

PCT

世界知的  
国際

特許協力条約に基づい



WO 9604558A1

<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/543</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO96/04558  (43) 国際公開日 1996年2月15日(15.02.96)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01510 (22) 国際出願日 1995年7月28日(28.07.95)  (30) 優先権データ 特願平6/197207 1994年7月29日(29.07.94) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヤトロン(IATRON LABORATORIES, INC.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 星野信広(HOSHINO, Nobuhiro)(JP/JP) 川本道子(KAWAMOTO, Michiko)(JP/JP) 嶋本三利(SHIMAMOTO, Mitoshi)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 森田憲一(MORITA, Kenichi) 〒173 東京都板橋区板橋三丁目6番17号 SKT板橋ビル502号 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : MEASUREMENT SYSTEM USING WHOLE BLOOD

(54) 発明の名称 全血を用いる測定方法

(57) Abstract

An adequate amount of whole blood sample is kept in contact with an insoluble carrier covered with a first partner specifically bindable to a measurement object for short period of time. After the combination of the object with the first partner on the insoluble carrier is brought into contact with a second partner by specific binding to the object, the resulting complex comprising the insoluble carrier, the first partner, the measurement object and the labeled second partner is separated from a portion not containing the complex. Then, signals originating from the labeled substance contained in either of the separated parts are detected. According to this method, the whole blood can be used as such without pre-treatment as the specimen, and the measurement object in the whole blood specimen can be measured quickly.

(57) 要約

測定対象物質と特異的に結合する第1のパートナーで被覆された不溶性担体と充分な量の全血被検試料とを短時間接触させ、続いて、不溶性担体上に担持された第1のパートナーと測定対象物質との複合体に、前記の測定対象物質と特異的に結合し、標識化された第2のパートナーを接触させた後、生成した不溶性担体・第1のパートナー・測定対象物質・標識化された第2のパートナーからなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出することを特徴とする測定対象物質の測定方法を記載する。この方法により、全血を前処理せずにそのまま被検試料として使用し、その全血被検試料中の測定対象物質を迅速に測定することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストラリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー			TD	チャード
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	米国
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
		LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム

## 明細書

## 全血を用いる測定方法

## 技術分野

本発明は、全血被検試料をそのまま用いてその全血被検試料中の測定対象物質を検出する方法に関する。すなわち、患者などから採取した全血から血清や血漿を調製することなく、全血をそのまま被検試料として用いて、全血被検試料中に含まれる測定対象物質を測定する方法に関する。

## 背景技術

被検試料中の測定対象物質、とりわけ生体試料中の微量成分の測定に免疫学的測定方法が利用されて久しい。これら微量成分の大部分は、一般に被検試料には  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のオーダー又はそれ以下の量で含まれているに過ぎず、例えば、抗原抗体反応により生成する複合体を免疫拡散法やレーザーネフェロメトリーにより直接的に測定する方法では検出感度に限界があるため、抗原か抗体の一方を好適な物質で標識し、それに基づく信号を検出する方法、いわゆる標識免疫測定法などの手段によって、生体試料中の微量成分をより高精度に測定することができる。標識免疫測定法は種々の方法により実施されるが、例えば、測定対象物質の第1の免疫学的パートナーで被覆された不溶性担体と被検試料を接触させ、続いて洗浄し、又はしないで、不溶性担体上に担持された第1の免疫学的パートナーと測定対象物質との複合体に、標識化された第2の免疫学的パートナーを接触させた後、生成した不溶性担体・第1の免疫学的パートナー・測定対象物質・標識化された第2の免疫学的パートナーからなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出するフォワードサンドイッチ法又はディレイド1ステップサンドイッチ法、測定対象物質の第1の免疫学的パートナーで被覆された不溶性担体と被検試料及び標識化された第2の免疫学的パートナーを同時に接触させた後、生成した不溶性担体・第1の免疫学的パートナー・測定対象物質・標識化された第2の免疫学的パートナーからなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識に由来する信号を検出する1ステップサンドイッチ法、標識化された測定対象物質の第1の免疫学的パートナーと被検試料を接触させ、続いて標識化された第1の免疫学的

パートナーと測定対象物質との複合体に、不溶性担体に担持された第2の免疫学的パートナーを接触させた後、生成した標識化された第1の免疫学的パートナー・測定対象物質・第2の免疫学的パートナー・不溶性担体からなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出するリバースサンドイッチ法、また測定対象物質に対する標識化された免疫学的パートナー（抗体の場合は好適にはモノクローナル抗体）と被検試料を接触させ、続いて不溶性担体上に担持された測定対象物質と同様の作用をする物質（又は不溶性担体上に担持された測定対象物質に対する免疫学的パートナー）を接触させ、生成した標識化された免疫学的パートナー・測定対象物質と同様の作用をする物質・不溶性担体からなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出する免疫阻害法、更に、測定対象物質の免疫学的パートナーで被覆された不溶性担体と被検試料及び測定対象物質と同様の作用をする標識された物質を競合的に接触させ、生成した不溶性担体・免疫学的パートナー・測定対象物質と同様の作用をする標識された物質からなる複合体とその複合体を含まない部分に分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出する競合法等が挙げられる。更に、標識免疫測定法は、用いる標識物質から区分された方法として、例えば、酵素を標識して用いるE I A法、赤血球やラテックス粒子等を担体として用い凝集塊を肉眼等で判定する免疫凝集法、アイソトープを標識物質として用いるR I A法等が挙げられる。これらの方法においては、被検試料と測定対象物質に対する免疫学的パートナーとの接触時間は平衡すなわち時間の経過とともにそれらの複合体が形成される量が増加してくるので、通常、複合体の量が変化しなくなる長時間が選択される。

前記の方法のうち、R I A法は特別な設備を必要とすることや、放射性物質廃棄の問題があることから徐々にE I A法等に置き換えられているが、上記のいずれの方法においても、血液を試料とする場合には、採取した全血をそのまま使用せずに、その全血から血清又は血漿を調製し、それらを被検試料として分析を実施していた。これらの測定法に限らず、一般に不溶性成分例えば血球等を含んでいる全血を被検試料として用いると、それらの不溶性成分が測定値に種々の干渉を及ぼす可能性がある。例えば、B/F分離を行わない均一系の測定法において標識物質に由来する

検出信号を可視領域で測光する場合、測定値に正の誤差を与えることがある。また、凝集反応においては、目的の免疫反応とは関連の無い濁りの要因（血球等）が存在するため、正確な測定が困難である。一方、B/F分離を行う測定においては、不溶性担体に固定化した抗体などと全血を反応させた後に、全血を洗浄してから標識抗体などと反応させることにより、測定を行うことができる。しかし、血球成分が多量に含まれるため、この方法で得られた測定結果と、血清を検体とした場合の測定結果に違いがでてしまい、更に血球量は個人によって異なるため、一定の係数をかけても補正することはできない。このようなことから、全血を測定して診断基準となる結果を得るためには、その血液のヘマトクリット値を測定し、全血測定値を補正する必要がある、その手間を考えるとB/F分離を行う系でも、全血検体は血清又は血漿に分離してから測定に用いられてきた。

一方、不溶性成分の影響を排除する試みも種々行われ、例えば、特公平02-51150号公報には凝集反応に先だつて予め溶血剤を全血に加え不溶性成分の影響を排除する方法、特開平01-237454号公報には酵素による消化又は温和な酸に対する曝露を利用して阻害物質を除くと共に、全血中の結合サイトを露出させて検出感度を向上させる方法、特開平01-165964号公報には全血をノイラミニダーゼで処理し、潜在腫瘍関連抗原を完全に遊離させることにより、不溶性成分の影響を極力低減させる方法が開示されている。また、不溶性成分を除去せずに測定する試みとして、例えば、特開昭64-63868号公報には乾燥濾紙血による肝炎ウイルスの検出方法が開示されている。ここでは、血液を付着させた濾紙を自然乾燥し、測定時には乾燥血液が付着した濾紙の所定面積を切り取り、この濾紙と濾紙に付着した血液成分を抽出するための緩衝液と表面に抗体をコーティングしたビーズを20時間程度反応させている。しかしながら、この方法では、濾紙に吸着させた血液を自然乾燥させるという操作、濾紙を切り取る前処理が必要であり、更に濾紙から血液成分を抽出しており、全血をそのまま被検試料として用いているとはいい難い。

また、上記のような液相で免疫反応を行う系以外に、ドライケミストリーと称される乾式免疫分析要素を用いる方法（例えば特開平01-112159号公報）、いわゆるバイオセンサーを用いる方法（例えば特表平04-502671号公報）、又は免疫クロマトグラフィー試験を用いる方法（例えば特開平06-94718号

公報)は、全血をそのまま被検試料として用い、目的物質の検出を行うことができる。

しかしながら、液相で免疫反応を行う前記の従来法においては、所望の免疫反応を実施する前に、更に一段階の追加操作(前処理)が必要であり、分析操作が繁雑となるか、又は多くの場合、多検体、多項目処理に適していなかった。一方、全血を直接被検試料として用いる乾式免疫分析要素法は、測定精度の面で不充分であった。更に、バイオセンサーや免疫クロマトグラフィー試験を用いる方法は、特殊な器具を用いる必要があった。

従って、本発明の目的は、全血を前処理せずにそのまま被検試料として使用し、その全血被検試料中の測定対象物質を迅速に測定することのできる分析手段を提供することにある。即ち、全血を被検試料としたときに発生する問題、例えば不溶性成分と可溶性成分の存在割合が変動するという不都合が生じて、全血を用いたときの測定対象物質の測定結果が、血清あるいは血漿といった従来の試料を用いたときの測定結果と一致する測定手段を提供することで、従来の採取全血を前処理する操作等を省略して緊急検査を可能にするだけでなく、一般の検査においても大幅な省力化を達成することにある。

#### 発明の開示

本発明方法では、簡便、迅速な測定方法(特に免疫学的測定方法)を用いて、全血被検試料中の測定対象物質の濃度を、血清や血漿を被検材料とした場合と同じく得ることができる。これによって血清や血漿分離にかかる時間が不要になり、更に、本発明方法では特異的結合パートナー(特に免疫学的パートナー)で被覆された不溶性担体と全血被検試料を短時間で接触させることを特徴としているため、結果的には測定結果を迅速に得ることができる。

前記の目的は、本発明による、測定対象物質と特異的に結合する第1のパートナーで被覆された不溶性担体と充分な量の全血被検試料とを短時間接触させ、続いて、不溶性担体上に担持された第1のパートナーと測定対象物質との複合体に、測定対象物質と特異的に結合し、標識化された第2のパートナーを接触させた後、生成した不溶性担体・第1のパートナー・測定対象物質・標識化された第2のパートナーからなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいず

れか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出することを特徴とする測定対象物質の測定方法によって達成することができる。この際、第1のパートナーと第2のパートナーは同じであっても異なってもよく、測定対象物質に対応して適宜選択することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、HBs抗原を測定する被検試料として、血清を用いた場合と全血を用いた場合との相関図である。

図2は、HBs抗体を測定する被検試料として、血清を用いた場合と全血を用いた場合との相関図である。

#### 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。

本発明は、任意の方法（例えば採血）により患者などから得られた全血及び人工的に作られた測定対象物質あるいはその類似体を含む試料を被検試料とし、この被検試料中の測定対象物質を免疫学的方法で測定することを含んでなる。ここで「全血」被検試料とは、患者などから採血された血液に含まれている不溶性成分を除去する処理を実施しておらず、不溶性成分を含有している試料を意味する。従って、血清試料や血漿試料は含まれないが、患者などから採血した血液それ自体の他に、採血した血液に、例えば、抗凝固剤（例えば、EDTA、クエン酸ナトリウム、ヘパリン、フッ化ナトリウム又はシュウ酸ナトリウム）及び/又は血液保存剤（例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸、ブドウ糖及びリン酸二水素ナトリウムからなるCPD）などを添加した試料は前記の「全血」被検試料に含まれる。また、患者などから採血した血液を、例えば、抗凝固作用を有する緩衝液で希釈した試料も、本発明の全血被検試料に含まれる。更に、患者などから採血した血液を、上記の処理などを施した後、長期間〔例えば、血液保存剤による有効期間（4～6℃）である21日以上〕放置した試料も本発明の全血被検試料に含まれる。また、「人工的に作られた測定対象物質あるいはその類似体を含む試料」とは、本発明を定量化するため、あるいは正確性を管理するために主に使用される物質であり、天然あるいは人工の不溶性成分、例えば血球、ラテックスビーズ等を含んでいてもいなくても

よいが、操作性からは不溶性成分を含んでいない方が好ましく、更には、測定対象物質と相関関係を示す物質であれば、必ずしも測定対象物質あるいはその類似体を含んでいる必要はない。

本発明方法において測定対象物質とは、血液中に一般に含まれている成分（特に微量成分）であれば特に制限されないが、例えば、各種タンパク質、多糖類、脂質、ハプテン、核酸及びそれらの複合体又は断片等が挙げられる。より詳細には、HBs抗原、HBs抗体、HIV-1抗体、HIV-2抗体、HTLV-I抗体、トレポネーマ抗体等の感染症関連マーカー、AFP、CRP、CEA等の腫瘍関連抗原、プラスミノゲン、アンチトロンビン-III、D-ダイマー、トロンビン-アンチトロンビンIII複合体等の凝固線溶マーカー、ホルモン、サイトカイン、酵素等や抗てんかん薬及びジゴキシン等の各種薬剤等を挙げる事ができる。また、特定の配列を有するDNA若しくはRNA又はそれらの一部からなるポリヌクレオチド等が挙げられる。

また、その測定対象物質と特異的に結合するパートナーとは、前記の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、すなわち免疫学的パートナー、例えば、前記各種タンパク質、多糖類、脂質、核酸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）である。例えば測定対象物質がHBs抗原であるときのHBs抗体、測定対象物質がHIV-1抗体であるときのHIV-1抗原等の感染症関連マーカーに対する抗原又は抗体、腫瘍関連抗原に対する抗体等を挙げる事ができる。また、測定対象物質と特異的に結合するパートナーとしては、測定対象物質が核酸であれば、それに対する抗体の他に、測定対象核酸の塩基配列と相補的な配列の少なくとも一部分好ましくは全部を有する相補核酸、例えば、相補的DNA若しくはRNA又はそれらを制限酵素等で処理した断片又は合成ポリヌクレオチド等を挙げる事ができる。更に、免疫学的パートナーとして、抗体を用いる場合には、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。従って、未処理あるいは酵素などで処理した免疫グロブリン〔IgGやそれをペプシン消化したF(ab')<sub>2</sub>等〕を用いる事ができる。抗原の場合は、ウイルスライゼート等を常法、例えば密度勾配遠心法等により得たもの、また、抗原の1部に相当するペプチド及び組み換え蛋白質等を使用することができる。これらの特異的結合性バ



ートナーの内、標識を付してないものを不溶性担体に固定して第1の特異的結合性パートナーとし、標識を付したものを第2の特異的結合性パートナーとして用いる。以下、特異的結合性パートナーとして免疫学的パートナーを用いる場合について説明するが、とくに不都合がないかぎり、それらの説明はそのまま相補核酸にもあてはまるものと理解されたい。

本発明方法を実施する場合には、まず、測定対象物質に対する第1の免疫学的パートナーを不溶性担体に被覆する。不溶性担体に免疫学的パートナーを被覆する方法としては、例えば「酵素免疫測定法」(医学書院)に記載されているような物理的吸着あるいは共有結合等の従来公知の方法によって被覆することができる。具体的には、不溶性担体と免疫学的パートナーを含む溶液を室温で数時間接触させた後、適当な緩衝液で洗浄し、必要に応じて風乾することにより調製することができる。このとき、必要に応じて、従来公知の手段で免疫学的パートナーを被覆した後、ウシ血清アルブミンあるいはスキムミルク等で、又は、化学結合における過剰の官能基をリジン等でブロッキングすることにより、測定対象物質以外の成分が非特異的に不溶性担体に吸着することを防止することができる。こうして得た免疫学的パートナー被覆不溶性担体は、そのままの状態でも、あるいは適当な緩衝液(例えばリン酸緩衝液)等で湿潤させた状態で保存してもよい。

上記不溶性担体としては、従来公知の不溶性担体、例えばチューブ、プレート、メンブレン、フィルム又はビーズ等を用いることができ、それらの材料は、天然又は合成された物質、例えばセルロースあるいはナイロン、ポリスチレン、ポリエチレン等及び担体として適度な強度を得るために、それらを組み合わせた物質、またそれらに無機物例えば鉄等を含んでいる物質が用いられる。これらの不溶性担体は被検試料中の測定対象物質以外の成分あるいは標識された免疫学的パートナーが非特異的に吸着しないように従来公知の手段により表面処理、例えば担体表面に適当なアニオン基を導入したもの等また、測定対象物質に対する免疫学的パートナーを不溶性担体に被覆しやすいように適当な官能基、例えば、カルボキシル基、アミノ基等を従来公知の手段により担体表面に導入したもの等が好適に用いられる。更に不溶性担体がビーズの場合には多孔性であってもなくてもよいが、洗浄効率が良好な多孔性でないものが好ましく、直径が0.1  $\mu$ m $\sim$ 7mm、より好適には、フィルター等を用いた濾過方式又はノズル等での吸引方式で洗浄を行う場合には全血被

検試料中の不溶性成分の直径よりも大きな直径を有するビーズ、例えば直径が10  $\mu$ m以上のビーズが用いられる。しかし、ビーズにフェライト等の磁性体成分が含まれている場合には、フィルター等を用いず、磁石でビーズを集めて洗浄を行うことができるため、直径が10  $\mu$ m以下のもの、好ましくは0.1~5  $\mu$ mのものを用いることができる。

このように構成された免疫学的パートナー被覆不溶性担体と全血被検試料とを接触させ、測定対象物質と不溶性担体上の免疫学的パートナーとの複合体を形成させる。本発明方法において、この際、多量の液性物質、例えば検体希釈用緩衝液を含まない方が好ましい。

長時間免疫反応を行う測定系は、一般にエンドポイント法と言われ、反応系に加えた検体中の測定対象物質全てが免疫反応を起こすことを原理としている。この場合、ヘマトクリット値30%の全血を検体とすると、そこに含まれる測定対象物質は、血清を同量用いた場合の70%となり、測定結果も70%の値となる。更にヘマトクリット値50%の全血では、測定結果が血清を同量用いた場合の50%となり、ヘマトクリット値補正を行わないと、血清を用いて得られた測定結果と互換性が得られない。

これに対し本発明は、全血被検試料と免疫学的パートナー被覆不溶性担体を、反応初期から短時間だけ接触させ、エンドポイントに達する前の時点で反応を停止する（測定する）ことを特徴としている。これにより全血被検試料の全ての測定対象物質が不溶性担体上の免疫学的パートナーと反応するのではなく、限られた時間内に測定対象物質の濃度に依存した量だけが濃度に比例して反応することになる。この場合、全血中と血清中の測定対象物質濃度は同一であることから、血球成分の存在は測定結果に何の影響も及ぼさず、これまで予想もできなかった程度に全血を用いた測定結果と血清を用いた測定結果の一致が見られた。

具体的な接触時間は、測定対象物質の種類及び全血被検試料中の濃度、用いる免疫学的パートナーの種類、更には、不溶性担体の表面積などにより変化するが、全血被検試料を用いる場合の測定結果が、その全血被検試料から得られる血清又は血漿被検試料を用いる場合の測定結果と一致する時間帯は、簡単なパイロット試験を実施することにより容易に決定することができる。

また、免疫学的パートナーで被覆された不溶性担体と接触させる全血被検試料の

量は、例えば不溶性担体がビーズの場合、そのビーズが自由に動き回れる程度であればよく、この量は以下の実験により決定することができる。

測定対象物質に抗原、その免疫学的パートナーに抗体を用いる場合、一定量の抗体を例えば直径100 $\mu$ mのポリスチレンビーズに被覆し、試験あたりの一定のビーズ量に対し、全血被検資料の量と反応時間を変化させ、血清で得られた測定結果と同じ結果が得られる条件を採用すればよい。

例えば、測定対象物質としてHBs抗原を用い、第1及び第2の免疫学的パートナーとして抗HBsウサギ特異抗体F(a b')<sub>2</sub>をそれぞれ1.7 $\mu$ gと0.12 $\mu$ gを用い、不溶性担体として直径100 $\mu$ mのポリスチレンビーズ5mg（表面積=2.5cm<sup>2</sup>）を用いる場合には、前記の接触時間は、24時間以内、好ましくは30秒～30分間、より好ましくは1～10分間であることができる。

前記の接触により、全血被検試料中の測定対象物質と不溶性担体上の第1の免疫学的パートナーとの複合体を形成させた後、必要に応じてリン酸緩衝液等で洗浄操作を行う。この洗浄工程は実施しなくてもよいが、実施する方が好ましい。なぜなら、次工程の標識化された第2の免疫学的パートナーを加える時、標識化された第2の免疫学的パートナーを含む緩衝液が存在すると、全血被検試料が、この緩衝液により希釈されるため、実質的に被検試料量の変動を生じる。しかしながら、標識化された第2の免疫学的パートナーを含む他の液性成分が存在しても、前工程と異なり、その影響を非常に小さいものにすることができる。例えば、被検試料中の測定対象物質と不溶性担体上に被覆された免疫学的パートナーが、平衡近くに達した後に標識化された第2の免疫学的パートナーを含む緩衝液を加える、又は、全血被検試料量に比べ、少量（好ましくは50%以下）の標識化された第2の免疫学的パートナーを含む緩衝液を加えることであるが、これら2法を組合せると、緩衝液等の他の液性成分が存在する影響をより小さくすることができる。当然のことながら、標識化された第2の免疫学的パートナーが、例えば、粉末であったり、カプセル等に粉末状態で含まれている場合は、洗浄工程は実施しなくてもよい。また、洗浄工程を実施すれば、次工程の標識化された第2の免疫学的パートナーを加える時、標識化された第2の免疫学的パートナーを含む緩衝液が存在しても、全血被検試料を用いる場合の測定結果と、その全血被検試料から得られる血清又は血漿被検試料を用いる場合の測定結果を一致させることになら影響しない。

続いて、適当な標識物質で標識化された第2の免疫学的パートナーを添加して、先の複合体と接触させる。免疫学的パートナー被覆不溶性担体と測定対象物質の複合体と、標識化された第2の免疫学的パートナーとの接触時間は特に限定されるものではなく、従来公知の方法で実施されている数時間以内であればよい。迅速測定の観点からは、この接触時間は1時間以内、好ましくは30分以内、より好ましくは10分以内が好適である。この工程により、不溶性担体に被覆された免疫学的パートナー／測定対象物質／標識化された第2の免疫学的パートナーとの結合体を形成させ、適当な緩衝液で洗浄操作を行い、未結合の標識化された第2の免疫学的パートナーを取り除く。

本発明方法では、従来公知の標識物質を用いることができる。例えば、標識物質として、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、ルシフェリンールシフェラーゼ等の生物発光物質、ルミノール、アクリジン誘導体、アダマンタン誘導体等の化学発光物質、フルオレセインイソチアネート等の蛍光物質、金コロイド等の金属、 $^{32}\text{P}$ 等の放射性物質等を用いることができる。また、標識物質を酵素サイクリング等で増感して用いてもよい。好ましくはルミノール、アクリジン誘導体、アダマンタン誘導体等の化学発光物質を用いる。

前記の標識物質を公知の手段によって、第2の免疫学的パートナーに標識化することができる。例えば、直接両者を混合する物理的結合法、好ましくは適当なリンカー剤を介して結合させるグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法、アビジンとビオチンを介する方法等によって標識物質を第2の免疫学的パートナーに結合させることができる。こうして得た標識化物質は、適当な溶液、好ましくはリン酸緩衝液中に保存し、そのまま、あるいは更に希釈して、必要量を先に形成した複合体に添加する。この時、必要に応じて、従来公知のプロッキング剤（例えばウシ血清アルブミン、スキムミルク等）や、防腐剤（例えばアジ化ナトリウム等）や信号増強剤（例えばp-ヨードフェノール等）を含ませることができる。

前述の工程で得られた、不溶性担体に被覆された免疫学的パートナー／測定対象物質／標識化された第2の免疫学的パートナーとの結合体を、適当な緩衝液で洗浄して結合体を含む部分（洗浄残渣）と、その結合体を含まない部分（洗浄液）とに分離し、こうして分離されたいずれか一方の部分、好ましくは結合体を含む部分

(洗浄残渣)に含まれる標識物質に由来する信号を検出することにより、被検試料中に含まれていた測定対象物質を定性的に、あるいは定量的に測定することができる。

標識物質が酵素の場合は、基質及びクロモジェン等を添加して一定時間反応させた後、その発色強度を分光学的に検出すればよい。また、標識物質が化学発光物質、例えばアクリジン誘導体の場合には、アクリジン誘導体の発光を発現させる過酸化水素及びアルカリ性溶液を同時又は別個に添加して一定時間反応させた後、その発光量を発光検出器によって検出すればよい。この時、必要に応じて信号増強剤(例えば塩酸等)を過酸化水素及びアルカリ性溶液の添加前、又は過酸化水素等に含ませ、添加することができる。このようにして得られる、標識物質由来の信号を検出することで、全血被検試料中の測定対象物質を短時間に検出することができる。

以上のように、本発明方法によれば、全血を前処理せずにそのまま被検試料として使用し、その全血被検試料中の測定対象物質を迅速に測定することができる。更に、被検試料と免疫学的パートナーとの接触時間を極端に短くすることができ、しかもその接触時間と、被検試料の量、及び不溶性担体の量(担体の表面積や免疫学的パートナーの被覆量)などを或る好適な条件にすれば、全血を用いたときの測定対象物質の測定結果が、血清又は血漿といった従来の試料を用いたときの測定結果と相関関係を有するという驚くべき効果も得ることができる。従って、本発明方法は、採取全血を前処理する従来法の必須の操作等を省略し、前記の接触時間を短くすることができるので、緊急検査への対応や一般の検査においても大幅な省力化が可能になる。本発明方法は上記のフォワードサンドイッチ法及びディレイド1ステップサンドイッチ法に限らず、標識免疫測定法全般で実施できるものであり、例えば前述の1ステップサンドイッチ法、リバースサンドイッチ法、競合法等にも適用することができる。また、被検試料としては全血に限らず、他の体液成分、例えば血清、血漿、尿、髄液等にも適用することができる。

## 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

### 実施例1：HBs抗体コートビーズの調製

HBs抗原をウサギに免疫して得られた抗血清を以下の方法で精製した。すなわち、HBs抗原固定化セファローズ4Bカラムで抗血清を処理し、結合しなかった血清成分を、0.15M食塩を含むpH7.0の20mMリン酸緩衝液（以下、PBSという）で十分に洗浄した。続いて、3Mチオシアン酸ナトリウムを含むPBSで特異抗体を溶出し、50mM酢酸緩衝液（pH4.5）に対して透析した。この特異抗体に、抗体の2%重量のペプシンを加え、37℃で16時間消化した。そこに1Mトリス溶液を加えてpH8として反応を停止した後、セファクリルS-200カラム（PBS平衡化）でF(ab')<sub>2</sub>を分画した。得られた抗HBs特異抗体F(ab')<sub>2</sub>画分をPBSで100μg/mlに調整し、抗体液1mlに対し直径100μmのポリスチレンビーズ0.35gを加え、37℃で4時間ローテーターで混和してコートした。PBSで3回洗浄後、PBS中に10%懸濁液として保存した。

#### 実施例2：アクリジニウムエステル標識HBs抗体の調製

実施例1に従って調製した抗HBs抗体F(ab')<sub>2</sub>画分を0.1Mリン酸緩衝液（pH8.0）で0.25mg/mlに調整した。その抗体液1mlに、ジメチルホルムアミドで0.125mg/mlに調製した発光物質である10-メチル-9-[4-[2-(スクシンイミジルオキシカルボニル)エチル]フェニルオキシカルボニル]-アクリジニウムフルオロスルホネート溶液50μlを加えた。室温で30分間振盪反応した後、ブロック剤として0.2Mグリシン緩衝液（pH8.0）0.5mlを加えて、更に1時間振盪反応した。この反応液を生理食塩水で平衡化したPD-10カラム（ファルマシア社）に通し、余分な低分子発光物質を除去した。

#### 実施例3：全血中のHBs抗原の測定

実施例1で調製したHBs抗体コートビーズ懸濁液から前記ビーズ5mg相当量をピペットにより反応容器に分注し、EDTA添加全血試料100μlを加え、37℃で振盪しながら3分間反応させた。次いで、洗浄液（0.15M食塩及び0.1%Tween20を含むpH7.0の10mMリン酸緩衝液）で4回洗浄後、実施例2で調製した発光物質標識HBs抗体を前記の洗浄液で100倍に希釈したものの100μlと希釈液（0.05%Tween20を含むPBS）200μlを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。続いて洗浄液で4回洗浄した後、0.

1 N塩酸水溶液100  $\mu$  lを加え、更にそこに20 mM過酸化水素を含む0.1 M水酸化ナトリウム溶液300  $\mu$  lを加えて発光させた。その発光量をフォトマルチプライヤーで測定した。

また、対照として、前記で用いた全血試料から分離した血清試料を同様に操作し、その発光量を測定した。血清試料と全血試料の相関を図1に示した。287例での相関係数は0.9958、回帰式は $y = 0.9863x + 114$  (x:血清、y:全血)と両者の発光量は良く一致した。

#### 実施例4：全血静置時間によるHBs抗原量の変動

HBs抗原が陰性であることが既知である患者とHBs抗原が陽性であることが既知である患者から、EDTA加採血管〔テルモ(株)〕で採血した全血試料を試験管に各5 ml分取し、各々について採血直後、15分後、30分後、60分後に、実施例3に記載の操作に従い、HBs抗原に由来する発光量を測定した。なお、全血試料の攪拌は試験管に分取した直後に実施したが、その後は室温に静置した。結果を表1に示す。

表1

	発光量 (カウント)			
	採血直後	15分後	30分後	60分後
HBs抗原陰性検体	2,185	2,159	2,226	2,148
HBs抗原陽性検体	46,666	46,270	46,136	47,253

全血試料を試験管に分取した後の静置時間が長くなるにつれて血球が沈降していく様子が目視でも確認されたが、静置時間による発光量の差は認められなかった。なお、分析操作時の検体100  $\mu$  lの採取は液面の3 mm下から行った。

#### 実施例5：HBs抗原コートビーズの調製

HBs抗原陽性ヒト血漿を、セシウムクロライドの密度が1.04から1.20の範囲で48000 rpm、210分間の密度勾配超遠心法で分画し、ウイルス粒子を得た。このウイルス粒子をTween 80で可溶化してHBs抗原の材料として用いた。この可溶化HBs抗原は電気泳動の結果、分子量24000と27000のHBs抗原タンパク質を主に含んでいることが確認された。このHBs抗原を

40  $\mu$ g/mlとなるように0.1Mグリシン-NaOH緩衝液で調整し、この液1mlに対して直径100  $\mu$ mのスチレンビーズを0.35g加え、37℃で16時間攪拌して抗原をコートした。このビーズをPBSで5回洗浄し、PBS中に10%懸濁液として保存した。

#### 実施例6：アクリジニウムエステル標識HBs抗原の調製

実施例5に記載の方法に従って調製したHBs抗原を0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)で0.25mg/mlに調整し、その抗原液1mlに、ジメチルホルムアミドで0.125mg/mlに調整した発光物質である10-メチル-9-[4-[2-(スクシンイミジルオキシカルボニル)エチル]フェニルオキシカルボニル]-アクリジニウムフルオロスルホネート溶液50  $\mu$ lを加えた。室温で30分間振盪反応した後、ブロック剤として0.2Mグリシン緩衝液(pH8.0)0.5mlを加えて、更に1時間振盪反応した。この反応液を生理食塩水に対して3回透析し、発光物質標識HBs抗原とした。

#### 実施例7：全血中のHBs抗体の測定

実施例5で調製したHBs抗原コートビーズ懸濁液から前記ビーズ5mg相当量をピペットにより反応容器に分注し、EDTA添加全血試料100  $\mu$ lを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。次いで、実施例6で調製した発光物質標識HBs抗原を前記の洗浄液で100倍に希釈したもの50  $\mu$ lを加え、振盪しながら更に5分間反応させた。洗浄液で4回洗浄した後、0.1N塩酸水溶液100  $\mu$ lを加え、そこに20mM過酸化水素を含む0.1N水酸化ナトリウム溶液300  $\mu$ lを加えて発光させた。その発光量をフォトマルチプライヤーで測定した。

また、対照として前記全血試料から分離した血清試料も同様に操作し、その発光量を測定した。血清試料と全血試料の相関を図2に示した。286例での相関係数は0.9927、回帰式は $y = 1.017x + 207$  (x:血清、y:全血)と両者の発光量は良く一致した。

#### 実施例8：HBs抗体コート磁性体ビーズの調製

磁性ビーズ(トシル活性化ダイナビーズ、粒径0.5  $\mu$ m)2mlを専用磁石(MPC)で集め、上清を吸引除去した。50mMホウ酸緩衝液(pH9.5)4mlを加えて洗浄した後、MPCでビーズを集め、上清を吸引除去した。このビーズに上記緩衝液1mlを加えて懸濁液とした。



実施例1で調製した抗HBs特異抗体F(a b')<sub>2</sub>画分を50 mMホウ酸緩衝液(pH 9.5)に透析した後、0.5 mg/mlに濃度を調製した抗体液1 ml中に上記ビーズ懸濁液を滴下混和し、37℃のフラン器中で24時間ゆっくり攪拌した。MPCでビーズを集めた後、上清を吸引除去した。ここに、0.15 Mの食塩を含む20 mM磷酸緩衝液(pH 7.0)で1 mg/mlに調製した牛血清アルブミン(BSA)液4 mlを加え、4℃で一夜攪拌して過剰の反応基をブロックした。PBSを用いて上記の方法に従い4回洗浄操作を行った後、0.05%アジ化ナトリウムと1 mg/mlのBSAを含むPBS 2 ml中にビーズを保存した。

#### 実施例9：反応時間とHBs抗原の測定値

実施例1で調製したHBs抗体コートビーズ懸濁液から前記ビーズ5 mg相当量をピペットにより反応容器に分注し、EDTA添加全血試料(HBs抗原25 U/mlの試料)100  $\mu$  lを加え、37℃で振盪しながら1分間、3分間、5分間、15分間、30分間、1時間、3時間、7時間、24時間、48時間反応させた。次いで、洗浄液(0.15 M塩化ナトリウム、0.1% Tween 20を含むpH 7.0の10 mMリン酸緩衝液)で4回洗浄後、実施例2で調製した発光物質標識HBs抗体を前記の洗浄液で100倍に希釈したもの100  $\mu$  lと希釈液(0.05% Tween 20を含むPBS)200  $\mu$  lを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。続いて前記洗浄液で4回洗浄した後、0.1 N塩酸水溶液100  $\mu$  lを加え、更にそこに20 mM過酸化水素を含む0.1 M水酸化ナトリウム溶液300  $\mu$  lを加えて発光させ、その発光量をフォトマルチプライヤーで測定した。

また、対照として、全血試料から分離した血清試料を用いて同様の操作を行い、結果を表2に示す。表2から明らかなおり、EDTA添加全血試料と、全血試料から分離した血清試料との間で、試料とHBs抗体ビーズとの接触時間が1分間～30分間の範囲で両者の測定値(発光量)はほぼ同じ値であった。

表 2

時間	全血	血清
1 分間	6 1 1 4	5 8 5 0
3 分間	1 6 0 2 6	1 6 1 6 4
5 分間	2 5 0 6 0	2 4 9 4 0
1 5 分間	5 2 3 6 8	5 3 1 7 6
3 0 分間	7 9 9 5 3	8 7 2 3 4
1 時間	9 2 0 3 5	1 2 1 8 6 9
3 時間	1 0 8 6 9 4	1 4 5 2 8 6
7 時間	1 1 3 9 4 5	1 6 9 3 4 6
2 4 時間	1 1 6 5 2 3	1 7 2 3 4 5
4 8 時間	1 1 8 6 9 2	1 7 6 6 9 2

(数字は発光カウント)

実施例 1 0 : ヘマトクリット値による HB s 抗原量の変動

HB s 抗原が陽性であることが既知の患者から EDT A 加採血管〔テルモ (株) 〕で採血し、その全血試料のヘマトクリット値を 7 0 % に調整後、同一患者から得られた血漿でヘマトクリット値が 0 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 % になるように希釈した。各々について実施例 3 に記載の方法に従い、HB s 抗原に由来する発光量を測定した。その結果を表 3 に示す。なお、ヘマトクリット値が 7 0 % 以上の全血被検試料は、その液性から被検試料としての採取が困難であったため測定には使用しなかった。

実施例 1 1 : 検体希釈による HB s 抗原量の変動

実施例 1 で調製した HB s 抗体コートビーズ懸濁液から前記ビーズ 5 m g 相当量をピペットにより反応容器に分注した。実施例 1 0 と同様の方法で、各々のヘマトクリット値となるように希釈した全血試料 1 0 0  $\mu$  l と、実施例 3 で使用した洗浄液 1 0 0  $\mu$  l を、前記ビーズが入っている反応容器に加えた。以後、実施例 3 に記載の方法に従い、HB s 抗原に由来する発光量を測定した。その結果を表 3 に示す。

実施例 1 2 : 一次洗浄を行わない場合の HB s 抗原量の変動 - 1

実施例 1 で調製した HB s 抗体コートビーズ懸濁液から前記ビーズ 5 m g 相当量

をピペットにより反応容器に分注し、実施例10と同様の方法で、各々のヘマトクリット値になるように希釈した全血試料100 $\mu$ lを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。次いで、実施例2で調製した発光物質標識HBs抗体を実施例3で使用した洗浄液で100倍に希釈したもの100 $\mu$ lと希釈液(0.05% Tween 20を含むPBS)100 $\mu$ lを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。以後、実施例3に従いHBs抗原に由来する発光量を測定した。その結果を表3に示す。

### 実施例13：一次洗浄を行わない場合のHBs抗原量の変動-2

実施例1で調製したHBs抗体コートビーズ懸濁液から前記ビーズ5mg相当量をピペットにより反応容器に分注し、実施例12で得られた各々のヘマトクリット値になるように希釈した全血試料100 $\mu$ lを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。次いで、実施例2で調製した発光物質標識HBs抗体を実施例3で使用した洗浄液で27.5倍に希釈したもの10 $\mu$ lを加え、37℃で振盪しながら5分間反応させた。以後、実施例3に記載の方法に従い、HBs抗原に由来する発光量を測定した。その結果を表3に示す。

表3

ヘマトクリット値	実施例10	実施例11	実施例12	実施例13
0%	17764	17566	16486	18182
10%	17506	16376	16284	18286
20%	17682	15250	15752	17978
80%	17340	14122	15426	18000
40%	17982	12874	14876	17620
50%	17860	11700	14720	17782
60%	17886	10258	14450	17894
70%	17368	7974	13118	17460

(数字は発光カウント)

以上の実施例10~13の結果から、HBs抗原を含む全血被検試料とHBs抗体コートビーズを接触させるときに、他の液性成分が存在しないとヘマトクリット

値による差は見られない（影響を受けない）ことが確認された（実施例 10）。更に、HBs 抗原を含む全血被検試料と HBs 抗体コートビーズを接触させた後、洗浄しないで被検試料量の 1 / 10 容のアクリジニウムエステル標識 HBs 抗体を加えても、ヘマトクリット値の差による測定値の変動は非常に少ないことも確認された（実施例 13）。これは、アクリジニウムエステル標識 HBs 抗体が加えられるまでに、全血被検試料中の HBs 抗原と HBs 抗体コートビーズの複合体形成が進行しているためであり、ヘマトクリット値から計算された被検試料量の変化が測定結果に及ぼす影響に比べ非常に少ないことを示唆している。

#### 実施例 14：磁性体ビーズを用いた全血中 HBs 抗原の測定

実施例 8 で調整した HBs 抗体コート磁性体ビーズ懸濁液 50  $\mu$  l を反応容器に取り、MPC でビーズを吸引し、液成分を吸引除去した後、EDTA 添加全血試料 100  $\mu$  l を加え、37℃で振盪しながら 3 分間反応させた。次いで、実施例 3 と同じ洗浄液で 4 回洗浄後、実施例 2 で調製した発光物質標識 HBs 抗体を洗浄液で 100 倍に希釈したもの 100  $\mu$  l と実施例 3 と同じ希釈液 200  $\mu$  l を加え、37℃で 5 分間振盪反応させた。洗浄液で 4 回洗浄した後、0.1 N 塩酸水溶液 100  $\mu$  l を加え、更に、20 mM の過酸化水素を含む 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液 300  $\mu$  l を加えて発光させ、その発光量をフォトマルチプライヤーで測定した。また、対照として全血から分離した血清を同様に操作し、その発光量を測定した。血清と全血の 50 例による相関係数は、0.9892、回帰式は  $y = 0.9739x + 189$  と両者の発光量はよく一致した。

#### 産業上の利用可能性

本発明方法によれば、全血を前処理せずにそのまま被検試料として使用し、その全血被検試料中の測定対象物質を迅速に測定することができるので、従来の採取全血を前処理する操作等を省略して緊急検査を可能にするだけでなく、一般の検査においても大幅な省力化を達成することができる。

以上、本発明を特定の実施態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形は本発明の範囲に含まれる。

## 請 求 の 範 囲

1. 測定対象物質と特異的に結合する第1のパートナーで被覆された不溶性担体と充分な量の全血被検試料を短時間接触させ、続いて、不溶性担体上に担持された第1のパートナーと測定対象物質との複合体に、前記の測定対象物質と特異的に結合し、標識化された第2のパートナーを接触させた後、生成した不溶性担体・第1のパートナー・測定対象物質・標識化された第2のパートナーからなる複合体とその複合体を含まない部分とに分離し、こうして分離されたいずれか一方に含まれる標識物質に由来する信号を検出することを特徴とする測定対象物質の測定方法。
2. 第1のパートナーで被覆された不溶性担体と全血被検試料とを接触時間が30分間より短い請求項1に記載の方法。
3. 測定対象物質と特異的に結合する第1のパートナー及び測定対象物質と特異的に結合する第2のパートナーが、それぞれ免疫学的パートナーである、請求項1に記載の方法。
4. 免疫学的測定法である、請求項3に記載の方法。
5. 免疫学的測定法が化学発光免疫測定法である、請求項4に記載の方法。
6. 免疫学的測定法が酵素免疫測定法である、請求項4に記載の方法。
7. 測定対象物質がHBs抗原である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01510

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> G01N33/543

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)

Int. Cl<sup>6</sup> G01N33/543, G01N33/48-52, G01N33/58-98

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

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1995

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1995

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

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 3-225277, A (Fuji Rebio Inc.), October 4, 1991 (04. 10. 91) & EP, 440193, A3	1 - 7
X	JP, 2-115767, A (Asupen Diagnostics Corp.), April 27, 1990 (27. 04. 90) & EP, 359274, A2 & US, 5079171, A	1, 3-6

 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 document 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
August 30, 1995 (30. 08. 95)Date of mailing of the international search report  
September 19, 1995 (19. 09. 95)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/543

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))

Int. Cl. G01N33/543, G01N33/48-52,  
G01N33/58-98

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 1926-1995年  
日本国公開実用新案公報 1971-1995年

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

CAS ONLINE

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	JP, 3-225277, A (富士レビオ株式会社), 4. 10月. 1991 (04. 10. 91) & EP, 440193, A3	1-7
X	JP, 2-115767, A (アスペン・ダイアグノステイツクス・ コーポレーション), 27. 4月. 1990 (27. 04. 90) & EP, 359274, A2&US, 5079171, A	1, 3-6

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」 先行文献ではあるが、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

30. 08. 95

国際調査報告の発送日

19.09.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

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)

亀田 宏之

2 J 9 4 0 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3252