1-26
A	JP 11-511255 A (ABBOTT LABORATORIES) 28 September 1999 (1999-09-28) claim 1	1-26
A	CN 108267580 A (NANJING TZONEECHO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 10 July 2018 (2018-07-10) abstract	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/030136

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

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

International application No.

**PCT/JP2024/030136**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2001-255325 A	21 September 2001	(Family: none)	
JP 2-21548 B2	15 May 1990	US 4455381 A column 1, line 44 - column 5, line 15 EP 51985 A2	
JP 2019-506866 A	14 March 2019	WO 2017/134274 A1 page 2, lines 16-23 JP 2022-115853 A US 2019/0345533 A1 EP 3411389 A1 KR 10-2018-0124857 A CN 109311951 A	
JP 2006-112834 A	27 April 2006	(Family: none)	
WO 2013/118844 A1	15 August 2013	(Family: none)	
WO 2018/203572 A1	08 November 2018	US 2020/0057055 A1 abstract, paragraphs [0018], [0019]	
JP 58-146855 A	01 September 1983	EP 83869 A1 page 5, line 15 - page 6, line 26 US 4946796 A	
JP 2010-19689 A	28 January 2010	(Family: none)	
WO 2009/025364 A1	26 February 2009	EP 2184608 A1 claims US 2011/0189704 A1 US 2015/0050666 A1 KR 10-2010-0076951 A	
JP 3602135 B2	15 December 2004	WO 1996/014337 A1 claims US 5804391 A US 5965378 A WO 1996/014338 A1 EP 782585 A1 EP 789714 A1 KR 10-1997-0707157 A	
JP 11-511255 A	28 September 1999	WO 1997/007401 A1 claim 1 US 5698393 A EP 846268 A1	
CN 108267580 A	10 July 2018	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/531(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i FI: G01N33/531 B; G01N33/543 581J		
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）） G01N33/531; G01N33/543 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 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024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）		
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	JP 2001-255325 A (国際試薬株式会社) 21.09.2001 (2001 - 09 - 21) [0004]	1-26
Y	JP 2-21548 B2 (インタナショナル, インスティテュート, オヴ, セリユラ, アン ド, モレキュラ, パスオロジ) 15.05.1990 (1990 - 05 - 15) 3 ページ左欄 2 8 行 - 4 ページ右欄 4 行, 5 ページ右欄 4 行 - 4 1 行	1-26
Y	JP 2019-506866 A (ジェノビス エービー) 14.03.2019 (2019 - 03 - 14) [0008]	1-26
Y	SEELE Jana, Identification of a novel host-specific IgM protease in Streptococcus suis, J. Bacteriol., 2012.12.14, Vol.195 No.5, Page.930-940 Abstract	1-26
A	JP 2006-112834 A (アポットジャパン株式会社) 27.04.2006 (2006 - 04 - 27) [0031]	1-26
<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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵 触するものではなく、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	29. 10. 2024	国際調査報告の発送日 12. 11. 2024
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	権限のある職員（特許庁審査官）  三木 隆 2J 3312  電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
A	WO 2013/118844 A1 (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社) 15.08.2013 (2013 - 08 - 15) [0002][0006][0036][0055]請求の範囲	1-26
A	WO 2018/203572 A1 (田中貴金属工業株式会社) 08.11.2018 (2018 - 11 - 08) [要約][0016][0017]	1-26
A	JP 58-146855 A (インタナショナル・インステイテユート・オヴ・セリユラ・アン ド・モレキユラ・パスオロジ) 01.09.1983 (1983 - 09 - 01) 3 ページ左下欄 15 行 - 4 ページ左下欄 7 行	1-26
A	JP 2010-19689 A (HOYA株式会社) 28.01.2010 (2010 - 01 - 28) [要約]	1-26
A	WO 2009/025364 A1 (三菱化学メディエンス株式会社) 26.02.2009 (2009 - 02 - 26) [特許請求の範囲]	1-26
A	JP 3602135 B2 (ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー) 15.12.2004 (2004 - 12 - 15) [特許請求の範囲]	1-26
A	JP 11-511255 A (アボット・ラボラトリーズ) 28.09.1999 (1999 - 09 - 28) [請求項1]	1-26
A	CN 108267580 A (NANJING TZONEECHO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 10.07.2018 (2018 - 07 - 10) 摘要	1-26

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
  - a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
  - b.  国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）  
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2.  この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

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/JP2024/030136

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2001-255325 A	21.09.2001	(ファミリーなし)	
JP 2-21548 B2	15.05.1990	US 4455381 A 1 欄 4 行 - 5 欄 1 5 行 EP 51985 A2	
JP 2019-506866 A	14.03.2019	WO 2017/134274 A1 2 ページ 1 6 行 - 2 3 行 JP 2022-115853 A US 2019/0345533 A1 EP 3411389 A1 KR 10-2018-0124857 A CN 109311951 A	
JP 2006-112834 A	27.04.2006	(ファミリーなし)	
WO 2013/118844 A1	15.08.2013	(ファミリーなし)	
WO 2018/203572 A1	08.11.2018	US 2020/0057055 A1 ABSTRACT, [0018][0019]	
JP 58-146855 A	01.09.1983	EP 83869 A1 5 ページ 1 5 行 - 6 ページ 2 6 行 US 4946796 A	
JP 2010-19689 A	28.01.2010	(ファミリーなし)	
WO 2009/025364 A1	26.02.2009	EP 2184608 A1 Claims US 2011/0189704 A1 US 2015/0050666 A1 KR 10-2010-0076951 A	
JP 3602135 B2	15.12.2004	WO 1996/014337 A1 Claims US 5804391 A US 5965378 A WO 1996/014338 A1 EP 782585 A1 EP 789714 A1 KR 10-1997-0707157 A	
JP 11-511255 A	28.09.1999	WO 1997/007401 A1 Claim1 US 5698393 A EP 846268 A1	
CN 108267580 A	10.07.2018	(ファミリーなし)	