

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008 年 4 月 24 日 (24.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/047799 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/549 (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/070190

(22) 国際出願日:

2007 年 10 月 16 日 (16.10.2007)

(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 2006-281841

2006 年 10 月 16 日 (16.10.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社三菱化学ヤトロン (MITSUBISHI KAGAKU IATRON, INC.) [JP/JP]; 〒1620812 東京都新宿区西五

軒町 1 3 番 1 号 Tokyo (JP). 国立大学法人千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号 Chiba (JP).

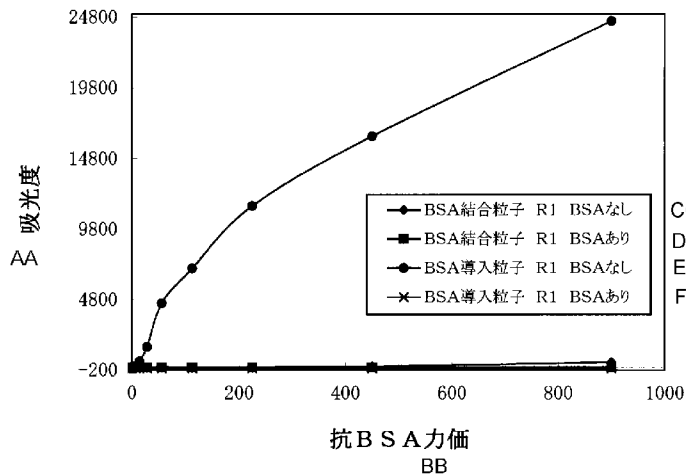
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 澤井 時男 (SAWAI, Tokio) [JP/JP]; 〒1620812 東京都新宿区西五軒町 1 3 番 1 号 株式会社三菱化学ヤトロン内 Tokyo (JP). 坪田 博幸 (TSUBOTA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1620812 東京都新宿区西五軒町 1 3 番 1 号 株式会社三菱化学ヤトロン内 Tokyo (JP). 谷口 竜王 (TANIGUCHI, Tatsuo) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号 千葉大学大学院工学研究科共生応用化学専攻内 Chiba (JP). 水野 晃宏 (MIZUNO, Akihiro) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市

[続葉有]

(54) Title: IMMUNOLOGICAL ANALYSIS REAGENT AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 免疫学的分析試薬及び免疫学的分析方法



AA ABSORBANCE

BB ANTI-BSA TITER

CC BSA-BOUND PARTICLES R1, WITHOUT BSA

DD BSA-BOUND PARTICLES R1, WITH BSA

EE BSA-LOADED PARTICLES R1, WITHOUT BSA

FF BSA-LOADED PARTICLES R1, WITH BSA

(57) Abstract: It is intended to disclose an immunological analysis reagent comprising a suspension of latex particles having an antigen or an antibody to a target substance to be analyzed introduced into the surface thereof which are produced by, in a reaction of synthesizing the latex particles, polymerizing a monomer in the coexistence of the above-described antigen or antibody; and an immunological analysis method comprising contacting in a liquid a test sample (1) possibly containing a target compound to be analyzed with latex particles (2) having an antigen or an antibody to the above target substance to be analyzed introduced into the surface thereof, wherein the latex particles are produced by, in a reaction of synthesizing the latex particles, polymerizing a monomer in the coexistence of the above-described antigen or antibody. Use of the immunological analysis reagent or the immunological analysis method as described above makes it possible to achieve a high detection sensitivity while avoiding a nonspecific reaction occurring in the existing methods.

(57) 要約: ラテックス粒子の合成反応において、分析対象物質に対する抗原又は抗体を共存させた状態でモノマーを重合させ、前記ラテックス粒子の表面に前記抗原又は抗体が導入されたラテックス粒子の懸濁液を含む、免疫学的分析試薬; 並びに、(1) 分析対象化合物を含む可能性のある被検試料と、(2) ラテックス粒子の合成反応において、前記分析対象物質に対する抗原又は抗体を共存させた状態でモノマーを重合させ、前記ラテックス粒子の表面に前記抗原又は抗体が導入されたラテックス粒子とを液中で接触させる、免疫学的分析方法を開示する。前記免疫学的分析試薬及び免疫学的分析方法は、検出感度が高く、且つ、

[続葉有]

WO 2008/047799 A1



稲毛区弥生町 1 番 3 3 号 千葉大学大学院工学研究
科共生応用化学専攻内 Chiba (JP).

SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(74) 代理人: 森田 憲一, 外(MORITA, Kenichi et al.); 〒
1730004 東京都板橋区板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中
央ビル 5 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, 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, JP, 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,

(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, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, 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

免疫学的分析試薬及び免疫学的分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、免疫学的分析試薬及び免疫学的分析方法に関する。

なお、本明細書における前記「分析」には、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」との両方が含まれる。

背景技術

[0002] 現在、臨床診断検査の現場では、多数の検体について疾病診断の指標となる多岐に渡る物質を短時間且つ高精度に測定し、その結果を迅速・正確に治療現場にフィードバックすることが求められており、中でも抗原抗体反応を利用した免疫学的測定によって、微量な分析対象物の正確な定量が多く実施されている。特に検出感度や正確性を向上させるための方法として、分析対象物質に対する抗原又は抗体を、ポリスチレン等の合成高分子（いわゆるラテックス）粒子の表面に担持させた粒子を利用したラテックス凝集法が公知である。ラテックス凝集法とは、分析対象物質と、ラテックス粒子に結合した抗原又は抗体との反応により生じるラテックス粒子の凝集の程度を目視あるいは光学的に検出することにより、短時間に分析対象物質を測定する方法である。

また、ラテックス粒子を磁性粒子にすることで、磁性粒子に結合した第一抗体により分析対象物をトラップし、磁石で集積させて未反応物等を洗浄後（いわゆるB/F分離）、酵素や蛍光剤等シグナルを発生する物質を標識した第二抗体を添加して分析するサンドイッチ法も多用されている。

抗原抗体反応によって定量する分析対象物質の多くは、一般的に生体試料中に含まれる微量成分であり、低濃度領域における定量性を重視している。しかし、疾病の進行度合いによっては測定対象物質濃度が異常に高値を示す場合があるため、臨床検査の現場においては、低値から高値までを正確に測定できる性能を有する試薬が求められている。

[0003] ラテックス凝集法でもサンドイッチ法でも、ラテックス粒子を用いる場合には、ラテックス粒子の表面に抗原又は抗体を固定することが必要であり、その方法としては、物理的又は化学的に担持させる方法が用いられている。例えば、物理的吸着によりラテックス粒子に抗原又は抗体を直接固定化するか、あるいは、ラテックス粒子の表面の官能基、例えば、アミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、又はエポキシ基などを介した共有結合により、ラテックス粒子に抗原又は抗体を結合させる方法が使用されている。

[0004] しかし、これらの物理的又は化学的な結合方法では、ラテックス表面に担持可能な抗原又は抗体の量に限界があり、前記ラテックス凝集法やサンドイッチ法の実施には測定範囲や検出感度の面で限界があった。即ち、ラテックス粒子自体の特性(表面の電荷、官能基の導入率、粒度分布等)がロット間、メーカー間で一定ではなく、その為、抗原又は抗体を結合する操作が一定であっても、調製された抗体結合ラテックス粒子の性能はバラツキが生じる。例えば、ラテックス表面への物理的又は化学的な結合方法においても、抗原又は抗体が全て結合できずに、結合後の洗浄により取り除かれたり、遠心や分散処理により、結合した抗原又は抗体が剥がれ落ちたりした。即ち、結合する抗原又は抗体の量がばらつくため、測定範囲や検出感度に影響がある。

また、近年あらたな問題として、非特許文献1に開示されているように、ラテックス粒子表面に抗原又は抗体を結合させることで抗原又は抗体に構造的な変性が起こり、試料中に共存する「変性部位に対して結合する物質」による非特異反応を起こす検体がみられることがあった。これにより、測定結果の信頼性が失われることになり、正確な疾病診断ができなくなる。この問題は、抗原又は抗体、あるいはラテックス粒子をそれぞれ個別に検討しても解決できるものではなく、非常に困難性の高い課題である。

[0005] 非特許文献1:「臨床病理」, 2000年8月, 第48巻, 第8号, 760—763頁

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明者は、ラテックス凝集反応における前記の問題点を克服するために鋭意研

究を重ねた結果、分析対象物質に対する抗原又は抗体をラテックス粒子の合成時に共存させることで、従来法より反応性が高く、従来発生していた非特異的反応を回避することができることを見出した。

すなわち、ラテックス粒子を合成する際に抗原又は抗体を共存させる低温ミニエマルジョン重合により作製されたラテックス粒子は、合成完了時に抗原又は抗体がラテックス粒子表面に導入させることで、従来結合できずに洗浄により取り除かれたり、遠心や分散処理により結合した抗原又は抗体が剥がれ落ちたりすることがないラテックス粒子を作製することができた。上記粒子を使用することにより高い反応性を得ることが可能となった。

また、ラテックス粒子を合成する際に抗原又は抗体を共存させるミニエマルジョン重合により作製されたラテックス粒子は、合成完了時に抗原又は抗体がラテックス粒子表面に導入されているため、結合による立体障害による変性が起こることがなく、従って従来みられていた非特異反応を起こす検体との反応が回避できるようになった。本発明はこうした知見に基づくものである。

[0007] 従って、本発明の課題は、検出感度が高く、且つ、従来発生していた非特異的反応を回避することができる免疫学的分析試薬及び免疫学的分析方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 前記課題は、本発明による、ラテックス粒子の合成反応において、分析対象物質に対する抗原又は抗体を共存させた状態でモノマーを重合させ、前記ラテックス粒子の表面に前記抗原又は抗体が導入されたラテックス粒子の懸濁液を含む、免疫学的分析試薬により解決することができる。

また、本発明は、(1)分析対象化合物を含む可能性のある被検試料と、
(2)ラテックス粒子の合成反応において、前記分析対象物質に対する抗原又は抗体を共存させた状態でモノマーを重合させ、前記ラテックス粒子の表面に前記抗原又は抗体が導入されたラテックス粒子と
を液中で接触させる、免疫学的分析方法に関する。

本発明方法の好ましい態様によれば、前記接触の後、抗原抗体反応により生じた

ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する。

本発明方法の別の好ましい態様によれば、前記接触の後、前記液と前記ラテックス粒子とを分離し、前記ラテックス粒子に結合した分析対象物質、あるいは、前記液中に残存する分析対象物質を分析する。

[0009] 更に、本発明は、

[1]モノマー、ラジカル重合開始剤、乳化剤、及びハイドロフォーブを用いてミニエマルション重合を行う際に、抗原又は抗体を共存させて高分子微粒子を製造することを特徴とする、表面に前記抗原又は抗体が導入された高分子微粒子の製造方法；

[2]前記ミニエマルション重合が、重合反応を低温で行う低温エマルション重合である、[1]の製造方法；

[3]前記ラジカル重合開始剤がレドックス開始剤である、[1]又は[2]の製造方法；

[4]前記レドックス開始剤が、アスコルビン酸と H_2O_2 との組合せである、[3]の製造方法；

[5]前記乳化剤が界面活性剤である、[1]～[4]の製造方法；

[6]前記乳化剤が、ポリエチレングリコール鎖を有する重合性界面活性剤である、[1]～[5]の製造方法；

[7]前記ハイドロフォーブがヘキサデカン又はポリスチレンである、[1]～[6]の製造方法；

[8][1]～[7]の製造方法により得られる、高分子微粒子の表面に抗原又は抗体が導入された高分子微粒子に関する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、検出感度が高く、且つ、従来発生していた非特異的反応を回避することができる免疫学的分析試薬及び免疫学的分析方法を提供することができる。

すなわち、ラテックス粒子を合成する際に抗原又は抗体をさせる低温ミニエマルション重合により作製されたラテックス粒子は、合成完了時に抗原又は抗体がラテックス粒子表面に導入させることで、従来結合できずに洗浄により取り除かれたり、遠心や

分散処理により結合した抗原又は抗体が剥がれ落ちたりすることがないラテックス粒子を作製することができ、このようなラテックス粒子を使用することにより高い反応性を得ることが可能である。また、合成完了時に抗原又は抗体がラテックス粒子表面に導入されているため、結合による立体障害による変性が起こることがなく、従って従来みられていた非特異反応を起こす検体との反応を回避することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]BSA導入ラテックス粒子を用いる本発明試薬と、BSA結合ラテックス粒子を用いる従来試薬とを用いて、抗BSA抗体標準溶液の2倍希釈列を測定した結果を示すグラフである。

[図2]BSA導入ラテックス粒子を用いる本発明試薬と、BSA結合ラテックス粒子を用いる従来試薬とを用いて、抗IgG抗体標準溶液の2倍希釈列を測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 本発明では、従来使用されている、物理的又は化学的結合によりラテックス表面に抗原又は抗体を担持させたラテックス粒子に代えて、ラテックス粒子の表面に抗原又は抗体(すなわち、免疫学的パートナー)が導入されたラテックス粒子(以下、パートナー導入ラテックス粒子と称する)を使用する。

従来公知のラテックス粒子では、例えば、物理的吸着によりラテックス粒子に抗原又は抗体を直接固定化するか、あるいは、ラテックス粒子の表面の官能基、例えば、アミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、又はエポキシ基などを介した共有結合により、ラテックス粒子に抗原又は抗体を結合させていた。

[0013] 本発明で用いるパートナー導入ラテックス粒子は、抗原又は抗体の一部がラテックス粒子に埋め込まれることにより、前記抗原又は抗体がラテックス表面に担持されているラテックス粒子である限り、特に限定されるものではない。このようなパートナー導入ラテックス粒子は、例えば、本発明の製造方法により調製することができる。

[0014] 本発明の製造方法は、重合反応の際に抗原又は抗体を共存させること以外は、従来公知のミニエマルション重合(例えば、M. Antonietti, K. Landfester, Prog. Polym. Sci., 2002, 27, 689-757、J.

M. Asua, Prog. Polym. Sci., 2002, 27, 1283-1346)と同様にして実施することができる。

- [0015] 通常のミニエマルジョン重合は、これに限定されるものではないが、例えば、モノマー、ラジカル重合開始剤、乳化剤、及びハイドロフォブを混合する工程、前記混合物を剪断する工程、並びに前記混合物を重合開始温度まで加熱して重合させる工程を含むことができる。ミニエマルジョン重合では、重合用モノマーと乳化剤とを混合した後、例えば、超音波照射による剪断工程を実施することにより、前記剪断力によりモノマーが引きちぎられ、乳化剤に覆われたモノマー微小油滴が形成される。ラジカル重合開始剤の重合開始温度まで加熱することにより、モノマー微小油滴をそのまま重合し、高分子微粒子が得られる。
- [0016] 本発明で用いる抗原又は抗体は、界面活性を示す抗原又は抗体である限り、特に限定されるものではなく、ラテックス法(例えば、ラテックス凝集法、ラテックスを用いたB/F分離)に利用可能な抗原又は抗体であることが好ましい。或る抗原又は抗体が界面活性を示すか否かは、公知方法、例えば、表面張力測定、あるいは、ピレンを蛍光プローブに用いた蛍光スペクトル測定により確認することができる。また、本発明で使用する抗原又は抗体としては、前記ピレンを蛍光プローブに用いた蛍光スペクトル測定において、ピレンの第一発光ピーク(I1)と第三発光ピーク(I3)の強度比(I1/I3)が0.5~1.6(より好ましくは0.6~1.5)である抗原又は抗体が好ましい。例えば、前記抗原又は抗体としては、各種抗体、レセプター、酵素、脂質、糖鎖等を挙げることができ、具体的には、IgG、C反応性タンパク質(CRP)、フェリチン、 β -2マイクログロブリン、 α -フェトプロテイン(AFP)、IgE、B型肝炎ウイルス(HBS抗体又はHBc抗体)、Dダイマー、フィブリン・フィブリノゲン分解産物(FDP)、可溶性フィブリン(Soluble fibrin:SF)、プラスミン・ α 2-プラスミンインヒビター複合体(PPI)、前立腺特異抗原(PSA)、エラスターゼ1、エラスターゼXDP、トロンボモジュリン、又はアルブミン(好ましくは血清アルブミン)等を挙げることができる。
- [0017] 抗体を用いる場合には、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いることができる。また、抗体の種類としては、免疫グロブリン分子自体のほか、抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFv等も使用可能である。

- [0018] 本発明で用いることのできるモノマーとしては、通常のエマルジョン重合で使用可能なモノマーを使用することができ、例えば、スチレン、スチレン誘導体(例えば、クロロメチルスチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム)、アクリル酸若しくはメタクリル酸、アクリル酸エステル若しくはメタクリル酸エステル[例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、ヘキサデシル(メタ)アクリレート]、酢酸ビニルを挙げることができる。
- [0019] 本発明で用いることのできるラジカル重合開始剤としては、通常のエマルジョン重合で使用可能なラジカル重合開始剤を使用することができ、例えば、過酸化開始剤、過硫酸開始剤、アゾ系開始剤、又はレドックス開始剤を挙げることができる。本発明においては、重合反応を低温で行うことができる点で、レドックス開始剤を用いることが好ましい。重合反応時に共存させる抗原又は抗体が生理活性を有する場合、前記重合反応を低温で行うことにより、生理活性の低下を抑制することができる。
- [0020] 前記過酸化開始剤としては、例えば、過酸化ベンゾイル(BPO)、ジ-*t*-ブチルペルオキシド(DBPO)、過酸化アンモニウムを挙げることができる。前記過硫酸開始剤としては、例えば、過硫酸カリウム(KPS)、過硫酸アンモニウム(APS)、過硫酸ナトリウム(NPS)を挙げることができる。前記アゾ系開始剤としては、例えば、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)、ジメチル2, 2'-アゾビスイソブチレート(MAIB)、4, 4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレロニトリル)を挙げることができる。
- [0021] 前記レドックス開始剤としては、例えば、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン[N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TMEDA)]／過硫酸カリウム[potassium persulfate (KPS)]、 FeSO_4 ／KPS、 FeSO_4 ／ H_2O_2 、アスコルビン酸(ビタミンC)／ H_2O_2 等を挙げることができる。高い転化率(例えば、75～98%)を達成することができる点で、アスコルビン酸／ H_2O_2 の組合せが好ましい。
- [0022] 本発明で用いることのできる乳化剤としては、エマルジョン重合で一般に使用される各種界面活性剤を用いることができ、例えば、アニオン性化合物、カチオン性化合物、ノニオン性化合物を挙げることができる。前記ノニオン性化合物としては、例え

ば、ポリエチレングリコール(PEG)鎖を有する重合性界面活性剤、長鎖アルコール、ポリビニルアルコール、Brij 35(PIERCE社)を挙げることができる。

- [0023] ポリエチレングリコール(PEG)鎖を有する重合性界面活性剤としては、例えば、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ (n は2以上の整数、好ましくは2~100、より好ましくは5~80、更に好ましくは8~50、特に好ましくは9~23)を挙げることができる、より具体的には、例えば、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{23}\text{CH}_3$ [$n=23$; (商品名)NKエステルM-230G (商品名); 新中村化学工業株式会社]、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_9\text{CH}_3$ [$n=9$; (商品名)NKエステルM-90G; 新中村化学工業株式会社]を挙げることができる。前記重合性界面活性剤を乳化剤として用いることで、立体反発による分散安定性を得ることができる。

前記長鎖アルコールとしては、例えば、1-ペンタノール、デカノールを挙げることができる。

- [0024] 本発明で用いることのできるハイドロフォブとしては、通常のエマルジョン重合で使用可能なハイドロフォブを使用することができ、例えば、ヘキサデカン、シルセスキオキサン、又は疎水性ポリマー(例えば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチル)を挙げることができる、ヘキサデカン又はポリスチレンが好ましい。ハイドロフォブを用いることにより、オストワルド熟成による粒径の不均一性の増大を抑制し、単分散なラテックス粒子を合成することができる。

- [0025] 重合時の反応条件、例えば、溶媒、混合比、温度、反応時間などは、使用するモノマー及び抗原又は抗体の種類、合成する高分子微粒子の平均粒径、微粒子表面に担持させる抗原又は抗体の量などに応じて、例えば、パイロット試験を実施することにより適宜決定することができる。

例えば、重合用モノマー(例えば、スチレンモノマー)40mmolに対して、抗原又は抗体[例えば、ウシ血清アルブミン、IgG、 F(ab')_2]を、通常0.01~5g、好ましくは0.02~2g、より好ましくは0.08~0.8gの量で;ラジカル重合開始剤(例えば、アスコルビン酸、 H_2O_2)を、通常0.01~4mmol、好ましくは0.02~2mmolの量で;乳化剤(例えば、NKエステルM-230G、NKエステルM-90G)を、通常0.1~10mmol、好ましくは0.2~5mmol、より好ましくは0.4~4mmolの量で;それぞれ、

用いることができる。反応時間は、通常1時間以上、好ましくは3～48時間、より好ましくは4～24時間である。反応温度は、通常0～80℃、好ましくは0～60℃、より好ましくは0～40℃である。

[0026] 本発明の製造方法において、ミニエマルジョン重合の際に共存させた抗原又は抗体が高分子微粒子(例えば、ラテックス)表面に導入される作用機序は明らかでないが、本発明者は以下のとおり推測している。すなわち、本発明で用いる抗原又は抗体は界面活性を示すため、その親水的な部分により、水との接合帯である高分子微粒子(例えば、ラテックス)表面に存在すると考えられる。なお、本発明は、この推測に限定されるものではない。

[0027] 本発明では分析においてラテックス法(例えば、ラテックス凝集法、ラテックスを用いたB/F分離)を用いる。分析対象物質に対する抗原又は抗体(例えば、ポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体、又はそれらの抗体フラグメント)を導入したラテックス粒子と、分析対象物質とを接触させるラテックス上での抗原抗体反応を実施する系において、導入された抗原又は抗体が立体障害による変性のない状態であるため、変性部位に対する非特異的な検体とは反応せずに、従来法より高感度で分析対象物質を分析(検出又は測定、好ましくは測定)することができる。

[0028] 本発明により分析することのできる物質(分析対象物質)は、一般に抗原抗体反応を利用して抗原又は抗体として分析することのできる物質(特に生理活性物質)であれば特に限定されない。分析対象物質の代表例としては、タンパク質、脂質、糖鎖等を挙げることができ、より詳しくは、例えば、各種抗体、レセプター、又は酵素等を挙げることができる。具体的には、IgG、C反応性タンパク質(CRP)、フェリチン、 β -2マイクログロブリン、 α -フエトプロテイン(AFP)、IgE、B型肝炎ウイルス(HBS抗体又はHBc抗体)、Dダイマー、フィブリン・フィブリノゲン分解産物(FDP)、可溶性フィブリン(Soluble fibrin:SF)、プラスミン・ α 2-プラスミンインヒビター複合体(PPI)、前立腺特異抗原(PSA)、エラスターゼ1、エラスターゼXDP、トロンボモジュリン、又はアルブミン(好ましくは血清アルブミン)等を挙げることができる。

また、本発明で分析可能な被検試料は、前記分析対象物質を含む可能性のある試料であれば、特に限定されず、特に生体試料、例えば、血液、血清、血漿、尿、

髄液、又は細胞若しくは組織破碎液などを挙げることができる。

[0029] 本発明では、その分析においてラテックス法を用いる。本発明におけるラテックス法では、分析対象物質に特異的に反応する抗原又は抗体を導入したラテックス粒子を用いる。

パートナー導入ラテックス粒子の平均粒径は、分析対象物質の検出濃度又は測定機器によって適宜選択することができ、通常、 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の範囲で適宜選択することができる。

[0030] ラテックス粒子に導入させる抗体としては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いることができる。また、抗体の種類としては、免疫グロブリン分子自体のほか、抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 又はFv等も使用可能である。

[0031] 本発明による免疫学的分析試薬は、例えば、抗原又は抗体を導入したラテックス粒子と緩衝液を含む1液系の試薬；緩衝液である第1試薬と、抗原又は抗体を導入したラテックス粒子とモノクローナル抗体との両方を含む第2試薬とで構成される2液系の試薬；あるいは、緩衝液と導入したラテックス粒子との両方を含む第1試薬と、抗原又は抗体を感作したラテックス粒子を含む第2試薬とで構成される2液系の試薬など、種々の形態であることができる。

[0032] 本発明においては、前記のような試薬を用いて凝集反応を行い、生じた凝集の度合い(凝集度)を光学的に分析(特には測定)することにより、被検試料中の分析対象物質の量を分析(特には測定)することができる。ラテックス粒子の凝集度を光学的に検出する具体的方法においては、例えば、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度を測定する光学機器を用いて測定を行うことができる。好ましい測定波長は $300 \sim 800 \text{ nm}$ である。測定方法は、公知の方法に従い、用いるラテックス粒子の大きさ(平均粒径)若しくは濃度の選択、又は反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度の増加又は減少を測定することにより行うことができる。また、これらの方法を併用することも可能である。

あるいは、前記試薬と被検試料とを液中で接触させた後、B/F分離を行うことにより、ラテックス粒子と液とを分離し、前記ラテックス粒子に結合した分析対象物質、あるいは、前記液中に残存する分析対象物質を分析(特に測定)することにより、被検試

料中の分析対象物質の量を分析(特には測定)することができる。

[0033] 本発明においては、導入させる抗原又は抗体の種類を選択することに加え、ラテックス凝集反応に影響を与える他の因子を調節することによって、ラテックス粒子凝集反応を更に精密に増幅し、低濃度域の定量可能範囲を更に拡張させることや更に非特異反応を抑制することができる。ラテックス凝集反応に影響を与える他の因子としては、例えば、ラテックス粒子の濃度、ラテックス粒子に導入される抗原若しくは抗体量、又はラテックス粒子の粒径等を挙げることができる。

[0034] 本発明で用いる抗原抗体反応の条件は通常の場合と同様であってよく、反応媒体としては、分析対象物質の種類に応じた各種緩衝液を適宜選択することができる。この緩衝液は、分析対象物質を失活させることがなく、且つ、抗原抗体反応を阻害しないようなイオン濃度やpHを有するものであればよい。例えば、グッド緩衝液、グリシン緩衝液、又はトリス緩衝液を使用することができる。反応のpHは、5～10、特に6～8が好ましい。反応温度は0～50℃、特に20～40℃が好ましい。反応時間は適宜決めることができる。

実施例

[0035] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

[0036] 《実施例1:抗ウシ血清アルブミン(BSA)抗体測定試薬の調製》

(1)BSA導入ラテックス粒子の調製

スチレン40mmol、ヘキサデカン4mmol、BSA200mg、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_2)$ (NKエステルM-230G;新中村化学工業株式会社)0.8mmol、アスコルビン酸0.4mmol、及び水20gを混合し、ソニケーション(UH-300:株式会社エスエムテ)を出力80%、パルス50%で氷浴下15分間実施した。三口フラスコに入れ、100rpmで攪拌しながら窒素バブリングを15分間実施した後、 H_2O_2 0.4mmolを入れ、200rpmで攪拌しながら30℃又は60℃で6時間重合してBSA導入ラテックス粒子を調製した。なお、得られたBSA導入ラテックス粒子の平均粒径は0.109 μm (30℃の場合)及び0.121 μm (60℃の場合)であった。

[0037] (2)BSA導入ラテックス粒子懸濁液の調製

BSA導入ラテックス粒子(1%濃度)1mLに対して、免疫学的測定用ブロッキング試薬N101(日本油脂株式会社)1mLを添加し、室温にて30分間攪拌した。この混合液を35000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にトリス緩衝液(pH8.0)10mLを添加し、ラテックスを懸濁させ、BSA導入ラテックス粒子懸濁液を調製した。

[0038] (3) 緩衝液の調製

0.5重量%BSAを含有する0.1mol/Lトリス緩衝液(PH8.0)に、0.9重量%の濃度となるように塩化ナトリウムを添加して緩衝液とした。以下、BSAを含まないNaCl含有トリス緩衝液を「緩衝液A」と、BSAを含有するNaCl含有トリス緩衝液を「緩衝液B」と称する。

[0039] (4) 抗BSA抗体測定試薬

実施例1(2)で調製したBSA導入ラテックス粒子懸濁液(第2試薬)と、実施例1(3)で調製した緩衝液A又はB(第1試薬)とから構成される2液系の試薬を、本発明の免疫学的分析試薬としての抗BSA抗体測定試薬として、以下の実施例で評価した。

[0040] 《実施例2: 抗BSA抗体標準溶液の測定》

(1) 抗BSA抗体標準溶液の調製

抗BSA抗体(Rabbit Anti cow albumin; DAKO社、900単位)を生理食塩水で倍々希釈し、900、450、225、113、56、28、14、及び7単位濃度の標準抗BSA抗体希釈列を調製した。

[0041] (2) 抗BSA抗体標準溶液の測定

標準抗BSA抗体希釈列15 μ Lに、実施例1(3)で調製した緩衝液A又はB90 μ Lを混合し、37°Cで適時保持した後、実施例1(2)で調製したBSA導入ラテックス粒子懸濁液90 μ Lを添加攪拌し、この後、5分後の波長800/570nmでの吸光度を測定した。この間の570nm吸光度変化量と800nm吸光度変化量の差を吸光度変化量(Δ Abs)とした。測定は日立自動分析装置7170型を用いて行った。

なお、比較のために、平均粒径0.11 μ mのポリスチレンラテックス粒子(日本合成ゴム製: 固形分10%)を用いて、前記粒子1%濃度1mLにBSAを0.3%(3mg/mL)量感作して調製したBSA結合ラテックス粒子懸濁液を使用した。

[0042] 結果を表1及び図1、並びに表2に示す。表1及び図1には、緩衝液A又はBを使用

した場合の、実施例1(4)に記載の本発明試薬(重合温度=30℃)の結果を、従来試薬の結果と併せて示す。また、表2には、緩衝液A(すなわち、BSA不含)を用いた場合の、実施例1(4)に記載の本発明試薬(重合温度=30℃又は60℃)の結果を、従来試薬の結果と併せて示す。

[0043] 表1及び図1から明らかなように、緩衝液A(すなわち、BSA不含)を用いた場合、BSA導入ラテックス粒子懸濁液の場合(本発明試薬)には、抗BSA抗体濃度が900単位で吸光度変化量(Δ Abs)24513に対して、BSA結合ラテックス粒子懸濁液の場合(従来試薬)には、900単位で吸光度変化量(Δ Abs)385と、明らかにBSA導入ラテックス粒子懸濁液が高感度であった。また、緩衝液B(すなわち、0.5%BSA含有)を用いると、BSA結合ラテックス粒子懸濁液、BSA導入ラテックス粒子懸濁液ともに、抗BSA抗体希釈列との反応性はみられなかった。

[0044] [表1]

抗BSA抗体 (タイター)	吸光度変化 (Δ A B S)			
	従来試薬		本発明試薬	
	BSA結合粒子		BSA導入粒子	
	緩衝液A	緩衝液B	緩衝液A	緩衝液B
0	-20	-10	-102	-50
7	-38	-7	84	-50
14	-19	-7	407	-48
28	-19	-9	1439	-46
56	-18	-6	4546	-45
113	-15	-6	7024	-48
225	-5	-2	11471	-49
450	63	2	16397	-43
900	385	11	24513	-46

[0045] 表2から明らかなように、BSA導入ラテックス粒子懸濁液(本発明試薬)において、重合反応を低温(30℃)で実施して得られたBSA導入ラテックス粒子懸濁液の場合には、抗BSA抗体濃度が900単位で吸光度変化量(Δ Abs)24513に対して、高温(60℃)で実施して得られたBSA導入ラテックス粒子懸濁液は900単位で吸光度変化量(Δ Abs)8480と、低温でのBSA導入ラテックス粒子懸濁液のほうが高感度であった。また、BSA結合ラテックス粒子懸濁液の場合(従来試薬)には、900単位で吸光度変化量(Δ Abs)385と、明らかにBSA導入ラテックス粒子懸濁液が高感度で

あった。

[0046] [表2]

抗BSA抗体 (タイター)	吸光度変化 (Δ ABS)		
	BSA結合粒子	BSA導入粒子	
		重合温度 30℃	重合温度 60℃
0	-20	-102	-73
14	-19	407	-55
28	-19	1439	-1
56	-18	4546	114
113	-15	7024	406
225	-5	11471	1169
450	63	16397	3507
900	385	24513	8480

[0047] 《実施例3:抗BSA抗体測定試薬によるヒト血清の測定》

本実施例では、標準抗BSA抗体希釈列の代わりに、正常検体であるヒト血清5例(検体No. 1～No. 5)と非特異的検体であるヒト血清3例(検体No. 6～No. 8)を用いること以外は、前記実施例2(2)の操作を繰り返した。なお、前記非特異的検体は、ラテックス粒子にBSAを結合したBSA結合ラテックス粒子懸濁液に対して非特異的に反応し、BSAを結合していないラテックス粒子懸濁液とは反応しない検体である。

[0048] 結果を表3に示す。

表3から明らかなように、正常検体(血清NO. 1～No. 5)、非特異的検体(血清No. 6～No. 8)ともにBSA導入ラテックス粒子懸濁液との反応はみられないが、BSA結合ラテックス粒子懸濁液においては、BSAを含まない緩衝液(緩衝液A)においても、0.5%BSAを懸濁させた緩衝液(緩衝液B)においても、非特異検体との強い反応がみられた。

[0049] [表3]

検体No. (ヒト血清)	吸光度変化 ($\Delta A B S$)			
	従来試薬		本発明試薬	
	BSA結合粒子		BSA導入粒子	
	緩衝液A	緩衝液B	緩衝液A	緩衝液B
[正常検体]				
No. 1	-76	-54	-4	2
No. 2	-88	25	-31	-16
No. 3	53	63	-47	-39
No. 4	89	92	-5	16
No. 5	100	129	2	14
[非特異的検体]				
No. 6	6382	6463	20	60
No. 7	2536	3570	23	71
No. 8	1571	2317	13	74

[0050] 《実施例4:抗IgG測定試薬の調製》

(1) IgG導入ラテックス粒子の調製

スチレン40mmol、ヘキサデカン4mmol、IgG 200mg、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{CH}_2\text{O})_{23}\text{CH}_3$ (NKエステルM-230G; 新中村化学工業株式会社) 0.6mmol、アスコルビン酸0.4mmol、及び水20gを混合し、ソニケーション(UH-300: 株式会社エスエムテ)を出力80%、パルス50%で氷浴下15分間実施した。三口フラスコに入れ、100rpmで攪拌しながら窒素バブリングを15分間実施した後、 H_2O_2 0.4mmolを入れ、200rpmで攪拌しながら30°Cで6時間重合してIgG導入ラテックス粒子を調製した。なお、IgG導入ラテックス粒子の平均粒径は0.318 μm であった。

[0051] (2) IgG導入ラテックス粒子懸濁液の調製

IgG導入ラテックス粒子(1%濃度)1mLに対して、免疫学的測定用ブロッキング試薬N101(日本油脂株式会社)1mLを添加し、室温にて30分間攪拌した。この混合液を35000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にトリス緩衝液(pH8.0)10mLを添加し、ラテックスを懸濁させ、IgG導入ラテックス粒子懸濁液を調製した。

[0052] (3) 抗IgG抗体測定試薬

実施例4(2)で調製したIgG導入ラテックス粒子懸濁液(第2試薬)と、実施例1(3)で調製した緩衝液B(第1試薬)とから構成される2液系の試薬を、本発明の免疫学的分析試薬としての抗IgG抗体測定試薬として、以下の実施例で評価した。

[0053] 《実施例5:抗IgG抗体標準溶液の測定》

(1)抗IgG抗体標準溶液の調製

抗IgG抗体(Anti-IgG H&L chains;MILES-YEDA社、2.8mg/mL)を生理食塩水で倍々希釈し、2.8、1.4、0.7、0.35、0.175、0.088、及び0.044mg/mLの、7濃度の標準抗IgG抗体希釈列を調製した。

[0054] (2)抗IgG抗体標準溶液の測定

標準抗IgG抗体希釈列2 μ Lに、実施例1(3)で調製した緩衝液90 μ Lを混合し、37°Cで適時保持した後、実施例4(2)で調製したIgG導入ラテックス粒子懸濁液90 μ Lを添加攪拌し、この後、5分後の波長800/570nmでの吸光度を測定した。この間の570nm吸光度変化量と800nm吸光度変化量の差を吸光度変化量(Δ Abs)とした。測定は日立自動分析装置7170型を用いて行った。

なお、比較のために、平均粒径0.283 μ mのポリスチレンラテックス粒子(セキスイ社製:固形分10%)を用いて、前記粒子1%濃度1mLにIgGを1%(10mg/mL)量感作して調製したIgG結合ラテックス粒子懸濁液と、IgG未感作のラテックス粒子懸濁液とを使用した。

[0055] 実施例4(3)に記載の本発明試薬の結果を、従来試薬の結果と併せて、表4及び図2に示す。

表4及び図2から明らかなように、IgG導入ラテックス粒子懸濁液を用いた場合(本発明試薬)には、抗IgG抗体濃度が1.4mg/mLで吸光度変化量(Δ Abs)812に対して、IgG結合ラテックス粒子懸濁液を用いた場合(従来試薬)には、吸光度変化量(Δ Abs)219と、明らかにIgG導入ラテックス粒子懸濁液が高感度であった。

[0056] [表4]

抗 I g G 抗体 (m g / m L)	吸光度変化 (Δ A B S)		
	本発明試薬		従来試薬
	I g G 導入粒子	I g G 結合粒子	
0	— 1	— 4	— 1 2
0. 0 4 4	1 0 4	— 3	— 8
0. 0 8 8	1 7 4	7	— 5
0. 1 7 5	3 1 1	3 5	— 4
0. 3 5	5 0 4	7 1	— 6
0. 7	7 0 3	1 3 2	— 2
1. 4	8 1 2	2 1 9	— 5
2. 8	7 5 7	2 6 2	— 5

[0057] 《実施例6:抗CRP抗体F(ab')₂ 測定試薬の調製》

(1) 抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子の調製

スチレン10mmol、ヘキサデカン1mmol、抗CRP抗体F(ab')₂ 50mg、CH₂=C(CH₃)COO(CH₂CH₂O)₂₃CH₃(NKエステルM-230G;新中村化学工業株式会社)0.2mmol、アスコルビン酸0.1mmol、及び水5gを混合し、ソニケーション(UH-300:株式会社エスエムテール)を出力50%、パルス50%で氷浴下15分間実施した。三口フラスコに入れ、100rpmで攪拌しながら窒素バブリングを15分間実施した後、H₂O₂ 0.1mmolを入れ、200rpmで攪拌しながら室温で6時間重合して抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子を調製した。なお、抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子の平均粒径は0.249 μmであった。

[0058] (2) 抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子懸濁液の調製

抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子(1%濃度)1mLに対して、免疫学的測定用ブロッキング試薬N101(日本油脂株式会社)1mLを添加し、室温にて30分間攪拌した。この混合液を35000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にトリス緩衝液(pH8.0)10mLを添加し、ラテックスを懸濁させ、抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子懸濁液を調製した。

[0059] (3) CRP測定試薬

実施例6(2)で調製した抗CRP抗体F(ab')₂ 導入ラテックス粒子懸濁液(第2試薬)と、実施例1(3)で調製した緩衝液B(第1試薬)とから構成される2液系の試薬を、本発明の免疫学的分析試薬としてのCRP測定試薬として、以下の実施例で評価した。

[0060] 《実施例7:CRP標準溶液の測定》

(1)CRP標準溶液の調製

CRP(オリエンタル酵母株式会社製リコンビナントCRP溶液100mg/dL)を生理食塩水で希釈し、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、及び0.1mg/dLの、6濃度の標準CRP希釈列を調製した。

[0061] (2)CRP標準溶液の測定

標準CRP希釈列2 μ Lに、実施例1(3)で調製した緩衝液90 μ Lを混合し、37°Cで適時保持した後、実施例6(2)で調製した抗CRP抗体F(ab')₂導入ラテックス粒子懸濁液90 μ Lを添加攪拌し、この後、5分後の波長800/570nmでの吸光度を測定した。この間の570nm吸光度変化量と800nm吸光度変化量の差を吸光度変化量(Δ Abs)とした。測定は日立自動分析装置7170型を用いて行った。

[0062] 実施例6(3)に記載の本発明試薬の結果を、表5に示す。

表5から明らかなように、抗CRP抗体F(ab')₂ラテックス粒子懸濁液を用いた場合(本発明試薬)、0.1~3.2mg/dLの範囲においてCRP標準液と濃度依存的な反応性が得られた。

[0063] [表5]

C R P (m g / d L)	吸光度変化 (Δ A B S)
	本発明試薬 抗C R P抗体F (a b ') ₂ 導入粒子
0	- 3 6
0. 1	6
0. 2	5 7
0. 4	1 5 4
0. 8	3 1 5
1. 6	4 8 2
3. 2	5 3 3

産業上の利用可能性

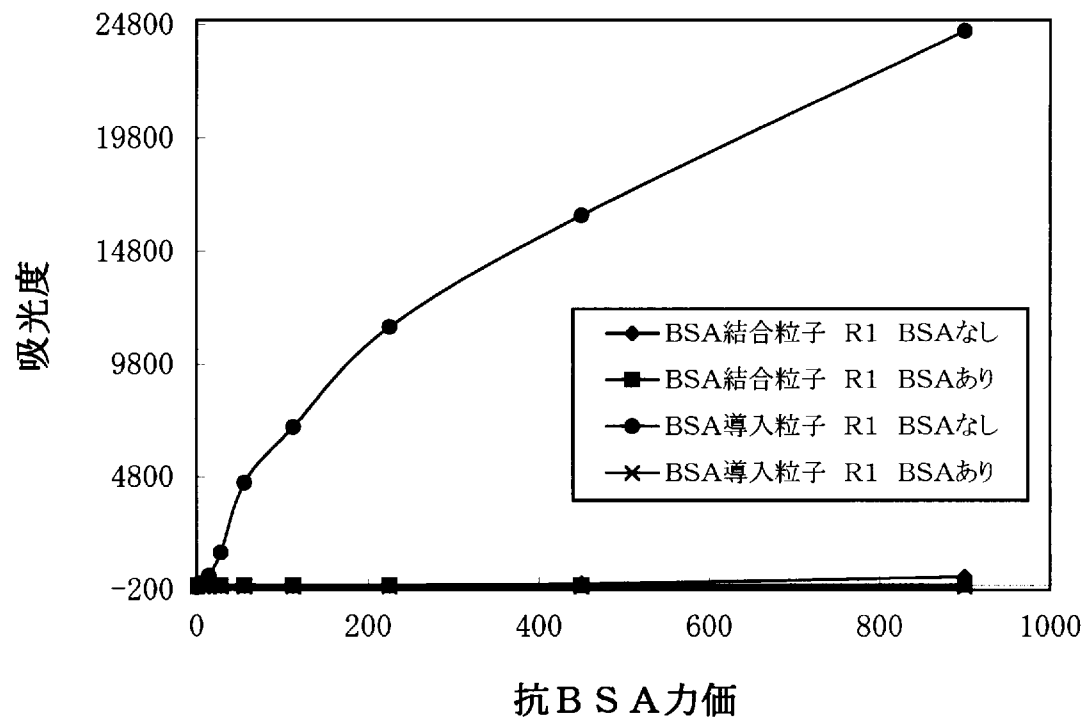
[0064] 本発明は、免疫学的分析(特にラテックス凝集法)の用途に適用することができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

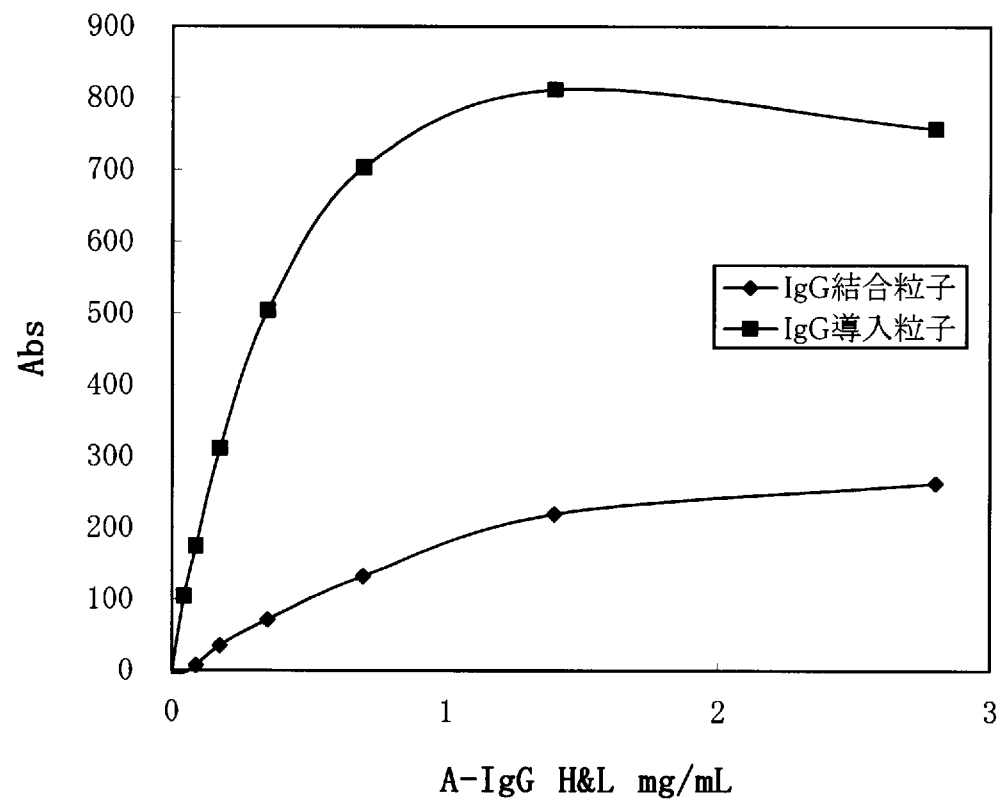
請求の範囲

- [1] ラテックス粒子の合成反応において、分析対象物質に対する抗原又は抗体を共存させた状態でモノマーを重合させ、前記ラテックス粒子の表面に前記抗原又は抗体が導入されたラテックス粒子の懸濁液を含む、免疫学的分析試薬。
- [2] (1)分析対象化合物を含む可能性のある被検試料と、
(2)ラテックス粒子の合成反応において、前記分析対象物質に対する抗原又は抗体を共存させた状態でモノマーを重合させ、前記ラテックス粒子の表面に前記抗原又は抗体が導入されたラテックス粒子と
を液中で接触させる、免疫学的分析方法。
- [3] 前記接触の後、抗原抗体反応により生じたラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する、請求項2に記載の免疫学的分析方法。
- [4] 前記接触の後、前記液と前記ラテックス粒子とを分離し、前記ラテックス粒子に結合した分析対象物質、あるいは、前記液中に残存する分析対象物質を分析する、請求項2に記載の免疫学的分析方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/070190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i, G01N33/545(2006.01) i, G01N33/549(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)

G01N33/543, G01N33/545, G01N33/549

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 60-13145 B2 (Ingvar Gosta Holger Sjöholm), 05 April, 1985 (05.04.85), Page 2, right column, line 38 to page 3, left column, line 27; page 8, right column, lines 34 to 36 & DE 2546379 A1 & FR 2288104 A1 & FR 2288104 B1 & GB 1533579 A & IT 1049121 B & NL 7512160 A & SE 7412990 A & SE 7412992 A & SE 7412993 A & US 4061466 A	1-4
Y	JP 2004-333171 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 25 November, 2004 (25.11.04), Claims (Family: none)	1-4

☒ 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
07 November, 2007 (07.11.07)

Date of mailing of the international search report
04 December, 2007 (04.12.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/070190

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 8-15259 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 19 January, 1996 (19.01.96), Claims (Family: none)	1-4
Y	JP 8-20447 B2 (Genetic Systems Corp.), 04 March, 1996 (04.03.96), Page 17 to page 24 & AT 101724 T & CA 1247522 A1 & DE 142810 T1 & DE 3486275 T2 & DK 536784 A & EP 142810 A2 & EP 142810 A3 & EP 142810 B1 & GR 80912 A1 & MC 1637 A & US 4511478 A & US 4609707 A & US 4711840 A & US 4752638 A & US 4843010 A	1-4
P,X	Akihiro MIZUNO, "Miniemulsion Jugo ni yoru Protein o Tanji shita Kobunshi Latex Ryushi no Gosei", The Society of Polymer Science, Japan Nenji Taikai Yokoshu, 10 May, 2007 (10.05.07), Vol.56, No.1, Page.1003 2H14	1-4
A	Daisuke KOBAYASHI, "Cho'onpa Kansetsu Shoshaka ni okeru Styrene Nyuka Jugo", Kagaku Kogaku Ronbunshu, 20 January, 2006 (20.01.06), Vol.32, No.1, pages 88 to 92	1-4
A	Hiroshi SEKIGUCHI, "Miniemulsion Jugo ni yoru Kin Colloid Ryushi o Tanji shita Kobunshi Biryushi no Gosei", The Society of Polymer Science, Japan Nenji Taikai Yokoshu, 10 May, 2006 (10.05.06), Vol.55, No.1, Page.1153 2Pf070	1-4
P,A	JP 2007-155691 A (Summit Pharmaceuticals International Corp.), 21 June, 2007 (21.06.07), (Family: none)	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/543 (2006.01) i, G01N33/545 (2006.01) i, G01N33/549 (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. G01N33/543, G01N33/545, G01N33/549

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 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 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 (JDream2)

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
Y	JP 60-13145 B2 (イングヴァー・ギヨスタ・ホルゲル・シヨーホルム) 1985.04.05, 2 ページ右欄 3 8 行 ~ 3 ページ左欄 2 7 行、8 ページ右欄 3 4 行 ~ 3 6 行 & DE 2546379 A1 & FR 2288104 A1 & FR 2288104 B1 & GB 1533579 A & IT 1049121 B & NL 7512160 A & SE 7412990 A & SE 7412992 A & SE 7412993 A & US 4061466 A	1-4
Y	JP 2004-333171 A (森永乳業株式会社) 2004.11.25, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4

☒ 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

0 7 . 1 1 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

0 4 . 1 2 . 2 0 0 7

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)

三木 隆

2 J

3 3 1 2

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 請求の範囲の番号
Y	JP 8-15259 A (東亜医用電子株式会社) 1996. 01. 19, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4
Y	JP 8-20447 B2 (ジェネティック システムズ コーポレーション) 1996. 03. 04, 17 ページ ~ 24 ページ & AT 101724 T & CA 1247522 A1 & DE 142810 T1 & DE 3486275 T2 & DK 536784 A & EP 142810 A2 & EP 142810 A3 & EP 142810 B1 & GR 80912 A1 & MC 1637 A & US 4511478 A & US 4609707 A & US 4711840 A & US 4752638 A & US 4843010 A	1-4
PX	水野晃宏, ミニエマルション重合によるタンパク質を担持した高分子ラテックス粒子の合成, 高分子学会年次大会予稿集, 2007. 05. 10, Vol. 56, No. 1, Page. 1003 2H14	1-4
A	小林大祐, 超音波間接照射下におけるスチレン乳化重合, 化学工学論文集, 2006. 01. 20, Vol. 32, No. 1, Page. 88-92	1-4
A	関口紘司, ミニエマルション重合による金コロイド粒子を担持した高分子微粒子の合成, 高分子学会年次大会予稿集, 2006. 05. 10, Vol. 55, No. 1, Page. 1153 2Pf070	1-4
PA	JP 2007-155691 A (住商ファーマインターナショナル株式会社) 2007. 06. 21, (ファミリーなし)	1-4