

(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
2023年4月27日(27.04.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/068249 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/038705

(22) 国際出願日: 2022年10月18日(18.10.2022)

(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:
特願 2021-171929 2021年10月20日(20.10.2021) JP

(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: 清水 知 (SHIMIZU Tomo); 〒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). 浅井 智英 (ASAI Tomohide); 〒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: 弁理士法人 もえぎ特許事務所 (MOEGI PATENT ATTORNEYS); 〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目12番3号 K a n a l P l a t z 7階 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, 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, 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:** MEASURING REAGENT FOR CROSS-LINKED N-TELOPEPTIDE OF TYPE I COLLAGEN, PREPARATION METHOD THEREOF, AND IMMUNOASSAY METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬、その調製方法、及びそれを用いた免疫測定方法

(57) **Abstract:** A measuring reagent for cross-linked N-telopeptide of type I collagen containing uric acid or a salt thereof. According to this measuring reagent, the operation is simple and NTx can be accurately measured.

(57) 要約: 尿酸又はその塩を含む、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬。この測定試薬は、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる。



WO 2023/068249 A1

明 細 書

発明の名称：

I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドの測定試薬、その調製方法、及びそれを用いた免疫測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドの測定試薬及びそれを用いた免疫測定方法に関する。本発明は、I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドの測定試薬の調製方法にも関する。

背景技術

[0002] I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (cross-linked N-telopeptide of type I collagen) (以後、NTx と称することがある) は、骨由来 I 型コラーゲン分解産物である。I 型コラーゲンが、骨吸収の過程で Cat K により消化されることにより、NTx が産生される。産生された後、NTx は、血液及び／又は尿中に排出される。

[0003] NTx は、骨吸収の亢進により高値を示す。したがって、NTx は、骨の吸収を直接に反映する指標となる。NTx は、この特性により、骨粗鬆症の診断又は治療効果判定のマーカーとして利用されている。

[0004] 特許文献 1 には、尿中の NTx を測定することにより、骨吸収の速度を測定することが記載されている。特許文献 2 には、NTx に結合するモノクローナル抗体 1H11 が記載されている。また、特許文献 2 には、モノクローナル抗体 1H11 が認識するエピトープについて記載されている。

モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による NTx の測定キットも販売されている (非特許文献 1)。しかしながら、より、操作が簡便であり、精度よく測定できる、NTx の測定試薬が望まれていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献 1：特表平 3-500818 号公報

特許文献2：特表平11-505804号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：「I型コラーゲン架橋N-テロペプチドキット オステオマーク（登録商標）」（アボット ダイアグノスティクス メディカル株式会社）体外診断用医薬品の添付文書

非特許文献2：J. Bone Miner. Res 1992, 7 (11), 1251~1258 A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる、NTxの測定試薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 非特許文献1に記載の測定キットでは、尿検体がNTxを測定上限を超える高濃度で含む場合に、NTx濃度が既知の尿で尿検体を希釈して測定する。その際、希釈用の尿に含まれるNTx量を、測定結果から除算又は減算する必要がある。本発明者がNTx濃度が既知の尿で尿検体を希釈して検体中のNTxの濃度を測定したところ、NTx測定の際に測定系に存在する尿酸の量が、NTxの測定値に影響することが明らかとなった（比較例1）。希釈用の尿中の尿酸濃度は様々であるため、これらの尿検体又は希釈用の尿に含まれる尿酸の量によりNTxの測定値が影響され、NTxの正確な測定ができない場合があった。

本発明者らは鋭意検討し、尿酸又はその塩を含む、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬を用いることで、操作が簡便であり、NTxを精

度よく測定できる免疫測定が可能であることを見出して、本発明を完成するに至った。

具体的に、本発明は以下のとおりである。

<1> 尿酸又はその塩を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬。

<2> 免疫測定用の試薬であり、液状である、<1>に記載の測定試薬。

<3> 尿中のⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドを測定するための測定試薬である、<1>又は<2>に記載の試薬。

<4> 検体希釈液、抗体希釈液、又は粒子懸濁液である、<1>～<3>のいずれかに記載の測定試薬。

<5> 尿酸又はその塩の濃度が、測定試薬基準で、0.001～10質量%である、<1>～<4>のいずれかに記載の測定試薬。

<6> 緩衝液をさらに含む、<1>～<5>のいずれかに記載の測定試薬。

<7> 生体試料と、尿酸若しくはその塩、又はこれらを含む試薬とを接触させる工程

を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。

<8> 接触させる工程が、生体試料と、尿酸又はその塩を含む試薬とを接触させる工程である、<7>に記載の免疫測定方法。

<9> 生体試料が、尿である、<7>又は<8>に記載の免疫測定方法。

<10> 生体試料とⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドと結合する抗体又はその抗体断片とを接触させる工程と

前記抗体又は抗体断片に間接的又は直接的に結合している標識物質に由来するシグナルを測定する工程と

をさらに含む、<7>～<9>のいずれかに記載の免疫測定方法。

<11> 抗体抗原反応時の、尿酸の濃度が、0.0001～1質量%である、<7>～<10>のいずれかに記載の免疫測定方法。

<12> 前記シグナル、又はシグナルに基づくⅠ型コラーゲン架橋N-テ

ロペプチドの測定値から、生体試料以外に由来するⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの量を除算又は減算する工程を含まない、＜7＞～＜11＞のいずれかに記載のⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。

＜13＞ 尿酸又はその塩を溶媒に添加すること

を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬の調製方法。

＜14＞ 溶媒が緩衝液である、＜13＞に記載のⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬の調製方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる、NTxの測定試薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] NTxの化学構造を示す図である。

[図2]尿で希釈した生体試料を用いて希釈測定を行った際の、ECLA測定値と、オステオマーク測定値との相関性を示すグラフである。

[図3]尿酸で希釈した生体試料を用いて希釈測定を行った際の、ECLA測定値と、オステオマーク測定値との相関性を示すグラフである。

[図4]オステオマーク測定において、尿希釈時と尿酸希釈液希釈時との測定値を比較した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、発明の態様 (aspect) に分けて説明をしているが、それぞれの態様に記載の事項、語句の定義、及び実施形態は、他の態様においても適用可能である。

[0012] 1. Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬

(Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTx))

NTxは、骨由来Ⅰ型コラーゲン分解産物である。Ⅰ型コラーゲンが、骨吸収の過程でCat Kにより消化されることにより、NTxが産生される。産生された後、NTxは、血液及び／又は尿中に排出される。

NTxは、骨吸収の亢進により高値を示す。したがって、NTxは、骨の

吸収を直接に反映する指標となる。NTxは、この特性により、骨粗鬆症の診断又は治療効果判定のマーカーとして利用されている。

また、骨粗鬆症の診断又は治療効果判定以外にも、NTxは、以下のような目的で測定される。

- ・ 原発性副甲状腺機能亢進症の手術適応の決定
- ・ 副甲状腺機能亢進症手術後の治療効果判定
- ・ 悪性腫瘍の骨転移の指標及び骨転移病巣の進行度の指標

なお、本発明の測定試薬は、上記の目的で測定されるものに限定されるものではない。

[0013] NTxは、図1に示される構造を有する。NTxでは、ピリジニウム架橋構造に α 1鎖と α 2鎖が結合している。

[0014] (尿酸又はその塩)

本発明の測定試薬は、尿酸を含む。尿酸とは、分子式 $C_5H_4N_4O_3$ (CAS RN 69-93-2) で表される有機化合物である。本発明では、溶液中で電離して尿酸を生成し且つ本発明の効果が得られる限りにおいて、尿酸の塩、例えば、尿酸水素ナトリウム、尿酸水素カリウム、尿酸二ナトリウム、尿酸二カリウム、及び尿酸カルシウム等を使用することもできる。

[0015] 本発明の測定試薬において、尿酸又はその塩の濃度は、抗原抗体反応時に所望の濃度となるように適宜調整することができるが、測定試薬基準で、例えば0.001～10質量%、好ましくは0.01～5質量%、より好ましくは0.02～2質量%、さらに好ましくは0.05～1質量%である。尿酸の塩を使用する場合は、上記濃度は、カリウムやナトリウム等の部分を除外した、尿酸の部分の濃度を意味する。

本明細書において、尿酸の量は、尿酸酸化酵素であるウリカーゼを用いた「酵素法」により測定することができる。

[0016] (生体試料)

本明細書におけるI型コラーゲン架橋N-テロペプチドを含む「生体試料」としては、主に生体由来の固形組織及び体液を挙げることができる。

生体試料としては、体液が好ましい、体液としては、血液、血清、血漿、尿、涙液、耳漏、前立腺液、又は呼吸器分泌液が挙げられる。生体試料としては、尿又は血清がより好ましく、尿がさらに好ましい。

生体試料を採取する対象は、ヒト又は動物（例えば、サル、イヌ、又はネコ）を含み、好ましくはヒトである。生体試料は、対象からの生体試料そのものであってもよく、採取した生体試料に通常行われる希釈、濃縮等の処理を行ったものであってもよい。なお、生体試料の採取や調製を行う者は、免疫測定を行う者と同一人物でもよく、別人物であってもよい。また、生体試料は、免疫測定の実施時に採取又は調製されたものでもよく、予め採取又は調製され保存されたものであってもよい。

生体試料は、骨吸収亢進を生じる代謝性疾患、例えば、骨粗鬆症、原発性副甲状腺機能亢進症、又は骨転移の疑いのある悪性腫瘍（特に、乳癌、肺癌、若しくは前立腺癌）を罹患する対象から採取された生体試料であることができる。

[0017] （緩衝液）

本明細書において、「緩衝液」は、pHの緩衝作用を有する溶液を意味する。

本発明において用いられる緩衝液は、以下に限定されるものではないが、例えば、P B S (phosphate buffered saline)、M E S (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)、P I P E S (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)、A C E S (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid)、A D A (N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid)、B i s—T r i s (2,2-Bis(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)-methane)、T r i s (tris(hydroxymethyl)aminomethane)、M O P S (3-Morpholinopropanesulfonic acid)、H E P E S (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)、クエン酸緩衝液、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液又はリン酸緩衝液などの公知の緩衝液を適宜用いることができる。

本発明において用いられる緩衝液は、好ましくはH E P E Sである。

[0018] 緩衝液の濃度は、本発明の効果が得られる限りは特に限定されないが、たとえば、1～500mM、5～400mM、10～300mM、又は15～100mMである。

本発明の測定試薬において、緩衝液の含有量は、測定試薬に対して、例えば90質量%以上、92質量%以上、95質量%以上、97質量%以上、又は99質量%以上であることができる。

[0019] (測定試薬)

本明細書において、「測定試薬」とは、NTxの測定のために使用される試薬を意味する。測定試薬は、検体希釈液、粒子懸濁液、抗体希釈液、キャリアブレーター、校正試料、及びコントロール溶液等を含む。測定試薬は、検体希釈液、又は粒子懸濁液であることが好ましい。検体希釈液とは、生体試料を希釈するために生体試料に添加される試薬を意味する。抗体希釈液とは、抗体を希釈するための試薬を意味する。検体希釈液及び抗体希釈液は、検体又は抗体の一方にのみ使用されるものでもよく、両方に使用されるものでもよい。粒子懸濁液とは、磁性粒子又はラテックス粒子などの粒子を測定に使用する場合に、これらの粒子を懸濁させて保存しておくための試薬を意味する。

本発明の測定試薬のpHは、例えば、4.0～11.0、5.0～10.0、6.0～9.5、又は6.4～8.6である。pHの調整は、当業者に周知のpH調整用試薬、例えば水酸化ナトリウム又は塩酸などを用いて行うことができる。

[0020] 本発明の測定試薬には、生体試料を希釈するための尿そのもの及び希釈した尿は含まれない。尿に尿酸又はその塩を添加して、尿酸の含有量を調整したものは、本発明の範囲内である。

本発明の測定試薬中のNTxの含有量は、好ましくは100ng/mL以下、より好ましくは50ng/mL以下、さらに好ましくは10ng/mL以下、さらに好ましくは5ng/mL以下、さらに好ましくは1ng/mL以下、さらに好ましくは0.1ng/mL以下であり、最も好ましくは、N

T_xを含まない。

[0021] 本発明の測定試薬は、任意の形態であることができるが、好ましくは液状である。本発明の測定試薬は、免疫測定用の試薬であることが好ましい。

尿酸又はその塩は、販売時に、測定試薬に含まれていることが好ましい。しかしながら、尿酸又はその塩が、測定試薬とは別容器で含まれており、測定を行う者が、尿酸又はその塩を測定試薬に添加してもよい。

本発明の測定試薬は、溶媒例えば緩衝液に、尿酸又はその塩を添加することにより、調製することができる。

[0022] (保存容器)

本発明の測定試薬は、好ましくは、保存容器に充填されている。保存容器の材質は、本発明の効果を得ることができ、そして密封ができれば特に限定されない。

[0023] I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法

「免疫測定方法」とは、抗原と抗体の反応を利用して、生体試料の中に含まれる物質のレベルを測定する方法である。「レベル」とは、物質の量、濃度、又は存在若しくは不存在の確認等を含む。

免疫測定方法としては、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、ラテックス免疫比濁法（LTA法）、化学発光免疫測定法、イムノクロマトグラフィー、及び蛍光抗体法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明において、免疫測定方法は、好ましくは、ELISA、又はECLIAである。本発明において、免疫測定方法は、インビボ又はインビトロの免疫測定方法であることができる。また、感度を増強するために、増感剤を使用することもできる。

[0024] 本発明の免疫測定方法において、抗体としてモノクローナル抗体を用いる場合、例えば、後述の競合法を採用して、モノクローナル抗体を1種のみ用いて、NT_xの免疫測定をすることが好ましい。モノクローナル抗体を2種用いる場合は、2種類のモノクローナル抗体は、異なるエピトープを認識することが好ましい。「異なるエピトープを認識する」とは、エピトープとし

て認識するアミノ酸配列が重複しないことを意味する。エピトープが複数ある場合、この複数のエピトープの1つがもう一方の抗体の複数のエピトープのうちの1つと異なればよい。例えば、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体と、N T xの他の構造に結合する抗体との2種類を用いてサンドイッチ系を構築することができる。

[0025]（抗体）

本発明の免疫測定方法では、抗体として、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いることができる。モノクローナル抗体を用いることが好ましい。抗体の機能を有する抗体断片を使用することもできる。抗体としては、N T xに結合する抗体を、際限なく使用することができるが、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体を用いることが好ましく、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片に加えてQ Y D G K（C）G V G（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体を用いることがより好ましい。「Q Y D G K（C）G V G」中の（C）は、Kの側鎖に結合している。すなわち、「（C）」と「G V G」中の1つ目の「G」は、いずれもKに結合している。

[0026]（標識物質）

抗体には、標識物質が結合していることが好ましい。標識物質が発するシグナルの強さを測定して、生体試料中のN T xの量を測定することができる。標識物質は、抗体に直接結合していてもよく、二次抗体を介して間接的に結合していてもよい。以後、標識物質が結合している抗体を、標識抗体と呼ぶことがある。標識抗体を調製するための標識物質としては、例えば金属錯体、酵素、不溶性粒子、蛍光物質、化学発光物質、電気化学発光物質（例えば、ルテニウム錯体等）、ビオチン、アビジン、放射性同位体、金コロイド粒子、又は着色ラテックスが挙げられる。

本発明の免疫測定方法においては、標識物質として、電気化学発光物質を

用いることが好ましく、ルテニウム錯体を使用することがより好ましい。また、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）又はアルカリホスファターゼ（ALP）などの酵素を標識物質として用いる場合には、その酵素の特異的基質を用いて生体試料中のNTxの濃度を測定することができる。酵素がHRPの場合には、基質として例えばO-フェニレンジアミン（OPD）あるいは3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を用いることができ、ALPの場合には基質としてp-ニトロフェニル・ホスフェートなどを用いることができる。

[0027] 本明細書において、抗原や抗体を固相に物理的あるいは化学的に担持させることあるいは担持させた状態を「固定化」又は「固相化」と表現することがある。また、「分析」、「検出」、又は「測定」という用語は、NTxの存在の確認及びNTxの定量を含む。

固相に抗原を固定化する場合、抗原は、抗体と結合する限り特に限定されない。抗原は、例えば、NTx、NTxの α 鎖、又はJYDGKGVG（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片であることができる。

[0028] 固相としては、ポリスチレン樹脂などの高分子基材、ガラスなどの無機基材、又はセルロースやアガロースなどの多糖類基材などからなる固相を用いることができる。固相の形状は特に限定されず、板状（例えば、マイクロプレートやメンブレン）、ビーズ若しくは粒子状（例えば、ラテックス粒子、磁性粒子）、又は筒状（例えば、試験管）など任意の形状を選択できる。

[0029] 本明細書において、抗体又はその抗体断片が特定の物質又はアミノ酸配列と「反応する」、「認識する」、及び「結合する」は、同義で用いられる。抗体が抗原（化合物）と「反応する」か否かの確認は、抗原固相化ELISA、競合ELISA、又はサンドイッチELISAなどにより行うことができる。その他、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）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。

る、装置、センサー、又は試薬類を使用して行うことができる。

[0030] 例えば、後述する調製例1のスクリーニング方法（抗原固相化ELISA）と同様の操作をした場合に、ペプチド断片を添加していないネガティブコントロールと比較して、有意に吸光度が上昇したペプチド断片を、抗体とペプチド断片とが結合したと評価することができる。

測定系における本発明の抗体の濃度は、免疫測定方法又は生体試料の種類等に応じて適宜調整することができるが、例えば、 $0.1 \text{ ng/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ であることができる。

[0031] （生体試料と、尿酸若しくはその塩、又はこれらを含む試薬とを接触させる工程）

「接触」とは、物理的に接触することを意味し、その手段は限定されない。例えば、生体試料を含む測定系に尿酸又はその塩を直接添加してもよく、尿酸又はその塩を含む試薬を測定系に添加してもよい。なお、測定系への、生体試料、尿酸若しくはその塩、又はこれらを含む試薬、及びNTxと結合する抗体又はその抗体断片の添加順序は、本発明の効果が得られる限りにおいて、限定されることはない。尿酸の存在下で、生体試料に含まれるNTxとNTxと結合する抗体又はその抗体断片とが抗体抗原反応を行うことにより、本発明の効果をを得ることができる。

生体試料と、尿酸若しくはその塩、又はこれらを含む試薬とを接触させる工程には、生体試料と、尿又はその希釈液とを接触させる工程は、含まれない。

[0032] 抗体抗原反応時の、尿酸の濃度は、本発明の効果が得られる限り限定されないが、例えば $0.0001 \sim 1$ 質量%、好ましくは $0.0005 \sim 0.5$ 質量%、より好ましくは $0.001 \sim 0.2$ 質量%、さらに好ましくは $0.002 \sim 0.1$ 質量%である。

[0033] 本発明の免疫測定方法は、シグナル、又はシグナルに基づくNTxの測定値から、生体試料以外に由来するNTxの量を除算又は減算する工程を含まないことが好ましい。本発明の免疫測定方法に含まれないことが好ましい前

記除算又は減算する工程とは、得られたシグナルに対して除算又は減算する工程、及び得られた測定値に対して除算又は減算する工程である。

[0034] 従来の、検体を尿で希釈するNTxの測定方法では、希釈用の尿に含まれるNTxの量を、測定により得られた値から除算又は減算する必要があった。本発明の免疫測定方法では、測定により得られた値から除算又は減算する工程を有しなくともNTxの量の正確な測定が可能である。ただし、このような除算又は減算する工程が、本発明の免疫測定方法に含まれることを除外するものではない。

[0035] 以下、免疫測定方法として、競合ELISA及び競合ECLAを例示して、測定の手順及び原理を説明する。下記は本発明の一実施形態における測定の手順及び原理を単に例示するものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。また、下記の免疫測定方法の各々において、抗体の固相への固定化の方法、抗体と標識物質との結合方法、及び標識物質の種類等の具体的な方法は、前述のものを含め、当業者に周知の方法を制限なく使用することができる。

[0036] 本発明の免疫測定方法としては、以下のような工程(1)～(3)を含む、競合法である競合ELISAを挙げることができる。工程(1)～(3)を行う順序は限定されない。

(1) 分析する生体試料を、固相結合用NTx又はそのペプチド断片を固定したマイクロプレートに添加する。生体試料は、予め尿酸を含む検体希釈液で希釈されている

(2) 酵素で標識したNTx又はそのペプチド断片に結合する抗体をマイクロプレートに添加する

(3) 前記酵素の基質を添加して、酵素反応に由来するシグナルを測定する。

生体試料中にNTxが存在し、生体試料中のNTxとNTx又はそのペプチド断片に結合する抗体との反応と、固相に固定したNTx又はそのペプチド断片とNTx又はそのペプチド断片に結合する抗体との反応との間で競合

が生じると、シグナルの強度が低下する。また、抗体を酵素に替えてビオチンで標識することもできる。その場合、ビオチンに酵素で標識したスト렙トアビジンを結合させることができる。そして、基質としてOPDを添加することにより生じる発色シグナルを測定することができる。

[0037] 競合ELISAにおいて、二次抗体を用いることもできる。本明細書において、二次抗体とは、NTxに結合する抗体を特異的に認識する抗体である。二次抗体を用いる場合、以下の手順（１）～（５）を採用することができる。

（１）分析する生体試料を、固相結合用NTx又はそのペプチド断片を固定化したマイクロプレートに添加する。生体試料は、予め尿酸を含む検体希釈液で希釈されている

（２）NTx又はそのペプチド断片に結合する抗体をマイクロプレートに添加する

（３）さらに酵素標識した二次抗体を添加する

（４）基質を加えて発色させる

（５）プレートリーダー等を用いて、前記基質のシグナルを測定する。

[0038] 電気化学発光免疫測定法（ECLA）とは、通電により標識物質を発光させ、その発光量を検出することで被検出物質の量を測定する方法を意味する。電気化学発光免疫測定法では、標識物質として、ルテニウム錯体を用いることができる。固相（マイクロプレート等）に電極を設置してこの電極上でラジカルを発生させることによりルテニウム錯体を励起状態にして発光させる。そして、このルテニウム錯体の発光量を検出することができる。

本発明の免疫測定方法としては、以下のような工程（１）～（３）を含む、競合法である競合ECLAを挙げることができる。工程（１）～（３）を行う順序は限定されない。

（１）分析する生体試料を、固相結合用NTx又はペプチド断片を固定した磁性粒子を含む測定系に添加する。生体試料は、予め尿酸を含む検体希釈液で希釈されている

(2) 電気化学発光物質、好ましくはルテニウム錯体で標識した、NTx又はそのペプチド断片に結合する抗体を測定系に添加する

(3) 発光標識に由来する発光の強度を計測する。

生体試料中にNTxが存在し、生体試料中のNTxとNTx又はそのペプチド断片に結合する抗体との反応と、磁性粒子に固定した固相結合用NTx又はペプチド断片とNTx又はそのペプチド断片に結合する抗体との反応との間で競合が生じると、発光強度が低下する。

[0039] 本発明の免疫測定方法では、異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を用いることが好ましい。なお、便宜上、一方のモノクローナル抗体を第一モノクローナル抗体と称し、他方のモノクローナル抗体を第二モノクローナル抗体と称することがある。

第一モノクローナル抗体が標識抗体であり、第二モノクローナル抗体が固相抗体である場合、本発明の免疫測定方法では、以下の工程(1)～(3)を含むことができる。

(1) 生体試料と標識物質に結合している第一モノクローナル抗体とを接触させ、第一複合体(生体試料中のNTx又はそのペプチド断片、標識物質、及び第一モノクローナル抗体を含む)を形成する工程と、

(2) 前記第一複合体と、第二モノクローナル抗体とを接触させ、第二複合体(生体試料中のNTx又はそのペプチド断片、標識物質、第一モノクローナル抗体、及び第二モノクローナル抗体を含む)を形成する工程と、

(3) 標識物質に由来するシグナルを測定する工程。

第二複合体には、標識物質が含まれている。シグナルの測定は、標識物質に応じて、当業者に周知の測定方法を採用することができる。シグナルの測定は、測定機器を用いて行ってもよく、目視により行ってもよい。

[0040] 本発明の免疫測定方法は、必要に応じて、以下の工程を含むこともできる。

- ・ 生体試料の前処理工程、
- ・ 固相結合用NTx又はペプチド断片を固相に固定化させる工程、

- ・固相結合用 N T x 又はペプチド断片に結合していない抗体、及び生体試料を洗浄して除去する B / F 洗浄工程、
- ・既知濃度の N T x 含有試料を測定した際の発光強度に基づいて、計測した発光強度から生体試料中の N T x 濃度を算出する工程、及び／又は
- ・算出した生体試料中の N T x 濃度を第一閾値と比較する比較工程。

[0041] 前処理としては、生体試料のろ過、及び検体希釈液による生体試料の希釈などが挙げられる。

[0042] 第一閾値は、感度、生体試料等の種類、及び N T x の測定の目的を考慮して、適宜設定することができる。第一閾値は、生体試料が尿である場合、測定の目的に応じて、以下の値を採用できる。

- ・副甲状腺摘出術の適応：200 nM BCE / mM · Cre 以上
- ・悪性腫瘍（乳癌、肺癌、前立腺癌）の骨転移の指標：100 nM BCE / mM · Cre 以上
- ・骨吸収亢進の指標：55 nM BCE / mM · Cre 以上
- ・骨粗鬆症薬剤治療の指標（骨折高リスクの指標）：54.3 nM BCE / mM · Cre 超
- ・骨粗鬆症薬剤治療の指標（骨量減少高リスクの指標）：35.3 nM BCE / mM · Cre 以上。

[0043] 第一閾値は範囲であってもよい。「第一閾値が範囲である」とは、示される範囲の間に、具体的な閾値が存在し、測定値がその具体的な閾値より大きい又は小さいか判定することにより疾患の有無等を判断することを意味する。

第一閾値が範囲である場合、第一閾値は、1.0 ~ 300 nM BCE / mM · Cre の間、5.0 ~ 250 nM BCE / mM · Cre の間、又は 7.0 ~ 220 nM BCE / mM · Cre の間に存在することができる。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第一閾値より高い場合は、骨吸収亢進を生じる代謝性疾患、例えば、骨粗鬆症若しくは原発性副甲状腺機能亢進症罹患している、又は、悪性腫瘍（特に、乳癌、肺癌、若しくは

は前立腺癌)を有する対象において、骨転移の疑いがあると判定する工程を含むことができる。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第一閾値より低い場合は、骨吸収亢進を生じる代謝性疾患、例えば、骨粗鬆症若しくは原発性副甲状腺機能亢進症罹患していない、又は、悪性腫瘍（特に、乳癌、肺癌、若しくは前立腺癌）を有する対象において、骨転移の疑いがないと判定する工程を含むことができる。

[0044] 本発明の免疫測定方法により算出した生体試料中のNTx濃度に基づいて、骨粗鬆症を罹患している対象における、特定の医薬の治療効果を判定することができる。この場合、本発明の免疫測定方法は、上記工程に加えて、以下の工程をさらに含むことができる。

- ・対象に、特定の医薬を投与する工程、及び／又は
- ・対象から採取した生体試料中のNTx濃度を第二閾値と比較する工程、

この場合、第二閾値は、免疫測定方法の感度、生体試料等の種類、及びNTxの測定の目的を考慮して、適宜設定することができる。第二閾値は、対象に特定の医薬を投与する前の前記対象におけるNTxの測定値であってもよい。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第二閾値より低い場合は、特定の医薬が骨粗鬆症に対して治療効果があると判定する工程、又はシグナルの強さが第二閾値より高い場合は、特定の医薬が骨粗鬆症に対して治療効果がないと判定する工程、を含むことができる。

前記の治療効果の判定では、数日毎に測定を行い、治療効果をモニタリングしてもよい。

前記特定の医薬としては、例えば、ビスフォスフォネート製剤、抗RANKL抗体（デノスマブ）、カルシウム製剤等が挙げられる。

[0045] 次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に説明のない限り、%は質量%を意味する。

実施例

[0046] 《調製例 1 モノクローナル抗体の調製》免疫原及びスクリーニング用抗原の調製

Imject Maleimide-Activated Ovalbumin (Thermo scientific 社製、CAT No. 77126) を 0.2 mL の精製水で溶解し、10 mg/mL の Maleimide-Activated Ovalbumin 溶液を調製した。2 mg のペプチド QYDGK (C) GVG ((C) は K の側鎖に結合、Nx-2 ペプチド) を 0.2 mL の PBS で溶解し、10 mg/mL のペプチド溶液とした。調整した Maleimide-Activated Ovalbumin 溶液とペプチド溶液とを混合し、室温で 2 時間攪拌した。得られた反応液を PBS で透析し、システインのチオール基を介して Ovalbumin が結合したペプチド (免疫原) を得た。

[0047] 免疫方法

20 μ L の免疫原を Freund' s Complete Adjuvant (Difco Laboratories 社製) と混合し、6 週齢、F344/Jc1 ラットの背部皮下、又はフットパッドに免疫した。2 週間後、20 μ L の免疫原を Freund' s Incomplete Adjuvant (Difco Laboratories 社製) と混合し、前記ラットの背部皮下、又はフットパッドに免疫し、同様の操作を 2 週間毎に継続した。3 回免疫実施以降、十分な抗体力価上昇の確認できた個体に、PBS で希釈した免疫原を腹腔免疫した。腹腔免疫の 1～3 日後に、脾臓細胞、腸骨リンパ節細胞及び鼠頸部リンパ節細胞を回収し、電気融合法によりミエローマ細胞 SP2/0 と融合した。融合細胞は 96 well プレートで培養し、融合から 7 又は 8 日後に培養上清を回収した後、後述する抗原固相化 ELISA によるスクリーニングを実施し、Nx-2 ペプチドに反応した株を選択しクローニングした。

[0048] スクリーニング方法 (抗原固相化 ELISA)

Imject Maleimide-Activated BSA (Thermo scientific社製、CAT No. 77126) を0.2 mLの精製水で溶解し、10 mg/mLのMaleimide-Activated BSA溶液を調製した。2 mgのNx-2ペプチドを0.2 mLのPBSで溶解し、10 mg/mLのペプチド溶液とした。調製したMaleimide-Activated BSA溶液とペプチド溶液を混合し、室温で2時間攪拌した。得られた反応液をPBSで透析し、システインのチオール基を介してBSAが結合したペプチド (Nx-2ペプチド結合BSA) を得た。0.1 μ L/mLの濃度でPBSに溶解したNx-2ペプチド結合BSAを50 μ Lずつ96wellプレートの各ウェルに分注し、室温で2時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、ブロッキング液 (1% BSA-PBST) を100 μ Lずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルからブロッキング液を除去後、培養上清を50 μ Lずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、ブロッキング液で10000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ラットIgG (Fc) ポリクローナル抗体 (Southern Biotech社製) を50 μ Lずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、OPD発色液を50 μ Lずつ各ウェルに分注し、室温で10分間静置した。停止液を50 μ Lずつ各ウェルに添加し、反応を停止した。プレートリーダーで波長492 nmにおける吸光度を測定し、Nx-2ペプチド結合BSAと抗体との反応性を確認した。Nx-2ペプチド及びNTxに反応する3株の抗体を樹立した。樹立した抗体からS88230R抗体を選定し、抗体産生細胞を用いて腹水を作製、プロテインGカラムで腹水を精製して以降の試験に用いた。

[0049] ≪調製例2 S88230R抗体を用いたECLA測定のための各種試薬の調製≫

ビオチン標識Nx7ペプチドの調製

JYDGKGVGのアミノ酸配列から成るペプチド (Nx7ペプチド) 2

mgを100mM PBS pH7.5 1mLに溶解し、Nx7ペプチド溶液を調製した。Ez-Link NHS-PEG12-Biotin (Thermo Scientific社製) 12.7mgを脱水DMF 0.041mLに溶解し、全量をNx7ペプチド溶液に添加した。氷上で3時間攪拌後、逆相クロマトグラフィーで精製し、未反応のビオチン試薬を除去してビオチン標識Nx7ペプチド溶液を得た。

[0050] Nx7ペプチド固相化磁性粒子の調製

30mg/mLのStreptavidin固相磁性粒子100μLをPBSで3回洗浄し、PBSを完全に除去後、3.3μg/mLの濃度でPBSに溶解したビオチン標識Nx7ペプチド溶液600μLを添加し、25℃で2～3時間攪拌した。得られた磁性粒子を磁性粒子保存液(50mM HEPES、1% BSA、150mM NaCl、2mM EDTA・4Na、0.01% Tween20、pH7.2)で3回洗浄後、磁性粒子保存液300μLで磁性粒子を懸濁し、Nx7ペプチド固相化磁性粒子懸濁液を得た。Nx7ペプチド固相化磁性粒子懸濁液を、R2試薬(50mM HEPES、1% BSA、150mM NaCl、2mM EDTA・4Na、0.01% Tween20、pH7.2)で0.05mg/mL濃度に調整しECLIA測定に供した。

[0051] ルテニウム標識S88230R抗体の調製

1mg/mLのS88230R抗体1mLに、10mg/mLのRuthenium (II) Tris(bipyridyl)-NHS Ester (DMSOに溶解) 68μLを添加し室温で30分攪拌後、2mol/Lのグリシン50μLを添加し室温で10分間攪拌した。得られた反応液から、セファデックスG-25を用いて未反応の抗体やルテニウム錯体を除去し、ルテニウム標識S88230R抗体を得た。

[0052] キャリブレーター及び試料の調製

Nx7ペプチドをR1試薬(50mM HEPES、1% BSA、150mM NaCl、2mM EDTA・4Na、0.01% Tween2

0、非特異抑制剤、pH 7.2)で250 ng/mLとなるよう溶解し標準品とした。標準品をR1試薬で1、2、4、8、16、32、64、128倍に希釈した溶液をそれぞれ調製し、キャリブレーターとして用いた。試料としては、原液の尿検体か、任意の溶液で希釈した尿検体を用いた。

[0053] 《分析例1 S88230R抗体を用いたECLIA測定の操作》

ECLIAによるNTxの測定は、ECLIA自動測定装置「ピコルミ11」を用いて実施した。キャリブレーター及び試料を20 µLずつそれぞれ反応管に注入した。R1試薬で0.1 µg/mLの濃度に調整したルテニウム標識S88230R抗体50 µLをそれぞれの反応管に注入し攪拌した。0.05 mg/mLのNx7ペプチド固相化磁性粒子25 µLをそれぞれの反応管に注入し、10.5分間反応させた。反応管内の液を吸引除去し、ピコルミBF洗浄液（積水メディカル（株）製）350 µLで磁性粒子を洗浄した。反応管に発光電解液（積水メディカル（株）製）を300 µL注入し、ビーズをフローセル電極に導いて、発光量を測定した。キャリブレーターの測定結果から、Logit-Log1次式で検量線を作成し、各試料の測定値を算出した。なお、尿で希釈した試料の測定値は、希釈に用いた尿由来のNTx値を実測値から差し引いて算出した。

[0054] 《分析例2 オステオマークを使用した測定の操作》

I型コラーゲン架橋N-テロペプチドキット オステオマーク（アボットダイアグノスティクス メディカル株式会社）を用い、製品の添付文書に従ってNTxの測定を実施した。標準品はキットに付属のものを、試料はECLIAによる測定と同様のものを用いた。なお、尿で希釈した試料の測定値は、希釈に用いた尿由来のNTx値を実測値から差し引いて算出した。

[0055] 《比較例1 NTx濃度既知の尿又は生理食塩水を検体希釈液として用いた場合の希釈回収試験》

骨粗鬆症患者由来の尿検体（ビジコムジャパン社）4例を、NTx濃度既知の尿又は生理食塩水で10倍希釈し、ECLIAでNTx濃度を測定した際の希釈回収率（測定値×希釈倍率／原液測定値×100%）を表1に示す

。一部の尿検体と希釈用の組合せ、及び従来より検体希釈液として広く用いられている生理食塩水では、希釈測定時にNT×測定値が40%以上変動し、測定の正確性が担保できないことが分かった。検体の希釈用溶液として尿を用いる場合に正確な測定値を得るためには、希釈用の尿を適切に選択する必要があることが示唆された。

[0056] [表1]

	検体	尿検体 1	尿検体 2	尿検体 3	尿検体 4
	原液の NT x 測定値 [ng/mL]	1169	1175	32.2	57.6
希釈用 溶液	希釈用尿 A	106.9%	102.9%	NT	NT
	希釈用尿 B	NT	NT	143.5%	103.3%
	希釈用尿 C	NT	NT	156.5%	171.1%
	生理食塩水	209.5%	156.8%	NT	NT

[0057] 《実施例 1 各種添加剤を含む検体希釈液による希釈回収試験》

20 mM HEPES pH 6.5 に各種添加剤を加えることで、各種希釈液を調製した。調製した希釈液で2例の尿検体を10倍希釈し、ECLIAでNT×濃度を測定した際の希釈回収率を表2に示す。尿酸を0.08～0.25%の濃度で添加した希釈液を用いた場合の希釈回収率は、75～125%以内と良好であった。一方、添加剤を加えない条件や、尿酸と同じく尿中に含まれる尿素やクレアチンを添加希釈液では、希釈回収率が不良であった。以上より、希釈液に尿酸を添加することによって、NT×の希釈測定が正確に実施できることが明らかとなった。

[0058]

[表2]

検体		尿検体 5	尿検体 6
原液の NT x 測定値[ng/mL]		380	430
希釈液 添加剤	なし	151.2%	147.0%
	0.08%尿酸	121.9%	122.4%
	0.15%尿酸	103.0%	107.8%
	0.20% 尿酸	86.0%	81.2%
	0.25% 尿酸	76.2%	77.9%
	2%尿素	147.6%	139.7%
	0.2%クレアチニン	157.3%	147.1%

※尿酸の濃度は、添加剤中の濃度である。測定系における尿酸の濃度は、添加剤中の濃度を4.8で除算することで計算できる。

[0059] 《実施例2 各種添加剤を含む検体希釈液による希釈回収試験とオステオマークを用いた測定との相関》

骨粗鬆症患者由来の尿検体22例を、希釈回収率が良好な尿、又は尿酸を含む希釈液（0.15%尿酸、20mM HEPES、150mM NaCl、pH7.6）で10倍希釈し、ECLA測定及びオステオマーク測定に供した。尿を用いて希釈測定を行った際の、ECLA測定値と、オステオマーク測定値との相関性を図2に、本実施例の尿酸を含む希釈液を用いて希釈測定を行った際の、ECLA測定値と、オステオマーク測定値との相関性を図3に示す。オステオマーク測定値とECLA測定値との相関係数は、尿による希釈測定で0.909、尿酸を含む希釈液による希釈測定で0.892となった。したがって、測定結果は希釈用溶液間で同等であり、検体種によらず尿酸を含む希釈液を用いた希釈測定が可能であることが分かった。オステオマーク測定において、尿を用いた希釈時と尿酸を含む希釈液を用いた希釈時との測定値を比較した結果を図4に示す。希釈用溶液間の相関係数は0.962であり、本実施例の尿酸を含む希釈液が、ECLA測定以外の測定法においても使用可能であることが分かった。希釈用溶液として尿酸を含む希釈液を用いることで、検体希釈用溶液として尿を用いる場合に

必要であった、希釈用尿由来のNTx値の除算、及び適切な希釈用尿の選別が不要となるため、より簡便にNTx値の希釈測定が実施できる。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明によれば、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる、NTxの測定試薬を提供することができる。

請求の範囲

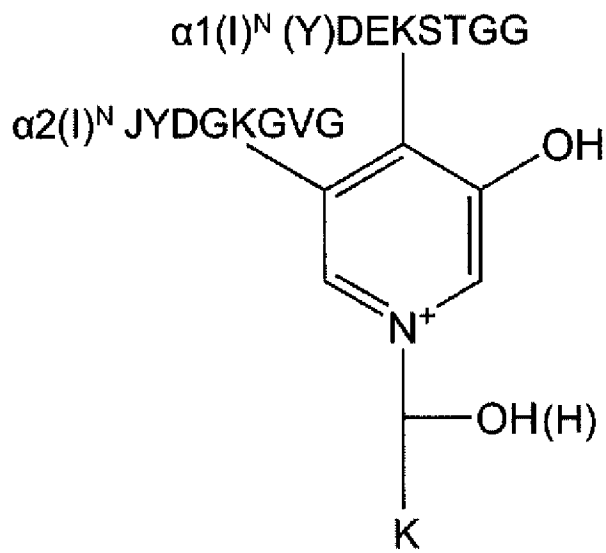
- [請求項1] 尿酸又はその塩を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬。
- [請求項2] 免疫測定用の試薬であり、液状である、請求項1に記載の測定試薬。
- [請求項3] 尿中のⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドを測定するための測定試薬である、請求項1に記載の試薬。
- [請求項4] 検体希釈液、抗体希釈液、又は粒子懸濁液である、請求項1に記載の測定試薬。
- [請求項5] 尿酸又はその塩の濃度が、測定試薬基準で、0.001～10質量%である、請求項1～4のいずれかに記載の測定試薬。
- [請求項6] 緩衝液をさらに含む、請求項1に記載の測定試薬。
- [請求項7] 生体試料と、尿酸若しくはその塩、又はこれらを含む試薬とを接触させる工程を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。
- [請求項8] 接触させる工程が、生体試料と、尿酸又はその塩を含む試薬とを接触させる工程である、請求項7に記載の免疫測定方法。
- [請求項9] 生体試料が、尿である、請求項7に記載の免疫測定方法。
- [請求項10] 生体試料とⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドと結合する抗体又はその抗体断片とを接触させる工程と前記抗体又は抗体断片に間接的又は直接的に結合している標識物質に由来するシグナルを測定する工程とをさらに含む、請求項7に記載の免疫測定方法。
- [請求項11] 抗体抗原反応時の、尿酸の濃度が、0.0001～1質量%である、請求項7に記載の免疫測定方法。
- [請求項12] 前記シグナル、又はシグナルに基づくⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定値から、生体試料以外に由来するⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの量を除算又は減算する工程を含まない、請求項7

～ 1 1 のいずれかに記載のⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。

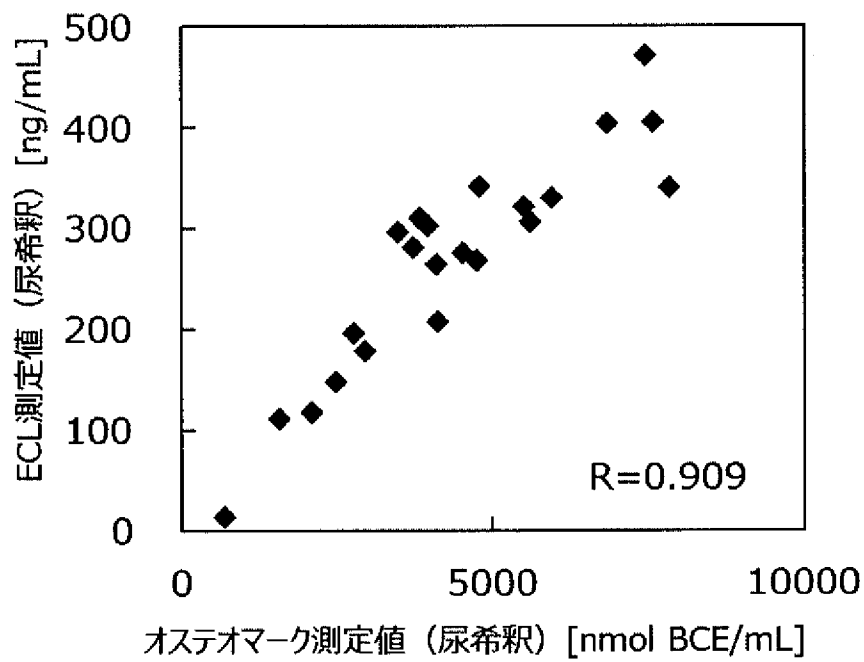
[請求項13] 尿酸又はその塩を溶媒に添加すること
を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの測定試薬の調製方法
。

[請求項14] 溶媒が緩衝液である、請求項1 3に記載のⅠ型コラーゲン架橋N-
テロペプチドの測定試薬の調製方法。

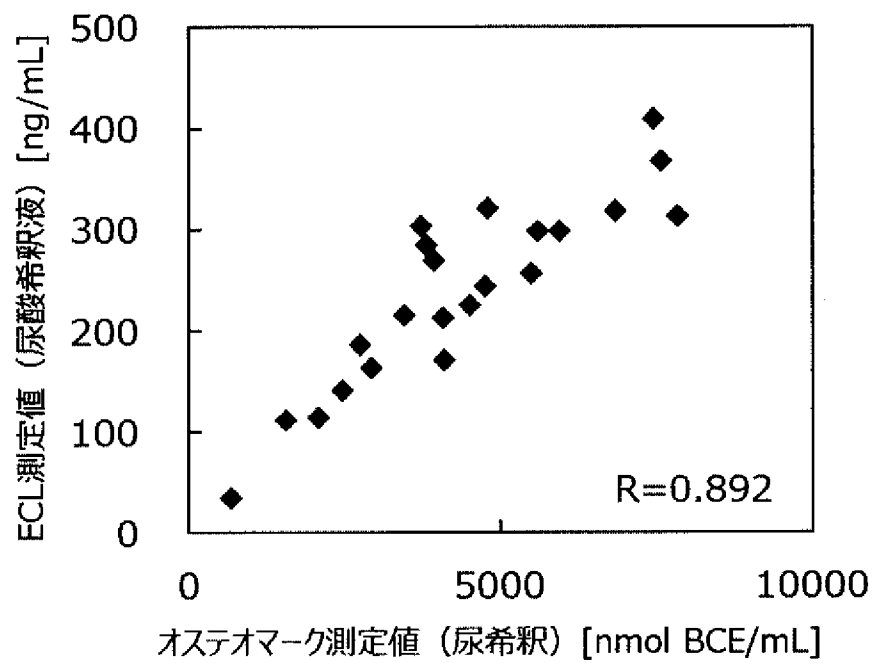
[図1]



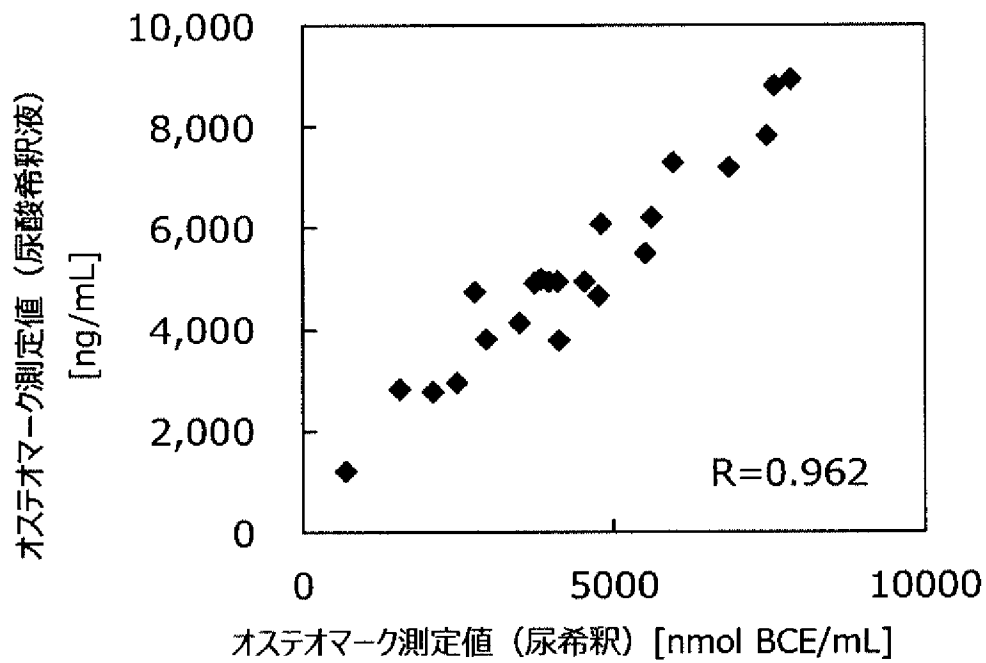
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/53 (2006.01)i; C07K 14/78 (2006.01)i; C07K 16/18 (2006.01)i; G01N 33/50 (2006.01)i FI: G01N33/53 D; G01N33/50 T; C07K14/78; C07K16/18 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/48; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/68 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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); PubMed; 医中誌WB (Ichushi WEB)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>アボットダイアグノスティクスメディカル株式会社, I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドキット オステオマーク OSTEOMARK 添付文書, July 2019, https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/20900AMZ00592000_A_02_01/ non-official translation (Abbott Diagnostics Medical Co., Ltd. I-type collagen bridge Ntx OSTEOMARK supplemental documentation.) [形状・構造等 (キットの構成)], [測定原理], [用法・用量 (操作方法)] (Shape, composition etc. (kit composition), Measurement principles, Usage and dosage (operating procedures))</td> <td>1-5, 7-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-3, 5-6, 13-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2003-166990 A (THE CIRCLE FOR THE PROMOTION OF SCIENCE AND ENGINEERING) 13 June 2003 (2003-06-13) paragraph [0002]</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2008-101924 A (TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE) 01 May 2008 (2008-05-01) claims, paragraphs [0018], [0021]-[0026], [0032]</td> <td>1-3, 5-6, 13-14</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	アボットダイアグノスティクスメディカル株式会社, I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドキット オステオマーク OSTEOMARK 添付文書, July 2019, https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/20900AMZ00592000_A_02_01/ non-official translation (Abbott Diagnostics Medical Co., Ltd. I-type collagen bridge Ntx OSTEOMARK supplemental documentation.) [形状・構造等 (キットの構成)], [測定原理], [用法・用量 (操作方法)] (Shape, composition etc. (kit composition), Measurement principles, Usage and dosage (operating procedures))	1-5, 7-11	Y		1-3, 5-6, 13-14	A	JP 2003-166990 A (THE CIRCLE FOR THE PROMOTION OF SCIENCE AND ENGINEERING) 13 June 2003 (2003-06-13) paragraph [0002]	1-14	Y	JP 2008-101924 A (TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE) 01 May 2008 (2008-05-01) claims, paragraphs [0018], [0021]-[0026], [0032]	1-3, 5-6, 13-14
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	アボットダイアグノスティクスメディカル株式会社, I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドキット オステオマーク OSTEOMARK 添付文書, July 2019, https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/20900AMZ00592000_A_02_01/ non-official translation (Abbott Diagnostics Medical Co., Ltd. I-type collagen bridge Ntx OSTEOMARK supplemental documentation.) [形状・構造等 (キットの構成)], [測定原理], [用法・用量 (操作方法)] (Shape, composition etc. (kit composition), Measurement principles, Usage and dosage (operating procedures))	1-5, 7-11															
Y		1-3, 5-6, 13-14															
A	JP 2003-166990 A (THE CIRCLE FOR THE PROMOTION OF SCIENCE AND ENGINEERING) 13 June 2003 (2003-06-13) paragraph [0002]	1-14															
Y	JP 2008-101924 A (TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE) 01 May 2008 (2008-05-01) claims, paragraphs [0018], [0021]-[0026], [0032]	1-3, 5-6, 13-14															
☒ 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 “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 29 November 2022		Date of mailing of the international search report 20 December 2022															
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038705**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-202338 A (OSTEOMETER BIOTECH AS) 18 July 2003 (2003-07-18) entire text, all drawings	1-14
A	JP 2001-506000 A (OSTEOMETER BIOTECH A/S) 08 May 2001 (2001-05-08) entire text, all drawings	1-14
A	JP 10-300749 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORP.) 13 November 1998 (1998-11-13) entire text, all drawings	1-14
A	JP 5-502223 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 22 April 1993 (1993-04-22) entire text, all drawings	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038705

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/038705

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2003-166990	A	13 June 2003	(Family: none)	
JP	2008-101924	A	01 May 2008	EP 2098864 A1 claims, paragraphs [0023]- [0029], [0035], [0086] WO 2008/047941 A1	
JP	2003-202338	A	18 July 2003	WO 1995/008115 A1 whole document EP 742902 A1 AU 7652194 A	
JP	2001-506000	A	08 May 2001	US 2003/0148272 A1 whole document WO 1998/026286 A2 EP 944833 A2 AU 5754298 A	
JP	10-300749	A	13 November 1998	WO 1998/049556 A1 whole document	
JP	5-502223	A	22 April 1993	US 4973666 A whole document WO 1989/004491 A1 EP 394296 A1 AU 6889891 A HK 101395 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/53(2006.01)i; C07K 14/78(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i FI: G01N33/53 D; G01N33/50 T; C07K14/78; C07K16/18		
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）） G01N33/48; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/68		
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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); PubMed; 医中誌WB		
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
X	アボットダイアグノスティクスメディカル株式会社, I型コラーゲン架橋N-テロペプチドキット オステオマーク OSTEOMARK 添付文書, 2019.07, https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/20900AMZ00592000_A_02_01/ [形状・構造等（キットの構成）], [測定原理], [用法・用量（操作方法）]	1-5, 7-11
Y		1-3, 5-6, 13-14
A	JP 2003-166990 A (財団法人理工学振興会) 13.06.2003 (2003 - 06 - 13) [0002]	1-14
Y	JP 2008-101924 A (財団法人 東京都医学研究機構) 01.05.2008 (2008 - 05 - 01) [特許請求の範囲], [0018], [0021] - [0026], [0032]	1-3, 5-6, 13-14
A	JP 2003-202338 A (オステオミーター・バイオテック・エー／エス) 18.07.2003 (2003 - 07 - 18) 全文, 全図	1-14
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ 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、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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 29.11.2022		国際調査報告の発送日 20.12.2022
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） 倉持 俊輔 2J 3209 電話番号 03-3581-1101 内線 3250

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
A	JP 2001-506000 A (オステオメーター・バイオテク・エー／エス) 08.05.2001 (2001 - 05 - 08) 全文, 全図	1-14
A	JP 10-300749 A (三菱化学株式会社) 13.11.1998 (1998 - 11 - 13) 全文, 全図	1-14
A	JP 5-502223 A (ワシントン リサーチ ファウンデーション) 22.04.1993 (1993 - 04 - 22) 全文, 全図	1-14

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
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は、「ST.26形式」と読み替える。

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/JP2022/038705

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2003-166990	A	13.06.2003	(ファミリーなし)	
JP	2008-101924	A	01.05.2008	EP 2098864 A1	
				Claims, [0023]-[0029],	
				[0035], [0086]	
				WO 2008/047941 A1	
JP	2003-202338	A	18.07.2003	WO 1995/008115 A1	
				Whole Document	
				EP 742902 A1	
				AU 7652194 A	
JP	2001-506000	A	08.05.2001	US 2003/0148272 A1	
				Whole Document	
				WO 1998/026286 A2	
				EP 944833 A2	
				AU 5754298 A	
JP	10-300749	A	13.11.1998	WO 1998/049556 A1	
				Whole Document	
JP	5-502223	A	22.04.1993	US 4973666 A	
				Whole Document	
				WO 1989/004491 A1	
				EP 394296 A1	
				AU 6889891 A	
				HK 101395 A	