

(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6月8日(08.06.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/100910 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/044078
- (22) 国際出願日: 2022年11月30日(30.11.2022)
- (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 2021-194361 2021年11月30日(30.11.2021) JP
- (71) 出願人: 株式会社 L S I メディエンス (LSI MEDIENCE CORPORATION) [JP/JP];
〒1050023 東京都港区芝浦一丁目2番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 淳史 (SATO Atsushi); 〒1050023 東京都港区芝浦一丁目2番3号 株式会社 L S I メディエンス内 Tokyo (JP). 長濱 裕 (NAGAHAMA Yutaka); 〒1050023 東京都港区芝浦一丁目2番3号 株式会社 L S I メディエンス内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 山口 健次郎 (YAMAGUCHI Kenjiro);
〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目67
- 番8号 板橋中央ビル5階 森田・山口国際特許事務所内 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).

(54) Title: METHOD FOR MEASURING ELASTASE 1 IN FECES

(54) 発明の名称: 糞便中エラスターゼ1を測定する方法

(57) Abstract: Provided are a reagent for immunoanalysis of elastase 1 and an immunoanalysis method, by which elastase 1 (E1) present in human fecal samples can be analyzed in a simple manner that enables handling of large volumes of samples without the need for special facilities or equipment, within a short period of time fitting for emergency testing, and which enable quantitative analysis over a wide range of concentrations, i.e., from low to high concentration areas. This analysis method comprises: (a) a step for adding $\alpha 1$ -antitrypsin ($\alpha 1$ AT) to a fecal sample obtained from a subject; (b) a step for incubating the fecal sample to cause reaction between E1 and $\alpha 1$ AT, thereby forming a complex; (c) a step for incubating the fecal sample with a solution containing a carrier on which an immunological partner capable of recognizing the E1- $\alpha 1$ AT complex is immobilized; and (d) a step for analyzing a change caused by the reaction between the E1- $\alpha 1$ AT complex and the immunological partner.

(57) 要約: ヒト糞便試料中に存在するエラスターゼ1 (E1) を特別な施設や器材を必要とすることなく大量の検体に対応できるように簡便で、緊急検査に対応し得るよう短時間で分析可能な、かつ、低濃度領域から高濃度領域まで広範囲にわたって定量的に分析可能な、エラスターゼ1の免疫分析用試薬及び免疫分析方法を提供する。前記分析方法は、(a) 被検者から得た糞便試料に $\alpha 1$ -アンチトリプシン ($\alpha 1$ AT) を添加する工程、(b) 前記糞便試料をインキュベートし、E1と $\alpha 1$ ATを反応させ複合体を形成させる工程、(c) 前記E1- $\alpha 1$ AT複合体を認識する免疫学的パートナーが固相された担体を含む溶液を、前記糞便試料と共にインキュベートする工程、(d) E1- $\alpha 1$ AT複合体と免疫学的パートナーとの反応により生じた変化を分析する工程を含む。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：糞便中エラスターゼ1を測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、糞便中エラスターゼ1の免疫分析用試薬及び免疫分析方法並びに膵疾患の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 膵臓の疾患は各種検査法が発達した現在でも診断の困難な疾患であるといわれている。その理由は、膵臓が腹腔内の最深奥に位置するため、触診、視診、聴診等の古典的診断方法及びX線検査等では疾患の存在又は疾患の性質の把握は困難であること、また膵臓疾患の臨床症状が他の消化器系疾患と類似していること、及び簡便で確実な検査法が無いことなどである（特許文献1）。特に膵癌は5年生存率が極めて短く、予後の改善には早期発見が不可欠と言われている。

[0003] 膵疾患の診断に使用するバイオマーカーとして、膵酵素であるエラスターゼ1（CELA1；Chymotrypsin-like elastase family, member 1、以下、単にE1と称することがある）が測定されている。E1は、セリンプロテアーゼ族に属し、白血球、血小板、及び脾臓などにも存在するエラスターゼとは免疫学的に区別される。E1は他の消化酵素と並行して、膵臓から十二指腸へと分泌されるが、膵管の狭窄や膵炎によって血中に漏出される。血中では、そのほとんどが α 1-アンチトリプシン（以下、単に α 1ATと称することがある）と結合しており、血中濃度の測定が臨床的に有用とされる。特に、膵臓癌（特に膵頭部）に伴う膵炎を反映して、比較的早期から高頻度に異常高値を示すことから、膵臓疾患の診断の指標又は経過観察に有用である（特許文献2）。しかし、侵襲性のある検査であることから積極的に実施されているとは言い難く、血中E1についての報告は多くはない。

[0004] E1分泌と、膵臓のリパーゼ、アミラーゼ及びトリプシン分泌との間には

、線形相関があり、さらに、十二指腸内へのE1分泌は、糞便中のE1濃度と相関を示す（特許文献3）。膵外分泌機能障害は、E1の分泌低下に関係しており、その分泌低下の結果、便中の酵素濃度が低下すると考えられるため、E1は膵外分泌機能不全の診断、真性糖尿病、嚢胞性線維症及び慢性膵炎における膵外分泌機能の監視のためのマーカーとしての使用が報告されている。

[0005] ヒト糞便試料中におけるE1を診断用途として使用する場合、その濃度は、膵液中よりも5～6倍高いといった報告があるものの、その詳細な実態や膵疾患との関連については、血中濃度と糞便中濃度のいずれが最適であるかなど十分に理解されているとは言えないのが現状である。

[0006] 糞便試料中のE1を正確に測定しその実態が把握されていない理由として夾雑物の影響と、糞便試料の取扱いが挙げられる。糞便試料は、通常、水分、食物残渣、腸粘膜細胞、腸内細菌などを含むが、体内に吸収されずに排泄される成分や固体の夾雑物が多いこと、また、排出状態によって、成分や形状、pHなどが多様であるという特有の性質を有する。このため、測定結果に与える影響も原因も様々であり、糞便試料を使用した検査において非特異的反応の抑制等の取扱いに通常の血液検体とは異なる労力を要する。糞便試料の取扱いについては、例えば、Kampanis et al. の乾式抽出法は、ヒト糞便中のエラスターゼ1の測定に関して開示しているが、実際の取扱いが煩雑で大量の検体検査を実施するに際して現実的な使用に向いているとは言い難い（非特許文献1）。また、湿式抽出法の場合、湿った糞便試料又は緩い糞便試料は、乾燥させた後に秤量して、最後に抽出溶液で希釈する必要があるなど、非常に重労働であるうえ、衛生上の問題も生じさせ得る。更に、抽出方法間の基準濃度の適用に関して統一が難しく正確な測定が難しい一因ともなる。

[0007] 糞便を臨床検査の試料として使用した場合、便潜血による影響を考慮しなければならない。便潜血は糞便中に血液が含まれることを意味するが、腸内の出血や裂肛、経血等による影響を受けて正確に測定できないことがある。

一般的に便潜血検査において陽性率は5～10%程度とされているが、便中の共存物質によって生じ得る影響に加えて、被検者によっては便潜血による血液中の物質による影響をも検討しなければならない。

[0008] 上記のような状況から、ヒト糞便試料中におけるE1を正確に測定することができる方法及び試薬の開発が待たれていた。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開昭63-73152号公報

特許文献2：WO2002/079782号公報

特許文献3：特開2017-516088号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ann. Clin. Biochem 46 ; 33-7, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、ヒト糞便試料中に存在するE1を特別な施設や器材を必要とすることなく大量の検体に対応できるよう簡便で、緊急検査に対応し得るよう短時間で分析可能な、かつ、低濃度領域から高濃度領域まで広範囲にわたって定量的に分析可能な、E1の免疫分析用試薬及び免疫分析方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは前記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、 α 1ATを使用してE1と複合体を形成させた状態でヒト糞便試料中のE1を正確に測定可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0013] 本発明は、ヒト糞便試料中のE1をその阻害剤である α 1ATと複合体を形成させて安定化させた状態でE1- α 1AT複合体に対して特異的なモノクローナル抗体を使用した抗原抗体反応により分析する免疫分析方法に関する

る。更に、本発明は、前記免疫分析方法によりE 1を分析する膵疾患の検出方法に関する。

[0014] すなわち、本発明は以下を提供する：

[1] 糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ1の測定方法であって、

(a) 被検者から得た糞便試料に α 1-アンチトリプシンを添加する工程、

(b) 前記糞便試料をインキュベートし、膵臓エラスターゼ1と α 1-アンチトリプシンを反応させ複合体を形成させる工程、

(c) 前記膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン複合体を認識する免疫学的パートナーが固相された担体を含む溶液を、前記糞便試料と共にインキュベートする工程、

(d) 膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン複合体と免疫学的パートナーとの反応により生じた変化を分析する工程、

を含む方法。

[2] 前記工程(a)を、糞便試料を抽出する前処理工程において実施する、[1]の方法。

[3] 前記工程(a)において糞便試料に α 1-アンチトリプシンを添加する前に、糞便試料を希釈する工程を含む、[1]又は[2]の方法。

[4] 前記工程(a)において糞便試料に添加する α 1-アンチトリプシンが、 $20\mu\text{g}$ 以上である、[1]～[3]のいずれかの方法。

[5] 前記工程(b)において反応工程に供される反応液中に含まれる α 1-アンチトリプシン量が 100ng 以上である、[1]～[4]のいずれかの方法。

[6] [1]～[5]のいずれかの測定方法により膵臓エラスターゼ1を分析する、膵臓疾患の検出を補助する方法。

[7] 前記工程(d)において実施する分析が、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィー、ウェスタンブロットティング法、ラテックス凝集法、免疫比濁法のいずれかである、[1]～[6]のいずれかの方法。

[8] 膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン複合体を認識する免疫学的パートナーを担持した固相担体、及び α 1-アンチトリプシンを含む、免疫学的測定用試薬。

[9] 反応工程に供される反応液中に含まれる α 1-アンチトリプシンが100ngである、[8]の免疫学的測定用試薬。

[10] 膵臓エラスターゼ1又は膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン測定用試薬に供する糞便試料の前処理工程に使用される、 α 1-アンチトリプシンを含む前処理用抽出液。

[11] 前記 α 1-アンチトリプシンが41~975ng含有する、[10]の前処理用抽出液。

発明の効果

[0015] 本発明の方法である、ヒト糞便試料中に存在するE1を測定することで、簡便に膵疾患の検出の補助を行うことが可能となる。ヒト糞便試料中のE1を正確に測定することによって、膵外分泌機能の監視のためのマーカーとしての使用が可能となり、治療方針決定などの有用性が期待される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] α 1AT溶液添加濃度に対するE1濃度測定結果を示す図である。

[図2]E1サンプルの調製理論値に対する、 α 1AT溶液濃度ごとの回収率を示す図である。

[図3]複数の測定試薬を用いて、 α 1ATを添加した場合の測定値を比較した図である。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、ヒト糞便試料中に存在するE1を α 1ATと複合体を形成させた状態で測定する免疫分析方法に関する。また、本発明は、ヒト糞便試料中に存在するE1- α 1AT複合体を測定する免疫学的分析試薬に関する。

[0018] 以下において、ヒト糞便試料中に存在するE1を測定する方法の実施態様について詳細に説明するが、利用方法の態様はこれに限定されるものではない。例えば、本発明には、

糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ 1 を測定する、膵臓疾患の検出方法 ;

糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ 1 を測定する、膵臓疾患の検出を補助する方法 ;

膵臓疾患を検出するために、糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ 1 を測定する方法 ;

糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ 1 を測定する、膵臓疾患の *in vitro* 検出方法 ;

膵臓エラスターゼ 1- α 1-アンチトリプシン複合体を認識する免疫学的パートナーの、膵臓疾患の検出用キットの製造における使用 ;

膵臓疾患の検出に必要な情報を提供するために、糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ 1 を測定する方法

が含まれる。

なお、本明細書における「測定」（広義）には、分析対象物の量を定量的または半定量的に決定する「測定」（狭義）に加えて、分析対象物の存在の有無を判定する「検出」の意味が含まれるものとする。

[0019] 本発明の測定に用いる試料としては、ヒト由来糞便試料、腸管洗浄液等を使用することができる。糞便試料は、糞便由来の試料である限りその具体的な形態は特に制限されない。例えば、硬さ（硬便、普通便、軟便、下痢便、水様便など）等の形状や水分の含有量などは問わず使用することができる。腸管洗浄液とは腸管内腔を経て回収されたものを意味し、経口で摂取された腸管洗浄剤が、腸管内腔を経て回収された経口腸管洗浄液をも含む。腸管洗浄液は、対象から排泄されたものを回収してもよいし、対象の直腸に貯留している排泄寸前のものを回収してもよい。なお、本明細書において、測定に用いる「試料」の意味で用語「糞便試料」を用いる場合（例えば、請求項 1）には、糞便試料だけでなく、腸管洗浄液等を含むものとする。

[0020] 糞便試料は、前処理として E 1 の抽出操作や不溶性画分の除去を行う一般的な手法を採用して使用することができる。抽出操作に用いる抽出液には、

生理食塩水を使用することができるが、Good's bufferやリン酸塩等の緩衝剤、BSA (Bovine Serum Albumin) 等のたんぱく質や界面活性剤を含んだ溶液を使用してよい。このとき緩衝液の濃度・pH、界面活性剤やBSAの濃度等の抽出液の各種条件は、当業者であれば適宜設定して使用することができる。

[0021] 抽出操作は、前記抽出液を添加して糞便試料を十分に分散させてE1を抽出液に溶出させる。この時、必要に応じてホモジネーターやボルテックスミキサーを用いても良い。よりE1を溶出させるため、糞便試料を抽出液に分散した後30分から1時間程度静置してもよい。

[0022] 不溶性画分の除去には遠心分離やフィルターろ過を用いることができる。遠心分離条件やろ過に使用するフィルターメンブレン等は、前処理用に使用可能なものであれば特に制限されず、使用することができる。例えばフィルターを構成する担体としては、例えば、ポリプロピレン (PP)、ポリフッ化ビリニデン (PVDF)、ガラス繊維 (GF)、ポリエーテルスルホン (PES)、ナイロン (NY)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、再生セルロース (RC)、酢酸セルロース (CA)、メタクリレートブタジエンスチレン (MBS) を含むことができる。また、これらの構成要素が複数組み合わせられて構成されたハイブリッド型であってもよい。

[0023] 以上の操作は一般的な採便キットを用いて行うこともできる。採便キットの例として、便潜血のための採便キットであるOC-ヘモキャッチ (登録商標) S (栄研化学社製) を使用してもよい。また前処理後の糞便試料は冷暗所または冷凍で保存することが好ましい。より好ましくは超低温冷凍庫 (-85~-40℃) を用いた保存であり、測定の際には凍結した糞便試料を融解して使用することができる。

[0024] これらの抽出操作に使用する抽出液に、後述する α 1ATを添加させるようにしてもよい。

[0025] 本発明のE1を測定するための方法は、特に制限されないが、E1を測定できる免疫学的パートナーを使用することが可能である。免疫学的にタンパ

ク質の検出を行う方法としては、例えば、酵素免疫測定法（ELISA法）、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィー等の標識抗体を用いた免疫測定法、あるいは、ウェスタンブロットティング法、ラテックス凝集法、免疫比濁法等のそれ自体公知の通常用いられる方法であればいかなる方法でも用い得る。

[0026] 本発明において用いる用語「免疫学的パートナー」とは、測定対象物質と免疫学的に特異的に結合するパートナー、例えば、各種タンパク質、多糖類、脂質、核酸、ハプテン及びそれらの複合体又は断片等と特異的に結合することのできる免疫学的物質（すなわち、抗原又は抗体）を意味する。免疫学的パートナーが抗体である場合、使用する抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、それらを酵素などで処理した断片でもよい。抗体の断片とは、抗体の抗原結合領域またはその可変領域を含む機能性の断片であることが好ましく、例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ などが挙げられる。 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ とは、イムノグロブリンを、蛋白分解酵素（例えば、ペプシンまたはパパイン等）で処理することにより製造されるもので、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体断片である。また、免疫学的パートナーは複数種類を組み合わせ使用してもよい。

[0027] 以下、例として、免疫学的パートナーとして抗体を使用する場合について記載する。本発明の方法において、 $E 1 - \alpha 1 A T$ の複合体を測定対象物質として測定を実施するため、使用する抗体は、 $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体を認識することができる抗体であればよく、 $E 1$ を特異的に認識する抗 $E 1$ 抗体であってもよいし、 $E 1 - \alpha 1 A T$ との複合体を特異的に認識する抗 $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体抗体であってもよい。抗 $E 1$ 抗体は、 $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体を認識しない抗体でなければ、適宜選択して使用することができる。使用する抗体の数は、 $E 1$ を特異的に認識する抗体1種類のみであってもよいし、 $E 1$ を特異的に認識する第1の抗体、第1の抗体とは異なる $E 1$ を認識する第2の抗体の組合せであってもよい。また、 $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体を特異的に

認識する抗体 1 種類のみであってもよいし、 $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体を特異的に認識する第 1 の抗体、第 1 の抗体とは異なる $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体を認識する第 2 の抗体の組合せであってもよい。また、これらを組み合わせて使用してもよい（以下、これらを総称して「抗 E 1 抗体」と称することがある）。特異的に結合する部位が異なる抗 E 1 抗体である限り、特に限定されるものではない。

[0028] 抗 E 1 抗体は、例えば、 $E 1$ または $E 1 - \alpha 1 A T$ 複合体のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペプチドを免疫原として作製することができる。抗原ポリペプチドは、公知の方法に従って化学的に合成された合成ポリペプチドでも、遺伝子組み換え等により産生されたものでもよい。

[0029] 本発明に用いる抗体は、固相担体などの不溶性担体上に担持された固定化抗体として使用したり、標識物質で標識した標識抗体として使用したりすることができる。

[0030] 固定化抗体とは、不溶性担体に物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある抗体を言う。これらの固定化抗体は、試料中に含まれる測定対象物質を検出または定量するために用いることができる。抗体を担持させるのに使用できる不溶性担体としては、例えば、ラテックス、ゴム、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）、シリコンなどのポリマー材料；アガロース；ゼラチン；赤血球；シリカゲル、ガラス、不活性アルミナ、磁性体などの無機材料などが挙げられる。これらの 1 種又は 2 種以上を組み合わせてもよい。

[0031] 本発明の方法においては、例えば、抗 E 1 抗体をラテックス粒子に担持して実施することができる。その場合に使用することができるラテックス粒子は、通常の免疫分析用試薬に使用可能なラテックス粒子である限り、特に限

定されるものではなく、例えば、ポリスチレン、又はスチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体などを挙げることができる。ラテックス粒子の平均粒径は、測定対象物の検出濃度又は測定機器によって適宜選択することができ、例えば、0.05~0.5 μm の粒径を有する粒子を使用することができる。異なる粒径のラテックス粒子を使用することにより、特に低値から高値までを正確に分析することができ好ましい。特に、高値側では、高濃度エラストマーゼ1であっても凝集能の低下による誤認（過度な高濃度によって凝集能が低下し、見かけ上凝集が減少してしまい、実際の値より少ない測定結果になってしまう、いわゆるプロゾン現象）を防ぐことができるため、好ましい。なお、本発明におけるラテックス粒子の平均粒径とは、電子顕微鏡により測定した値を意味する。

[0032] 抗E1抗体をラテックス粒子に固相する場合、例えば、E1またはE1- α 1AT複合体に対して異なる特異性を有する2種類の抗E1抗体を担持した異なる粒径の2種類のラテックス粒子、好ましくは、(1) E1またはE1- α 1AT複合体に対する第1の抗E1抗体を担持した第1のラテックス粒子と、(2) 前記第1抗E1抗体と異なる特異性を有するE1またはE1- α 1AT複合体に対する第2の抗E1抗体を担持した、前記第1ラテックス粒子と異なる粒径の第2のラテックス粒子とを少なくとも含むようにしてよい。

[0033] 酵素免疫測定法（ELISA法）、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィー等の標識抗体を用いた免疫測定法の場合、標識物質を使用することが好ましい。標識物質は、通常の免疫学的測定法において用い得る標識物質であれば特に限定されず、例えば、酵素、蛍光物質、放射性同位元素、不溶性粒状物質などが挙げられる。該標識用の酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼなどが挙げられる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、グリーン蛍光タンパク質（GFP）、ルシフェリンなどが

挙げられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P などが挙げられる。

[0034] また、標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質を用いて発光、蛍光、又は発色反応を行うことにより、標識物質を測定できる。例えば、酵素がアルカリホスファターゼである場合、基質としては、CDP-star（登録商標）（2-クロロ-5-（4-メトキシスピロ{1,2-ジオキサタン-3,2'-（5'-クロロ）-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル）-1-フェニルホスフェート・二ナトリウム）、CSPD（登録商標）（3-（4-メトキシスピロ{1,2-ジオキサタン-3,2-（5'-クロロ）トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル）フェニルリン酸2ナトリウム）、AMPD（登録商標）（アダマンチルメトキシフェニルホスホリルジオキサセタン）、APS-5などの化学発光基質；4-メチルウンベリフェリルフォスフェート（4-methylumbelliferyl phosphate）などの蛍光基質；p-ニトロフェニルホスフェート、BCIP（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸）、NBT（4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリド）、INT（ヨードニトロテトラゾリウム）などの発色基質を用いることができる。

[0035] 本発明の免疫学的測定方法は、1液もしくは2液以上から構成される免疫学的測定試薬を用いて実施することができる。

本発明を実施するための試薬が1液から構成される場合、例えば、少なくとも免疫学的複合体を形成するための免疫学的パートナーを担持させた不溶性担体を含む反応試薬からなることができる。公知の方法に従い、試料を試薬と反応させ、シグナルを検出する。

[0036] 糞便試料中に存在するE1を直接正確に測定することは難しいため、本発明の測定では、E1と $\alpha 1\text{AT}$ とで複合体を形成させた状態で測定する。

本発明で用いる $\alpha 1\text{AT}$ は最終的に試料と混和される態様であればよく、前処理工程に使用される前処理試薬に含有されていても良いし、安定化試薬

に含有されていても良いし、前述の不溶性担体を含む試薬に含有されていても良い。本発明では糞便試料中に存在するE1を正確に測定するためには、一定濃度範囲の $\alpha 1 A T$ を試料中又は試薬に添加することが重要であることを見出した。

[0037] 本発明で用いる $\alpha 1 A T$ は、試料と試薬とが反応する前に、試料に添加されても良いし、試薬に添加された状態で供給されてもよい。測定対象物質であるE1- $\alpha 1 A T$ 複合体と免疫反応が行われる反応液中に含まれていればよく、例えば、測定試料をあらかじめ希釈する希釈液、不溶性担体に結合した固相化した抗E1抗体と測定試料を混合し測定対象物質であるE1- $\alpha 1 A T$ 複合体と固相化した抗E1抗体と反応させる試薬、標識抗体と測定サンプルと混合反応し標識抗体と測定対象物質であるE1- $\alpha 1 A T$ 複合体と反応させる試薬のいずれか、又はこれらそれぞれの試薬に添加してもよい。

[0038] 使用する $\alpha 1 A T$ は、ヒト膵臓由来エラスターゼ1と複合体を形成するものであればよく、好ましくは、ヒト由来 $\alpha 1 A T$ が使用される。ヒト由来 $\alpha 1 A T$ は血液中に存在する $\alpha 1 A T$ を精製したものであってもよいし、培養細胞等を使用して組換え発現させたものであってもよく、当業者であれば適宜選択して使用することができる。

[0039] E1と複合体を形成させるために添加される $\alpha 1 A T$ の量は、E1と複合体を形成できる十分量が添加されることが好ましい。添加される下限量は20 μg 以上あればよく、上限量は試料中に含まれるE1の量に応じて適宜設定してよい。例えば、下限は41 μg 以上が好ましく、49 μg 以上がより好ましい。上限は975 μg 以下が好ましい。なお、前記下限および上限は適宜組み合わせることができる。

[0040] 反応液中に含まれる $\alpha 1 A T$ 量の下限としては、E1と複合体を形成できる十分量が存在し、 $\alpha 1 A T$ 無添加時に比べて反応性が確認される濃度において、適宜設定してよく、100ng以上あればよい。例えば、514ng以上が好ましく、609ng以上がより好ましい。また、反応液中に含まれる $\alpha 1 A T$ 量の上限は、12188ng以下が好ましく、6094ng以下

がより好ましく、5143 ng以下が更に好ましい。当業者であれば糞便試料中に含まれると想定されるE1濃度を考慮の上、測定試薬毎に最適な添加量を決定することができる。なお、前記下限および上限は適宜組み合わせることができる。

[0041] また、測定に用いる試薬の測定可能範囲に応じてE1と α 1ATの重量比によって添加する量を決定してもよい。その場合、例えば、E1重量に対して6~2400倍の重量の α 1ATを添加することでE1と α 1ATとの複合体を十分に形成させることが可能となり、糞便試料中のE1測定を正確に実施することができる。

[0042] 本発明の試薬が2液以上から構成される場合、例えば、安定化試薬と、少なくとも免疫学的複合体を形成するための抗体あるいは抗原を担持させた不溶性担体を含む反応試薬からなることができる。安定化試薬は、試料を適当な濃度に希釈したり、前処理を行ったりする試薬で、公知の方法に従って調製することができる。公知の方法に従い、試料を安定化試薬と反応させ、その後、反応試薬と反応させ、シグナルを検出する。本発明で用いる α 1ATは、試料と反応試薬とが反応する前に、安定化試薬及び／又は反応試薬に添加されていると良いが、好ましくは、該安定化試薬及び／又は該反応試薬に添加された状態で供給することができる。

[0043] 血中に存在するE1は、その9割近くが α 1ATと複合体を形成していることが知られており、E1- α 1AT複合体を測定することでE1の測定とみなすことで臨床検査に用いられている。 α 1ATが属するセルピンスーパーファミリーのセリンプロテアーゼ阻害剤は、プロテアーゼ分子の活性中心のセリン残基と共有結合でつながって、ループインサクションに伴って、セルピン分子に強く引き寄せられることにより活性中心近傍の構造が壊れ、加水分解によるプロテアーゼの解離が起こらなくなるとされる。このように、E1と α 1ATとは共有結合によってつながって容易に解離しないと考えられる。糞便試料中においてもE1と α 1ATとは複合体を形成している状態にあると考えられていたところ、糞便試料中に α 1ATを添加することによ

ってE 1が測定可能となったことは意外な効果であった。

- [0044] 本発明のE 1測定方法を膵臓疾患の検出の補助を行う方法として、判定用閾値（カットオフ値）を算出するためのオリジナルデータ又は統計処理データなどとしては、糞便試料中のE 1濃度と各種疾患との相関を示す統計データ等から算出された判定用閾値（カットオフ値）を適宜使用して実施してもよい。当業者であれば膵疾患との関連性からカットオフ値を適宜設定して使用することができる。例えば、これらのカットオフ値を算出するための方法としては、例えば、E 1濃度からROC曲線（Receiver Operating Characteristic Curve）を作成し解析を行って、診断の感度と特異度が有効な範囲からカットオフ値を設定することができる。
- [0045] また、測定されたE 1濃度をリスク評価のための値として使用することも可能である。膵臓の炎症や膵臓癌などが投薬等の治療によって改善しているかどうかを判定するための指標とすることが可能である。例えば、E 1濃度が高値を持続する又は増加するような場合には治療方針を再検討する必要性を示唆する。
- [0046] 本発明の試薬は、抗E 1抗体担持ラテックス粒子以外にも、ラテックス試薬に添加可能な種々の添加剤、例えば、緩衝液、凝集促進剤（例えば、ポリエチレングリコール等の水溶性高分子）、非特異的反応抑制剤（例えば、アルカリ金属塩又は糖類等）、又はタンパク質〔例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）〕等を更に含有させてよい。
- [0047] 前記緩衝液としては、pH 6～8.5に緩衝能を有する緩衝液が好ましい。pH 6～8.5の緩衝液は、従来周知の緩衝液であり、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、又はグッド緩衝液等が挙げられる。
- [0048] 本発明の試薬において、例えば、トリス緩衝液を用いる場合には、トリス緩衝液中のトリス濃度は、それを使用する際に、ラテックス凝集反応を実施する系において、以下に説明する所定のトリス濃度を達成することができる濃度である限り、特に限定されるものではないが、0.1～0.5 mol /

Lであることが好ましい。

[0049] ラテックス凝集反応を実施する系におけるトリス濃度は、ラテックス粒子の自己凝集反応を抑制することのできる濃度である限り、特に限定されるものではなく、共存する塩、タンパク質、及び／又は糖類等の添加物の濃度によって適宜選択することができる。ラテックス凝集反応を実施する系におけるトリス濃度は、 $0.1 \sim 0.5 \text{ mol/L}$ であることが好ましく、 $0.2 \sim 0.3 \text{ mol/L}$ であることがより好ましい。 0.1 mol/L 未満であると、ラテックス粒子が自己凝集反応を起こすことがあり、 0.5 mol/L を越えると、抗原抗体反応を抑制してしまい、検出感度が悪くなることもある。なお、トリス濃度の前記下限および上限は、例えば、 $0.1 \sim 0.3 \text{ mol/L}$ のように、適宜組み合わせることができる。

[0050] また、緩衝液のpHは、 $6 \sim 8.5$ であることが好ましい。pHがこの範囲外であると、ラテックス粒子が自己凝集したり、測定精度の面で不都合が生じることがある。

[0051] 本発明の試薬が、pH $6 \sim 8.5$ の緩衝液を含有する場合には、その使用時におけるラテックス凝集反応の際に、抗体を担持したそれぞれのラテックス粒子、pH $6 \sim 8.5$ の緩衝液、及び被検試料が接触することができる限り、試薬中における各抗E1抗体担持ラテックス粒子及びpH $6 \sim 8.5$ の緩衝液の状態は特に限定されるものではない。すなわち、この場合、本発明の試薬の形態は、特に限定されるものではなく、例えば、各抗E1抗体担持ラテックス粒子とpH $6 \sim 8.5$ の緩衝液との両方を含む1液系の試薬であることもできるし、あるいは、各抗E1抗体担持ラテックス粒子を含む第1試薬と、pH $6 \sim 8.5$ の緩衝液である第2試薬とで構成される2液系の試薬であることもできる。

本発明の測定方法では、好ましくはpH $6 \sim 8.5$ の条件下にて、抗体を担持したそれぞれのラテックス粒子と、被検試料とを接触させることにより、抗原抗体反応及びそれによって生じるラテックス凝集反応を行わせ、その凝集程度を分析することにより、被検試料中のE1を分析することができる

- 。
- [0052] 本発明の測定方法において、pH 6～8.5の緩衝液を用いてpH 6～8.5の条件下でラテックス凝集反応を実施する場合には、各抗E1抗体担持ラテックス粒子と、pH 6～8.5の緩衝液と、被検試料とを接触させる際には、pH 6～8.5の緩衝液不在下で抗原抗体反応が進行することがない（すなわち、各抗E1抗体担持ラテックス粒子と被検試料とを先に接触させない）限り、その接触順序は特に限定されるものではない。例えば、各抗E1抗体担持ラテックス粒子とpH 6～8.5の緩衝液とを予め接触させておき、その混合物と被検試料とを接触させることもできるし、あるいは、被検試料とpH 6～8.5の緩衝液とを予め接触させておき、その混合物と各抗E1抗体担持ラテックス粒子とを接触させることもできる。
- [0053] 本発明の測定方法における抗原抗体反応の条件は、通常の免疫学的ラテックス比濁分析方法の実施条件と同様であることができる。例えば、反応のpHは、6～8.5で実施することが好ましい。反応温度は0～50℃であることが好ましく、20～40℃がより好ましい。反応時間は、適宜決定することができる。例えば、汎用自動分析機では10～15分間で測定を完了することができる。なお、反応温度の前記下限および上限は、例えば、0～40℃のように、適宜組み合わせることができる。
- [0054] 抗原抗体反応により生じた凝集の程度は、公知の分析方法、例えば、光学的分析方法により分析することができる。前記光学的分析方法としては、例えば、反応液に光を照射して散乱光又は透過光を分析する方法を挙げることができ、より具体的には、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度を測定する光学機器を用いて分析を行うことができる。好ましい測定波長は300～800nmである。前記光学機器を用いた分析では、公知の方法に従って、用いるラテックス粒子の大きさ及び／又は濃度の選択、並びに反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度の増加又は減少を測定することにより実施することができる。また、これらの方法を併用することも可能である。

[0055] 本発明による膵臓疾患の検出方法では、被検試料として血清又は血漿を用い、本発明の測定方法により糞便試料中のE1を分析することによって、膵臓疾患（特には急性膵炎）の検出（診断）を行うことができる。

[0056] これらのことから、本発明を使用してヒト糞便試料中に存在するE1を迅速かつ正確に測定することは、膵臓疾患の診断の補助のみならず、治療経過のモニタリングにおいて、より信頼性の高い測定値を提供することとなり、極めて有用な情報を提供することが可能となる。

実施例

[0057] 以下、実施例によっ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。

[0058] [実施例1：便抽出溶液への $\alpha 1$ AT添加実験]

糞便試料中のE1測定試薬としてイアトロIRE111（以下、IRE1、LSIメディエンス社製）を使用し、便抽出溶液へ $\alpha 1$ アンチトリプシン添加することで、イアトロIRE111の測定値が得られるかを確認した。

[0059] ヒト血漿由来 $\alpha 1$ ATの精製品（シグマアルドリッチ社製）をTrisバッファーに溶解し、 $\alpha 1$ ATの吸光係数による換算で0、16、130、325、813、3250、6500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となる $\alpha 1$ AT溶液を調製した。150 μL のヒト便の抽出溶液（以下、便抽出溶液）に、調製した各濃度の $\alpha 1$ AT溶液150 μL を加えて $\alpha 1$ AT添加便抽出溶液を調製した。IRE1試薬の測定範囲に入れるため、 $\alpha 1$ AT添加便抽出溶液をさらに80倍に希釈した。希釈には市販のD-Dダイマー希釈液（LSIメディエンス社製）を用いた。80倍に希釈した $\alpha 1$ AT添加便抽出溶液を、7180型日立自動分析装置（以下、H7180、日立ハイテク社製）に搭載したIRE1試薬を用いて、多重度2で測定した。

[0060] 図1に、便抽出溶液に添加した $\alpha 1$ AT溶液の濃度に対するIRE1試薬の測定結果を示した。便抽出溶液に $\alpha 1$ ATを添加することでIRE1試薬の測定値が増加することが確認でき、 $\alpha 1$ AT溶液の濃度が325～3250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の時に最大を示した。実験条件のうちで最大濃度である650

0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、測定値が3250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に比べ7.5%の低下が見られたものの、E1測定に使用するためには十分な回収率であることが確認された。この時測定工程に供された試料中に添加された各 $\alpha 1\text{AT}$ 量は、49、122、488、975 μg であるが、80倍希釈されて測定に供されているため、実質609、1523、6094、12188 ng となる。このことから、 $\alpha 1\text{AT}$ 添加を添加することで、便抽出検体でIRE1試薬の測定値が得られることを確認した。

[0061] [実施例2： $\alpha 1\text{AT}$ 溶液濃度の検討]

IRE1試薬の測定レンジである80~4000 ng/dL における、添加する $\alpha 1\text{AT}$ の至適濃度を検討し、今後の実験で用いる $\alpha 1\text{AT}$ 溶液濃度を決めた。

ヒト腭液より精製したエラスターゼ1を、リン酸バッファーを用いて、E1の吸光係数による換算で14、57、142、285、571 ng/mL の濃度となるE1サンプルを調製した。 $\alpha 1\text{AT}$ も同様にリン酸バッファーを用いて、 $\alpha 1\text{AT}$ の吸光係数による換算で171、875、3429、8571、17143、34268 ng/mL の濃度となる $\alpha 1\text{AT}$ 溶液を調製した。150 μL のE1サンプルに $\alpha 1\text{AT}$ 溶液150 μL を加えて、E1- $\alpha 1\text{AT}$ 混合溶液を調製した。

H7180にIRE1試薬を搭載し、E1- $\alpha 1\text{AT}$ 混合溶液を多重度3で測定した。571 ng/mL のE1サンプル1と34268 ng/mL の $\alpha 1\text{AT}$ 溶液1の混合溶液の測定値をE1サンプル1の調製理論値（3778 ng/dL ）とした。各E1サンプルの調製理論値は、E1サンプル1からの希釈倍率から設定した。

[0062] 図2に、各E1サンプルの調製理論値に対する、 $\alpha 1\text{AT}$ 溶液濃度ごとの回収率を示した。調製理論値が378~3778 ng/dL であるE1サンプル1~4では、 $\alpha 1\text{AT}$ 濃度が3429~34286 ng/mL の $\alpha 1\text{AT}$ 溶液1~4で90%以上の回収率が得られた。調製理論値が94 ng/dL であるE1サンプル5では、 $\alpha 1\text{AT}$ 濃度が3429~17143 ng/mL

mLの $\alpha 1$ AT溶液2~4で最大の87.6%を示し、34286 ng/mL $\alpha 1$ AT溶液では69.7%の回収率であり、E1測定としては十分な回収率であることが確認された。IRE1試薬の測定レンジである80~4000 ng/dLとなるE1濃度を対象とした時、 $\alpha 1$ AT濃度3429~17143 ng/mLが、調製理論値に対する回収率として良好である。具体的には、E1の回収率が70%以上となる場合の $\alpha 1$ ATの添加量は、それぞれ514、1286、2571、5143 ngであった。そのため、以降の実験では暫定的に8600 ng/mLを $\alpha 1$ AT溶液の濃度として使用し、1290 ngが測定に供される試料中に含まれるようにした。

[0063] [実施例3：IRE1試薬とfPELA試薬の比較実験]

IRE1試薬を用いて $\alpha 1$ ATを添加する評価系と既存の便中エラスターゼ1LTX試薬の反応性を比較した。

既存の便中E1測定試薬としてfPELA turbo (以下、fPELA、BUHLMANN社製)を使用した。

[0064] ヒト腭液より精製したE1と、リン酸バッファーを用いて、E1の吸光係数による換算で14、57、142、285、571 ng/mLの濃度となるE1サンプルを調製した。 $\alpha 1$ ATも同様にリン酸バッファーを用いて、 $\alpha 1$ ATの吸光係数による換算で8600 ng/mLの濃度となる $\alpha 1$ AT溶液を調製した。調製した各E1溶液200 μ Lと $\alpha 1$ AT溶液200 μ Lを混合して、E1- $\alpha 1$ AT混合溶液を調製した。

自動分析装置cobas c501 (以下、c501、Roche社製)に搭載したfPELA試薬を用いて、各E1サンプルとE1- $\alpha 1$ AT混合溶液、IRE1試薬の標準品、IRE1試薬のコントロールを多重度2で測定した。

H7180に搭載したIRE1試薬を用いて、E1- $\alpha 1$ AT混合溶液を多重度2で測定した。

[0065] 図3に、IRE1の値に対する各E1サンプルとE1- $\alpha 1$ AT混合溶液、IRE1試薬の標準品、IRE1試薬のコントロールのfPELA試薬の

測定値をプロットした。IRE1 試薬における E1- α 1AT 混合溶液の測定値と、fPELA 試薬で E1 サンプルを測定した時の値は濃度依存的に良好な線形が得られた。fPELA 試薬では、E1- α 1AT 混合溶液を測定すると、E1 溶液をそのまま測定した時よりも測定値が低下した。fPELA 試薬の E1- α 1AT 混合溶液の測定値は、IRE1 試薬の標準品やコントロールを測定した値に近しかった。IRE1 試薬の標準品およびコントロールでは E1 は α 1AT との複合体として含まれており、fPELA 試薬は α 1AT の影響を受けることがわかった。糞便試料の場合には便潜血が見られる検体である場合があり、血中の α 1AT が混入して測定値に影響を与える可能性があるが、E1- α 1AT 複合体を認識する試薬を使用すると、便潜血が見られる検体でも測定値に影響を受けないことが確認された。

E1- α 1AT 複合体を認識する IRE1 試薬の測定値と、E1 を認識して測定する fPELA 試薬の測定値とが相関することから、糞便試料に α 1AT を添加して測定して得られた結果が、信頼性のあるデータであることが確認された。

産業上の利用可能性

[0066] 本発明の測定試薬及び測定方法を使用することにより、測定妨害物質の影響を受けることなく糞便試料中の E1 の濃度測定が可能となり、膵臓疾患の診断の補助の使用することができる。

また、健常人糞便試料中の E1 濃度が正確に把握できることから、膵臓疾患の診断だけでなく、適切な治療法の選択や治療効果のモニタリング、予後予測として使用することによって、信頼性の高い測定値を提供することになり、診療に極めて有用な情報を提供できる。

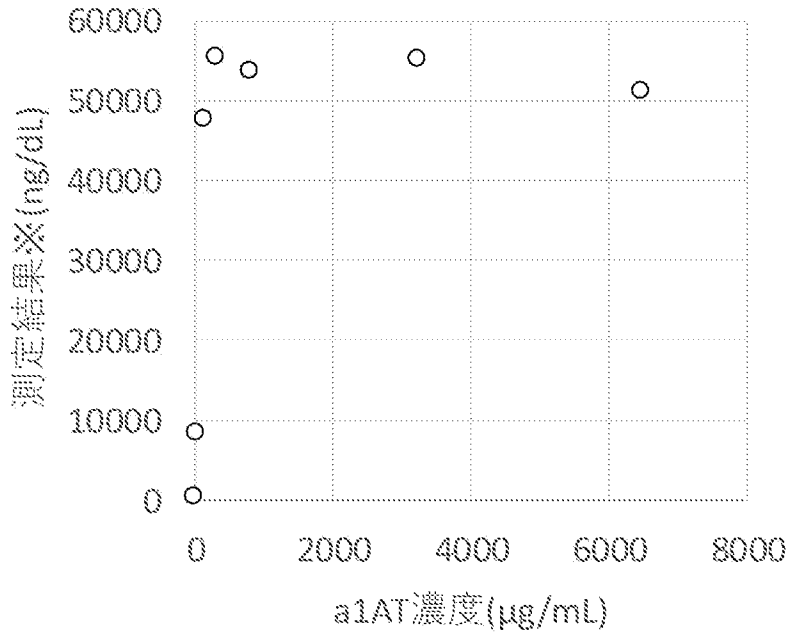
請求の範囲

- [請求項1] 糞便試料中に存在する膵臓エラスターゼ1の測定方法であって、
- (a) 被検者から得た糞便試料に α 1-アンチトリプシンを添加する工程、
 - (b) 前記糞便試料をインキュベートし、膵臓エラスターゼ1と α 1-アンチトリプシンを反応させ複合体を形成させる工程、
 - (c) 前記膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン複合体を認識する免疫学的パートナーが固相された担体を含む溶液を、前記糞便試料と共にインキュベートする工程、
 - (d) 膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン複合体と免疫学的パートナーとの反応により生じた変化を分析する工程、を含む方法。
- [請求項2] 前記工程(a)を、糞便試料を抽出する前処理工程において実施する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程(a)において糞便試料に α 1-アンチトリプシンを添加する前に、糞便試料を希釈する工程を含む、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記工程(a)において糞便試料に添加する α 1-アンチトリプシンが、 $20\mu\text{g}$ 以上である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程(b)において反応工程に供される反応液中に含まれる α 1-アンチトリプシン量が 100ng 以上である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか一項に記載の測定方法により膵臓エラスターゼ1を分析する、膵臓疾患の検出を補助する方法。
- [請求項7] 前記工程(d)において実施する分析が、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィー、ウェスタンブロットティング法、ラテックス凝集法、

免疫比濁法のいずれかである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

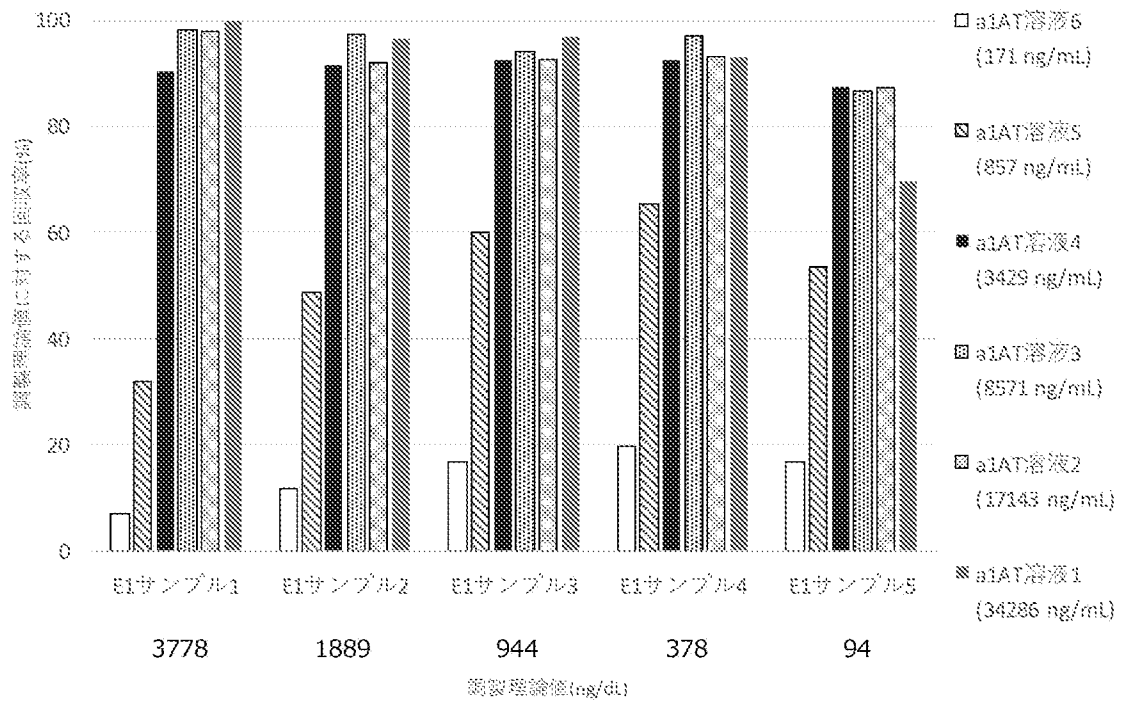
- [請求項8] 膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン複合体を認識する免疫学的パートナーを担持した固相担体、及び α 1-アンチトリプシンを含む、免疫学的測定用試薬。
- [請求項9] 反応工程に供される反応液中に含まれる α 1-アンチトリプシンが100ngである、請求項8に記載の免疫学的測定用試薬。
- [請求項10] 膵臓エラスターゼ1又は膵臓エラスターゼ1- α 1-アンチトリプシン測定用試薬に供する糞便試料の前処理工程に使用される、 α 1-アンチトリプシンを含む前処理用抽出液。
- [請求項11] 前記 α 1-アンチトリプシンが41～975ng含有する、請求項10に記載の前処理用抽出液。

[図1]

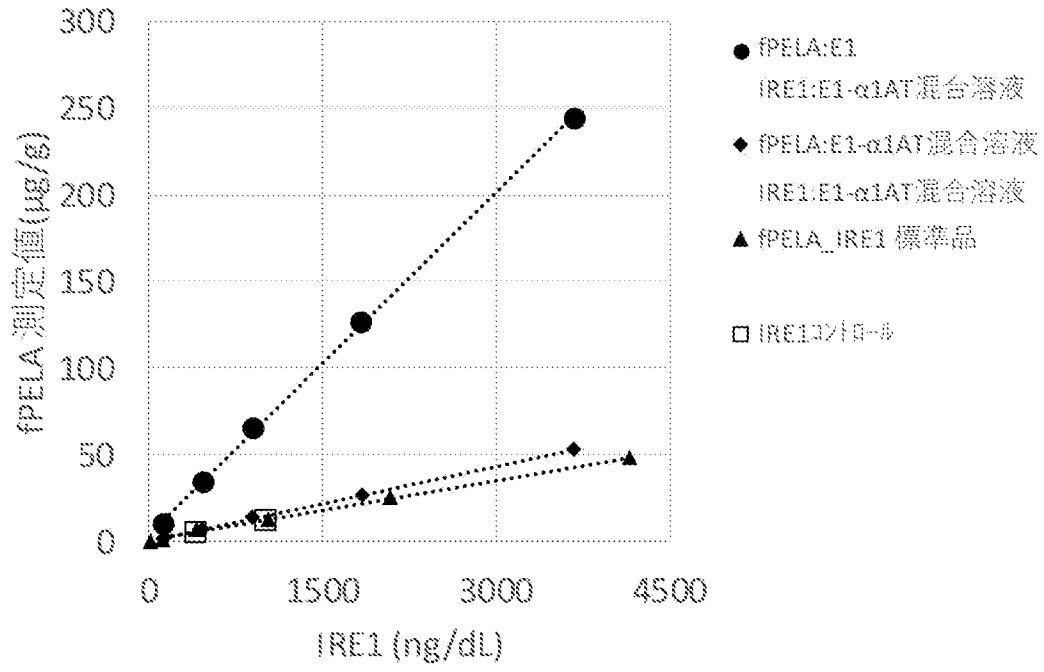


※測定値に80倍かけたもの

[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/044078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/53</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/543</i> (2006.01)i FI: G01N33/53 D; G01N33/543 501A; G01N33/543 575; G01N33/543 581A; G01N33/543 545A		
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; G01N33/543		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 63-073152 A (DAINABOT CO LTD) 02 April 1988 (1988-04-02) entire text, all drawings, in particular, see claims, p. 4, lower left column, line 16 to p. 5, upper left column, line 17, etc.	8-9
A	JP 2017-516088 A (BUHLMANN LABORATORIES AG) 15 June 2017 (2017-06-15) entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	1-11
A	JP 2004-524522 A (VIVOTEC BIOMEDICAL TECHNOLOGIES GMBH) 12 August 2004 (2004-08-12) entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	1-11
A	JP 2002-524737 A (PRIVATES INSTITUT BIOSERV GMBH) 06 August 2002 (2002-08-06) entire text, in particular, see claims, etc.	1-11
A	JP 05-508770 A (SCHEBO TECH MEDIZINISCH-BIOLOGISCHE FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH) 09 December 1993 (1993-12-09) entire text, in particular, see claims, etc.	1-11
A	WO 02/079782 A1 (IATRON LABORATORIES, INC.) 10 October 2002 (2002-10-10) entire text, in particular, see claims, etc.	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 February 2023		Date of mailing of the international search report 14 February 2023
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
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/044078

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 63-073152	A 02 April 1988	(Family: none)	
JP 2017-516088	A 15 June 2017	US 2017/0108507 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc. US 2020/0240994 A1 WO 2015/177211 A1 EP 2947459 A1	
JP 2004-524522	A 12 August 2004	US 2004/0219540 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc. WO 2002/057785 A1 EP 1354202 A1	
JP 2002-524737	A 06 August 2002	US 8415113 B1 entire text, in particular, see claims, etc. WO 2000/014542 A2 EP 1112496 A2	
JP 05-508770	A 09 December 1993	WO 1992/002630 A1 entire text, in particular, see claims, etc. EP 547059 A1 JP 10-80272 A	
WO 02/079782	A1 10 October 2002	US 2004/0091940 A1 entire text, in particular, see claims, etc. EP 1385001 A1	
JP 03-215747	A 20 September 1991	(Family: none)	

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; G01N 33/543(2006.01)i FI: G01N33/53 D; G01N33/543 501A; G01N33/543 575; G01N33/543 581A; G01N33/543 545A		
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）） G01N33/53; 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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 63-073152 A (ダイナボット株式会社) 02.04.1988 (1988-04-02) 全文・全図、特に、特許請求の範囲、第4頁左下欄第16行-第5頁左上欄第17行等参照	8-9
A	JP 2017-516088 A (ビュールマン ラボラトリーズ アクツイエンゲゼルシャフト) 15.06.2017 (2017-06-15) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-11
A	JP 2004-524522 A (ヴィヴォテック バイオメディカル テクノロジーズ ゲーエム ペーハー) 12.08.2004 (2004-08-12) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-11
A	JP 2002-524737 A (プリファテス インスティトゥット バイオサルフ ゲーエムペー ハー) 06.08.2002 (2002-08-06) 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-11
A	JP 05-508770 A (シェーボ・テヒ・メディツィーニシユービーオローギツシエ・フォー ルシュングスゲゼルシャフト・ミット・バシユレンクテル・ハフツング) 09.12.1993 (1993-12-09) 全文、特に、請求の範囲等参照	1-11
<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	01.02.2023	国際調査報告の発送日 14.02.2023
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） 草川 貴史 2J 4075 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	WO 02/079782 A1 (IATRON LABORATORIES, INC.) 10.10.2002 (2002 - 10 - 10) 全文、特に、特許請求の範囲等参照	1-11
A	JP 03-215747 A (マルコ製薬株式会社) 20.09.1991 (1991 - 09 - 20) 全文、特に、特許請求の範囲等参照	1-11

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/JP2022/044078

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 63-073152 A	02.04.1988	(ファミリーなし)	
JP 2017-516088 A	15.06.2017	US 2017/0108507 A1 全文・全図, 特に, 特許請求の範囲等参照 US 2020/0240994 A1 WO 2015/177211 A1 EP 2947459 A1	
JP 2004-524522 A	12.08.2004	US 2004/0219540 A1 全文・全図, 特に, 特許請求の範囲等参照 WO 2002/057785 A1 EP 1354202 A1	
JP 2002-524737 A	06.08.2002	US 8415113 B1 全文、特に、特許請求の範囲等参照 WO 2000/014542 A2 EP 1112496 A2	
JP 05-508770 A	09.12.1993	WO 1992/002630 A1 全文, 特に, 請求の範囲等参照 EP 547059 A1 JP 10-80272 A	
WO 02/079782 A1	10.10.2002	US 2004/0091940 A1 全文、特に、特許請求の範囲等参照 EP 1385001 A1	
JP 03-215747 A	20.09.1991	(ファミリーなし)	