

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年11月22日 (22.11.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/132928 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/060176
- (22) 国際出願日: 2007年5月11日 (11.05.2007)
- (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2006-135032 2006年5月15日 (15.05.2006) JP
特願2007-024437 2007年2月2日 (02.02.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鹿児島大学 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松山航 (MAT-SUYAMA, Wataru) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION FOR DILUTION OF ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗体希釈用組成物

(57) Abstract: Disclosed is a composition for diluting an antibody, which can improve the accuracy of an immunological analysis. The composition comprises agar, carrageenan or a mixture thereof.

(57) 要約: 免疫学的分析の精度を上げることができる抗体希釈用組成物を提供する。抗体希釈用組成物に寒天、カラジナン又はそれらの混合物を含有する。



WO 2007/132928 A1

明 細 書

抗体希釈用組成物

技術分野

本発明は、免疫学的分析の精度を上げることができる抗体希釈用組成物、その製造方法及び使用方法、並びに抗体希釈用組成物を含む免疫学的分析用キットに関する。

背景技術

免疫染色は、検体(例えば、血液や細胞の溶解液等)中に目的のタンパク質又は目的の抗体が存在するか否かを調べる方法であり、免疫学や分子生物学等の幅広い分野の研究で用いられている。また、当該免疫染色により、目的のタンパク質の量や活性化の有無を調べることもできる。

免疫染色では、使用する抗体や血清等の実験材料をバッファーで希釈して使用する。免疫染色において、目的のタンパク質を検出する上で最も問題となることは、目的のタンパク質に対応するバンド以外の非特異的なバンドが出現する現象である。この現象は、「バックグラウンドがあがる」とも呼ばれる。

そこで、従来より、このような非特異的なバンドの出現を防ぐべく、例えばブロッキング溶液(例えば、ブロックエース(登録商標)Catalog number:UK-B25(大日本住友製薬株式会社製))を使用する方法、あるいは市販のバッファー(例えば、DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components Catalog number:S3022(Dako Cytomation 社製))を使用して抗体を希釈する方法がある。

しかしながら、免疫染色において、これら従来の方法を用いても、非特異的なバンドが出現することが多い。

そこで、免疫染色における非特異的なバンドの出現を抑制する方法や試薬が望まれている。

一方、特許文献1には、免疫学的測定に用いる免疫反応を促進するための組成物が開示されている。

また、特許文献 2 には、抗原を安定化するための緩衝液が開示されている。

さらに、特許文献 3 には、タンパク及びペプチドのための安定化溶液が開示されている。

しかしながら、これまでに、寒天又はカラジーン(carrageenan)を含有する抗体希釈用組成物の、免疫分析の精度を向上させる目的及び/又は免疫分析における非特異的な検出を抑制する目的での使用は知られていなかった。

特許文献 1 国際公開第 2005/121790 号パンフレット

特許文献 2 特表 2001-517799 号公報

特許文献 3 特表平 10-500704 号公報

発明の開示

本発明は、上述した実情に鑑み、免疫学的分析の精度を向上させるための及び/又は免疫学的分析における非特異的な検出を抑制するための抗体希釈用組成物を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、寒天又はカラジーンを含有する抗体希釈用組成物を使用することで、免疫学的分析の精度を上げることができると見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は以下を包含する。

(1) 寒天、カラジーン又はそれらの混合物を含有することを特徴とする、免疫分析の精度を向上させるための及び/又は免疫分析における非特異的な検出を抑制するための抗体希釈用組成物。

(2) 上記カラジーンが λ カラジーンであることを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(3) さらに糖及びゼラチンを含有することを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(4) 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤から成る群より選択される 1 以上の成分を含有することを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(5) 上記寒天の濃度が 0.1~5 重量%であることを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(6) 上記寒天の濃度が 0.2～3 重量%であることを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(7) 上記カラジナーンの濃度が 0.01～5 重量%であることを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(8) 上記カラジナーンの濃度が 0.03～2 重量%であることを特徴とする、(1) 記載の抗体希釈用組成物。

(9) 上記糖がショ糖であることを特徴とする、(3) 記載の抗体希釈用組成物。

(10) 上記糖の濃度が 0.0017～0.83 モル濃度であることを特徴とする、(3) 記載の抗体希釈用組成物。

(11) 上記ゼラチンの濃度が 0.01～2 重量%であることを特徴とする、(3) 記載の抗体希釈用組成物。

(12) 上記塩が塩化ナトリウムであることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(13) 上記塩の濃度が 10mM～2M であることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(14) 上記キレート剤がエチレンジアミン四酢酸であることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(15) 上記キレート剤の濃度が 1mM～100mM であることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(16) 上記緩衝液がトリスであることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(17) 上記緩衝液の濃度が 10mM～1M であることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(18) 上記非イオン系界面活性剤が Tween 20 又は Triton X-100 であることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(19) 上記非イオン系界面活性剤の濃度が 0.01～1 容量%であることを特徴とする、(4) 記載の抗体希釈用組成物。

(20) (1)～(19) のいずれかに記載の抗体希釈用組成物を使用することを特徴とする免疫学的分析方法。

(21) 上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、(20) 記載の方法。

(22) (1) ～ (19) のいずれかに記載の抗体希釈用組成物と抗体とを含む免疫学的分析用キット。

(23) 上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、(22) 記載の免疫学的分析用キット。

(24) 以下の工程：

(i) 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤からなる群より選択される1以上の成分を含む水中の混合液を攪拌する工程；

(ii) 工程(i)で生じた混合液を加温下でインキュベートする工程；

(iii) 前記混合液を冷却する工程；及び

(iv) カラジーンを添加して攪拌する工程；

を含む、抗体希釈用組成物の製造方法。

(25) 上記工程(i)の水中の混合液がさらにゼラチンを含むことを特徴とする、(24) 記載の方法。

(26) 上記工程(ii)において、インキュベーションの温度を 35℃～40℃とすることを特徴とする、(24) 記載の方法。

(27) 上記工程(iii)において、混合液を 4℃～30℃に冷却することを特徴とする、(24) 記載の方法。

(28) 上記工程(iv)において、カラジーンと共に糖を添加して攪拌することを特徴とする、(24) 記載の方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2007-24437 号及び 2006-135032 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す（左図：従来方法、右図：本発明に係る寒天含有抗体希釈用組成物を使用）。

図2は、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を用いたウ

エスタンプロッティングの結果を示す。A の左図と右図は、それぞれ従来方法を使用した結果と、カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用した結果を示す。B の左図と右図は、それぞれ従来方法を使用した結果と、カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用した結果を示す。C は、それぞれカラジーンを含まない本発明の抗体希釈用組成物を使用した結果（左図）と、カラジーンを含む本発明の抗体希釈用組成物を使用した結果（右図）を示す。D の左図と右図は、それぞれ従来方法を使用した結果と、カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用した結果を示す。

図 3 は、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を用いた肺組織の免疫組織染色の結果を示す（A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にラビット IgG を使用した negative control（カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用）、D:ヘマトキシリンエオジン染色）。

図 4 は、本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を用いた腎組織の免疫組織染色の結果を示す（A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にヤギ IgG を使用した negative control（カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用）、D:ヘマトキシリンエオジン染色）。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る抗体希釈用組成物は、寒天、カラジーン又はそれらの混合物を含有する組成物である。本発明に係る抗体希釈用組成物は、免疫学的分析に使用する抗体を希釈するために使用する。本発明に係る抗体希釈用組成物を使用すれば、免疫学的分析の精度を上げることができる。

具体的には、免疫学的分析において、目的のタンパク質（抗原）以外のタンパク質の非特異的な検出を抑制することができる。例えば、ウエスタンプロッティング又は免疫染色において本発明に係る抗体希釈用組成物を使用することで、非特異的なバンドの出現を抑制することができる。

本発明の組成物には、寒天又はカラジーン以外に、塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤から成る群より選択される 1 以上の成分、特に好まし

くはこれら全ての成分を含有する。その他、例えば、アジ化ナトリウム、グリセロール、ウシ血清アルブミン(BSA)、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、ゼラチン、糖等を混合液中に含有させてもよい。ゼラチン及び糖を含有することが特に好ましい。本発明に使用し得る糖は、例えばショ糖、セルロースが挙げられ、特にショ糖を含むことが好ましい。糖の添加は、カラジナーンの溶解性を高めるのに有効である。また、ゼラチンの添加は本組成物の汎用性の向上に効果的である。その際、混合液中の糖の濃度は 0.0017~0.83 モル濃度、好ましくは 0.005~0.33 モル濃度となるように調整する。混合液中のゼラチンの濃度は 0.01~2 重量%、好ましくは 0.05~1 重量%となるように調整する。また、本発明の組成物の成分類の混合に使用する水として、例えば、2 回蒸留水(D2W)、蒸留水、滅菌水等を使用することができる。

使用する寒天としては、例えば、特級粉末寒天、粉末寒天、粉寒天、糸寒天、角寒天等が挙げられ、特に特級粉末寒天が好ましい。混合液中の寒天の濃度は 0.1~5 重量%、好ましくは 0.2~3 重量%となるように調製する。

使用するカラジナーンは、 κ カラジナーン、 ι カラジナーン及び λ カラジナーンが挙げられ、特に λ カラジナーンを使用することが好ましい。混合液中のカラジナーンの濃度は 0.01~5 重量%、好ましくは 0.03~2 重量%である。

一方、塩としては、その形態は限定されないが、例えば塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等が挙げられ、特に NaCl が好ましい。混合液中の塩の濃度は 10mM~2M、好ましくは 100mM~1.5M となるように調製する。

キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、ジヒドロキシエチルエチレンジアミン二酢酸(DHEDDA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、EDTA 金属塩等が挙げられ、特に EDTA が好ましい。EDTA を使用する際は、例えば pH7.0~8.5、特に pH8 のものを使用することが好ましい。混合液中のキレート剤の濃度は 1mM~100mM、好ましくは 3mM~50mM となるように調製する。

また、緩衝液としては、例えばトリス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン; 以下、「Tris」という)、グリシン、フタル酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、

リン酸、ホウ酸、炭酸、グッドバッファー(MES、PIPES、MOPS、HEPES、ピストリス等)等が挙げられ、特に Tris が好ましい。Tris を使用する際は、例えば pH7.0～8.0、特に pH7.4 のものを使用することが好ましい。混合液中の緩衝液の濃度は 10mM～1M、好ましくは 30mM～600mM となるように調製する。

さらに、非イオン系界面活性剤としては、例えば Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート))、Triton X-100 (Octylphenolpoly(ethylene glycolether) (オクチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)))、Tween 80、Brij 35、Triton X-114、Nonidet P-40 (NP-40)、Octyl β -glucoside 等が挙げられ、特に Tween 20 又は Triton X-100 が好ましい。混合液中の非イオン系界面活性剤の濃度は 0.01～1 容量%、好ましくは 0.03～0.6 容量%となるように調製する。

本発明の別の態様では、本発明の抗体希釈用溶液の製造方法が提供される。

寒天を含有する本発明の抗体希釈用組成物の製造方法では、先ず寒天を含有する混合液を攪拌する。攪拌においては、温度は、例えば 10～30℃、好ましくは 15～20℃とする。攪拌速度は、例えば 200～1500rpm、好ましくは 600～800rpm とする。また攪拌時間は例えば 1～6 時間、好ましくは 1～2 時間とする。次いで、攪拌後の混合液をインキュベートする。インキュベーションにおいて、温度は例えば 35～40℃、好ましくは 37℃とする。また、インキュベーション時間は、例えば 5～24 時間、好ましくは 8～12 時間とする。以上に説明した方法により、本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を製造することができる。

カラジーンを含有する本発明の抗体希釈用組成物の製造方法は、(i) 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤からなる群より選択される 1 以上の成分を含む水中の混合液を攪拌する工程；(ii) 工程(i)で生じた混合液を加温下でインキュベートする工程；(iii) 前記混合液を冷却する工程；及び(iv) カラジーンを添加して攪拌する工程を含む。

上記工程(i)で、先ずカラジーン及び糖(含有する場合)を除く全ての成分(例えば、ゼラチン、塩、キレート剤、緩衝液、非イオン系界面活性剤等)を含む水中の混合液を攪拌する。攪拌時の温度は、例えば 10～30℃、好ましくは 15～20℃とする。攪拌速度は、例えば 200～1500rpm、好ましくは 600～800rpm とする。ま

た攪拌時間は例えば 1～6 時間、好ましくは 1～2 時間とする。次いで、上記工程 (ii) で攪拌後の混合液をインキュベートする。インキュベーションにおいて、温度は例えば 35～40℃、好ましくは 37℃とする。また、インキュベーション時間は、例えば 5～24 時間、好ましくは 8～12 時間とする。インキュベーション後、工程 (iii) でこの混合液を 4℃～30℃、好ましくは 4℃～20℃、最も好ましくは 4℃～12℃まで冷却し、次いで工程 (iv) でカラジINANを加えて攪拌する。工程 (iv) の攪拌速度は、例えば 200～1500rpm、好ましくは 600～800rpm とし、攪拌時間は、例えば 1～6 時間、好ましくは 1～2 時間とする。以上に説明した方法により、本発明に係る、カラジINANを含有する抗体希釈用組成物を製造することができる。

本発明の好ましい態様では、上記工程 (i) の混合液はゼラチンを含む。その際、混合液中に含まれるゼラチンの濃度は 0.01～2 重量%、好ましくは 0.05～1 重量% となるように調整する。これによって、本組成液の汎用性が向上する。

本発明の別の好ましい態様では、工程 (iv) においてカラジINANと共に糖を添加して攪拌する。添加する糖の量は、0.0017～0.83 モル濃度、好ましくは 0.005～0.33 モル濃度である。これにより、本発明の溶解速度が増し、混合液中でのカラジINANの十分な溶解を達成することができる。

また、寒天及びカラジINANの混合物を含有する本発明の抗体希釈用組成物は、上記工程 (iv) においてカラジINANと共に寒天を添加して攪拌することを除き、上記と同様に製造することができる。なお、その際に添加することができる成分量は以下の通りである：カラジINAN、0.001～5 重量%、好ましくは 0.005～1 重量%；寒天、0.001～3 重量%、好ましくは、0.015～1 重量%；ゼラチン、0.005～2 重量%、好ましくは 0.01～1 重量%；糖、0.00017～0.83 モル濃度、好ましくは 0.00083～0.165 モル濃度。

なお、本発明に係る抗体希釈用組成物を免疫学的分析で使用する際には、例えば、D2W、蒸留水、滅菌水等の水を使用して適宜希釈したものを使用してもよい。

使用時の抗体希釈用組成物における寒天又はカラジINANの濃度は、例えば 0.1～0.5 重量%、好ましくは 0.2～0.3 重量%、特に好ましくは 0.28 重量%とする。

また、使用時の抗体希釈用組成物における塩の濃度は、例えば 50mM～200mM、

好ましくは 100mM～150mM、特に好ましくは 120mM とする。

さらに、使用時の抗体希釈用組成物におけるキレート剤の濃度は、例えば 1mM～8mM、好ましくは 3mM～5mM、特に好ましくは 4mM とする。

使用時の抗体希釈用組成物における緩衝液の濃度は、例えば 10mM～80mM、好ましくは 30mM～60mM、特に好ましくは 50mM とする。

また、使用時の抗体希釈用組成物における非イオン系界面活性剤の濃度は、例えば 0.01～1 容量%、好ましくは 0.03～0.06 容量%、特に好ましくは 0.05 容量% とする。

本発明に係る抗体希釈用組成物は、免疫学的分析に使用する抗体の希釈に使用する。本発明に係る抗体希釈用組成物を用いて希釈する抗体としては、特に限定されないが、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント(例えば、Fab、F(ab')₂)、抗血清及び腹水(モノクローナル抗体含有)等が挙げられる。また、標識抗体(例えば、蛍光標識抗体、酵素標識抗体)の希釈にも、本発明に係る抗体希釈用組成物を使用することができる。抗体希釈倍率としては、例えば、2 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1000 倍、5000 倍、10000 倍等が挙げられる。

このように希釈された抗体を使用することで、免疫学的分析の精度を上げることができる。ここで、免疫学的分析としては、例えば免疫染色、免疫細胞染色、免疫組織染色、酵素免疫測定(例えば、ELISA、EIA)、放射免疫測定、蛍光抗体法及びフローサイトメトリーが挙げられる。例えば、ウエスタンブロッディング終了後のメンブレンに対して、あるいは生物学的組織又は細胞の免疫学的分析において、本発明の抗体希釈用組成物で希釈した一次抗体及び/又は二次抗体を用いて発色又は免疫染色することで、非特異的な検出を抑制することができる。また、本発明に係る抗体希釈用組成物で希釈した抗体を用いて免疫学的に発色又は染色するときには、従来より使用されるブロッキング溶液を使用する必要がない。さらに、本発明に係る抗体希釈用組成物は、抗体保存に使用することもできる。

さらに、本発明に係る抗体希釈用組成物は、抗体と共に免疫学的分析用キットとして提供することができる。当該キットでは、本発明に係る抗体希釈用組成物と抗体とは、同じ容器又は別々の容器に入れて提供することができる。またその

際、抗体は上記例示の抗体を含む。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1：本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング

[材料及び方法]

1. 抗原及び抗体

抗原には、 1×10^8 個の COS-1 細胞 lysate (以下、「タンパク A」という) 及び 1×10^8 個の MCF-7 細胞 lysate (以下、「タンパク B」という) を使用した。

抗体には、Cell Signaling 社製マウスモノクローナル抗 Phospho-Estrogen Receptor α (Ser118) 抗体 (#2511) を使用した。

2. 本発明に係る寒天含有抗体希釈用組成物の作製

以下のようにして、本発明に係る、寒天を含有する抗体希釈用組成物を作製した。

まず、5M NaCl 240ml、0.5M EDTA (pH8) 80ml、1M Tris (pH7.4) 500ml、Tween 20 5ml 及び特級粉末寒天 (和光純薬工業株式会社製) 28g を混合し、D2W で合計 1L とした。

次いで、この混合液を 17°C において 700rpm の速度で 1 時間攪拌した。攪拌後の混合液を、37°C で 10 時間インキュベートし、使用時の 10 倍濃度の抗体希釈用組成物を作製した。さらに、同組成物を D2W にて 1 倍濃度に薄め、抗体希釈用組成物とした。

3. 電気泳動、ウエスタンブロッティング及び発色

以下のようにして電気泳動、ウエスタンブロッティング及び発色を行った。

3-1. 電気泳動及びウエスタンブロッティング

タンパク A $10 \mu\text{l}$ 及びタンパク B $10 \mu\text{l}$ を、それぞれサンプルバッファー (20% グリセロール、6% SDS、10% 2-メルカプトエタノール) $10 \mu\text{l}$ と混合し、10 分間 95°C でインキュベートした。

冷却後、これら 2 種のサンプル $20 \mu\text{l}$ を、10% Tris-Glycine ポリアクリルアミドゲル (Invitrogen 社製) にアプライして、電気泳動を 15mA で 90 分間行った。

電気泳動後、電気泳動を行ったゲルから Hybond-ECL Membrane (Amersham 社製) ヘタンパク質をトランスファーした。トランスファーは、膜の面積×1mA で 60 分間行った。

3-2. 従来方法を用いたウエスタンブロッティング

第 3-1 節のウエスタンブロッティング後に得られた膜を、TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄し、その後、発色に供した。

従来方法を用いた場合では、洗浄後の膜をブロッキングバッファー (ブロックエース：大日本住友製薬株式会社製) 中に浸し、37℃で 1 時間インキュベートした (ブロッキング)。

ブロッキング後、膜を TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄し、続いて一次抗体反応を行った。一次抗体として、Dako Cytomation 社製 DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Catalog number: S3022) で 1000 倍に希釈したマウスモノクローナル抗 Phospho-Estrogen Receptor α (Ser118) 抗体を用いた。一次抗体反応は、4℃で 10 時間のインキュベーションにより行った。

一次抗体反応後、膜を TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体として、Dako Cytomation 社製 DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components で 1000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham 社製) を用いた。二次抗体反応は、20℃で 15 時間のインキュベーションにより行った。

二次抗体反応後、膜を TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄し、Amersham 社製 ECL-plus キットを用いて、膜を発色させた。発色後、膜を Amersham 社製の HyperfilmECL に露光して解析した。

3-3. 本発明に係る抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング

第 2 節で作製した抗体希釈用組成物を使用する場合には、第 3-1 節のウエスタンブロッティング後に得られた膜を、TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄した後、ブロッキングを行わずに、一次抗体反応を直接行った。一次抗体として、第 2 節で作製した抗体希釈用組成物で 1000 倍希釈したマウスモノクローナル抗 Phospho-Estrogen Receptor α (Ser118) 抗体を使用した。一次抗体反応は、4℃で 10 時間のインキュベーションにより行った。

一次抗体反応後、膜を TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体として、第 2 節で作製した抗体希釈用組成物で 1000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham 社製) を用いた。二次抗体反応は、20°C で 15 分間のインキュベーションにより行った。

二次抗体反応後、膜を TBS (0.1% Tween-20 含有) で洗浄し、Amersham 社製 ECL-plus キットを用いて、膜を発色させた。発色後、膜を Amersham 社製の HyperfilmECL に露光して解析した。

〔結果〕

上記のように、従来方法で行ったウエスタンブロッティング (第 3-2 節) の結果と本発明に係る抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング (第 3-3 節) の結果を図 1 に示す。図 1 において、M は分子量マーカー (kDa) を示す。また、矢印で示すバンドは、目的のタンパク質 (Phospho-Estrogen Receptor α (Ser118)) のバンドである。

図 1 に示すように本発明に係る抗体希釈用組成物を使用したウエスタンブロッティングでは、従来方法に比べてはるかに非特異的バンドの出現を抑えていた。

実施例 2：本発明に係る、カラジーン含有する抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング

〔材料及び方法〕

1. 抗原及び抗体

抗原には、上記タンパク質 A 及び B、並びに 1×10^8 個の THP-1 細胞 lysate (以下、「タンパク質 C」という) を使用した。

抗体には、タンパク質 A 及び B については Cell Signaling 社製マウスモノクローナル抗 Phospho-Estrogen Receptor α (Ser118) 抗体 (#2511) を使用し、タンパク質 C についてはラビットポリクローナル抗 DDR1 抗体 (Santa-Cruz 社 sc-532) を使用した。

2. 本発明に係るカラジーン含有抗体希釈用組成物の作製

以下のようにして、本発明に係る、カラジーン含有する抗体希釈用組成物を作製した。

先ず、200mM NaCl 11.7g、40mM EDTA (pH8.0) 80ml、500mM Tris (pH7.4) 500ml、

0.05% Tween 20 0.5ml、0.1%ゼラチン 1g を混合し、D2W で総量 1L とした。この混合液を 800rpm で 2 時間、16℃で攪拌し、その後、37℃で 10 時間インキュベートした。次いで、この混合液を室温まで冷やし、0.3 重量%のショ糖に続いて 0.1 重量%の λ カラジINAN (和光純薬工業株式会社 035-09693) を添加して 800rpm で 2 時間攪拌することにより、カラジINANを含有する抗体希釈用組成物を完成させた。

3. 電気泳動、ウエスタンブロッティング及び免疫染色

図 2 は、上記のようにして製造したカラジINAN含有抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。

図 2A～B に示されるウエスタンブロッティングは、実施例 1 に記載の方法に従って行った。タンパク質 C に関するウエスタンブロッティング (図 2B) については、一次抗体としてラビットポリクローナル抗 DDR1 抗体を 150 倍に希釈したものを用いた。

図 2C は、カラジINANを含む本発明の抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング結果と、カラジINANを含まない本発明の抗体希釈用組成物を用いたウエスタンブロッティング結果との比較を示す。

図 2C に示される実験において、電気泳動からトランスファーまでは実施例 1 に記載される方法で行った。カラジINAN無含抗体希釈用組成物を用いる方法では、トランスファー後、カラジINAN無含抗体希釈用組成物でマウスモノクローナル抗アクチン抗体 (Santa-Cruz 社 sc-8432) を 200 倍に希釈し、4℃で 10 時間のインキュベーション後に洗浄し、カラジINAN無含抗体希釈用組成物で 1000 倍に希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体で二次抗体反応を行い、実施例 1 に記載の方法で発色させた。カラジINAN含有抗体希釈用組成物を用いる方法では、カラジINAN無含抗体希釈用組成物に代えてカラジINAN含有抗体希釈用組成物を用いる点を除いて、上記と同様の方法で行った。

図 2D に示される実験では、実施例 1 に記載のサンプルバッファ 20 μ l に Human brain lysate (IMGEX Corporation #40141)、Human Spinal Cord lysate (GENETX, Inc. #GTX15372) を 10 μ g ずつ混合し、実施例 1 に記載される方法で電気泳動からトランスファーまで行った。トランスファー後、従来の方法で

は、実施例 1 に記載の方法で洗浄した後にブロッキングを行い、里吉病（この病気では脳や脊髄に対する抗体が血清中に産生される）の患者から取得した血清を Dako 社の Antibody Diluent with Background Deducing Components (#S3022) で 2 倍に希釈し、4℃で 10 時間インキュベーションした後に洗浄し、Dako 社の Antibody Diluent with Background Deducing Components で 1000 倍に希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体で二次抗体反応を行い、実施例 1 に記載の方法で発色させ解析した。一方、カラジINAN含有抗体希釈用組成物を用いた方法では、上記トランスファーの後、ブロッキングは行わずカラジINAN含有抗体希釈用組成物で患者血清を 2 倍に希釈し、4℃で 10 時間インキュベーションした後に洗浄し、カラジINAN含有抗体希釈用組成物で 1000 倍に希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体によって二次抗体反応を行い、実施例 1 に記載の方法で発色させ解析した。

[結果]

図 2A、B 及び D に示すように、本発明に係る、カラジINANを含有する抗体希釈用組成物を使用したウェスタンブロッティングでは、従来方法に比べてはるかに非特異的バンドの出現を抑えていた。また図 2C から、本発明に係る抗体希釈用組成物の上記効果が、カラジINANの存在と有意に関連していることがわかる。

実施例 3：本発明に係る、カラジINANを含有する抗体希釈用組成物を使用した肺組織の免疫組織染色

器質化肺炎の肺組織を、標準的なプロトコールに従って、ホルマリン固定後に脱水処理を行い、その後パラフィンにて包埋し、4 μ m の厚さでプレパラートに薄切し、それをキシレンを用いて脱パラフィンを行った。そのプレパラートを 2% H₂O₂メチルエーテルで 10 分間インキュベートし脱ペルオキシダーゼ反応を行った。その後、PBS で洗浄した。

従来の方法では、洗浄後のプレパラートを 4%BSA 及び 1%馬血清入りの PBS で 10 分間ブロッキング反応を行い、その後 Dako 社の Antibody Diluent with Background Deducing Components で 150 倍に希釈したラビットポリクローナル抗 DDR1 抗体（Santa-Cruz 社 sc-532）と共に 4℃で 10 時間インキュベーションして一次抗体反応を行った。その後、PBS で洗浄し Dako 社の Antibody Diluent with Background Deducing Components で 1000 倍に希釈したビオチン標識抗ラビット

IgG 抗体 (VECTOR 社 BA-1000) で二次抗体反応を行い、PBS で洗浄した後、VECTOR 社の VECTASTAIN ABC Kit Standard (PK6100) で三次反応を行い 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドで発色させた。

本発明に係る、カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用する方法では、洗浄後ブロッキングは行わず、カラジーン含有抗体希釈用組成物で 150 倍に希釈したラビットポリクローナル抗 DDR1 抗体 (Santa-Cruz 社 sc-532) と共に 4℃で 10 時間インキュベーションして一次抗体反応を行った。その後、PBS で洗浄し、カラジーン含有抗体希釈用組成物で 1000 倍に希釈したビオチン標識抗ラビット IgG 抗体 (VECTOR 社 BA-1000) で二次抗体反応を行い、PBS で洗浄した後、VECTOR 社の VECTASTAIN ABC Kit Standard (PK6100) で三次反応を行い 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドで発色させた。

[結果]

上記のように、従来方法で行った免疫組織染色の結果と本発明に係るカラジーン含有抗体希釈用組成物を用いた免疫組織染色の結果を図 3 に示す (A:従来方法、B:カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にラビット IgG を使用した negative control (カラジーン含有抗体希釈用組成物を使用)、D:ヘマトキシリンエオジン染色)。図 3 において、茶色に染まっている部分が陽性である。図 3 からわかるように、通常の希釈液を使用すると全体が茶色に染まって判断し辛いのに対し、本発明の抗体希釈用組成物を用いると陽性部分が非常にクリアであることがわかる。

実施例 4: 本発明に係る、カラジーンを含有する抗体希釈用組成物を使用した腎組織の免疫組織染色

急性進行性糸球体腎炎の腎組織について、一次抗体にヤギポリクローナル抗 TRAIL レセプター 3 抗体 (R&D System 社、AF630)、二次抗体にビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体 (VECTOR 社 BA-5000) を用いて実施例 3 と同様にして免疫組織染色を行った。

[結果]

従来方法で行った免疫組織染色の結果と本発明に係るカラジーン含有抗体希釈用組成物を用いた免疫組織染色の結果を図 4 に示す (A:従来方法、B:カラジーン

ナン含有抗体希釈用組成物を使用、C:一次抗体にヤギ IgG を使用した negative control(カラジーナン含有抗体希釈用組成物を使用)、D:ヘマトキシリンエオジン染色)。図 4 において、茶色に染まっている部分が陽性である。図 4 からわかるように、通常の希釈液を使用する方法に比べ、本発明の抗体希釈用組成物を用いた方法により、陽性部が顕著にクリアになることが分かる。

産業上の利用可能性

本発明に係る抗体希釈用組成物によれば、非特異的な検出を抑制し、それによって免疫学的分析の精度を上げることができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 寒天、カラジINAN又はそれらの混合物を含有することを特徴とする、免疫分析の精度を向上させるための及び/又は免疫分析における非特異的な検出を抑制するための抗体希釈用組成物。
2. 上記カラジINANがλカラジINANであることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
3. さらに糖及びゼラチンを含有することを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
4. 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤から成る群より選択される1以上の成分を含有することを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
5. 上記寒天の濃度が0.1～5重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
6. 上記寒天の濃度が0.2～3重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
7. 上記カラジINANの濃度が0.01～5重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
8. 上記カラジINANの濃度が0.03～2重量%であることを特徴とする、請求項1記載の抗体希釈用組成物。
9. 上記糖がショ糖であることを特徴とする、請求項3記載の抗体希釈用組成物。
10. 上記糖の濃度が0.0017～0.83モル濃度であることを特徴とする、請求項3記載の抗体希釈用組成物。
11. 上記ゼラチンの濃度が0.01～2重量%であることを特徴とする、請求項3記載の抗体希釈用組成物。
12. 上記塩が塩化ナトリウムであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。
13. 上記塩の濃度が10mM～2Mであることを特徴とする、請求項4記載の抗

体希釈用組成物。

14. 上記キレート剤がエチレンジアミン四酢酸であることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

15. 上記キレート剤の濃度が1mM～100mMであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

16. 上記緩衝液がトリスであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

17. 上記緩衝液の濃度が10mM～1Mであることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

18. 上記非イオン系界面活性剤がTween 20又はTriton X-100であることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

19. 上記非イオン系界面活性剤の濃度が0.01～1容量%であることを特徴とする、請求項4記載の抗体希釈用組成物。

20. 請求項1～19のいずれか1項記載の抗体希釈用組成物を使用することを特徴とする免疫学的分析方法。

21. 上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、請求項20記載の方法。

22. 請求項1～19のいずれか1項記載の抗体希釈用組成物と抗体とを含む免疫学的分析用キット。

23. 上記免疫学的分析がウエスタンブロッティング又は免疫染色であることを特徴とする、請求項22記載の免疫学的分析用キット。

24. 以下の工程：

(i) 塩、キレート剤、緩衝液及び非イオン系界面活性剤からなる群より選択される1以上の成分を含む水中の混合液を攪拌する工程；

(ii) 工程(i)で生じた混合液を加温下でインキュベートする工程；

(iii) 前記混合液を冷却する工程；及び

(iv) カラジナンを添加して攪拌する工程；

を含む、抗体希釈用組成物の製造方法。

25. 上記工程(i)の水中の混合液がさらにゼラチンを含むことを特徴とする、

請求項 24 記載の方法。

26. 上記工程(ii)において、インキュベーションの温度を 35℃～40℃とすることを特徴とする、請求項 24 記載の方法。

27. 上記工程(iii)において、混合液を 4℃～30℃に冷却することを特徴とする、請求項 24 記載の方法。

28. 上記工程(iv)において、カラジINANと共に糖を添加して攪拌することを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

図 1

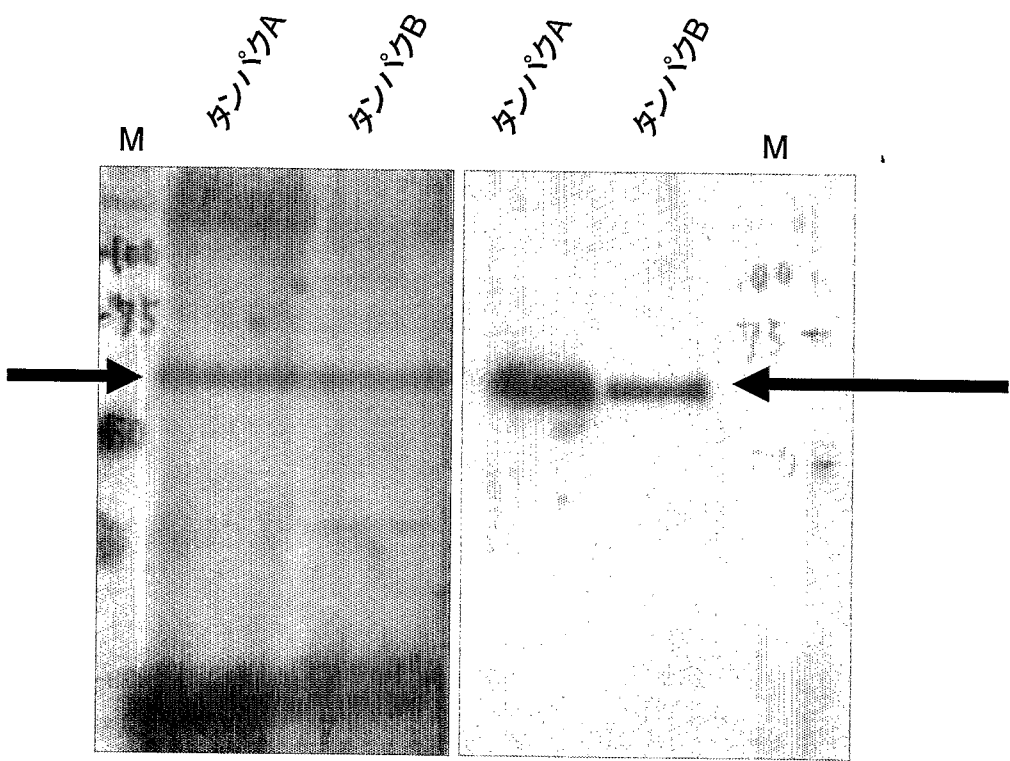


図 2

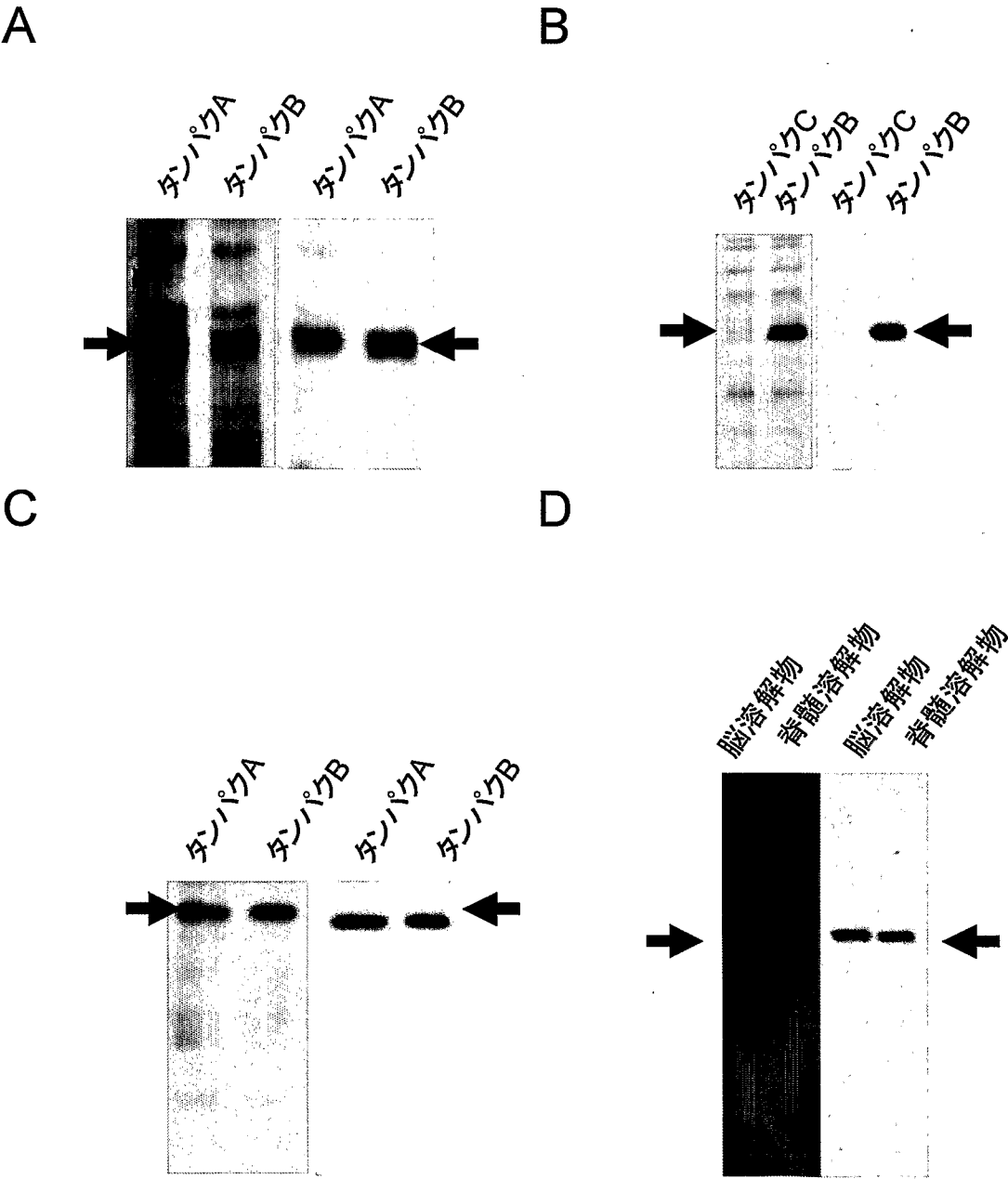
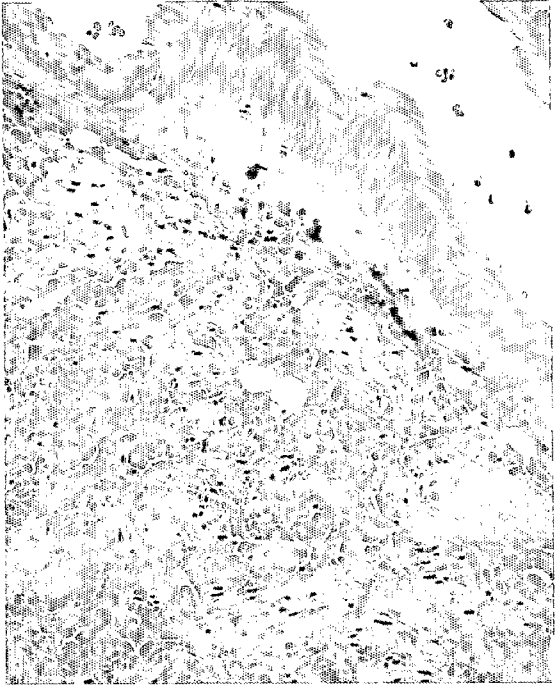


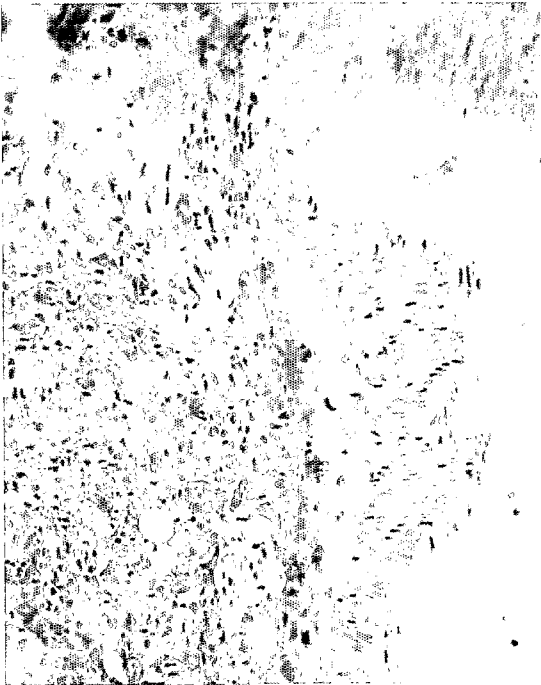
図3



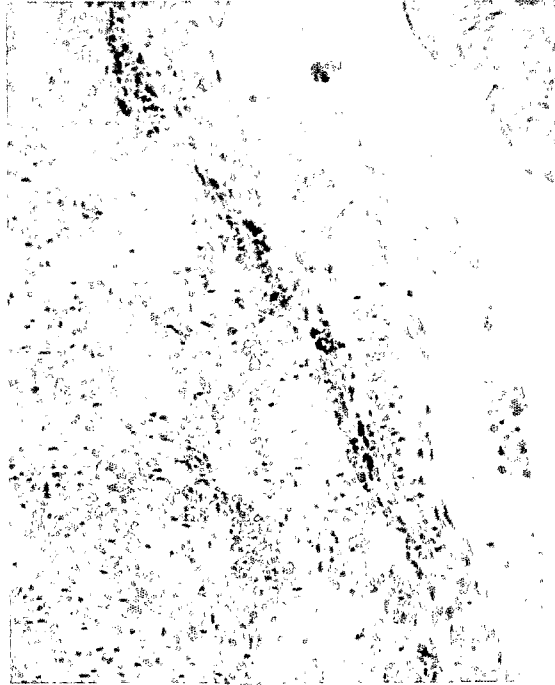
A



B



C



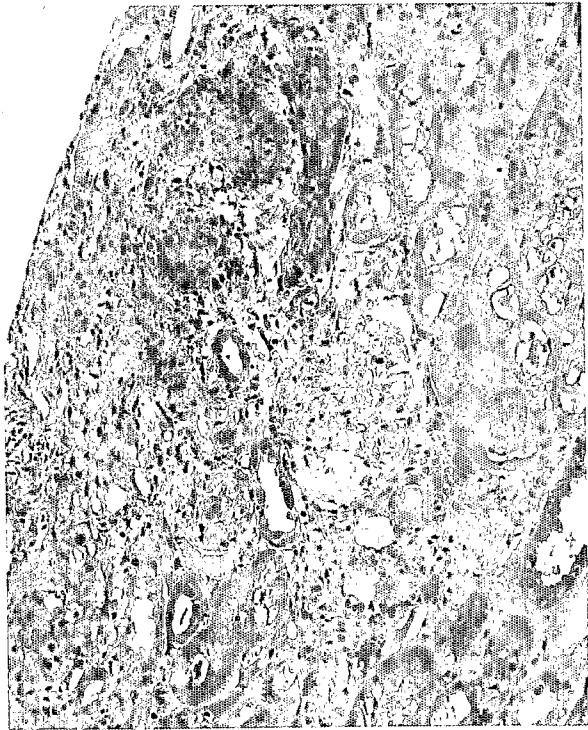
D



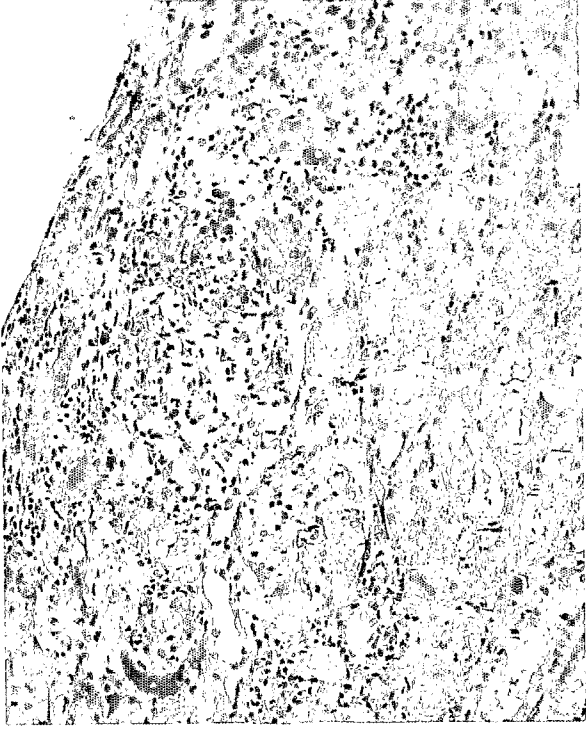
C



D



A



B

図4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53-G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-47255 A (Seikagaku Corp.), 16 February, 2006 (16.02.06),	1-4, 9, 10, 12, 13, 16-28
Y	Full text & US 2005/0089934 A1 & EP 1508805 A1 & CA 2477922 A	5-8, 11, 14, 15
X	JP 2-108969 A (Kaneka Corp.), 20 April, 1990 (20.04.90), Page 3, upper left column, line 12 to upper	1-8, 10-13, 17, 19, 21, 23-28
Y	right column, line 19; page 5, lower left column, line 13 to page 7, upper left column, line 11 (Family: none)	14-16, 18, 20, 22

☒ 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
04 June, 2007 (04.06.07)

Date of mailing of the international search report
19 June, 2007 (19.06.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060176

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-344410 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 03 December, 2003 (03.12.03), Par. Nos. [0014] to [0015], [0020] to [0021] (Family: none)	14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060176

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As a result of a search, it is found that the invention of claim 1 is not novel, because the invention is disclosed in the following documents: JP 2006-47255 A (Seikagaku Corp.) (16 February, 2006 (16.02.06)), the full text; US 2005/0089934 A1; EP 1508805 A1; CA 2477922 A; and the like.

Therefore, the invention of claim 1 has no special technical feature that contributes over the prior art. Thus, the inventions of claims 1-28 shear no common special technical feature.

In conclusion, the inventions of claims 1-28 do not comply with the requirement of unity of invention.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/53-G01N33/577

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	1971-2007年
日本国実用新案登録公報	1996-2007年
日本国登録実用新案公報	1994-2007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 請求の範囲の番号
X Y	JP 2006-47255 A（生化学工業株式会社）2006.02.16, 全文 & US 2005/0089934 A1 & EP 1508805 A1 & CA 2477922 A	1-4, 9, 10, 12, 13, 16-28 5-8, 11, 14, 15
X Y	JP 2-108969 A（鐘淵化学工業株式会社）1990.04.20, 第3頁左上欄第12行～右上欄第19行、第5頁左下欄第13行～第7頁左上欄第11行（ファミリーなし）	1-8, 10-13, 17 , 19, 21, 23-28 14-16, 18, 20, 22

☒ 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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.06.2007

国際調査報告の発送日

19.06.2007

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉田 佳代子

2 J

9 5 1 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-344410 A (積水化学工業株式会社) 2003. 12. 03, 【0 0 1 4】－【0 0 1 5】, 【0 0 2 0】－【0 0 2 1】 (ファミリーなし)	14, 15

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に係る発明は、調査の結果、文献 JP 2006-47255 A（生化学工業株式会社）2006.02.16, 全文 & US 2005/0089934 A1 & EP 1508805 A1 & CA 2477922 A 等の開示されており、新規でないことが明らかになった。

したがって、請求の範囲1に係る発明は、先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴がないため、請求の範囲1－28に係る発明は、共通する特別な技術的特徴を有していない。
よって、請求の範囲1－28に係る発明は、発明の単一性を満たさない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。