

(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
2014 年 1 月 9 日(09.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/007367 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/068503
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 5 日(05.07.2013)
- (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 2012-151610 2012 年 7 月 5 日(05.07.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 清木 元治(SEIKI, Motoharu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 越川 直彦(KOSHIKAWA, Naohiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

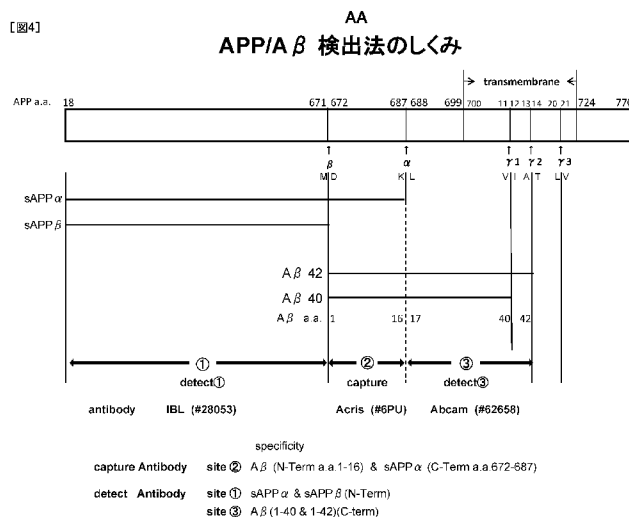
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 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: METHOD FOR DETECTING OR ASSAYING TWO KINDS OF SUBSTANCES IN SAME SAMPLE

(54) 発明の名称: 同一試料中の 2 種の物質を検出又は測定する方法



AA... PROCESS OF APP/Aβ DETECTION METHOD

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for easily and highly sensitively detecting or assaying two substances respectively, said substances having a common site and uncommon sites each possibly serving as an epitope, from a sample that contains these two substances. Provided is a method for detecting or assaying two substances respectively, said substances having a common site and uncommon sites each possibly serving as an epitope, from a sample that contains these two substances, said method comprising: a step for incubating the sample in contact with a first antibody that is capable of recognizing the common site; a step for incubating the substances, said substances having bound to the first antibody, in contact with a second antibody that is capable of recognizing the uncommon site of one of the substances; and a step for detecting or assaying the common site and the uncommon site.

(57) 要約: 本発明は、エピトープとなりうる共通部位と非共通部位とを有する 2 の物質を含む試料において、それぞれの物質を簡便且つ高感度に検出又は測定する方法を提供することを目的とする。本発明は、エピトープとなりうる共通部位と非共通部位とを有する 2 の物質を含む試料において、それぞれの物質を検出又は測定する方法であって、前記試料と、共通部位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、前記第一の抗体に結合した物質と、一方の物質の非共通部位を認識する第二の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、前記共通部位と、非共通部位とを検出又は測定する工程と、を含む方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：同一試料中の２種の物質を検出又は測定する方法 技術分野

[0001] 本発明は、共通な部位を有する２種の物質を同一の試料において検出又は測定する方法等に関する。

背景技術

[0002] 多くのタンパク質は翻訳された後、プロテアーゼによる限定分解を受け、活性を有する成熟体に変換される。この過程をプロセッシングと呼ぶ。膜タンパク質の場合、プロテアーゼによる限定分解には、膜直上で起こるシェディングと細胞外領域で起こるプロセッシングがある。前者は膜タンパク質を分泌型へと変換するのに対して、後者は膜タンパク質の活性制御に寄与する。

近年、膜タンパク質のプロセッシングの重要性が徐々に認知され、癌、慢性炎症疾患、アルツハイマー病など各種の難治疾患の発症に関与していることも明らかとなってきた。例えば、卵巣癌腹水中のHB-EGFの膜型MMPによるプロセッシング断片は卵巣癌の悪性度と相関がある。HB-EGFの増殖因子活性は、N末端にあるヘパリン結合性を持つ配列により抑制的に制御されているが、MT1-MMPがHB-EGFのN末端を切断することで、HB-EGFをヘパリン非依存的な増殖因子に変換し、EGF受容体の活性化を強く亢進させる。進行性の卵巣癌組織ではHB-EGFとMT1-MMPの両方の発現が観察され、卵巣癌患者より採取した腹水中に浸潤した腹水癌細胞においても、HB-EGF及びMT1-MMPの発現が免疫組織学的に確認された。また、腹水中のHB-EGFの分子種をEGF様ドメイン抗体でウェスによるンブロットで解析すると、10検体中3検体の腹水でMT1-MMPによるプロセッシングを受けたHB-EGFが検出された（非特許文献1及び2）。よって、患者サンプルにおけるHB-EGFの膜型MMPによるプロセッシング断片は、卵巣癌治療の奏功を判断する方法として有効であると考えられる。

[0003] このように、プロセシングの有無や異常を調べることにより、疾患の診断や、治療の奏功の判断ができる可能性がある。膜タンパク質のプロセシング断片を検出する方法としては、切断部位を特異的に認識するネオエピトープ抗体を用いる方法が知られている。しかしながら、ネオエピトープ抗体の作製は非常に困難である。また、切断部位は、エンドペプチダーゼによる消化を受ける可能性があり、その場合には抗原性が消失してネオエピトープ抗体に認識されなくなる。さらに、ネオエピトープ抗体の検出感度は一般にあまり高くない。そこで、さらに感度良く簡便にプロセシング断片を検出する方法が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Koshikawa, N. et al. Cancer Res, 2010, 70:6093-6103

非特許文献2 : Koshikawa, N. et al. Cancer Sci, 2011, 102:111-116

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、エピトープとなりうる共通部位と非共通部位とを有する2種の物質を含む試料において、それぞれの物質を簡便且つ高感度に検出又は測定する方法を提供することを目的とする。かかる方法は、例えば、タンパク質のプロセシングが関与する疾患の診断や治療の奏功の判断にも用いられうる。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、膜タンパク質のシェディングやプロセシングによって生じた2種類の断片は、これらの断片が共通に有する部位に対する第一の抗体と、一方の断片における非共通部位を認識する第二の抗体、及び／又は、第一の抗体とは異なる共通部位又は第二の抗体とは異なる非共通部位を認識する第三の抗体と、これらの抗体と断片との結合を検出することにより、簡便且つ高感度にプロセシング断片

のそれぞれを検出できることを見出し、その種々の応用を検討して、本発明を完成した。

即ち、本発明は、

〔１〕共通部位と非共通部位とを有する２種の物質を含む試料において、少なくとも一方の物質を検出又は測定する方法であって、

前記試料と、共通部位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、

前記第一の抗体に結合した物質と、一方の物質の非共通部位を認識する第二の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、

前記第一及び／又は第二の抗体と前記物質との結合を検出又は測定する工程と、を含む方法；

〔２〕前記第一の抗体と、前記第二の抗体が、互いに識別可能に標識されている、上記〔１〕に記載の方法；

〔３〕前記第一の抗体が固相担体に固定されており、

さらに、前記第一の抗体と結合した物質と、前記第一の抗体とは異なる共通部位を認識する第三の抗体と、を接触させてインキュベートする工程を含み、

前記第二の抗体と、前記第三の抗体が、互いに識別可能に標識されており、前記第一、第二及び／又は第三の抗体と前記物質との結合の検出又は測定を、該標識を検出又は測定することによって行う、上記〔１〕又は〔２〕に記載の方法；

〔４〕前記第一の抗体が固相担体に固定されており、

さらに、前記第一の抗体と結合した物質と、前記第二の抗体とは異なる非共通部位を認識する第三の抗体と、を接触させてインキュベートする工程を含み、

前記第二の抗体と、前記第三の抗体が、互いに識別可能に標識されており、

前記第一、第二及び／又は第三の抗体と前記物質との結合の検出又は測定

を、該標識を検出又は測定することによって行う、上記〔１〕又は〔２〕に記載の方法；

〔５〕前記２種の物質は、タンパク質がプロセッシング及び／又はシェディングによって生じた断片である、上記〔１〕から〔４〕のいずれか１項に記載の方法；

〔６〕各抗体の認識部位が、前記断片の末端ではない、上記〔５〕に記載の方法；

〔７〕共通部位と非共通部位とを有する２種の物質を含む試料において、少なくとも一方の物質を検出又は測定するためのキットであって、

共通部位を認識する第一の抗体と、一方の物質の非共通部位を認識する第二の抗体と、を含むキット；

〔８〕前記第一と第二の抗体は、それぞれ異なる色で蛍光標識されている、上記〔７〕に記載のキット；

〔９〕さらに、前記第一の抗体とは異なる共通部位を認識する第三の抗体を含む、上記〔７〕又は〔８〕に記載のキット；

〔１０〕さらに、前記第二の抗体とは異なる非共通部位を認識する第三の抗体を含む、上記〔７〕又は〔８〕に記載のキット；

〔１１〕前記第二と第三の抗体は、それぞれ異なる色で蛍光標識されている、上記〔９〕又は〔１０〕に記載のキット；

〔１２〕前記２種の物質は、タンパク質がプロセッシング及び／又はシェディングによって生じた断片である、上記〔７〕から〔１１〕のいずれか１項に記載のキット；

〔１３〕アルツハイマー病の検査方法であって、

被検者に由来する試料と、配列番号：１の６７２位から６８７位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、

前記第一の抗体に結合した物質と、配列番号：１の１位から６７１位を認識する第二の抗体、及び／又は、配列番号：１の６８８位から７１１位を認識する第三の抗体とを接触させてインキュベートする工程と、

前記第二の抗体及び／又は第三の抗体と前記物質との結合を検出又は測定する工程と、を含む方；

〔14〕前記第二の抗体と、前記第三の抗体が、互いに識別可能に標識されている、上記〔13〕に記載の方法；及び

〔15〕アルツハイマー病の検査用キットであって、

配列番号：1の672位から687位を認識する第一の抗体と、

配列番号：1の1位から671位を認識する第二の抗体、及び／又は、配列番号：1の688位から711位を認識する第三の抗体と、を含むキット、
に関する。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、共通部位と非共通部位とを有する2種の物質を含む試料から、少なくとも一方の物質を、簡便且つ高感度に検出又は測定することができる。

特に本発明の方法を、プロセッシング断片の検出に用いる場合、ペプチド末端を認識するネオエピトープ抗体を用いる必要がないので、作りやすい抗体を用いることができ、エンドペプチダーゼによる消化の影響も受けない。また、第一の抗体を固相担体に固定しておくことにより、微量の断片を高感度に検出することが可能である。

本発明の方法によれば、プロセッシングやシェディングの有無や異常を検出して、診断や治療の奏功の判断を行うことが可能である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）のA β 産生経路と非A β 産生経路によるプロセッシングを説明する概念図である。

[図2]図2は、本発明の方法によるsAPP α とsAPP β の測定を説明する概念図である。

[図3]図3は、本発明の方法によるsAPP α とA β の測定を説明する概念図である。

[図4]図4は、実施例に係るA P P / A β 検出法のしくみを示す概念図である。

[図5]図5は、ヒト正常血清にA β 及びs A P Pを種々の濃度で添加し、本発明に係る方法で測定した結果を示す。

[図6]図6は、本発明に係る方法で、A β 及びs A P Pを定量的に検出した結果を示す。

[図7]図7は、実施例で使用した抗体の反応性を、A β 及びs A P Pを用いたダイレクトE L I S Aで確認した結果を示す。

[図8]図8は、実施例で使用した抗体の反応性を、A β 及びs A P Pを用いたサンドイッチE L I S Aで確認した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] (検出又は測定方法)

本発明に係る検出又は測定方法の一態様は、同一試料に含まれる2種の物質を検出又は測定するものである。

本明細書において、検出又は測定の対象となる2種の物質は、エピトープとなりうる共通部位と非共通部位とを有するものである限り特に限定されず、ペプチドや核酸などが挙げられるが、典型的にはペプチドである。特に、同一のタンパク質から、プロセッシングやシェディングによって生じた2以上の断片が挙げられる。

[0010] 例えば、プロセッシングの異常やプロセッシングによって生じる断片が発症に関与する疾患として、アルツハイマー病が挙げられる。アルツハイマー病は、アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid Precursor Protein; A P P) のプロセッシングによって生じるアミロイド β タンパク質 (A β) が脳内に蓄積して老人斑を形成し、老人斑が神経細胞を死滅させることによって発症すると考えられている。

I型膜貫通タンパク質であるA P Pのプロセッシングには、A β 産生経路と非A β 産生経路がある。図1に示されるとおり、A β 産生経路では、A P Pが β セクレターゼと γ セクレターゼによって切断され、s A P P β とA β と

を生じる。一方、非A β 産生経路では、APPが α セクレターゼと γ セクレターゼによって切断され、sAPP α とP3と呼ばれるフラグメントを生じる。

アルツハイマー病の予防や治療のためにはセクレターゼ制御が重要な課題となっており、 β セクレターゼや γ セクレターゼを阻害してA β 産生を抑制する研究が行われている。したがって、sAPP α 、sAPP β 、A β 、P3等の断片を検出することができれば、治療薬候補の評価等に用いることが可能である。

また、A β にはアミノ酸40残基で構成されるA β 40と、アミノ酸42残基で構成されるA β 42が存在するが、このうちA β 42が脳内でアミロイド凝集の核となり、アルツハイマー病の発症の引き金となりうる分子である。したがって、特にA β 42を検出することができれば、治療薬候補の評価等に一層有用であると考えられる。

さらに、被検者の血清や脳脊髄液中のA β とsAPPをそれぞれ検出することができれば、アルツハイマー病の罹患の有無や罹患可能性の評価に用いることも可能である。

[0011] 本明細書において、2種の物質が「共通部位を有する」とは、2種の物質が同一の抗体によって認識されるエピトープを有する状態を意味する。エピトープとなりうる共通部位は、上記物質がペプチドである場合、アミノ酸配列のみが同一な部位であってもよいし、糖鎖や脂質による修飾、リン酸化の有無などまで含めて同一な部位であってもよい。

本明細書において、2種の物質が「非共通部位を有する」とは、2種の物質が、それぞれ異なる抗体によって認識されるエピトープを有する状態を意味する。エピトープとなりうる非共通部位としては、上記物質がペプチドである場合、アミノ酸配列が異なる部位や、アミノ酸配列は同一でも糖質や脂質による修飾が異なる部位、アミノ酸配列は同一でもリン酸化の有無が異なる部位などがあり得る。

このように、本発明に係る方法は、2種の物質がペプチドの場合、共通配

列と非共通配列を有する２種の物質；二つの共通配列を有し、そのうち一つの配列における糖鎖修飾が異なる２種の物質；二つの共通配列を有し、そのうち一つの配列における脂質による修飾が異なる２種の物質；二つの共通配列を有し、そのうち一つの配列におけるリン酸化の有無が異なる物質などの検出又は測定することが可能である。

[0012] 本発明に係る方法は、２種の物質のそれぞれを検出又は測定する方法であり、２種の物質のそれぞれの有無のみを調べるために用いてもよいし、それぞれの量を測定するために用いてもよく、また２種の物質の量の比を求めるために用いてもよい。また、本発明に係る方法は、試料中の３種以上の物質のそれぞれを検出又は測定するために応用することもできる。

[0013] 本発明に係る方法では、まず、２種の物質を含む試料と、共通部位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする。

本明細書において「試料」は、検出又は測定する物質を含む可能性があるものであれば特に限定されないが、例えば、ヒトや動物に由来する血液、尿、髄液、穿刺液、組織、血清、脳脊髄液などを挙げることができる。これらの試料は、第一の抗体と接触させる工程に先立って、適宜緩衝液等で希釈してもよいし、薬物等による処理を加えてもよい。

[0014] 試料と第一の抗体を接触させてインキュベートする工程は、公知の方法にしたがって行うことができる。インキュベーションの時間や温度などの条件は、当業者が適宜決定することができる。

この工程により、２種の物質の双方に第一の抗体が結合する。

[0015] 続いて、第一の抗体に結合した物質と、一方の物質にのみ存在する非共通部位を認識する第二の抗体とを接触させてインキュベートする。この工程も公知の方法にしたがって行うことができ、条件は当業者が適宜決定することが可能である。

この工程により、第一の抗体に結合した物質のうち、第二の抗体が認識する非共通部位を有する物質にのみ第二の抗体が結合する。

[0016] 次に、第一の抗体及び／又は第二の抗体と前記物質の結合を検出又は測定

する。抗体と物質の結合は、公知の種々の方法に従って検出又は測定することができる。これまでの工程により、2種の物質の一方には第一の抗体と第二の抗体が結合し、一方には第一の抗体のみが結合している。したがって、例えば、第一の抗体と第二の抗体を互いに識別可能に標識しておくことにより、第一及び第二の抗体が結合している物質と、第一の抗体のみが結合している物質を検出又は測定できる。

[0017] 抗体の標識方法としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子などを用いる方法が挙げられるがこれらに限定されない。抗体の標識は公知の方法にしたがって行うことができる。また、抗体をビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出してもよい。

例えば、第一の抗体を赤色の蛍光物質で標識し、第二の抗体を緑色の蛍光物質で標識すれば、第一の抗体と第二の抗体の双方が結合している物質は黄色となり、第一の抗体のみ結合している物質は赤となり、両者を識別し、検出又は測定することが可能である。

[0018] 本発明に係る方法の一態様では、第一の抗体を固相担体に固定して用いる。これにより、試料と第一の抗体を結合させる工程で、第一の抗体に結合する2つの物質を固相担体表面に濃縮することができるので、物質が微量である場合にも感度良く検出することができる。

本明細書において、「固相担体」は、抗体を固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、金属性、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられ、抗体は、これらの固相担体に公知の方法に従って固定することができる。

[0019] 第一の抗体を固相担体に固定する場合、試料と第一の抗体とを接触させる工程は、例えば、マイクロタイタープレートに第一の抗体を固定して、各ウェルに試料を滴下して行ってもよいし、第一の抗体を固定したビーズを試料中に投入して行ってもよい。

この工程により、試料中の2種類の物質の共通部位が第一の抗体に結合し、固相表面に捕捉される。この後、固相表面を洗浄する工程（例えば、固相担体としてマイクロタイタープレートを用いる場合）や、固相担体を回収する工程（例えば、固相担体としてビーズを用いる場合）を行って、固相担体に捕捉された物質のみを回収してもよい。

[0020] 第一の抗体が固相担体に固定されている場合、第一の抗体に結合した物質と、第二の抗体とを接触させてインキュベートする工程は、第二の抗体と固相担体表面とを接触させてインキュベートすることにより行うことができる。

[0021] この実施態様では、2種の物質を検出又は測定するために、第三の抗体を用いる。第三の抗体は、2種の物質における第一の抗体とは異なる共通部位を認識し、且つ、第二の抗体と識別可能に標識されている。

第一の抗体で、2種の物質を固相担体表面に捕捉し、第二の抗体で非共通部位を、第三の抗体で共通部位を標識することにより、非共通部位を有するものと、共通部位のみ有するもの2つの物質を検出・測定することができる。すなわち、第二の抗体で標識される分子数は非共通部位を有する分子数を表し、第三の抗体で標識される分子数から第二の抗体で標識される分子数を引くと、共通部位のみ有する分子の数を求めることができる（例えば、図2参照）。

[0022] また、第三の抗体としては、2つの物質における第二の抗体とは異なる非共通部位を認識し、且つ、第二の抗体と識別可能に標識されているものを用いてもよい。

第一の抗体で、2つの物質を固相担体表面に捕捉し、第二の抗体で非共通部位を、第三の抗体で別の非共通部位を標識することにより、2つの物質を

検出・測定することができる（図3参照）。

[0023] 本発明の方法に用いられる「抗体」は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであってもよく、いずれも公知の方法に従って作製することができる。

例えば、第一の抗体がモノクローナル抗体である場合、まず検出・測定の対象となる2つの物質のうち1つの物質を用いて非ヒト哺乳動物を免疫し、免疫動物から抗体産生細胞（リンパ節細胞又は脾臓細胞）を単離する。これをミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどを用いて細胞融合させ、ハイブリドーマを作製する。続いて、コロニーとなったハイブリドーマが所望の抗体、即ち、2つの物質の共通部位に結合する抗体を分泌しているかどうか、培養上清を用いてスクリーニングを行う。所望の抗体を産生している細胞を限界希釈してクローニングし、さらにスクリーニングを行って、2つの物質の共通部位を認識する第一の抗体を分泌するハイブリドーマクローンを樹立することができるので、これから精製して第一の抗体を得ることができる。

なお、検出・測定対象の物質がペプチドの場合、スクリーニングの際、当該ペプチドの末端ではない部位を認識する抗体を選択することが望ましい。これにより、エンドペプチダーゼによって検出・測定対象のペプチドの末端が分解されても、対象ペプチドに結合できる抗体を得ることができる。

また、上記方法において、非ヒト哺乳動物を免疫する際、2つの物質の共通部位である断片のみを抗原として用いてもよい。

[0024] 第二の抗体も同様に作製することができる。非ヒト哺乳動物を免疫する際、2つの物質のうち1つの物質を用いて行い、スクリーニングの際、2つの物質の一方にしか結合しないものを選択することにより、第二の抗体を得ることができる。

また、非ヒト哺乳動物を免疫する際、2つの物質の一方にしか存在しない非共通部位からなる断片を抗原として用いてもよい。

[0025] 第三の抗体も、第一の抗体と同様に作製することができる。スクリーニン

グの際、第一の抗体と異なるエピトープを認識し、且つ2つの物質の双方に結合するものを選択すればよい。

[0026] 抗体はポリクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体の場合は、適宜選択した抗原で非ヒト哺乳動物を免疫し、免疫動物の血清から得ることができる。

[0027] (検出又は測定用キット)

本発明に係るキットは、エピトープとなりうる共通部位と非共通部位とを有する2の物質を含む試料において、それぞれの物質を検出又は測定するためのものである。

本発明に係る検出又は測定方法で用いられた用語は、キットについても同義で用いられる。

[0028] 本発明に係るキットの一態様は、第一の抗体と第二の抗体を含む。第一の抗体と第二の抗体は、互いに識別可能に標識されていてもよいし、抗体とは別に標識するために必要な試薬がキットに備えられていてもよい。ほかに、本発明に係る検出又は測定方法に必要な、緩衝液や試薬、マイクロタイタープレート、マイクロプレートリーダーやビーズなどの固相担体、使用説明書等を備えていてもよい。

[0029] 本発明に係るキットの別の態様は、第一から第三の抗体を含む。各抗体は、互いに識別可能に標識されていてもよいし、抗体とは別に標識するために必要な試薬がキットに備えられていてもよい。ほかに、本発明に係る検出又は測定方法に必要な、緩衝液や試薬、マイクロタイタープレート、マイクロプレートリーダーやビーズなどの固相担体、使用説明書等を備えていてもよい。

[0030] (アルツハイマー病の検査方法)

本発明に係るアルツハイマー病の検査方法は、

被検者に由来する試料と、配列番号：1の672位から687位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、

第一の抗体に結合した物質と、配列番号：1の1位から671位を認識す

る第二の抗体、及び／又は、配列番号：１の６８８位から７１１位を認識する第三の抗体とを接触させてインキュベートする工程と、

第二の抗体及び／又は第三の抗体と前記物質との結合を検出又は測定する工程と、を含む。

[0031] 本明細書において、被検者に由来する試料とは、被検者から採取された血液、尿、髄液、穿刺液、組織、血清、脳脊髄液とすることができ、特に血清や脳脊髄液が好ましい。試料は、適当な緩衝液で希釈してもよいし、薬物等による処理を加えてもよい。

配列番号：１は、ヒトアミロイドβ前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。図１に示されるとおり、αセクレターゼによる正常なシェディングでは、配列番号：１の１位から６８７位までの断片である分泌型APPα（sAPPα）が生じる。一方、β及びγセクレターゼにより、６７２位から７１１位までの断片であるAβ₄₀や、６７２位から７１３位までの断片であるAβ₄₂、６７２位から７１４位間での断片であるAβ₄₃等が生じる。

sAPPαと、Aβ₄₀、₄₂又は₄₃とを検出する場合、配列番号：１の６７２位から６８７位が共通部位となり、１位から６７１位と、６８８位から７１１～７１３位が非共通部位となる。

[0032] そこで、共通部位を認識する抗体を第一の抗体とし、例えば固相に固定して試料と接触させてインキュベートすると、sAPPα、Aβ₄₀、₄₂又は₄₃が固相表面に捕捉される。適宜洗浄した後、配列番号：１の１位から６７１位を認識する第二の抗体を、固相表面に接触させてインキュベートすると、sAPPαが存在すれば、これに結合する。また、配列番号：１の６８８位から７１１位を認識する第三の抗体を、固相表面に接触させてインキュベートすると、Aβ₄₀、₄₂又は₄₃が存在すれば、これに結合する。

[0033] 第二及び第三の抗体とのインキュベートは、同時に行ってもよいし、別々に行ってもよい。第二及び第三の抗体をそれぞれ識別可能に標識しておけば、同一サンプルで、sAPPαと、Aβ₄₀等の比を簡便に求めることができる。第二、第三の抗体は、それぞれ標識されたものを用いてもよいし、二

次抗体を用いて検出してもよい。

s A P P α と A β 4 0 等の変化を経時的に測定すれば、アルツハイマー病の進行等を評価することが可能であり、また、治療薬や治療法の効果を評価することも可能である。

[0034] 第一乃至第三の抗体は、市販のものを用いてもよいし、上述した方法で作製してもよい。これらの抗体は、各断片の末端ではない部位を認識するものが好ましい。

[0035] 本明細書において、「検査」とは、診断に必要な情報を得るために、被検者から採取した試料を調べることを意味し、本発明の検出方法は、例えば検査会社等で実施され得る。

また、本発明において、「検査」は、アルツハイマー病に罹患しているか否かを確認する検査に加え、アルツハイマー病に罹患しやすいかどうかのリスクを調べることで、症状が現れない段階でアルツハイマー病の可能性をスクリーニングすること、アルツハイマー病に罹患していることが明らかになった後で、その進行度、予後、治療効果などを調べることのいずれも含んでいる。

本発明に係る検査方法は、アルツハイマー病の他の検査方法と組み合わせてもよい。

[0036] また本発明は、上記アルツハイマー病の検査方法を実施することを含むアルツハイマー病の診断方法も包含する。

[0037] (アルツハイマー病の検査用キット)

本発明に係るアルツハイマー病の検査用キットは、上記アルツハイマー病の検査方法に用いられる第一の抗体と、第二の抗体及び／又は第三の抗体とを含む。第二の抗体と第三の抗体の双方を備えていることが好ましい。

本発明に係るアルツハイマー病の検査用キットでは、各抗体は、互いに識別可能に標識されていてもよいし、抗体とは別に標識するために必要な試薬がキットに備えられていてもよい。捕捉用の第一の抗体は標識されていなくてもよい。また、第二又は第三の抗体は標識されておらず、これらを検出す

るための標識された二次抗体が備えられていてもよい。

ほかに、本発明に係る検出又は測定方法に必要な、緩衝液や試薬、マイクロタイタープレート、マイクロプレートリーダーやビーズなどの固相担体、使用説明書等が備えられていてもよい。

[0038] 本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

[0039] (実施態様1)

A P Pのプロセッシングプロダクトを検出する方法を例にとって本発明の実施態様を説明する。

上述のとおり、A P Pは、A β 産生経路と非A β 産生経路によってプロセッシングを受け、s A P P α 、s A P P β 、A β 、P 3が生じる。したがって、例えば、s A P P α とs A P P β を本発明にいう「2つの物質」とすれば、それぞれの産生経路によるプロセッシングを定量的に評価することができる。この態様を図2に示す。

図2の方法では、共通部位認識する第一の抗体、非共通部位を認識する第二の抗体、第一の抗体とは別の共通部位を認識する第三の抗体を用いる。第二、第三の抗体は、例えば、それぞれ赤と緑の蛍光物質で標識しておく。

[0040] 第一の抗体をマイクロタイタープレートに固定し、適宜処理した患者由来の試料をウェルに滴下すると、s A P P β とs A P P α が第一の抗体に捕捉される。いったんマイクロタイタープレートを洗浄し、第二、第三の抗体を加える。抗体を加える順序は特に限定されない。その後、洗浄処理、発色処理等を行って検出すると、s A P P α には第二及び第三の抗体が結合しているので、黄色に観察される。一方、s A P P β には第三の抗体のみ結合しているので、緑に観察され、これにより双方を定量することが可能である。

[0041] また、例えば、s A P P α とA β を本発明にいう「2つの物質」としても、それぞれの産生経路によるプロセッシングを定量的に評価することができる。この態様を図3に示す。図3の方法では、共通部位認識する第一の抗体、非共通部位を認識する第二の抗体、第二の抗体とは別の非共通部位を認識

する第三の抗体を用いる。第二、第三の抗体は、例えば、それぞれ赤と緑の蛍光物質で標識しておく。

[0042] 第一の抗体をマイクロタイタープレートに固定し、適宜処理した患者由来の試料をウェルに滴下すると、 $sAPP\alpha$ と $A\beta$ が第一の抗体に捕捉される。いったんマイクロタイタープレートを洗浄し、第二、第三の抗体を加える。抗体を加える順序は特に限定されない。その後、洗浄処理、発色処理等を行って検出すると、 $sAPP\alpha$ は第二の抗体が結合しているので、赤色に観察される。一方、 $A\beta$ には第三の抗体のみ結合しているので、緑に観察される。これにより双方を定量することが可能である。

[0043] 図2、図3の方法を、経時的に繰り返すことにより、 $A\beta$ 産生経路と非 $A\beta$ 産生経路のいずれが優勢かの変化を見ることができるので、疾患の悪化や、治療の効果を評価することも可能である。

実施例

[0044] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

[0045] 図4に本実施例における、 $APP/A\beta$ の検出法の概略を示す。アミロイド前駆体タンパク質（配列番号：1）の672位から687位の領域に特異的に結合する抗体を捕捉用抗体として用い、1位から671位の領域に特異的に結合する抗体、及び688位から713位の領域に特異的に結合する抗体を検出用抗体として用いた。

試料としては、ヒト正常血清に、 $sAPP\alpha$ と $A\beta 40$ を添加したものをを用いた。

用いた材料を下表に示す。

[表1]

		品 名	company	カタログ No.
plate		NUNC フルオロメックモジュール	NUNC	475515
antibody	site ①	anti-APP(18) pAb (Rabbit IgG)	IBL	#28053
	site ②	Human Amyloid β A4 N-terminus mAb (Mouse IgG)	Acris	AM00006PU-N
	site ③	Anti-beta Amyloid pAb (Rabbit IgG)	abcam	ab62658
	2nd Antibody	Alexa Flour 488 Goat Anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A11034
	2nd Antibody	Alexa Flour 555 Goat Anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A21428
peptide		Amyloid β -protein (1-40)	ペプチド研究所	4379-v
protein		Amyloid Precursor Protein α	SIGMA	S9564-25UG

Buffer	組 成
PBS(-)	
PBS-T	0.1% Tween20, PBS(-)
diluent buffer	0.1M NaCl, 50mM Na-Phosphate, 10mM EDTA, 1% BSA, 2% Tween20, 0.1% Proclin300 (SUEPICO #48912-U) (pH 7.2, 0.2 μ m filtered)

peptide		Amyloid β -protein (Human, 1-40)	ペプチド研究所	4379-v
		Amyloid β -protein (Human, 1-16)	ペプチド研究所	4359-v
		Amyloid β -protein (Human, 1-42)	ペプチド研究所	4349-v
		Amyloid β -protein (Human, 25-35)	ペプチド研究所	4309-v
protein		Amyloid Precursor Protein α	SIGMA	S9564-25UG
		Amyloid Precursor Protein β	SIGMA	S4316-25UG

[0046] 実験の手順を下表に示す。

[表2]

希釈	バッファー	Capture Ab.(Acris 6PU)は PBS(-) 上記以外は、diluent buffer
抗体	Capture Ab.	Human Amyloid β A4 N-terminus mAb (Mouse IgG) (Acris)
	Detect Ab. APP α	anti-APP(18) pAb (Rabbit IgG) (IBL)
	A β (1-40)	Anti-beta Amyloid pAb (abcam)
	2nd Ab.	Alexa Flour 488/555 goat anti-rabbit IgG
APP α		0, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml
A β (1-40)		0, 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ng/ml

方 法

capture Ab. coat (Acris 6PU : 5 μ g/ml in PBS(-)) 50 μ l/well
 ↓
 4°C O/N
 ↓
 3 $\times$ wash PBS(-) 200 μ l/well
 ↓
 Blocking 3%BSA/PBS(-) 200 μ l/well
 ↓
 37°C 30min.
 ↓
 3 $\times$ wash PBS(-) 200 μ l/well
 ↓
 APP α & A β (1-40) を処理する (1つの測定値に対して3wellずつ)
 APP α 0-1600ng/ml in diluent buffer 50 μ l/well
 A β (1-40) 0-80ng/ml in diluent buffer 50 μ l/well
 ↓
 37°C 2h.
 ↓
 3 $\times$ wash PBS-T 200 μ l/well
 ↓
 1次抗体を処理する
 IBL 4 μ g/ml in diluent buffer 50 μ l/well
 abcam 12.5 μ g/ml in diluent buffer 50 μ l/well
 ↓
 RT 2h.
 ↓
 3 $\times$ wash PBS-T 200 μ l/well
 ↓
 2次抗体を処理する
 Alexa488/555 0.5 μ g/ml in diluent buffer 50 μ l/well
 ↓
 RT 1h. (in the dark)
 ↓
 4 $\times$ wash PBS-T 200 μ l/well
 ↓
 measure Fluorescence (OPTIMA Ex/Em 485/530, 540/580)
 測定機器 FLUO star OPTIMA (BMG LABTECH)

[0047] ヒト正常血清に、様々な濃度の s A P P α と A β 4 0 を添加し、上記実験を行った結果を図5に示す。I B L (# 2 8 0 5 3) により、s A P P α を定量的に検出できた。一方、A b c a m (# 6 2 6 5 8) により、A β を定

量的に検出できた。

- [0048] 図5の結果をもとに、それぞれ横軸に濃度の対数を、縦軸に蛍光強度をとってプロットしたところ、 $A\beta$ は 10 ng/ml 以上、 $sAPP\alpha$ は 100 ng/ml 以上で有意に検出が可能であった。
- [0049] 上記実験で用いた抗体の反応性の確認を、 $A\beta$ 、 $sAPP\alpha$ を用いたダイレクトELISAで確認した結果を図7に示す。捕捉用抗体は両者に結合し、検出用抗体はそれぞれの抗原に特異的に結合することが確認された。
- [0050] 上記実験で用いた抗体の反応性の確認を、 $A\beta$ 、 $sAPP\alpha$ を用いたサンドイッチELISAで確認した結果を図7に示す。捕捉用抗体は両者に結合し、検出用抗体はそれぞれの抗原に特異的に結合することが確認された。

請求の範囲

- [請求項1] 共通部位と非共通部位とを有する2種の物質を含む試料において、少なくとも一方の物質を検出又は測定する方法であって、
前記試料と、共通部位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、
前記第一の抗体に結合した物質と、一方の物質の非共通部位を認識する第二の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、
前記第一及び／又は第二の抗体と前記物質との結合を検出又は測定する工程と、を含む方法。
- [請求項2] 前記第一の抗体と、前記第二の抗体が、互いに識別可能に標識されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記第一の抗体が固相担体に固定されており、
さらに、前記第一の抗体と結合した物質と、前記第一の抗体とは異なる共通部位を認識する第三の抗体と、を接触させてインキュベートする工程を含み、
前記第二の抗体と、前記第三の抗体が、互いに識別可能に標識されており、
前記第一、第二及び／又は第三の抗体と前記物質との結合の検出又は測定を、該標識を検出又は測定することによって行う、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記第一の抗体が固相担体に固定されており、
さらに、前記第一の抗体と結合した物質と、前記第二の抗体とは異なる非共通部位を認識する第三の抗体と、を接触させてインキュベートする工程を含み、
前記第二の抗体と、前記第三の抗体が、互いに識別可能に標識されており、
前記第一、第二及び／又は第三の抗体と前記物質との結合の検出又は測定を、該標識を検出又は測定することによって行う、請求項1又は2に記載の方法。

は 2 に記載の方法。

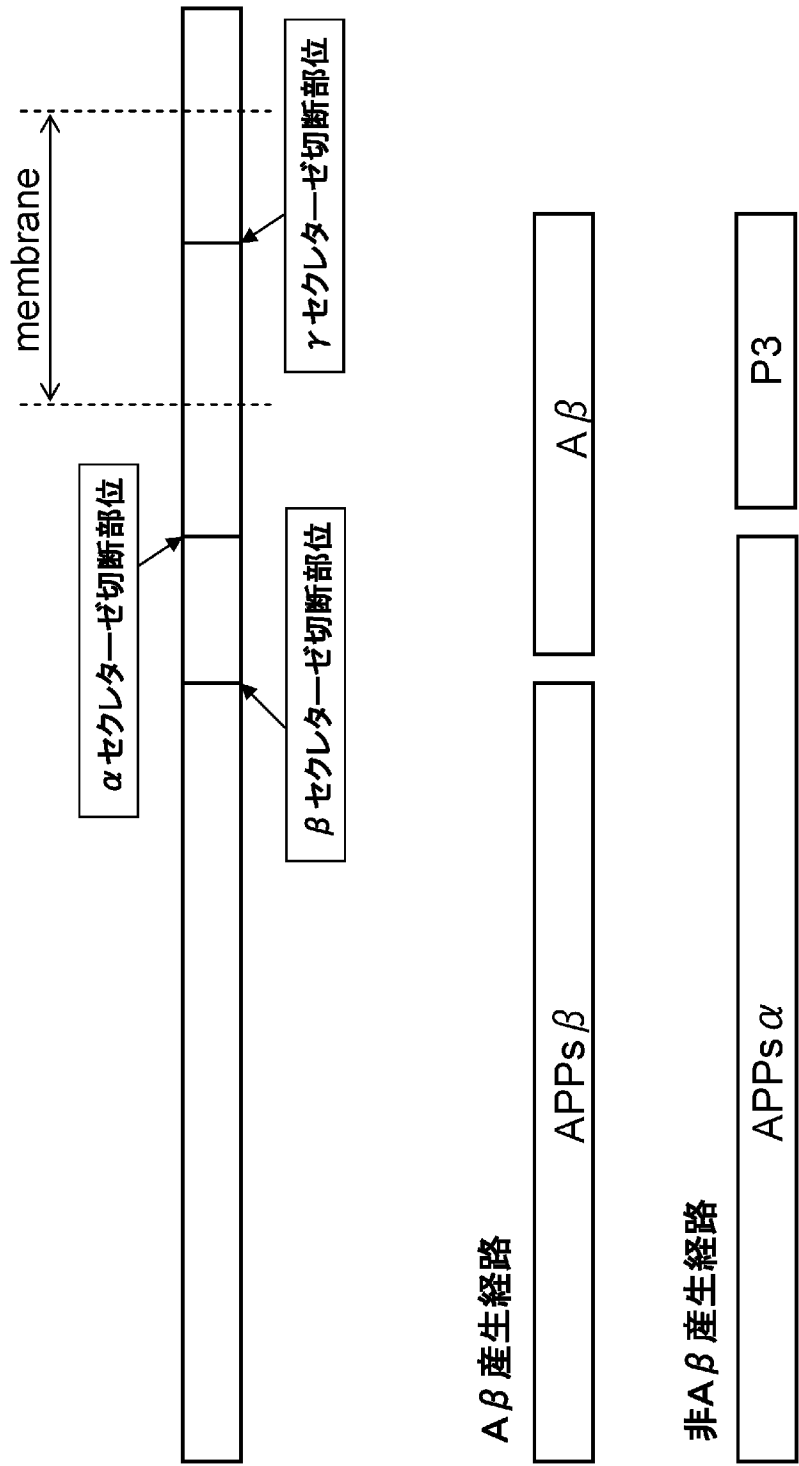
- [請求項5] 前記 2 種の物質は、タンパク質がプロセッシング及び／又はシェディングによって生じた断片である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項6] 各抗体の認識部位が、前記断片の末端ではない、請求項 5 に記載の方法。
- [請求項7] 共通部位と非共通部位とを有する 2 種の物質を含む試料において、少なくとも一方の物質を検出又は測定するためのキットであって、
共通部位を認識する第一の抗体と、一方の物質の非共通部位を認識する第二の抗体と、を含むキット。
- [請求項8] 前記第一と第二の抗体は、それぞれ異なる色で蛍光標識されている、請求項 7 に記載のキット。
- [請求項9] さらに、前記第一の抗体とは異なる共通部位を認識する第三の抗体を含む、請求項 7 又は 8 に記載のキット。
- [請求項10] さらに、前記第二の抗体とは異なる非共通部位を認識する第三の抗体を含む、請求項 7 又は 8 に記載のキット。
- [請求項11] 前記第二と第三の抗体は、それぞれ異なる色で蛍光標識されている、請求項 9 又は 10 に記載のキット。
- [請求項12] 前記 2 種の物質は、タンパク質がプロセッシング及び／又はシェディングによって生じた断片である、請求項 7 から 11 のいずれか 1 項に記載のキット。
- [請求項13] アルツハイマー病の検査方法であって、
被検者に由来する試料と、配列番号：1 の 672 位から 687 位を認識する第一の抗体と、を接触させてインキュベートする工程と、
前記第一の抗体に結合した物質と、配列番号：1 の 1 位から 671 位を認識する第二の抗体、及び／又は、配列番号：1 の 688 位から 711 位を認識する第三の抗体とを接触させてインキュベートする工程と、

前記第二の抗体及び／又は第三の抗体と前記物質との結合を検出又は測定する工程と、を含む方法。

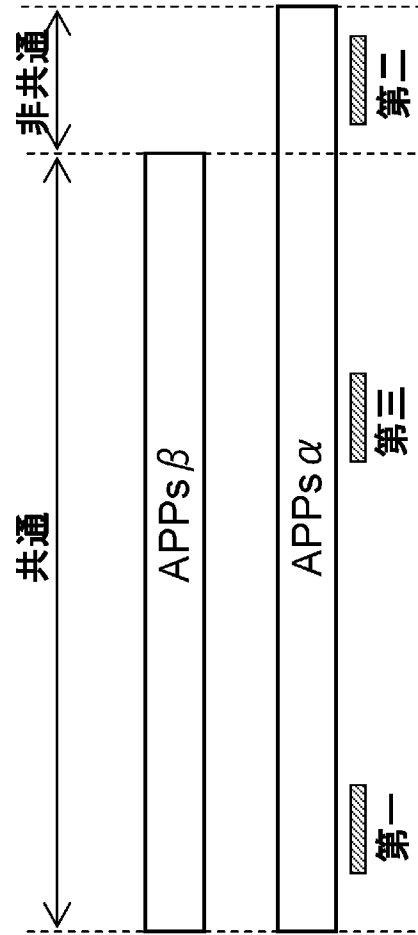
[請求項14] 前記第二の抗体と、前記第三の抗体が、互いに識別可能に標識されている、請求項13に記載の方法。

[請求項15] アルツハイマー病の検査用キットであって、
配列番号：1の672位から687位を認識する第一の抗体と、
配列番号：1の1位から671位を認識する第二の抗体、及び／又は、配列番号：1の688位から711位を認識する第三の抗体と、
を含むキット。

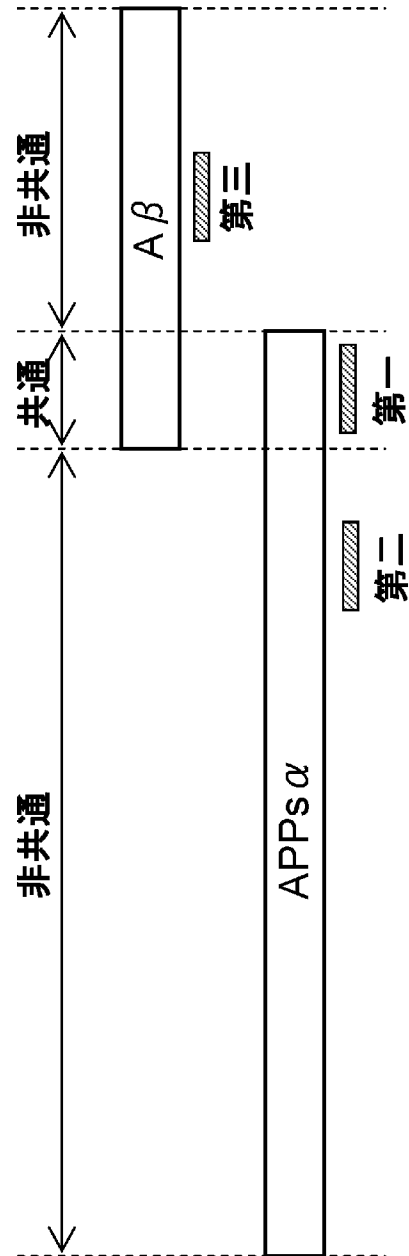
[図1]



[図2]

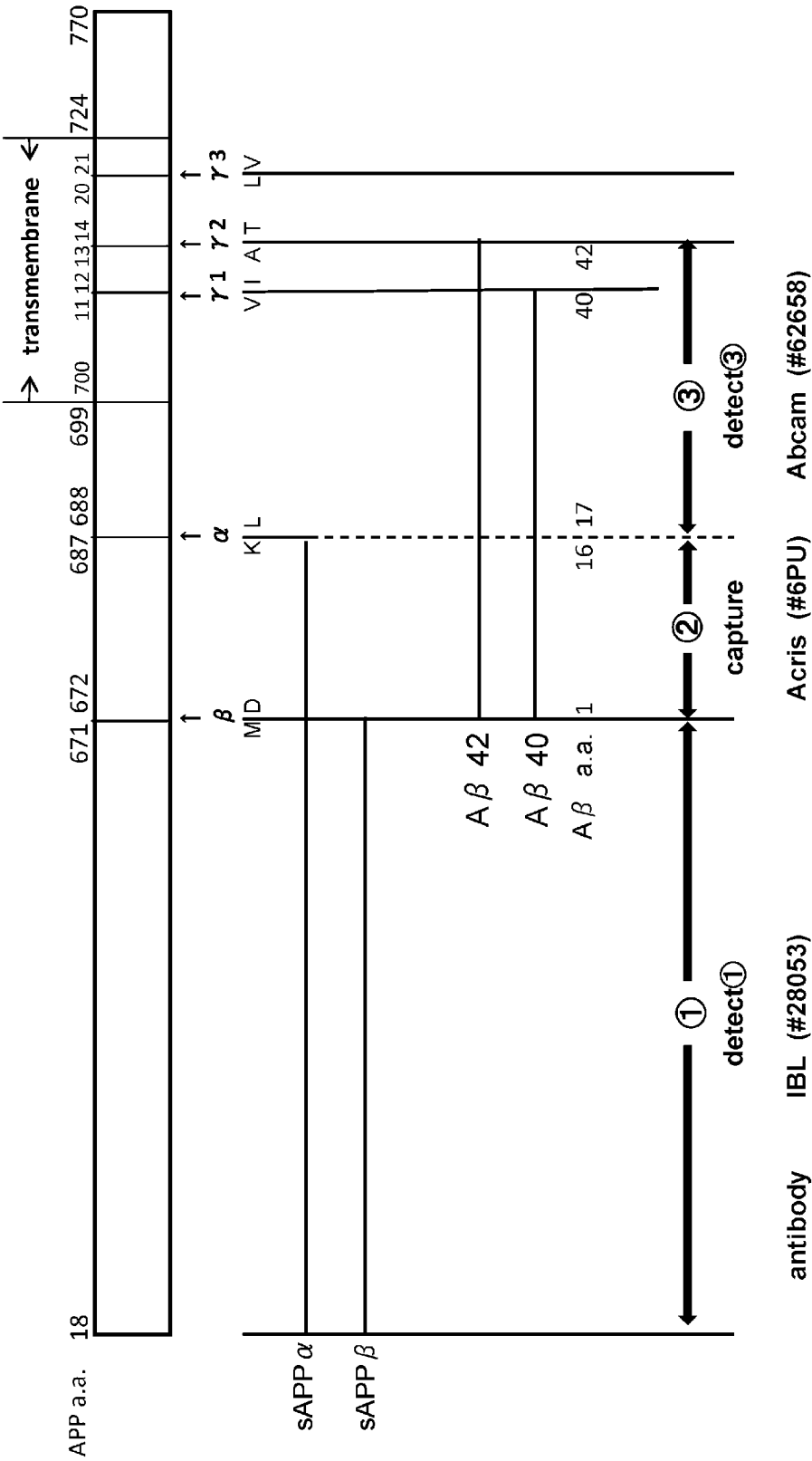


[図3]



[図4]

APPIAβ 検出法のしくみ



antibody IBL (#28053) Acris (#6PU) Abcam (#62658)

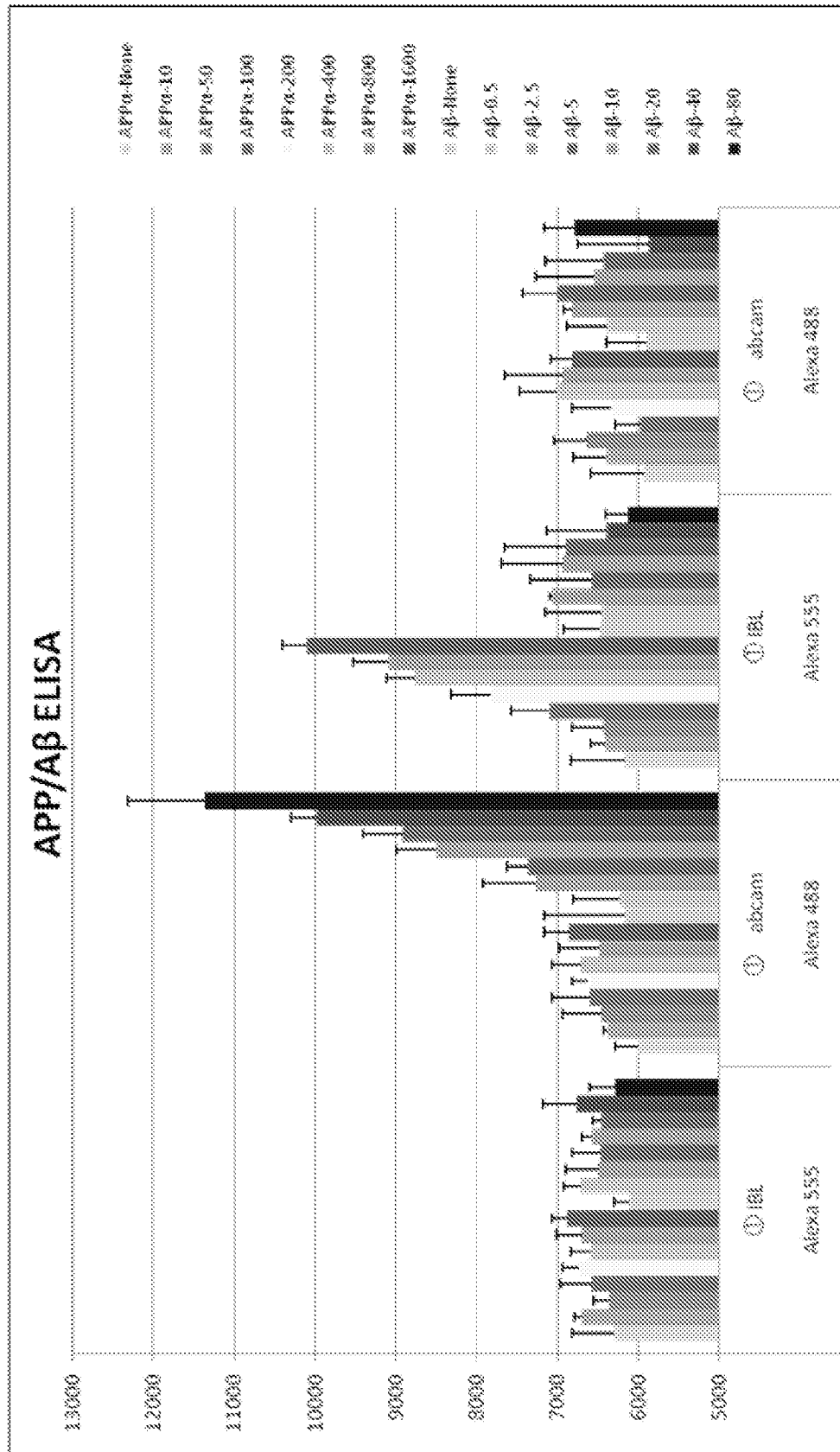
capture Antibody site ② Aβ (N-Term a.a.1-16) & sAPPα (C-Term a.a.672-687)

detect Antibody site ① sAPPα & sAPPβ (N-Term)

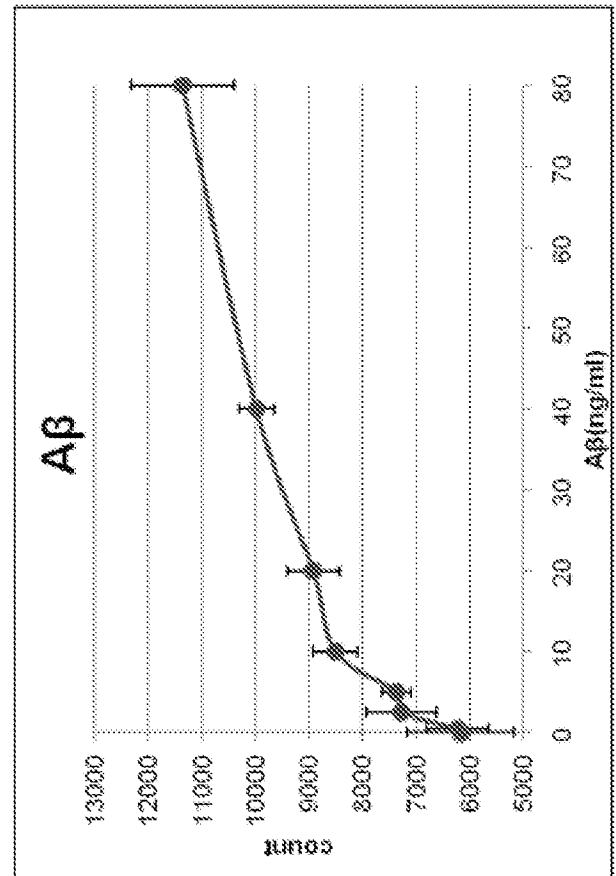
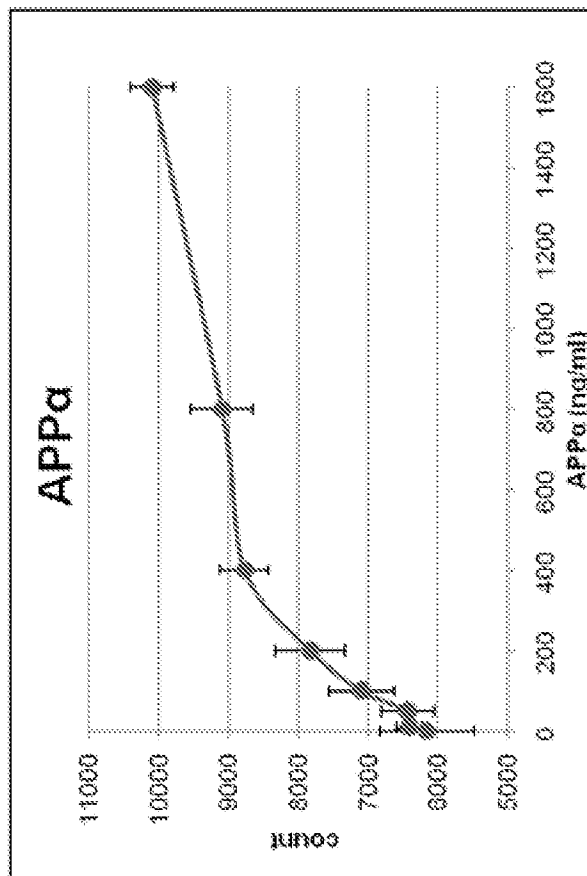
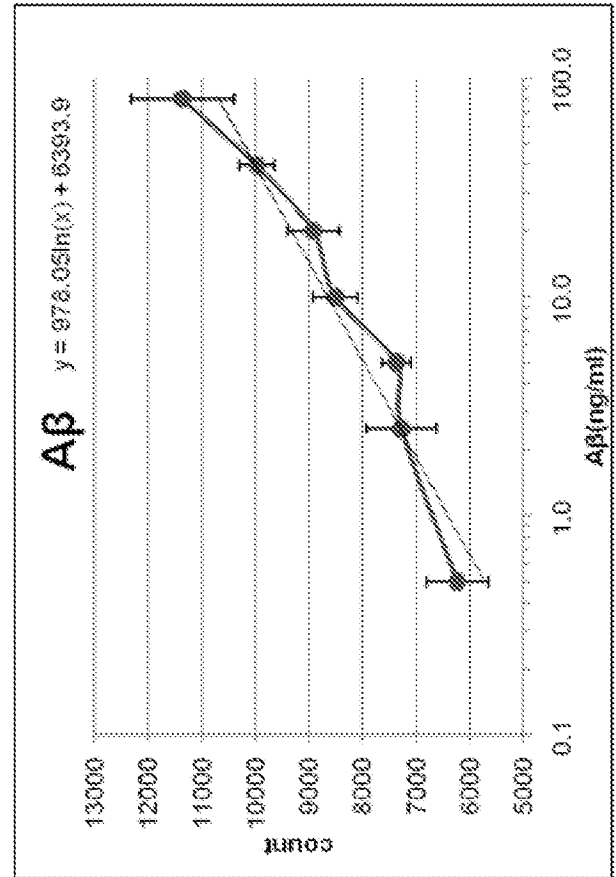
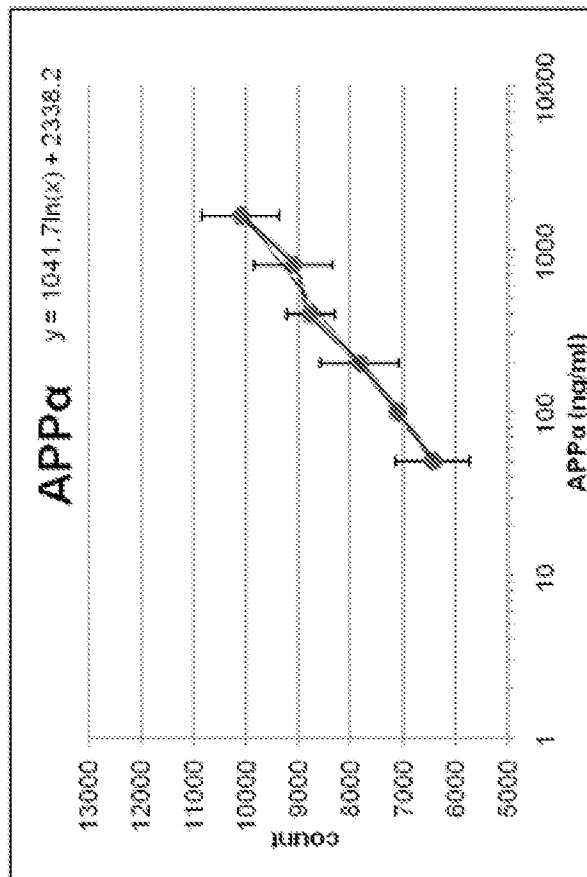
site ③ Aβ (1-40 & 1-42)(C-term)

specificity

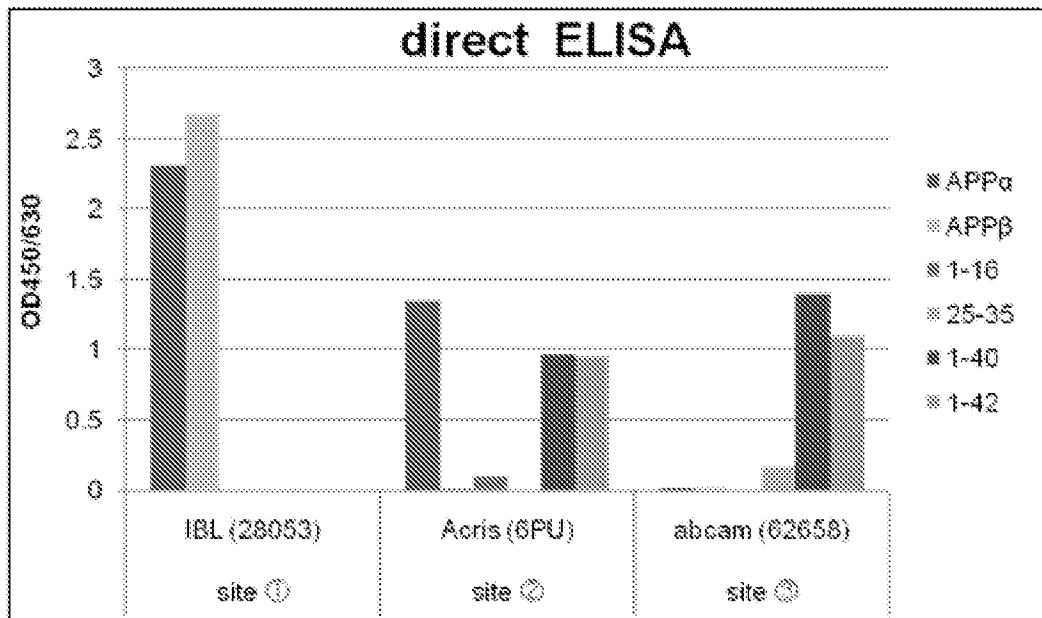
[図5]



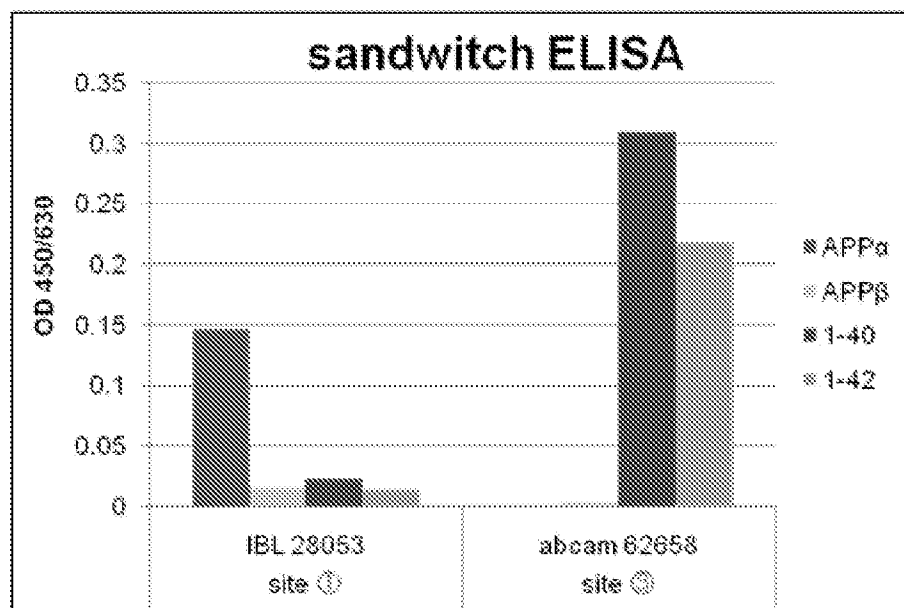
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i, G01N33/577(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, G01N33/536, 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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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 Y	JP 2010-507666 A (The Rockefeller University), 11 March 2010 (11.03.2010), paragraph [0156] & US 2010/0143361 A1 & EP 2077838 A & WO 2008/066626 A2	1, 5, 7 6, 8-15
X Y	JP 2011-509405 A (Luminex Corp.), 24 March 2011 (24.03.2011), paragraph [0124] & US 2009/0176255 A1 & EP 2240775 A & WO 2009/089254 A1 & CA 2711564 A & CN 101939648 A & AT 526583 T	1-4, 7 8-12
Y	WO 2012/015050 A1 (Riken, Japan), 02 February 2012 (02.02.2012), entire text; fig. 1 (Family: none)	6, 13-15

☒ 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
13 September, 2013 (13.09.13)

Date of mailing of the international search report
01 October, 2013 (01.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068503

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 2007-46959 A (BL Inc.), 22 February 2007 (22.02.2007), paragraph [0032] (Family: none)	8-12
Y	JP 2007-507217 A (Aventis Pharma S.A.), 29 March 2007 (29.03.2007), paragraphs [0079] to [0080] & US 2005/0076400 A1 & EP 1670309 A & WO 2005/032244 A1 & DE 602004027823 D & FR 2860391 A & NO 20061954 A & CA 2540622 A & KR 10-2006-0090988 A & CN 1889826 A & BRA PI0415032 & ZA 200602670 A & RU 2006114692 A & AT 471661 T & IL 174726 A & PT 1670309 E	13-15

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, G01N33/536(2006.01)i, G01N33/577(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, G01N33/536, 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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2010-507666 A（ザ ロックフェラー ユニヴァーシティ） 2010.03.11, 段落【0156】 & US 2010/0143361 A1 & EP 2077838 A & WO 2008/066626 A2	1, 5, 7 6, 8-15
X Y	JP 2011-509405 A（ルミネックス コーポレーション）2011.03.24, 段落【0124】 & US 2009/0176255 A1 & EP 2240775 A & WO 2009/089254 A1 & CA 2711564 A & CN 101939648 A & AT 526583 T	1-4, 7 8-12

☒ 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

1 3 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 1 . 1 0 . 2 0 1 3

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 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

赤坂 祐樹

2 J

3 3 1 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

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 請求項の番号
Y	WO 2012/015050 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2012. 02. 02, 全文、図 1 (ファミリーなし)	6, 13-15
Y	JP 2007-46959 A (株式会社ビーエル) 2007. 02. 22, 段落【0032】 (ファミリーなし)	8-12
Y	JP 2007-507217 A (アバンテイス・フアルマ・エス・アー) 2007. 03. 29, 段落【0079】 - 【0080】 & US 2005/0076400 A1 & EP 1670309 A & WO 2005/032244 A1 & DE 602004027823 D & FR 2860391 A & NO 20061954 A & CA 2540622 A & KR 10-2006-0090988 A & CN 1889826 A & BRA PI0415032 & ZA 200602670 A & RU 2006114692 A & AT 471661 T & IL 174726 A & PT 1670309 E	13-15