

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年6月25日 (25.06.2009)

PCT

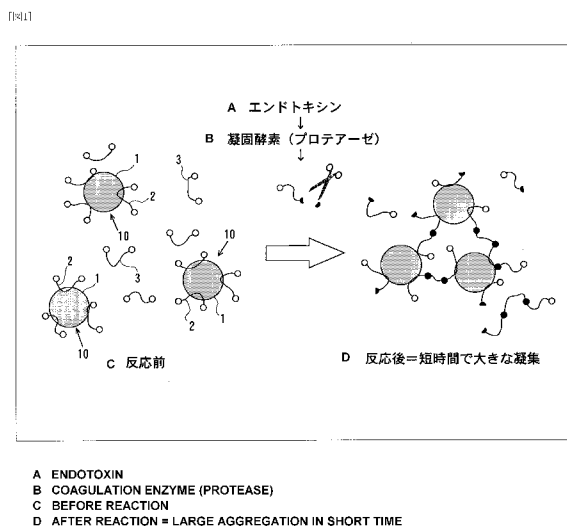
(10) 国際公開番号  
WO 2009/078465 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/579 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/073101
- (22) 国際出願日: 2008年12月18日 (18.12.2008)
- (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 2007-327784  
2007年12月19日 (19.12.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒4608625 愛知県名古屋市中区錦三丁目6番29号 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藪崎 克己 (YABUSAKI, Katsumi) [JP/JP]; 〒1820021 東京都調布市調布ヶ丘3-3-1 興和株式会社 電機光学事業部 光学電子研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR MEASURING ENDOTOXIN AND REAGENT KIT FOR MEASURING ENDOTOXIN

(54) 発明の名称: エンドトキシンの測定方法及びエンドトキシンの測定用試薬キット



A ENDOTOXIN  
 B COAGULATION ENZYME (PROTEASE)  
 C BEFORE REACTION  
 D AFTER REACTION = LARGE AGGREGATION IN SHORT TIME

(57) Abstract: A technique which is less likely to be affected by turbid or color of samples and with which prompt and simple detection or concentration measurement of endotoxin can be achieved is provided. A reagent in which proteins contained in LAL are adsorbed or bound onto fine particles dispersed in a previously prepared drug liquid is prepared, and this reagent and a sample containing endotoxin are mixed. By doing this, endotoxin acts on the proteins on the fine particles and the fine particles are associated with one another to form a large aggregate at an early stage. By optically measuring the formation of this aggregate, detection or concentration measurement of endotoxin is performed.

(57) 要約: 試料の濁りや色の影響を受けづらく、迅速且つ簡便なエンドトキシンの検出または濃度測定を可能とする技術を提供する。LAL中に含まれる蛋白質を、予め準備され薬液中に分散した微粒子の上に吸着または結合させた試薬を作り、この試薬とエンドトキシンを含む試料とを混和させる。これにより、微粒子上の蛋白質にエンドトキシンを作用させて微粒子同士を会合させ、早期に大きな凝集塊を生成させる。この凝集塊の生成を光学的に測定することでエンドトキシンの検出または濃度測定を行う。



WO 2009/078465 A1



IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：  
— 国際調査報告書

## 明 細 書

### エンドトキシンの測定方法及びエンドトキシンの測定用試薬キット

#### 技術分野

[0001] 本発明は、エンドトキシンを検出またはその濃度を測定する方法及び、同検出または濃度測定に用いられる試薬キットに関する。

#### 背景技術

[0002] エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁に存在するリポ多糖であり、最も代表的な発熱性物質である。エンドトキシンに汚染された輸液、注射薬剤、血液などが人体に入ると、発熱やショックなどの重篤な副作用を惹起するおそれがある。このため、上記の薬剤、器具などは、エンドトキシンにより汚染されることが無いように管理することが義務付けられている。

[0003] カブトガニの血球抽出物(以下、「LAL : Limulus amoebocyte lysate」ともいう。)の中にはエンドトキシンによって活性化されるセリンプロテアーゼが存在する。そして、LALとエンドトキシンとが反応する際には、エンドトキシンの量に応じて活性化されるセリンプロテアーゼによる酵素カスケードによって、LAL中に存在するコアギュロゲンがコアギュリンへと水解されて会合し、不溶性のゲルが生成される。

[0004] このエンドトキシンの濃度を測定する方法としては、LALと混和した試料を静置し、一定時間後に容器を転倒させて、試料の垂れ落ちの有無によりゲル化したかどうかを判定し、試料に一定濃度以上のエンドトキシンが含まれるか否かを調べる半定量的なゲル化法がある。また、エンドトキシンの別の高感度な定量法として、LALとエンドトキシンとの反応によるゲルの生成に伴う試料の濁りを経時的に計測して解析する比濁法や、酵素カスケードにより水解されて発色する合成基質を用いる比色法などがある。

[0005] 上記の定量法のうち比濁法は、低濃度のエンドトキシンを作用させたときには、活性化される酵素が少ないためゲルの生成が検出されるまでに非常に長い反応時間を要する場合があった。一方比色法は、試料の濁り(血脂質など)や混入する色素(溶血によるヘモグロビンなど)の影響を受け易いという不都合があった。これらのこと

から、特に、救急時における患者の血液中のエンドトキシンの測定や、人工透析時の透析液や血液中のエンドトキシンの測定には、上記の比濁法や比色法は必ずしも最適な方法とは言えなかった。

[0006] また、LALとエンドトキシンとを混和した試料を攪拌することによりゲル微粒子を早期に生成させるとともに、ゲル微粒子により散乱されるレーザー光の強度からゲル微粒子の大きさと数を解析して、凝集初期のゲル微粒子生成を測定するレーザー光散乱粒子計測法が提案されている。この方法によれば、測定時間を比濁法に比べて約3分の1に短縮でき、且つ、試料の濁りや色の影響を低減できることが報告されている。

[0007] しかしながら、上記のレーザー光散乱粒子計測法を用いたとしても、1EU(エンドトキシンユニット)/L程度の低濃度のエンドトキシンの測定には40～50分の測定時間を要する。また、レーザー光散乱粒子計測法においては微小空間領域の粒子を観察するため光学系が複雑となり、多検体測定が困難であるという不都合があった。

特許文献1:特許第2667695号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は上述の問題点に鑑みて案出されたものであり、その目的とするところは、試料の濁りや色の影響を受けづらく、迅速且つ簡便なエンドトキシンの検出または濃度測定を可能とする技術を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明に係るエンドトキシンの測定方法は以下の点を最大の特徴とする。すなわち、LAL中に含まれる蛋白質を、予め準備され薬液中に分散した微粒子の上に吸着または結合させた試薬を作る。そして、この試薬にエンドトキシンを含む試料を作用させることにより、微粒子同士を会合させて早期に大きな凝集塊を生成させ、この凝集塊の生成を検出することでエンドトキシンの測定を行う。

[0010] より詳細には、試料中のエンドトキシンを検出または試料中のエンドトキシンの濃度を測定する、エンドトキシンの測定方法であって、

カプトガニの血球の抽出物に含まれる所定の蛋白質を、試薬中に分散可能な微粒子の表面に結合または吸着させ、

前記蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬と試料とを混和させ、

前記試薬と前記試料との混和液におけるゲルの生成を検出することでエンドトキシンの検出を行いまたは、前記ゲルの生成の程度を測定することでエンドトキシンの濃度を測定することを特徴とする。

[0011] ここで、発明者の鋭意研究によって、LAL中に含まれる蛋白質を例えば樹脂製の微粒子の上に結合または吸着させた状態でエンドトキシンを作用させると、LAL単体にエンドトキシンを含む試料を作用させた場合と比較して、より大きな凝集塊を早期に生成することが分かってきた。これは、微粒子上のコアギュロゲンがLAL中の酵素カスケードにより水解されコアギュリンとなり、これらが微粒子同士を会合させることによる。また、この凝集反応は試料の濁りや色の影響を受けづらいこと、さらには、この凝集反応はLAL単体で惹起される凝集反応よりも、非常に強大であることも明確になってきている。

[0012] 本発明においては、この現象を利用し、LAL中に含まれる蛋白質を微粒子の上に結合または吸着させた試薬を作り、この試薬(以下、「LAL試薬」ともいう。)にエンドトキシンを含む試料を作用させることで、微粒子同士を会合させてより大きな凝集塊を早期に生成させ、LAL試薬と試料との混和液におけるゲルの生成を促進することとした。これによれば、エンドトキシンの検出または濃度の測定(以下、これらを合わせて「エンドトキシンの測定」ともいう。)において、試料の濁りや色の影響を低減することができ、また、検出または濃度の測定をより迅速且つ簡便にすることができる。

[0013] なお、上記において所定の蛋白質は、エンドトキシンと反応してゲルを生成させる特性を有するものであり、少なくともコアギュロゲンを含む。また、セリンプロテアーゼ等の他の蛋白質を含んでもよい。また、本発明においてゲルの生成とは、上記の微粒子同士の会合による凝集塊の生成、微粒子に結合または吸着していないコアギュリンが会合することによるゲルの粒子の生成、LAL試薬と試料との混和液のゲル化、の少なくともいずれかを含んだ現象を意味している。

- [0014] また、本発明においてゲルの生成の程度とは、例えば、上記の微粒子同士の会合による凝集塊及び、微粒子に結合または吸着していないコアグュリンが会合することによるゲルの粒子の大きさまたは数の増加を意味する。あるいは、LAL試薬と試料との混和液のゲル化に起因する混和液の物理、化学特性(例、濁度)の変化を意味する。
- [0015] ここで、前記所定の蛋白質は、カプトガニの血球の抽出物から精製されたコアグュロゲンであってもよい。
- [0016] 前述のように、LALにエンドトキシンを作用させた際の凝集反応においては、コアグジュロゲンがLAL中の酵素カスケードにより水解されコアグジュリンとなり、これらが微粒子同士を会合させる。従って、LAL中の蛋白質を予め精製してコアグジュロゲンのみを抽出し、微粒子に結合または吸着しておくことで、より効率的に微粒子同士を会合させることが可能となり、より早期に凝集塊を生成させることが可能となる。
- [0017] また、本発明において、前記所定の蛋白質がセリンプロテアーゼとコアグジュロゲンとを含んでいる場合には、前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬に、試薬の調製過程において該試薬中のセリンプロテアーゼとエンドトキシンとの反応を抑制する抑制剤を添加するようにしてもよい。
- [0018] ここで、LAL中に含まれる蛋白質を微粒子の上に結合または吸着させる際には、まず、蛋白質を結合、吸着することが可能な官能基を微粒子の表面に存在せしめる。そして、その状態でLAL試薬を作用させて、蛋白質を微粒子表面に化学的に結合させるか、静電的、親水的、疎水的に吸着させる。その際のLAL中の蛋白質と微粒子の結合、吸着反応は長時間に及ぶため、微粒子や使用する試薬類、水などに微量に混在するエンドトキシンが蛋白質におけるセリンプロテアーゼと反応し、コアグジュロゲンをコアグジュリンに水解して微粒子の凝集が開始してしまうことが考えられる。そしてこの場合には、酵素の活性化によって試薬中のコアグジュロゲンが水解されて消費されてしまうことが考えられる。
- [0019] これに対し本発明では、前記所定の蛋白質がセリンプロテアーゼとコアグジュロゲンとを含んでいる場合に、前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散

した試薬に、該試薬中のセリンプロテアーゼとエンドトキシンとの反応を抑制する抑制剤を添加することとした。これにより、試薬の調製過程における微粒子の凝集を抑制するとともに、酵素の活性化によりコアギュロゲンが水解されて消費されるのを抑制することとした。

[0020] 具体的には前記抑制剤は、エンドトキシンを失活させる作用が知られている鉄イオンやアルミニウムイオンでもよい。また、LAL中のセリンプロテアーゼが活性化しないようにする酵素阻害剤であってもよい。

[0021] また、本発明においては、前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬を、さらに、カプトガニの血球の抽出物と混合し、  
前記混合と同時または混合後において、前記試薬と前記試料とを混和させるようにしてもよい。

[0022] これによれば、蛋白質が結合または吸着した微粒子が分散した試薬に対して、さらにLAL中の蛋白質を補給しておくことができる。そうすると、エンドトキシンを含有する試料と混和した際に、より確実にエンドトキシンを試薬中のセリンプロテアーゼに作用させ、微粒子上に結合または吸着されたコアギュロゲン及び、混合されたLAL中のコアギュロゲンを水解してコアギュリンとすることができる。その結果、より確実に、微粒子上に結合または吸着されたコアギュロゲン同士または、微粒子上に結合または吸着されたコアギュロゲンと混合されたLAL中のコアギュリンとを会合させることができ、微粒子を中心とした凝集塊の生成を促進することができる。これにより、より短時間でエンドトキシンの測定が可能となる。

[0023] また、これによれば、LAL中の蛋白質を予め精製してコアギュロゲンのみを抽出し、微粒子に結合または吸着させた場合や、前記試薬の調整過程において試薬中のセリンプロテアーゼとエンドトキシンとの反応を抑制する抑制剤を添加した場合にも有利である。すなわちこれらの場合でも、前記試薬とエンドトキシンを含有する試料とを混和した際に、より確実にエンドトキシンをセリンプロテアーゼに作用させることができる。

[0024] なお、上記においては、前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬を、さらに、カプトガニの血球の抽出物と混合し、その上でエンドトキシン

を含有する試料と混和するところ、この混和の時期は、前記血球抽出物との混合の後であってもよいし、混合と同時であってもよい。しかし、試薬中に補給されたコアグロゲンやセリンプロテアーゼをより均一に分散させておけるという点では、エンドトキシンを含有する試料との混和は、前記試薬と前記血球抽出物との混合時から所定時間が経過した後とするのが望ましい。

[0025] また、本発明は、カプトガニの血球の抽出物に含まれる所定の蛋白質を、試薬中に分散可能な微粒子の表面に結合または吸着させて調製されたことを特徴とするエンドトキシンの測定用試薬キットであってもよい。

[0026] ここで所定の蛋白質は、エンドトキシンと反応してゲルを生成させる特性を有するものであり、少なくともコアグロゲンを含む。また、セリンプロテアーゼ等の他の蛋白質を含んでいてもよい。

[0027] また、本発明に係るエンドトキシンの測定用試薬キットにおいて、所定の蛋白質は、カプトガニの血球の抽出物から精製されたコアグロゲンであってもよい。

[0028] また、本発明に係るエンドトキシンの測定用試薬キットにおいて、所定の蛋白質は、セリンプロテアーゼとコアグロゲンとを含んでおり、前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬には、前記セリンプロテアーゼとエンドトキシンとの反応を抑制する抑制剤がさらに添加されるようにしてもよい。

[0029] ここで、カプトガニの血球の抽出物に含まれる所定の蛋白質を、試薬中に分散可能な微粒子の表面に結合または吸着させて試薬キットを調製する際には、上述のように、微粒子や使用する試薬類、水などに微量に混在するエンドトキシンが蛋白質におけるセリンプロテアーゼと反応してしまうことが考えられる。そうすると、試薬の調製過程でコアグロゲンをコアグリンに水解して微粒子の凝集が開始してしまい、試薬中のコアグロゲンが消費されてしまうことも考えられる。

[0030] これに対し本発明に係るエンドトキシンの測定用試薬キットにおいては、前記所定の蛋白質がセリンプロテアーゼとコアグロゲンとを含んでいる場合に、前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬に、前記セリンプロテアーゼとエンドトキシンとの反応を抑制する抑制剤をさらに添加するようにした。そうすれば、試薬の調製過程における微粒子の凝集を抑制できるとともに、酵素の活性化に

よりコアギュロゲンが水解されて消費されるのを抑制できる。ここで前記抑制剤は、鉄イオンやアルミニウムイオンでもよいし、酵素阻害剤であってもよい。

[0031] また、本発明に係るエンドトキシンの測定用試薬キットにおいては、所定の蛋白質が結合または吸着した微粒子が分散した試薬を、さらに、カプトガニの血球の抽出物と混合して調製されるようにしてもよい。

[0032] なお、上記した本発明の課題を解決する手段については、可能なかぎり組み合わせ用いることができる。

### 発明の効果

[0033] 本発明にあつては、試料の濁りや色の影響を受けづらく、迅速且つ簡便なエンドトキシンの検出または濃度測定が可能となる。

### 図面の簡単な説明

[0034] [図1]本発明の実施例におけるLAL結合ビーズの凝集メカニズムについて説明するための図である。

[図2]本発明におけるLAL結合ビーズ試薬を、エンドトキシンを含む試料と混和させた場合の、LAL結合ビーズの量と混和液の透過光強度の変化との関係を説明するためのグラフである。

[図3]本発明におけるLAL結合ビーズ試薬を、エンドトキシンを含む試料と混和させた場合の、エンドトキシンの濃度と混和液の透過光強度の変化との関係を説明するためのグラフである。

[図4]LAL結合ビーズ法を用いた場合とレーザー光散乱粒子計測法を用いた場合の、LAL中の蛋白質とエンドトキシンの反応における、エンドトキシン濃度とゲル凝集開始時間との関係を比較するためのグラフである。

### 符号の説明

- [0035] 1・・・ビーズ  
2・・・コアギュロゲン  
3・・・コアギュロゲン  
10・・・LAL結合ビーズ

### 発明を実施するための最良の形態

- [0036] LALとエンドトキシンと反応してゲルが生成される過程はよく調べられている。すなわち、エンドトキシンがLAL中のセリンプロテアーゼであるC因子に結合すると、C因子は活性化し、活性化したC因子はLAL中の別のセリンプロテアーゼであるB因子を水解して活性化させる。この活性化したB因子は直ちにLAL中の凝固酵素の前駆体を水解して凝固酵素とし、さらに、この凝固酵素がLAL中のコアギュロゲンを水解してコアギュリンを生成する。そして、生成したコアギュリンが互いに会合して不溶性のゲルをさらに生成すると考えられている。
- [0037] この一連の反応は哺乳動物に見られるクリスマス因子やトロンビンなどのセリンプロテアーゼを介したフィブリンゲルの生成過程に類似している。このような酵素カスケード反応はごく少量の活性化因子であっても、その後のカスケードを連鎖して活性化していくために非常に強い増幅作用を有する。従って、LALを用いたエンドトキシン測定法によれば、サブピコグラム/mLオーダーのきわめて微量のエンドトキシンを検出することが可能になっている。
- [0038] エンドトキシンを定量することが可能な測定法としては前述のように比濁法、ならびに、レーザー光散乱粒子計測法が挙げられる。これらの測定法はこのLALの酵素カスケード反応によって生成されるコアギュリンの会合物を前者は試料の濁りとして、後者は系内に生成されるゲルの微粒子として検出することで、高感度な測定を可能にしている。
- [0039] しかしながら、比濁法では個々のコアギュリンはナノメートルオーダーの微小な粒子であるため、これらが漸次会合していても、光学的に検出可能な大きさまで成長しないと濁りとして検出できない。また、比濁法においては一般的に試料を静置して系全体におけるゲルの生成を待つので、コアギュリン同士の衝突確率が低く、会合の速度は必ずしも速くない。従って、比濁法を用いた場合には、エンドトキシンの検出または濃度測定が可能なるまでには相当の時間を要するという不都合があった。
- [0040] それに対して、レーザー光散乱粒子計測法では、系内に生成されたゲルの微粒子を直接測定するため、比濁法よりも高感度であり、且つ、一般的にLALと検体からなる試料を強制的に攪拌するので、比濁法と比較して短時間でゲルの生成を検出でき

る。

[0041] しかしながら、レーザー光散乱粒子計測法においては、微小空間領域の粒子を観察するため光学系が複雑となり、簡便な装置による測定が困難であるという不都合があった。

[0042] また、エンドトキシンの別の測定法として比色法がある。これは、LALの酵素カスケード反応を利用しつつも、コアギュリンゲルによる試料の濁りを測定するのではなく、凝固酵素により水解を受け発色する合成基質を利用して、合成基質を含んだLALと検体とを反応させ、その吸光度変化を測定する方法である。この比色法においては、系内に生成されていく発色物質の濃度を測定するので、試料におけるゲルの生成を測定する比濁法やレーザー光散乱粒子計測法と比べると、短時間で低濃度のエンドトキシンを測定することができる。

[0043] しかしながら、発色合成基質は405～410nm付近に吸光のピークがあるところ、この波長は溶血に伴う試料中に混入するヘモグロビンの吸光のピーク(410nm)と重複する。また、血液中の乳びなどの白色散乱体は光の波長が短いほどよく散乱するため、発色合成基質の吸光のピークがある可視光領域でも最も短波長側(紫)の光は特に白色散乱体の影響を受け易い。このように、比色法においては測定時間を極めて短時間にすることができるが、その一方で、血液を主とする検体での測定については精度の点で問題がある。

[0044] 本発明では、試料の濁りや色の測定に対する影響を低減することを目的の1つとしている。従って、比色法のような発色合成基質を使う方法ではなく、LALの酵素カスケードによるコアギュリンの生成過程を利用することとした。さらに、比濁法に類似しながらもレーザー光散乱粒子計測法よりもさらに短時間で測定可能で且つ、装置構成が容易な測定手法の確立を目的の一つとしている。従って、LALの酵素カスケードにより惹起されるコアギュロゲンからコアギュリンへの水解及び漸次的な凝集過程を、受動的に待つ方法は利用しないこととした。

[0045] 以下に図面を参照して、この発明を実施するための最良の形態を例示的に詳しく説明する。

## 実施例 1

- [0046] 本実施例においては、予め、比濁法あるいは、レーザー光散乱粒子計測法で検出され得るか、検出され得る限界より若干小さいサイズの微粒子の表面にコアギュロゲンを結合させておく。そして、これをLAL試薬と混合して調製した試薬に、エンドトキシンを含有する試料を混和する。これにより、LAL中に生成されるコアギュリンと微粒子上に生成されるコアギュリンとを会合させ、また、微粒子上に生成されるコアギュリン同士を会合させて、短時間で、比濁法あるいは、レーザー光散乱粒子計測法で検出可能なサイズの凝集塊を生成する。その結果、比濁法あるいは、レーザー光散乱粒子計測法によって、より迅速にエンドトキシンの測定を行うことができる。
- [0047] 図1には、本実施例による微粒子の凝集メカニズムを示した。図1において中央の矢印の左側はエンドトキシンと反応する前の試薬の模式図である。矢印の右側はエンドトキシンと反応した後の試薬の模式図である。
- [0048] 図1に示すとおり、反応前は、本実施例における微粒子であるビーズ1と、微粒子の表面に結合されたコアギュロゲン2と、微粒子の表面に結合されていないコアギュロゲン3とが分散した状態である。なお、以下において便宜上、ビーズ1にコアギュロゲン2を結合させた状態の微粒子をLAL結合ビーズ10と呼ぶことにする。
- [0049] コアギュロゲン2を結合させる担体となるビーズ1には、LAL中の蛋白質に含まれるコアギュロゲン2を吸着、担持あるいは結合でき、反応系内に均一に分散可能であり、且つ、エンドトキシンによるゲル生成過程を妨げたり亢進したりしないものが選定される。ビーズ1の素材は特に限定されるものではないが、ポリスチレンラテックス樹脂、シリカ、シリコン樹脂、セルロース樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、ハイドロキシアパタイトなどが例示でき、ポリスチレンラテックス樹脂、シリカ、セルロース樹脂が望ましい。
- [0050] ビーズ1の大きさは、凝集により早期に光学的に検出可能となる条件と、調製時のハンドリングの容易さ、系内への分散のし易さなどから、0.05  $\mu$  mから50  $\mu$  mの範囲であるものが用いられる。そして、0.1  $\mu$  mから30  $\mu$  mの範囲であることがさらに望ましい。ビーズ1の表面にコアギュロゲン2を結合させるには、静電的、親水的、あるいは、疎水的にコアギュロゲン2を吸着させる方法と、化学的に結合させる方法とが考えられる。

- [0051] コアギュロゲン2をビーズ1に静電的、親水的、あるいは疎水的に吸着させるには、ビーズ1の表面には、コアギュロゲン2を担持することを可能とする官能基を存在させる必要がある。このような官能基としては、アミノ基、カルボキシル基、リン酸基、水酸基、スルホン酸基、チオール基、アルコール基、アルキル基などを挙げることができる。
- [0052] 一方、化学的にビーズ1表面にコアギュロゲン2を結合させる場合、コアギュロゲン2の側鎖中に含まれるアミノ基、カルボキシル基、チオール基などと化学的に結合しうる官能基を存在させる必要がある。このような官能基としては、カルボキシル基、アミノ基、ビニル基、エポキシ基、スチリル基、メタクリロキシ基、アクリロキシ基、ウレイド基、チオール基、スルフィド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基などを挙げることができる。
- [0053] これらの官能基を表面に有するポリスチレンラテックス樹脂、シリカ、シリコン樹脂、セルロース樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、ハイドロキシアパタイトなどのビーズ1にLAL試薬あるいは、LAL試薬などから調製、精製したコアギュロゲンを作用させる。これにより、静電的、親水的、あるいは疎水的にビーズ1の表面にコアギュロゲン2を吸着、担持させる。または、ビーズ1上の反応性官能基とコアギュロゲン2とを、コアギュロゲン2中のアミノ基、カルボキシル基、あるいは、チオール基などを介して化学的に結合させる。このことによってLAL結合ビーズ10を調製することができる。
- [0054] このときの反応温度ならびに反応時間は、吸着、担持を行うのか、あるいは、化学結合を行うのかにもよるが、反応温度は0°Cから45°Cが望ましく、4°Cから37°Cがさらに望ましい。また、反応時間は10分から64時間が望ましく、2時間から24時間がさらに望ましい。また、反応の際には均一な反応が起こるように、試料をよく攪拌することが望ましい。
- [0055] なお、ビーズ1上にコアギュロゲン2を吸着、担持、結合させる際には、LAL中に含まれる蛋白質を選別することなくビーズ1に吸着、担持、結合させてもよいし、LAL中のコアギュロゲンを精製して吸着、担持、結合させてもよい。LAL中に含まれる蛋白質を選別することなく微粒子に吸着、担持、結合させる方法をとった場合には、ビーズ1上にコアギュロゲン2以外の蛋白質も吸着、担持、結合されるが、LAL中のコアギ

ュロゲンを精製する工程を省略することができるので試薬の調製、精製に係るコストを低減することができる。なお、その場合には、図1において、ビーズ1上及び、ビーズ1の周囲の試薬中にコアギュロゲン2、3以外に、LAL中に含まれる他の蛋白質(不図示)がより多く存在することとなる。

[0056] ところで、上記において、コアギュロゲンまたはLAL中の蛋白質とビーズ1との吸着、担持、結合に係る反応は長時間に及ぶ。従って、ビーズ1自身や使用する試薬類、水などにエンドトキシンが微量にでも混入していた場合に、試薬が完成する前に混入したエンドトキシンにより活性化した凝固酵素がコアギュロゲンを水解させてコアギュリンを生成せしめ、系内で凝集させてしまうことが考えられる。これを抑制するために、反応系内にエンドトキシンを失活させる作用が知られている鉄イオンやアルミニウムイオンを添加してもよい。この際に添加する鉄イオンやアルミニウムイオンの濃度は100 mM以下となることが望ましい。

[0057] また、LAL中のセリンプロテアーゼが活性化しないようにするために、各種の酵素阻害剤を添加してもよい。この酵素阻害剤としては、Diisopropylfluorophosphate、Benzamide、Phenylmethanesulfonyl fluoride、4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride、6-Amidino-2-naphthyl-4-guanidinobenzoatedimethanesulfonate、p-Amidinophenylmethylsulfonyl fluoride、Aprotinin、Antipain、Leupeptin、Ecotin、PPACK(Phe-Pro-Arg-chloromethylketone)、 $\alpha$  2-Macroglobulin、Trypsin inhibitorなどを例示することができる。これらの酵素阻害剤の濃度は100mM以下にするとよい。そして、20mM以下がさらに望ましい。

[0058] この状態においてLAL結合ビーズ10同士は、完全に独立して分散されていてもよい。また、吸着、担持あるいは化学結合の作用により、LAL結合ビーズ10の一部あるいは全てにおいて、複数のビーズが架橋されていてもよい。このようにして調製されたLAL結合ビーズ10は、その後、ビーズ1に結合していない過剰のLAL中の蛋白質あるいはコアギュロゲン、さらには、鉄イオン、アルミニウムイオンや酵素阻害剤などの添加物を除去する目的で、エンドトキシンを含まない精製水、あるいは、生理食塩水などで洗浄される。そして、最終的には使用目的に合った濃度になるようにこれらの精製水、あるいは、生理食塩水などに再懸濁させて使用に供する。以下、この状

態の試薬をLAL結合ビーズ試薬という。

- [0059] 次に、本実施例におけるLAL結合ビーズ試薬による実際のエンドトキシンの検出または濃度測定について述べる。本実施例においては、上記のLAL結合ビーズ試薬に対して、LAL試薬をさらに混合し、混合後の試薬と、エンドトキシンを含有する検体試料とを混和させる場合について説明する。なお、以下の説明においては、上記のLAL結合ビーズ試薬の調製時には、酵素阻害剤が添加されていることを前提とする。
- [0060] ここで、上記のように、LAL結合ビーズ試薬の調製段階においては、ビーズ1に結合していない過剰のLAL中の蛋白質、あるいは、LAL中蛋白質から精製されたコアグロゲン3は洗浄により除去される。また、ビーズ1に吸着、担持、結合したセリンプロテアーゼは、酵素阻害剤の添加により不可逆的に阻害されている。従って、この状態のLAL結合ビーズ試薬を単独でエンドトキシンを含有する試料と混和してもLAL結合ビーズ10の凝集は期待できない。
- [0061] そこで、本実施例においては、LAL結合ビーズ試薬をさらにLAL試薬と混合した上で、エンドトキシンを含有する試料と混和し、LAL結合ビーズ10を凝集させることとした。これによれば、セリンプロテアーゼをはじめとするLAL中の蛋白質の各成分をLAL結合ビーズ試薬中に補給することができる。そうすると、エンドトキシンを含有する試料と混和した際に、より確実にエンドトキシンを試薬中のセリンプロテアーゼに作用させることができ、より確実にコアグロゲンを水解してコアギュリンを生成することができる。その結果、より確実にLAL結合ビーズ10を凝集させ、迅速なエンドトキシンの測定を行うことが可能となる。
- [0062] また、この場合には、補給したLAL試薬中にもコアグロゲンが含まれているため、補給したLAL試薬中のコアグロゲンに由来するコアギュリンを介して、LAL結合ビーズ10の凝集が促進される効果も期待できる。
- [0063] また、本実施例においては、LAL結合ビーズ10上のセリンプロテアーゼが失活していても、混合させるLAL試薬中に過剰のセリンプロテアーゼが存在するので、LAL結合ビーズ試薬を調製する際には不可逆的で且つ、強い作用のある酵素阻害剤を用いても構わない。
- [0064] 上記のように調製されたLAL結合ビーズ試薬は、測定の利便性を図るために、規

定量のLAL結合ビーズ試薬を凍結乾燥させて、検体試料を加えるだけで測定が可能になるような調製を行なってもよい。また、この場合には、凍結乾燥させたLAL試薬と同様に凍結乾燥させたLAL結合ビーズ試薬とを任意の比率で混合するか、LAL結合ビーズ試薬とLAL試薬を任意の比率で混合させた後に凍結乾燥させるかしてもよい。

[0065] (製造例1)

次に、カルボキシル基をビーズ表面に有するポリスチレンラテックス粒子とLAL試薬を不可逆的な酵素阻害剤を作用させた環境下で結合させたLAL結合ビーズ試薬の実際の製造例について説明する。カルボキシル基を表面に有するビーズ1としては、Polyscience社製の粒径 $0.45\mu\text{m}$ 、あるいは、 $1.0\mu\text{m}$ のPolybead Carboxylate Microsphere(以下「PCM」と略す。)を用いた。

[0066] LAL試薬としては、和光純薬製のエンドトキシン検出試薬であるリムルスHS-Tシングルテストワコー(以下「LAL試薬」と略す。)を用いた。 $1.0\text{mL}$ のPCMを最大容量 $2.0\text{mL}$ の遠心管に入れて、さらに $\text{pH}9.6$ の $0.1\text{M}$ 炭酸バッファを最大容量まで加えてよく混合した後、卓上遠心器で $12500\text{rpm}$ にて5分間遠心してPCMを沈殿させて上澄みを除去した。この炭酸バッファとの混和、遠心、上澄みの除去といった一連の作業をさらに2回繰り返し、次に、沈殿させたPCMに $\text{pH}4.5$ の $0.02\text{M}$ のリン酸バッファを最大容量まで加えて混和させた後、同様に遠心、上澄みの除去という操作を合計3回行なった。

[0067] 得られたPCMの沈殿物にここで使用したリン酸バッファを $0.75\text{mL}$ 加え、さらに、 $0.75\text{mL}$ の $2.0\%$ カルボジイミド水溶液(水溶性カルボジイミド、同仁化学製)を加えて、室温で3時間転倒攪拌法を用いて攪拌してPCM上のカルボキシル基を活性化させた。反応後のPCMは遠心して上澄みを除去した後、再び、同様にリン酸バッファで3回洗浄し、最後に得られたPCMの沈殿物に $\text{pH}8.5$ の $0.2\text{M}$ ホウ酸バッファ $0.5\text{mL}$ を加えて懸濁させ、次に、LAL試薬にホウ酸バッファを $0.25\text{mL}$ 加えて溶解させたLAL試薬溶液を2本用意し、これらとPCM懸濁液を混合して容量を $1.0\text{mL}$ とした。さらに、これにセリンプロテアーゼ阻害剤であるPMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)を最終濃度で $4\text{mM}$ になるように加えた。混合溶液中のPCM上にある活性化

したカルボキシル基とLAL中の各蛋白質が持つアミノ基がアミド結合するように室温で2時間反応させた後に、4°Cで一晩反応させた。

[0068] 混合溶液を遠心して上澄みを除去した後、1.2mLのホウ酸バッファに再懸濁させ、さらに、この溶液に0.25Mの2-アミノエタノール/ホウ酸バッファを50 $\mu$ L加えて室温で30分転倒攪拌させて、PCM上の未反応の活性化カルボキシル基をアミノエタノールで消費した。最後に、PCM懸濁液を遠心してPCM沈殿物を得た後に注射用生理食塩水(大塚製薬製)で再懸濁、遠心、上澄みの除去による一連の操作で合計3回洗浄してLAL結合ビーズ試薬を得た。

[0069] (測定例1)

次に、上記の製造例1で得られたLAL結合ビーズ試薬を実際に使用した測定例1について説明する。製造例1で得られたLAL結合ビーズ試薬を10mLになるように注射用生理食塩水に懸濁させた。種々の量のLAL結合ビーズ懸濁液を注射用水(大塚製薬製)と混合して100 $\mu$ Lとした。これをさらに、LAL試薬(リムルスHS-Tシングルテストワコー)と混合し、さらに、2EU/Lの濃度のエンドトキシン水溶液を100 $\mu$ L加えた。この合計200 $\mu$ Lの混和液を、外径7mmで内部にマグネチックスターラーバーを内在し、且つ、乾熱滅菌(250°C、5時間)処理したガラス製測定キュベットに移し、試料を攪拌しながら経時的な濁度変化を記録することが可能な血小板凝集測定装置PA-200(興和製)でLAL結合ビーズ10の凝集に伴う透過光強度の時間変化を記録した。

[0070] 図2には、上記の測定によって得られた透過光強度の時間変化を示す。図2において横軸は時間、縦軸は混和液の透過光強度である。図2においては、記録したデータの攪拌開始から5分後の透過光強度を100%として、LAL結合ビーズ10の添加量が異なる場合の各試料の透過光強度の変化が示されている。図2によれば、添加したLAL結合ビーズ10の量が多いほど、変化量を大きくすることができ、且つ、凝集の開始時間を早くできることが判る。

[0071] ここで、本実施例におけるLAL結合ビーズ試薬をエンドトキシンの検出に使用する場合には、例えば図2における透過光強度が所定値に達したことをもって、試料がエンドトキシンを含んでいると判断するようにしてもよい。その場合には、本実施例によ

れば、添加したLAL結合ビーズ10の量が多いほど、エンドトキシンの検出に要する時間を短くすることができる。ここで、図2における透過光強度が所定値に達したことをもって、試料がエンドトキシンを含んでいると判断することは、混和液におけるゲルの生成を検出することでエンドトキシンの検出を行うことに相当する。

[0072] (測定例2)

次に、製造例1で得られたLAL結合ビーズ試薬を使用した別の測定例について説明する。本測定においては、製造例1で得られたLAL結合ビーズ試薬を20mLになるように注射用生理食塩水に懸濁させた。これから、100  $\mu$  Lをとり、LAL試薬に混合させ、さらに、種々の濃度のエンドトキシンを含有する水溶液100  $\mu$  Lと混和させて合計容量を200  $\mu$  Lとした。そして、上記の測定例1と同様に攪拌開始5分後の透過光強度を100%とした透過光強度変化を各試料について記録した。

[0073] 図3には、本測定によって得られた透過光強度の時間変化を示す。図3において横軸は時間、縦軸は混和液の透過光強度である。図3に示したように、試料のエンドトキシンの添加濃度が高いほど、透過光強度の立ち上がりが急峻となり、凝集開始時間が短くなった。すなわち、本実施例におけるLAL結合ビーズ試薬をエンドトキシンの濃度測定に使用する場合には、例えば図3において透過光強度が所定値に達するまでに要した時間(凝集開始時間)に基づいて濃度測定を行うことができる。また、このことは、本発明において、ゲルの生成の程度を測定することでエンドトキシンの濃度を測定することに相当する。

[0074] 次に、このときに得られたエンドトキシンの濃度と凝集開始時間との関係を、LAL結合ビーズ10を用いなかった場合にレーザー光散乱粒子計測法において得られたエンドトキシンの濃度と凝集開始時間との関係と比較した。図4には比較結果を示す。図4に示したように、LAL結合ビーズ10を用いた場合(図4においては簡単のため「LAL結合ビーズ法」と記載した。)には、比濁法を用いたにも拘らず、レーザー光散乱粒子計測法を用いた場合よりも凝集開始時間が短くなっている。これにより、LAL結合ビーズ10を用いることによって、レーザー光散乱粒子計測法を用いた場合よりもさらに迅速にエンドトキシンの検出が可能であることが分かる。

[0075] なお、本実施例における製造例1では、LAL中に含まれる蛋白質を選別することな

くビーズ1に結合させてLAL結合ビーズ試薬を調製している。しかし、本実施例のように、LAL結合ビーズ試薬をさらにLAL試薬と混合した上で、エンドトキシンを含有する試料と混和し、LAL結合ビーズ10を凝集させる場合には、LAL結合ビーズ10を形成するビーズ1上にはなるべく多くのコアギュロゲンが吸着、担持、結合していることが望ましい。従って、LAL結合ビーズ10を生成する際には、LAL中に含まれる蛋白質を選別することなくビーズ1に結合させるよりもむしろ、精製したコアギュロゲンをビーズ1に吸着、担持、結合させるようにしてもよい。

[0076] また、本実施例のように、LAL中の各蛋白質を選定することなくビーズ1に吸着、担持、結合させてLAL結合ビーズ試薬を調製する場合には、酵素阻害剤を少なくとも1種類以上、ならびに、エンドトキシン自体の機能を減衰させる作用を持つ鉄イオン、あるいはアルミニウムイオンを少なくとも1種類以上を共存させて、コアギュロゲンがコアギュリンに加水分解されないように調製してもよい。また、鉄イオン、あるいはアルミニウムイオンを少なくとも1種類以上を単独で添加しても構わない。

[0077] また、上記の実施例においては、LAL結合ビーズ試薬をLAL試薬と混合し、さらにエンドトキシン水溶液と混和して、混和液を攪拌しながら経時的な濁度変化を測定したが、混和液の攪拌は必ずしも必要ではない。混和液を攪拌せずに静置しながら経時的な濁度変化を測定することによっても、LAL結合ビーズ試薬を用いることによって、迅速なエンドトキシンの測定が期待できる。

[0078] また、上記の実施例においては、LAL結合ビーズ試薬をLAL試薬と混合し、さらにエンドトキシン水溶液を混和して、混和液を攪拌しながらレーザー光散乱粒子計測法によってゲルの生成(LAL結合ビーズ10同士の会合による凝集塊の生成)を測定してもよい。そうすれば、LAL結合ビーズ法とレーザー光散乱粒子計測法との相乗効果により、さらに迅速にエンドトキシンの測定を行うことが期待できる。

## 実施例 2

[0079] 次に、本発明における実施例2について説明する。本実施例においては、LAL結合ビーズ試薬を単独でエンドトキシンを含有する検体試料と混和して使用する例について説明する。

[0080] LAL結合ビーズ試薬を単独でエンドトキシンを含有する検体試料と混合して使用

する場合には、LAL結合ビーズ試薬とLAL試薬との混合という工程を省略できるので、より簡便にエンドトキシンの測定を行うことが可能である。一方でこの場合には、LAL結合ビーズ試薬に対してLAL試薬をさらに加えることができないので、LAL結合ビーズ試薬に対してLAL中の蛋白質を補給することができない。

- [0081] 従って、この場合には、LAL結合ビーズ10には、コアギュロゲン及び、セリンプロテアーゼの両方が吸着、担持、結合していることが望ましい。そうすることで、LAL結合ビーズ試薬をさらにLAL試薬と混合しなくても、LAL結合ビーズ試薬単体をエンドトキシンを含有する試料と混和させることにより、エンドトキシンをLAL結合ビーズ試薬に含有されるセリンプロテアーゼに作用させることができる。これによって、LAL結合ビーズ試薬に含有されるコアギュロゲンをコアギュリンに水解することができ、その結果、LAL結合ビーズ試薬中のLAL結合ビーズ10同士を会合させて早期に凝集させることが可能となる。
- [0082] このように本実施例では、LAL結合ビーズ試薬の調製時において、ビーズ1の表面には精製されたコアギュロゲンのみを吸着、担持、結合させるのではなく、LAL中の各蛋白質をビーズ1の表面に吸着、担持、結合させることが望ましい。
- [0083] 次に、本実施例において、ビーズ1に対してコアギュロゲン及び、セリンプロテアーゼをはじめとするLAL中の蛋白質のコアギュロゲン以外の各成分が結合している場合について考える。このような場合でも本実施例において、LAL結合ビーズ試薬の調製過程で、セリンプロテアーゼの活性が添加した酵素阻害剤により不可逆的に阻害されているような状態では、LAL結合ビーズ試薬をエンドトキシンを含有する試料と混和してもLAL結合ビーズ10の凝集を期待できない。
- [0084] 従って、本実施例においては、酵素機能が不可逆的に阻害されたり、あるいは、失活したりしないような酵素阻害剤の選定や調製法をとることが望まれる。例えば、LAL結合ビーズ試薬の調製過程において、エンドトキシンの作用を減弱させるために過剰量の鉄イオンやアルミニウムイオンを添加して、酵素機能を阻害することなくコアギュロゲンがコアギュリンに加水分解されるのを防いでよい。また、例えばLAL結合ビーズ試薬の調製過程において、不可逆的でない酵素阻害剤(可逆性阻害剤)によってセリンプロテアーゼの活性を阻害するようにしてもよい。この場合は、洗浄により酵

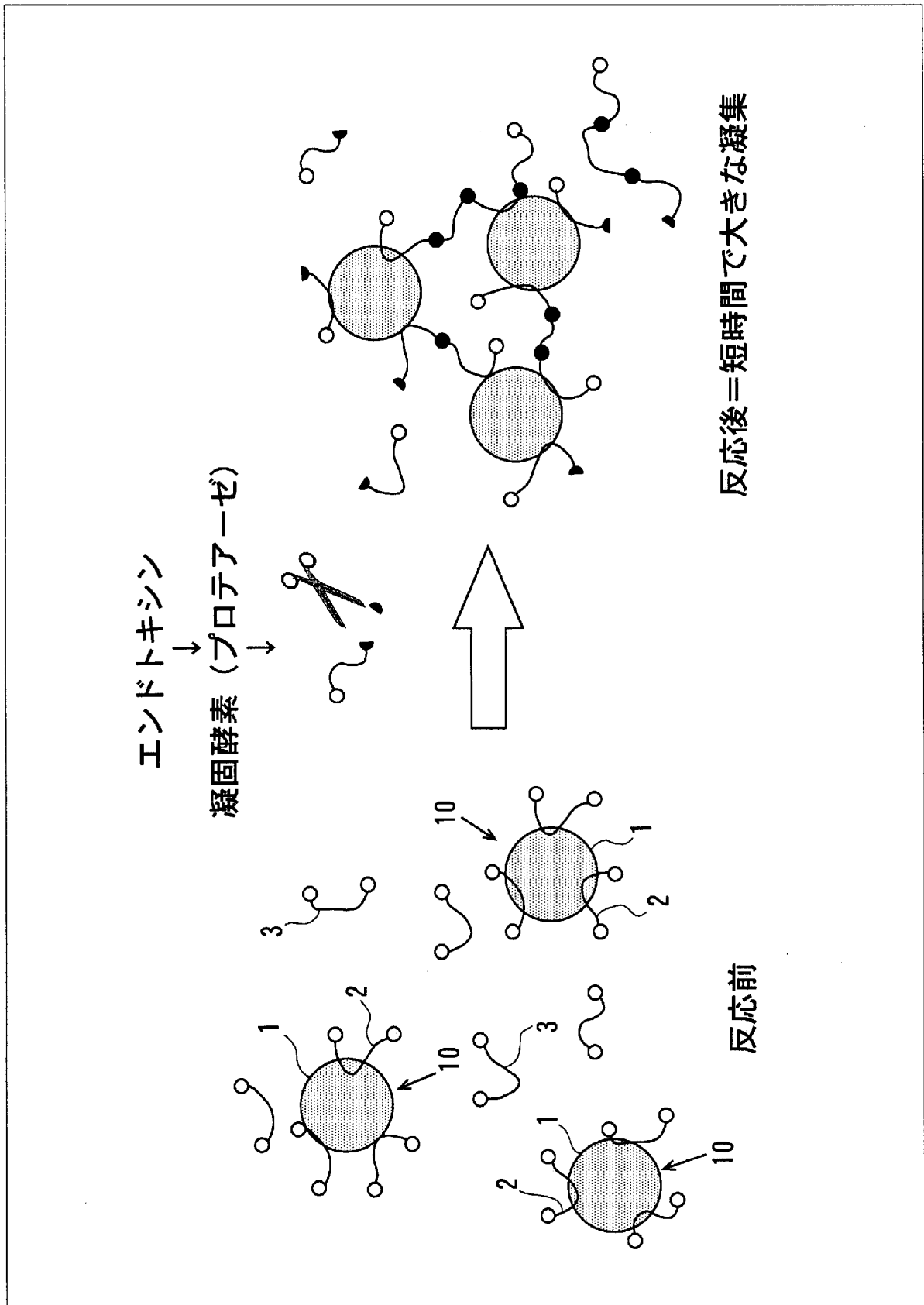
素の失活が解除される可能性がある。

- [0085] これによれば、ビーズ1上に吸着、担持、結合されたLAL中蛋白質の酵素機能が不可逆的に阻害されたり、あるいは、失活したりすることを抑制できる。その結果、LAL結合ビーズ試薬にさらにLAL試薬を混合しなくても、エンドトキシンを含有する試料と混和することで、エンドトキシンの高感度な測定を行うことができる。
- [0086] なお、上記の実施例において調製されたLAL結合ビーズ試薬は、本発明におけるエンドトキシンの測定用試薬キットに相当する。

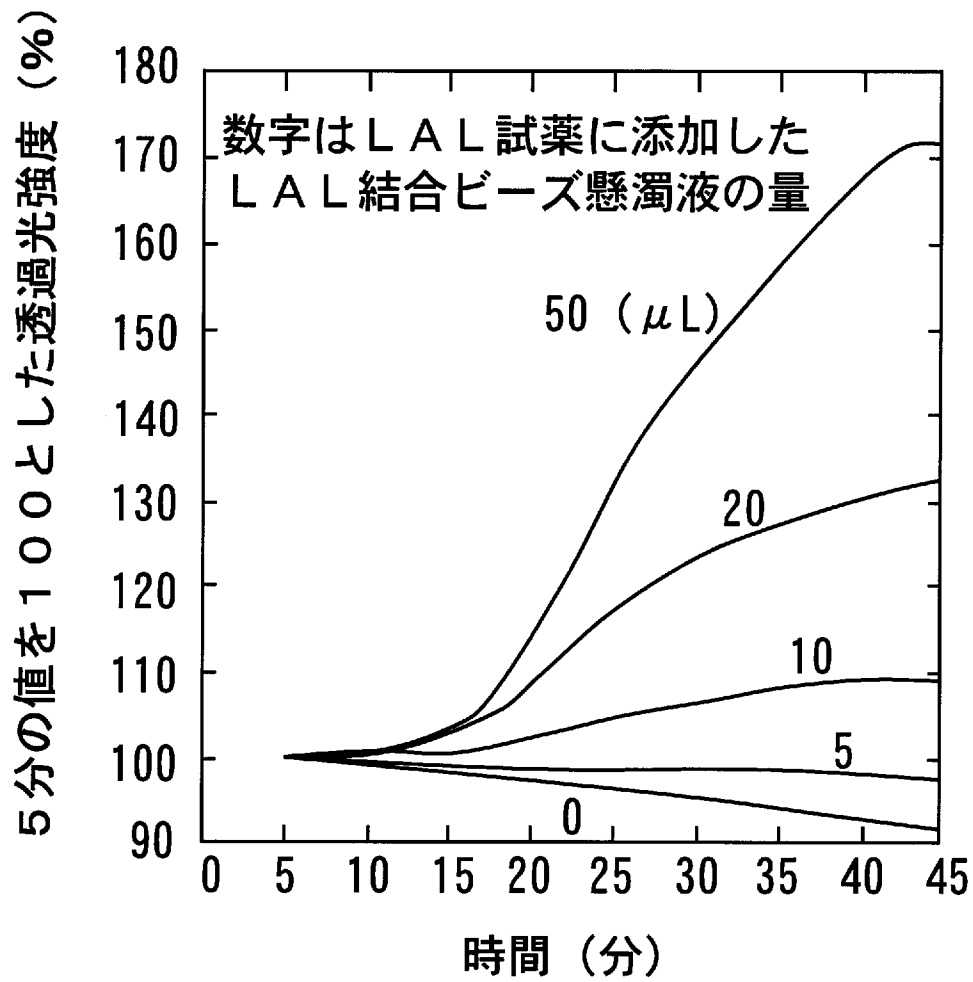
## 請求の範囲

- [1] 試料中のエンドトキシンを検出または試料中のエンドトキシンの濃度を測定する、エンドトキシンの測定方法であつて、
- カプトガニの血球の抽出物に含まれる所定の蛋白質を、試薬中に分散可能な微粒子の表面に結合または吸着させ、
- 前記蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬と試料とを混和させ、
- 前記試薬と前記試料との混和液におけるゲルの生成を検出することでエンドトキシンの検出を行いまたは、前記ゲルの生成の程度を測定することでエンドトキシンの濃度を測定することを特徴とするエンドトキシンの測定方法。
- [2] 前記所定の蛋白質は、カプトガニの血球の抽出物から精製されたコアギュロゲンであることを特徴とする請求項1に記載のエンドトキシンの測定方法。
- [3] 前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬を、さらに、カプトガニの血球の抽出物と混合し、
- 前記混合と同時または混合後において、前記試薬と前記試料とを混和させることを特徴とする請求項1または2に記載のエンドトキシンの測定方法。
- [4] カプトガニの血球の抽出物に含まれる所定の蛋白質を、試薬中に分散可能な微粒子の表面に結合または吸着させて調製されたことを特徴とするエンドトキシンの測定用試薬キット。
- [5] 前記所定の蛋白質は、カプトガニの血球の抽出物から精製されたコアギュロゲンであることを特徴とする請求項4に記載のエンドトキシンの測定用試薬キット。
- [6] 前記所定の蛋白質は、セリンプロテアーゼとコアギュロゲンとを含み、
- 前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬に、前記セリンプロテアーゼとエンドトキシンとの反応を抑制する抑制剤がさらに添加されたことを特徴とする請求項4に記載のエンドトキシンの測定用試薬キット。
- [7] 前記所定の蛋白質が結合または吸着した前記微粒子が分散した試薬を、さらに、カプトガニの血球の抽出物と混合して調製されたことを特徴とする請求項4から6のいずれか1項に記載のエンドトキシンの測定用試薬キット。

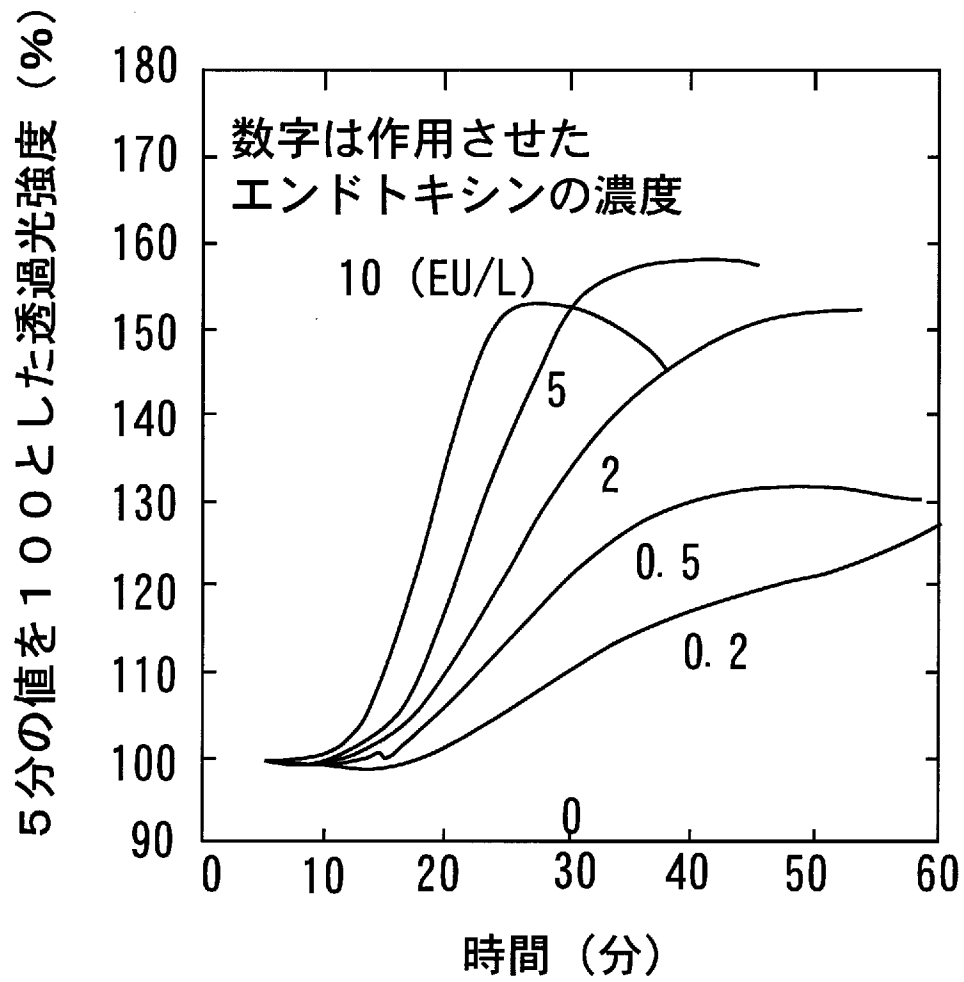
[図1]



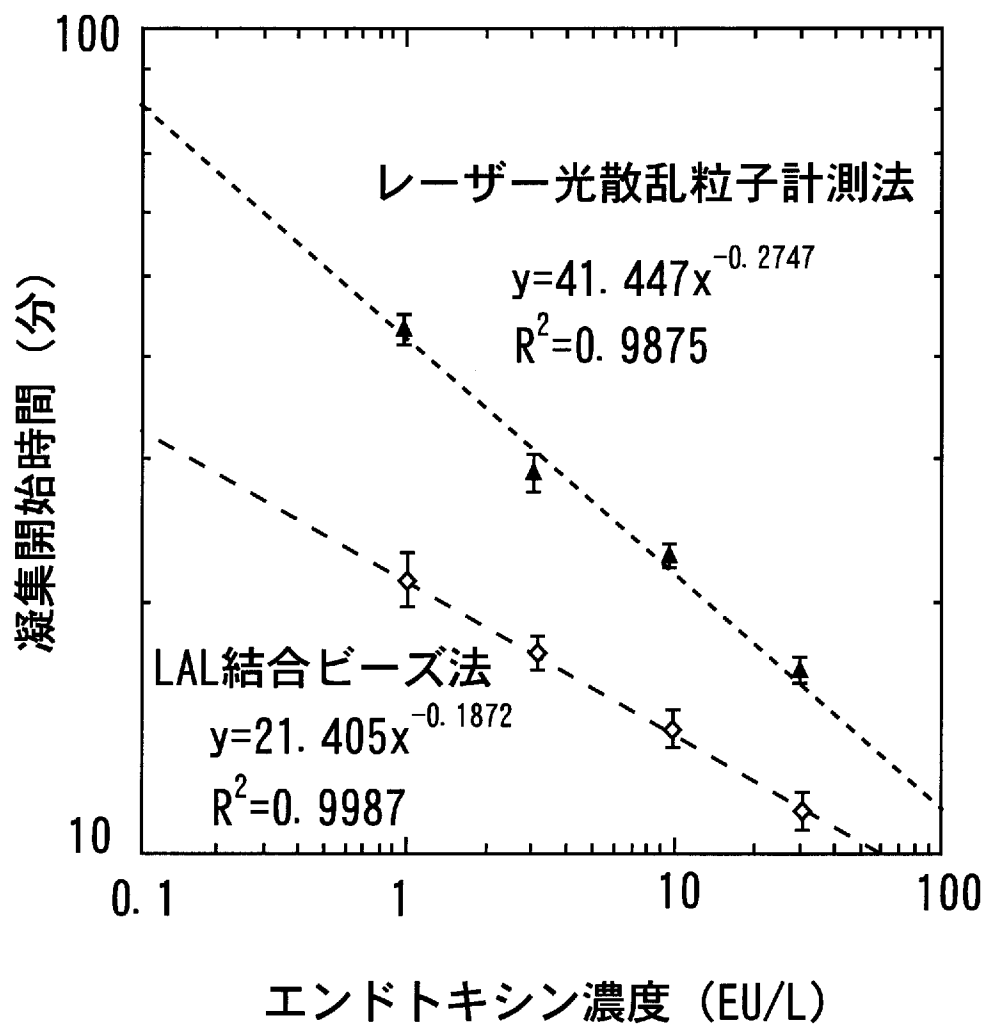
[図2]



[図3]



[図4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2008/073101

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N33/579(2006.01) i, C12Q1/37(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)  
G01N33/579, C12Q1/37

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-130064 A (Seikagaku Corp.), 13 May, 1994 (13.05.94), Full text; all drawings & US 5550030 A                      & EP 588303 A1 & DE 69327211 D                      & DE 69327211 T & AU 4733993 A                      & CA 2106119 A & CN 1091832 A                      & CA 2106119 A1	1-7
A	JP 2003-322655 A (Daicem Membrane-Systems Ltd.), 14 November, 2003 (14.11.03), Full text; all drawings (Family: none)	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.                       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 January, 2009 (22.01.09)	Date of mailing of the international search report 03 February, 2009 (03.02.09)
--	--

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. G01N33/579(2006.01)i, C12Q1/37(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 (IPC))  
 Int.Cl. G01N33/579, C12Q1/37

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 1971-2009年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2009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(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), 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 請求の範囲の番号
A	JP 6-130064 A (生化学工業株式会社) 1994.05.13, 全文・全図 & US 5550030 A & EP 588303 A1 & DE 69327211 D & DE 69327211 T & AU 4733993 A & CA 2106119 A & CN 1091832 A & CA 2106119 A1	1-7
A	JP 2003-322655 A (ダイセン・メンブレン・システムズ株式会社) 2003.11.14, 全文・全図 (ファミリーなし)	1-7

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  
 22.01.2009

国際調査報告の発送日  
 03.02.2009

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
 三木 隆  
 電話番号 03-3581-1101 内線 3252