

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4704572号
(P4704572)

(45) 発行日 平成23年6月15日 (2011. 6. 15)

(24) 登録日 平成23年3月18日 (2011. 3. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/28 (2006. 01)

G O 1 N 21/78 (2006. 01)

C O 7 C 229/12 (2006. 01)

C O 7 C 233/05 (2006. 01)

G O 1 N 33/483 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/28

G O 1 N 21/78

C O 7 C 229/12

C O 7 C 233/05

G O 1 N 33/483

C

C

請求項の数 8 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2000-605546 (P2000-605546)
 (86) (22) 出願日 平成12年3月17日 (2000. 3. 17)
 (65) 公表番号 特表2002-538806 (P2002-538806A)
 (43) 公表日 平成14年11月19日 (2002. 11. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/007030
 (87) 国際公開番号 W02000/055115
 (87) 国際公開日 平成12年9月21日 (2000. 9. 21)
 審査請求日 平成19年3月16日 (2007. 3. 16)
 (31) 優先権主張番号 60/124, 825
 (32) 優先日 平成11年3月17日 (1999. 3. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/526, 414
 (32) 優先日 平成12年3月16日 (2000. 3. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 398056779
 パーキンエルマー ライフ サイエンス
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2
 1 1 8. ボストン. オールバニーストリー
 ト 5 4 9
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 宍戸 嘉一

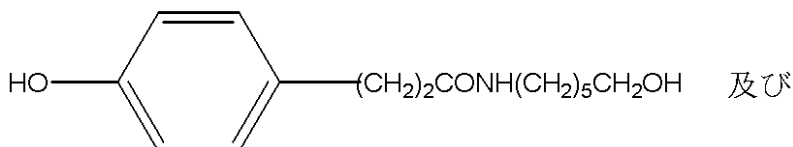
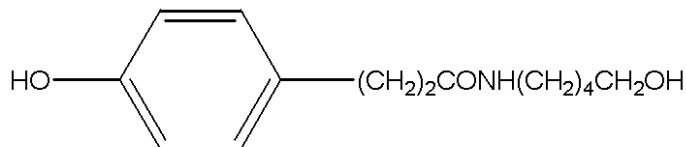
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 永久蛍光アッセイ法

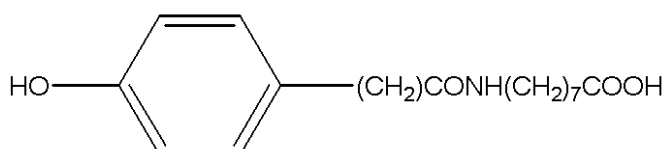
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペルオキシダーゼを基本とするアッセイを行う方法であって、
 ペルオキシダーゼ酵素と、下記の化合物：



及び



からなる群より選ばれる可溶性 p-ヒドロキシフェニル含有基質化合物とを反応させる工

程であって、

該基質化合物は、該ペルオキシダーゼ酵素との反応後に不溶性生成物を形成し、

該不溶性生成物は、照射されたときに活性化形態へと転換する

ことを特徴とする工程、

該不溶性生成物に光を照射することにより、該不溶性生成物を活性化形態へと転換する工程、

該活性化形態にある不溶性生成物に第1の波長の光を照射する工程であって、該照射により、該活性化形態にある不溶性生成物が、該第1の波長よりも長い第2の波長の蛍光を発するようにする工程、及び

該第2の波長を検出する工程

を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記ペルオキシダーゼ酵素がセイヨウワサビペルオキシダーゼである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記基質化合物の濃度が約 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ~ $5 \times 10^{-2} \text{M}$ の範囲にある、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記基質化合物の濃度が約 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ~ $1 \times 10^{-2} \text{M}$ の範囲にある、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

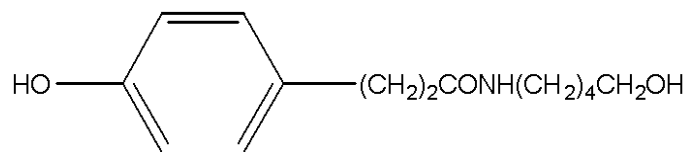
前記不溶性生成物に光を照射することにより、該不溶性生成物を活性化する工程が、該不溶性生成物に約 340 nm ~ 約 380 nm の波長を有する光を照射する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記光が約 350 nm ~ 約 370 nm の波長を有する、請求項5記載の方法。

【請求項7】

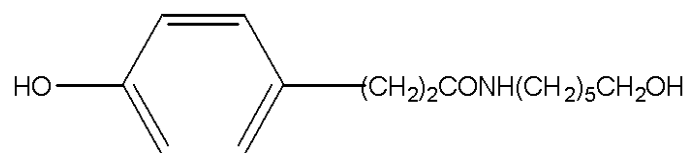
式：



で示される構造を有する化合物。

【請求項8】

式：



で示される構造を有する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、永久蛍光アッセイ、特にペルオキシダーゼ活性を通して不溶性生成物を形成する可溶性 p-ヒドロキシフェニル含有基質を利用した、ペルオキシダーゼを基本とする蛍光アッセイに関する。

【0002】

背景技術

セイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) (E C 1. 1. 1. 7) は、免疫学的検出系に対して一般的に使用される酵素標識である。H R P は 2 分子の過酸化水素を水及び酸素へ分解する。H R P は、電子対を過酸化水素へ供与するときこの反応を開始する。続いてこの酵素は、適切な供与体から電子を引き抜く (酸化する)。

H R P 及び可溶性蛍光生成物を形成するその他の酵素に対する供与体基質が文献に記載されている。Gross 及び Sizer, J. Biol. Chem., 234: 1611-1614 (1959) は、ペルオキシダーゼによるチラミン及びチロシンの酸化のメカニズムを記載している。彼らは、ペルオキシダーゼとチラミン及びチロシンとの反応生成物は、それぞれジチラミン及びジチロシンであることを見いだした。彼らは分析において、新規な可溶性蛍光物質の存在を証明した。

10

Guilbault ら, Analytical Chemistry, 40 (8): 1256-1263 (1980) は、酸化酵素の蛍光定量的測定のための新規な基質について記載している。炭水化物の比色測定の感度を改善するための試みにおいて、Guilbault らは、ガラクトースオキシダーゼ又はグルコースオキシダーゼのいずれかによる炭水化物の酸化と結びついた一連のフェノール系ペルオキシダーゼ基質を評価した。フェノール系基質が選ばれた。なぜなら、フェノール系基質はペルオキシダーゼ及び H_2O_2 と反応したときに蛍光性の液相生成物を形成したからである。最良の基質は p-ヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸、チラミン及びチロシンであることが見いだされた。酸化した蛍光生成物の特徴付けにおいて、Guilbault らは、このグループについての励起範囲は 315 ~ 326 nm であり、発光範囲は 410 ~ 425 nm であることを報告している。

20

Zaitsev 及び Ohkura, Analytical Biochemistry, 109: 109-113 (1980) は、セイヨウワサビペルオキシダーゼに対する新規な蛍光発生性基質を報告している。彼らは 25 種の p-ヒドロキシフェニル又は 3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル化合物について H R P に対する可溶性蛍光発生性基質としての適合性を評価した。彼らは 3- (p-ヒドロキシフェニル) プロピオン酸が最良の基質であると結論付けた。使用した蛍光アッセイについて、励起波長範囲は 312 ~ 320 nm であり、発光波長範囲は 400 ~ 422 nm であった。

非酵素的蛍光検出法がアッセイにおいて使用されてきているが、これらの方法は低感度に悩み、感度が十分であるときは不安定で、結果の達成を許容しない (Raap ら, Human Molecular Genetics, 4 (4): 529-534 (1995); Speel ら, J. Histochem. Cytochem., 45 (10): 1439-1446 (1997); Chao ら, Cytometry, 23: 48-53 (1996))。感度を増強させる 1 つの方法は、酵素的増幅の使用である。ペルオキシダーゼを基本とする固相アッセイでは、反応して不溶性蛍光生成物を形成する可溶性非蛍光基質の欠如により、酵素的増幅は困難である。したがって、増強した感度並びに永久保存及びアッセイ結果の後の使用を許容する、酵素的増幅アッセイにおける基質に対するニーズが存在している。

30

【0003】

発明の開示

本発明は、永久性の高度に蛍光性のペルオキシダーゼを基本とするアッセイ法であって、ペルオキシダーゼと可溶性 p-ヒドロキシフェニル含有基質とを反応させ、不溶性の蛍光性生成物を形成する工程を含むことを特徴とする方法に関する。

40

別の態様において本発明は、所望の物質を含むかもしれないサンプル中で前記所望の物質の存在又は不存在を検出するためのペルオキシダーゼを基本とするアッセイであって、ペルオキシダーゼ酵素と可溶性 p-ヒドロキシフェニル含有基質とを反応させて、ペルオキシダーゼ活性により不溶性の蛍光性生成物を形成する工程を含むことを特徴とする方法に向けられる。

【0004】

発明の実施の態様

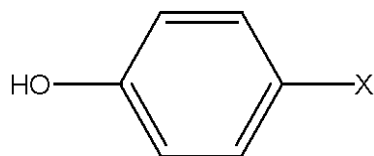
用語「ペルオキシダーゼを基本とするアッセイ」とは、固相酵素アッセイであって、ペルオキシダーゼ酵素、例えば H R P を、可溶性基質を不溶性生成物へ変換する酵素標識として使用するアッセイを意味する。

50

用語「不溶性生成物」とは、アッセイ溶液から沈殿して、一般的には表面上に析出する固体を形成する生成物を意味する。典型的な表面には、細胞、組織、ガラス、プラスチック及びケイ素が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明における「不溶性生成物」とは、ある溶媒中では可溶性であるが、本発明の特定のアッセイでは不溶性であることが理解されるだろう。

用語「p-ヒドロキシフェニル含有」とは、構造：

【0005】



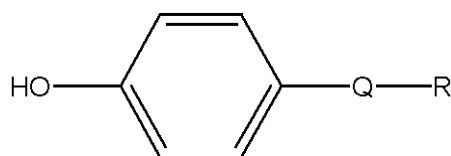
10

【0006】

(式中、Xは置換された脂肪族基である)
を含む化合物を意味する。

より好ましくは、p-ヒドロキシフェニル含有化合物は、構造：

【0007】



20

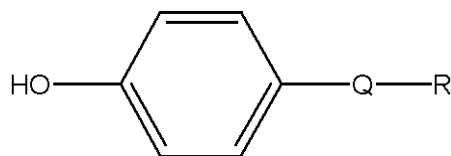
【0008】

(式中、Qは直鎖又は分岐鎖のヘテロ原子数1～12のアルキル(式中、ヘテロ原子はC、N、O及びSのうちの1つ以上である)であり、該ヘテロ原子アルキル鎖を連結する結合は単結合又は二重結合であり、該ヘテロ原子アルキル鎖中の全ての炭素原子は適宜置換基を含んでいてもよく、該置換基は-OH、-COOH、-NH₂又は-SHであり、Rは-OH、-COOH、-NH₂又は-CH₃の中の1つ以上である)を有している。可溶性p-ヒドロキシフェニル含有化合物は、照射したときに高度な蛍光性になる安定な不溶性生成物に変換することができる。

30

本発明の実施に使用することができるp-ヒドロキシフェニル含有基質の例には、

【0009】



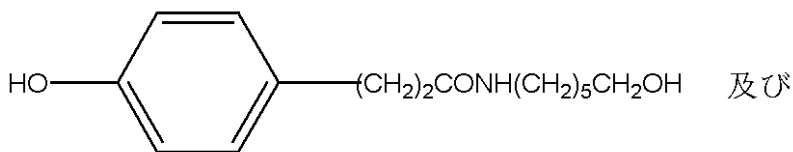
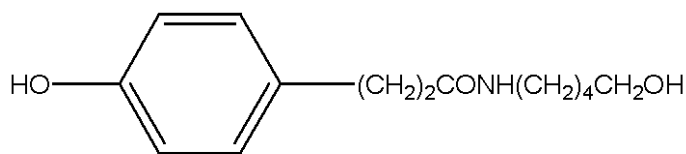
【0010】

(式中、Q-Rは、-(CH₂)₂CONH(CH₂)₄CH₂OH、-(CH₂)₂CONH(CH₂)₅CH₂OH、-(CH₂)₂CONH(CH₂)₇COOH、-(CH₂)₂COOH、-CH₂CH₂OH、-CH₂CH₃、-(CH₂)₂CH₂OH又は-(CH₂)₂CH₃である)が含まれる。

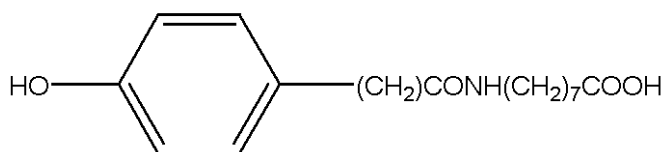
40

本発明の実施に使用することができる好ましいp-ヒドロキシフェニル含有基質は、

【0011】



及び



【0012】

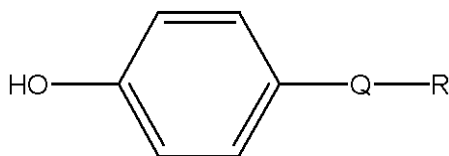
である。

本明細書で使用するとき、用語「置換された脂肪族」は、直鎖又は分岐鎖の炭化水素、例えばアルキル基を含むことができる。アルキル基の代表例はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル、ペンチル及びヘキシルである。

用語「照射したときに高度に蛍光性になる」とは、不溶性生成物が後に励起したときに不溶性生成物を高度に蛍光性にする、通常は300～400nmの波長における照射による最初の励起を要求することを意味する。物質が照射により最初に励起されない場合、後述するように蛍光は発生したとしても非常に弱く、ほとんど認識することができない。推論により縛られることを望むものではないが、本発明者等は、活性化が物質の安定又は準安定状態を作り出し、これにより蛍光が増強すると推定している。不溶性生成物の驚くべきかつ予想外の性質は、高分子性、結晶性又はデンドリマー（dendrimer）性の複合体の形成によるものであろう。この生成物は、適切な基質とペルオキシダーゼとの反応により形成することができ、これを使用してタンパク質、核酸又はその他の物質を標識する。

例えば、式：

【0013】



【0014】

（式中、Q-Rは、 $-(CH_2)_2CONH(CH_2)_4CH_2OH$ 、 $-(CH_2)_2CONH(CH_2)_5CH_2OH$ 、 $-(CH_2)_2CONH(CH_2)_7COOH$ 、 $-(CH_2)_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-(CH_2)_2CH_2OH$ 又は $-(CH_2)_2CH_3$ である）で示されるp-ヒドロキシフェニル含有基質について、最初の照射波長は400nm未満であり、典型的には約340～約380nmの範囲にある。好ましくは、照射波長は約350～約370nmの範囲にある。その他の照射波長を、使用する特定の基質に依存して用いることができることは明らかである。当業者は、与えられた基質について適切な波長を決定することができるだろう。

最初の照射の後、後に照射をしたとき、生成物は、驚くべきかつ予想外の蛍光励起及び発光特性を示す。予想外の性質とは、生成物が複数の波長において蛍光励起／発光を示すことである。例えば、典型的には低い500nm範囲の発光フィルターを用いて観察したとき、生成物は約490nmで励起して、高度又は明るい緑色蛍光を生成することができる。更に、典型的には高い570nm範囲の発光フィルターを用いて観察したとき、生成物

10

20

30

40

50

は約550nmで励起して、高度又は明るい赤色蛍光を生成することができる。更に、相
伴う発光特性を有する生成物をこれらの波長範囲よりも高い及び低い波長の両方で励起
することができる。したがって、多数の励起源及び蛍光フィルターを利用して蛍光を観察
することができる。（例えば490又は550nm）で蛍光が衰え始めるポイントまで励起
した場合、360nm範囲の照射により蛍光は再生する。したがって、本発明の方法は、
感受性、安定かつ永久的な蛍光生成物を生成することにより、前記の従来技術の問題を克
服する。発光特性もサンプルの自己蛍光の問題を克服する。

本発明の方法は、当業者に周知の慣用技術を用いて、ペルオキシダーゼを酵素標識として
使用する、例えばマイクロアレイ、組織化学的アッセイ、核酸アッセイ、イムノアッセイ
などのほとんどの固相アッセイについて使用することができる。組織化学的アッセイ又は
核酸ハイブリダイゼーション法について、好ましい表面は媒体自体、例えばガラス又はプ
ラスチック製のスライド、膜又はビーズに固定化された動物又は植物細胞及び組織である
。

【0015】

溶液中の基質量は、活性を測定するペルオキシダーゼ酵素の同一性及び濃度に依存してか
なりの範囲で変化させることができる。濃度は $1 \times 10^{-4} \text{M} \sim 5 \times 10^{-2} \text{M}$ の範囲である
ことができる。好ましくは、基質は $1 \times 10^{-3} \text{M} \sim 1 \times 10^{-2} \text{M}$ の量で存在する。その他
の基質濃度を、特定の基質に依存して利用することができることは明らかであり、当業者
は適切な基質濃度を確認することができるだろう。

不溶性生成物は、基質溶液と酵素含有サンプルとをインキュベートすることにより形成又
は発達する。不溶性生成物への照射、続く励起は、蛍光シグナルの発生にとっての必要条
件である。

本発明は、ペルオキシダーゼを基本とするアッセイにおける感度を増強する方法であって
、ペルオキシダーゼと本発明の可溶性p-ヒドロキシフェニル含有基質とを反応させて、
その後の励起において高度に蛍光性になる永久的不溶性生成物を形成する工程を含むこと
を特徴とする方法を含んでいる。

驚くべきかつ予想外なことに、p-ヒドロキシフェニル含有基質は蛍光性がないか又は蛍
光が弱い不溶性生成物を形成するが、照射後、励起したときには高度かつ明るい蛍光性にな
ることを見いだした。生成物は、高度な化学安定性、光安定性及び蛍光再生性を有して
いる。

別の態様において、本発明はある物質を含むことが疑われるサンプル中の当該物質の存在
又は不存在を検出するためのペルオキシダーゼを基本とするアッセイであって、改良点が
ペルオキシダーゼと可溶性p-ヒドロキシフェニル含有基質とを反応させて、最初の照射
後、その後の励起において蛍光性になる不溶性生成物を形成する工程を含んでいることを
特徴とするアッセイに向けられる。前記のアッセイは、当業者に周知の慣用技術を使用し
て行うことができる。本発明を使用して、全てのタイプの抗原又は核酸を検出することが
できる。

【0016】

実験データ

実施例1 p-ヒドロキシフェニル含有HRP基質を用いた、組織切片における蛍光の検
出

パラフィン包埋マウス腸切片を脱パラフィン化(deparaffinize)し、非特異的結合部
位をPBSブロッキング緩衝液(PBS-BB)(0.1M リン酸緩衝食塩水、pH7
.2、1.0%ウシ血清アルブミン、0.2%脱脂粉乳及び0.3% Triton X
-100)中の30分間の処理によりブロックした。濃度10µg/mlのセイヨウワサ
ビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートコムギ胚芽アグルチニン(Sigma, St. Lou
is, MO)のPBS-BB溶液を、切片と共に、室温下で1時間インキュベートした。次い
で切片をPBS(5分間の洗浄を3回)及びTris(0.1M Tris, pH8.5
、3分間の洗浄を3回)中で洗浄した。0.003%のH₂O₂を含むN-(5-ヒドロキ
シペンチル)-3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオンアミド(HHPA)の1mg

／m l T r i s 溶液を、切片へ、室温下で10分間添加した。次いで切片をT r i s (3分間の洗浄を3回) 中で洗浄し、T r i s : グリセロール (1 : 1) を用いてマウントし、カバーガラスで覆った。切片を、エピフルオレセンス (epifluorescence) 及び下記の励起／発光特性 (360 nm / > 400 nm (青－白色の蛍光)、490 nm / 520 nm (緑色蛍光) 及び550 nm / 570 nm (赤色蛍光)) を有するフィルターセットを備えたZeiss Axioskop 顕微鏡で観察した。切片を、Zeiss MC100 カメラシステムで撮影した。

コムギ胚芽アグルチニンは、腸ムチン産生ゴブレット細胞に多量に存在するN－アセチルグルコサミン残基に結合する。最初の顕微鏡試験は360 nmの励起で弱い蛍光シグナルを示したが (図1 A、青－白色フィルターセット)、標準の緑色 (図1 C) 又は赤色 (図1 E) フィルターセットで観察したときシグナルはほとんどなかった。顕微鏡の領域 (field) を360 nmで1分間照射し、前記の通りにして再試験した。360 nm照射への短時間の曝露の後に蛍光シグナルが劇的かつ予想外に増加した。ゴブレット細胞に局在化する強い蛍光シグナルが、3つのフィルターセット：青－白色 (図1 B)、緑色 (図1 D) 及び赤色 (図1 F) を用いて観察された。HRPをコンジュゲートしたコムギ胚芽アグルチニンとのインキュベートがない場合にはゴブレット細胞特異的シグナルは観察されなかった (データは示さず)。元の倍率は400×であった。

【0017】

実施例2 p－ヒドロキシフェニル含有HRP基質を用いた改善された蛍光シグナル安定性

パラフィン包埋マウス脳切片を脱パラフィン化し、非特異的結合部位をPBS－BB中の30分間の処理によりブロックした。微小管関連タンパク質－2に対するモノクローナル抗体 (Sigma) をPBS－BBで1 : 100, 000に希釈し、切片と共に4℃で一晩インキュベートした。次いで切片をPBS (5分間の洗浄を3回) で洗浄し、PBS－BBで1 : 1000に希釈したHRPコンジュゲートロバ抗マウス抗体 (Jackson Immuno research Laboratories, West Grove, PA) と共に室温下で1時間インキュベートした。次いで切片をPBS (5分間の洗浄を3回) 中で洗浄し、TSAダイレクトフルオレセインキットを製造者の指示 (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA) にしたがって用いて又はHHPA (TSA増幅希釈物中の1 mg / ml、10分間) のいずれかを用いて微小管関連タンパク質－2免疫反応性を局在化させた。次いで切片をT r i s (5分間の洗浄を3回) 中で洗浄し、T r i s : グリセロール (1 : 1) を用いてマウントし、カバーガラスで覆った。

フルオレセイン標識した切片を、490 nm / 520 nmに励起／発光ピークを有するフィルターセットを用いて観察した。HHPA標識切片を最初に360 nmで1分間照射して、沈殿した反応生成物を活性化し、次いで360 nm / 520 nmに励起／発光ピークを有するフィルターセットを用いて観察した。切片を連続的な励起の0及び15分後に観察した。標準的な2秒の曝露を使用した顕微鏡写真を両方の時間時点において撮影し、経時の蛍光強度の変化を評価した。更に両方の時間時点において、ASA設定1600及びMC100カメラシステム (Zeiss) を使用した標準領域における顕微鏡写真的ドキュメンテーション (documentation) に必要な自動曝露時間を記録することにより、蛍光強度を半定量化した。この測定を使用して、短時間の曝露時間と明るい蛍光とを関連させ、長時間の曝露時間と暗い蛍光とを関連づけた。

TSAダイレクトフルオレセインと反応させた切片は、強い初期シグナル (図2 A) を示し、15分間の連続的励起で劇的に衰えた (図2 B)。規格ASA1600に必要な時間は0 (1.8秒) から15分 (12.0秒) で6倍以上に増加した。対照的に、HHPA反応スライドへの15分間の連続的曝露は、蛍光強度の増加を起こした (図2 C、時間0。図2 D、15分間の励起後。)。15分間の一定の励起後、標準曝露時間は4.1秒から3.1秒へ減少した。HHPAについての著しい蛍光安定性は予想外のものであり、これはほとんどのフルオロホア (fluorophore) を長時間の励起に曝露したときに観察されるシグナルの典型的な損失とは異なるものであった。元の倍率は600×であった。

前記の図面、検討及び記載は、本発明及びこれのいくつかの態様の一般的原理を説明するものであり、本発明の実施についての限定を意味するものではない。なぜなら、多数の修飾及び改変が当業者にとって容易に明らかであるからである。全ての均等物を含む特許請求の範囲が本発明の範囲を規定する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1 A～Fは、小さいp-ヒドロキシフェニル含有HRP基質を利用した、組織における蛍光検出を示す写真である。(A)は青-白色フィルターセットを使用した360nm励起による蛍光シグナルを示す写真である。(B)は青-白色フィルターセットを使用した360nmで1分間照射した後の蛍光シグナルを示す写真である。(C)は緑色フィルターセットを使用した490nmでの励起後の蛍光シグナルを示す写真である。

10

(D)は360nmで1分間の照射後に緑色フィルターセットを使用した490nmで励起した同一スライドを示す写真である。(E)は赤色フィルターセットを使用した550nmでの励起後の蛍光シグナルを示す写真である。(F)は360nmで1分間の照射後に赤色フィルターセットを使用した550nmで励起した図1 Eに示されるのと同じスライドを示す写真である。

【図2】 図2 A～Dは、組織切片を示す写真である。(A)は最初の励起後にTSAダイレクト-フルオレセインと反応させた組織切片である。(B)は15分間の連続的励起後の図2 Aと同一の切片である。(C)は最初の励起後のHHPAと反応させた組織切片の写真である。(D)は15分間の連続的励起後の図2 Cと同一のスライドである。

【図1 A】

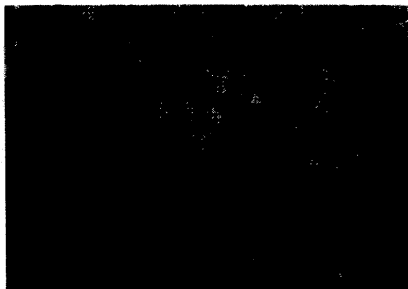


Fig. 1A

【図1 C】



Fig. 1C

【図1 B】

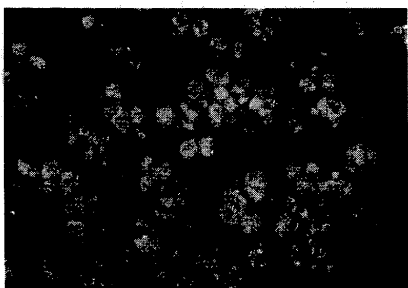


Fig. 1B

【図1 D】



Fig. 1D

【図 1 E】

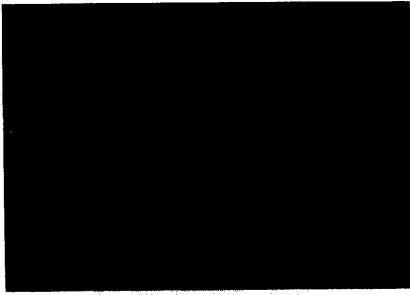


Fig. 1E

【図 2 A】

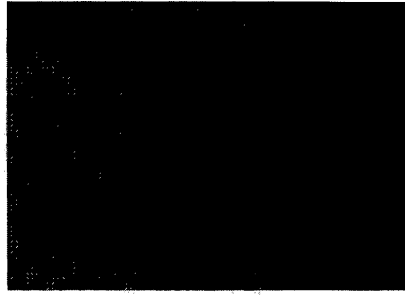


Fig. 2A

【図 1 F】



Fig. 1F

【図 2 B】

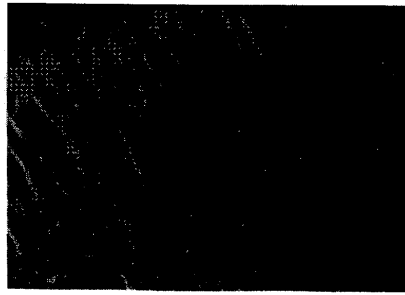


Fig. 2B

【図 2 C】

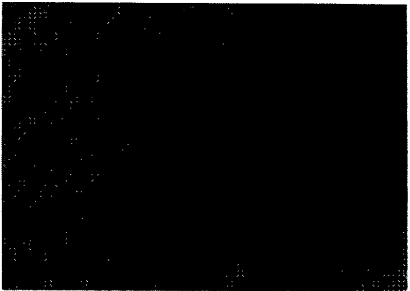


Fig. 2C

【図 2 D】

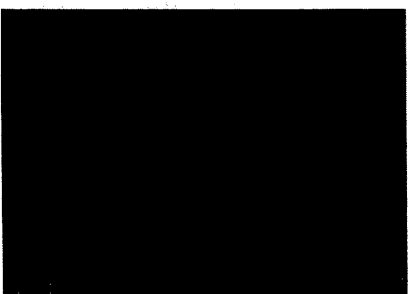


Fig. 2D

フロントページの続き

- (74)代理人 100096194
弁理士 竹内 英人
- (74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 ボブrow マーク ノーマン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02421 レキシントン バートル グリーン ロード
11
- (72)発明者 ロス ケヴィン アーロン
アメリカ合衆国 ミズーリー州 63119 ウェブスター グローブス ウェブスター フォレ
スト 526

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第00/007979 (WO, A1)
特開平11-318492 (JP, A)
日本化学会第72春季年会—講演予稿集, 1997年, p.677, 2B348
日本化学会第76春季年会—講演予稿集, 1999年 3月15日, p.802, 4A608

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/28
C07C 229/00-229/76
C07C 233/00-233/92
CA/REGISTRY(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)