

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6740083号  
(P6740083)

(45) 発行日 令和2年8月12日(2020.8.12)

(24) 登録日 令和2年7月28日(2020.7.28)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 B
GO 1 N 33/544 (2006.01)	GO 1 N 33/544 Z

請求項の数 8 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2016-208003 (P2016-208003)	(73) 特許権者 591122956 株式会社 L S I メディエンス 東京都千代田区内神田一丁目 1 3 番 4 号
(22) 出願日 平成28年10月24日 (2016.10.24)	
(65) 公開番号 特開2017-83440 (P2017-83440A)	(74) 代理人 100090251 弁理士 森田 憲一
(43) 公開日 平成29年5月18日 (2017.5.18)	
審査請求日 平成31年2月21日 (2019.2.21)	(74) 代理人 100139594 弁理士 山口 健次郎
(31) 優先権主張番号 特願2015-209063 (P2015-209063)	(72) 発明者 大西 侑士 東京都千代田区内神田一丁目 1 3 番 4 号 株式会社 L S I メディエンス内
(32) 優先日 平成27年10月23日 (2015.10.23)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(72) 発明者 野崎 順子 東京都千代田区内神田一丁目 1 3 番 4 号 株式会社 L S I メディエンス内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定試薬、測定方法及び測定範囲の拡大方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメントを固定化した不溶性担体を用いる、被検試料中の前記測定対象物質の免疫学的測定において、前記測定対象物質が D ダイマー又はフェリチンであり、 $0.19 \text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下で抗原抗体反応を行う、前記測定における測定範囲を拡大する方法。

【請求項 2】

測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメントを固定化した不溶性担体を用いる、被検試料中の前記測定対象物質の免疫学的測定において、前記測定対象物質が D ダイマー又はフェリチンであり、 $0.19 \text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下で抗原抗体反応を行う、前記測定における希釈直線性を改善する方法。

【請求項 3】

測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメントを固定化した不溶性担体を用いる、被検試料中の前記測定対象物質の免疫学的測定において、前記測定対象物質が D ダイマー又はフェリチンであり、 $0.19 \text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下で抗原抗体反応を行う、前記測定における検量線の形状と検体の希釈特性を近づける方法。

【請求項 4】

前記不溶性担体が、ラテックス粒子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記緩衝液が、H E P E S緩衝液、T r i s緩衝液、又はB i s - T r i s緩衝液から選ばれる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法に用いるための免疫学的測定試薬であって、測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメント、及び緩衝液を含み、前記緩衝液の濃度が、抗原抗体反応時の反応液中の濃度として  $0.19 \text{ mol/L}$  以上となる濃度である、前記免疫学的測定試薬。

【請求項 7】

前記不溶性担体が、ラテックス粒子である、請求項 6 に記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 8】

前記緩衝液が、H E P E S緩衝液、T r i s緩衝液、又はB i s - T r i s緩衝液から選ばれる、請求項 6 又は 7 に記載の免疫学的測定試薬。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学的測定方法、免疫学的測定試薬及び測定範囲の拡大方法に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床検査の分野では迅速かつ正確に測定を行うことが常に必要とされており、その要請に応じる形で、試薬組成や測定方法などについて、多くの改善努力がなされてきた。

20

臨床検査分野においては自動分析装置を使用することが多いが、高精度での測定という分析性能を左右する因子として、分析装置の性能と試薬の性能の両面からアプローチされる。特に複数の装置で使用されるような汎用性の高い測定試薬の場合には、その試薬性能として感度や特異性はもちろんのこと、試薬の安定性や測定範囲が十分に確保されていることが非常に重要である。

【0003】

特に、分析対象物質を定量的に測定する場合、臨床検査等の分野では、正確な測定が行える分析対象物質の濃度範囲を測定範囲として設定している。測定範囲を超える高値の検体であった場合、希釈して再検査を行う必要がある。このような高値検体の再検率を減らすことにより、報告時間の短縮やコストダウンが見込めるため、臨床現場では、測定範囲

30

【0004】

正確な測定とは、分析対象物質の濃度を高い信頼性で決定できることであり、評価する指標の一つとして、希釈試験が挙げられる。希釈試験は、被検試料の希釈系列を作製・測定し、横軸に希釈倍率を、縦軸に検量線から求めた測定値をとったグラフを描いた時に、原点を通る直線となることを確認する試験である。このグラフが直線とならない場合は、被検試料中に含まれる分析対象物質と標準品の反応性が異なっていることになり、検量線から求めた測定値の信頼性は低くなる。なお、上述のグラフを描く代わりに、被検試料の希釈系列を測定して得られた吸光度をプロットした曲線を検量線に重ね、その形状が一致していることを確かめることでも、希釈直線性を確認することができる。

40

【0005】

このような精度の高い測定が必要とされる試薬の一例として、Dダイマー測定試薬を例に説明する。Dダイマーとは、安定化フィブリン(cross-linked fibrin)のプラスミン分解産物(別称として、例えば、「D-Dダイマー」、「DD/E複合体」、「XD P」と総称されることがある)のことであり、最小単位であるDD/E(DD/Eモノマー)、並びにその高分子DD/E(DD/Eポリマー、例えば、DXD/YY、YXY/DX X D、DXXY/YXXDなど)を含み、深部静脈血栓症(DVT)の除外診断や、播種性血管内凝固症候群(DIC)の診断マーカーとして広汎に使用されている。

Dダイマーの測定方法としては、Dダイマーを認識するモノクローナル抗体を、ラテックス粒子、プラスチックプレートなどの固相に固定してDダイマーと結合させる抗原抗体

50

反応に基づく方法、すなわちラテックス凝集法やELISA法などが知られている。

【0006】

血中での存在形式が多様で分子量が不均一であるDダイマーを免疫学的に測定する場合、臨床検体に含まれるDダイマーと標準品に含まれるDダイマーでは含まれるDダイマーの分子量の分布が異なるため、臨床検体によっては希釈系列を測定して得られた吸光度をプロットした曲線の形状が、検量線の形状から乖離することがある。その傾向は高濃度領域であればあるほどより顕著に表れるため、検量線から乖離しない（希釈直線性が得られる）濃度範囲を測定範囲として設定しようと試みると、特に、測定上限が制限され、実用上問題であった。

【0007】

これまで、Dダイマーの測定において分析結果の正確性を向上するために、希釈用緩衝液にDモノマーを共存させる方法（特許文献1）や、血栓症患者の臨床挙動に合致したDダイマー測定用の標準物質（特許文献2）、Dダイマーに特異的な抗体（特許文献3）などが提案されている。しかし、依然として、被検試料中のDダイマーの反応性が検量線と一致する濃度範囲は限られており、低濃度域からより高濃度域まで、正確に測定可能なDダイマー測定試薬が望まれていた。また、このことはDダイマー測定試薬に限定された話ではなく、臨床検査で用いられる全ての試薬において求められるものである。

【0008】

ところで、非特異反応の抑制や感度の向上を目的として、反応液中の緩衝液濃度を検討したことが報告されている。特許文献4では、0.5 mol/Lまたは0.1 mol/LのHEPES、PIPES、又はMOPS緩衝液を凝集促進剤と共に用いた場合、0.1 mol/Lリン酸緩衝液を凝集促進剤と共に用いる場合と比較して、抗梅毒トレポネーマ抗体を含まない検体における非特異反応が抑制されることが開示されている。

一方、特許文献5では、0.05 mol/L又は0.1 mol/L（反応液中での濃度はそれぞれ0.04 mol/L又は0.08 mol/L）のMOPS、PIPES、又はHEPES緩衝液を用いた場合、高感度に標準梅毒トレポネーマ陽性血清を測定できるが、0.6 mol/L（反応液中での濃度は0.5 mol/L）の同緩衝液を用いた場合は、吸光度変化量の差が小さいため、感度の問題があることが開示されている。

しかし、これらの報告は、上記したような希釈直線性を改善して測定範囲を拡大することで正確な測定を達成できることを示唆するものはない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2001-21557号公報

【特許文献2】特開2006-234675号公報

【特許文献3】WO2011/125875号公報

【特許文献4】特開平8-278308号公報

【特許文献5】特開平9-101308号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

このような状況に鑑み、免疫学的測定において、低濃度域からより高濃度域まで、正確に測定することができる、免疫学的測定方法および測定試薬を提供することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、前記の問題点を解決すべく鋭意検討した結果、免疫学的測定において、免疫反応（抗原抗体反応）を行う反応液中の緩衝液濃度を0.19 mol/L以上にすることによって、被検試料の希釈直線性が良好となり、それにより測定範囲を拡大できることを見出し、本発明に至った。本発明はこの知見に基づいて、低濃度域からより高濃度域

10

20

30

40

50

まで正確な測定を行うための測定方法及び測定試薬を完成させたものである。

【0012】

すなわち、本発明は、

[1] 測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメント又は抗原を固定化した不溶性担体を用いる、被検試料中の前記測定対象物質を免疫学的に測定する方法において、 $0.19\text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下で抗原抗体反応を行う、測定方法、

[2] 前記不溶性担体が、ラテックス粒子である、[1]の測定方法、

[3] 前記緩衝液が、HEPES緩衝液、Tris緩衝液、又はBis-Tris緩衝液から選ばれる、[1]又は[2]の測定方法、

[4] 前記測定対象物質が、CRP、プロテインC、ヒアルロン酸、AFP( -フェト  
10  
プロテイン)、IgE、RF(リウマチ因子)、IRE(エラスターゼ1)、ASO(抗  
ストレプトリジンO)、アディポネクチン(ADN)、ATIII(アンチトロンピンIII)  
、 $2\text{ M}$ ( $2$  マイクログロブリン)、CEA(癌胎児性抗原)、第XIII因子(13  
因子、F13)、FDP(フィブリン・フィブリノゲン分解産物)、FRTN(フェリチ  
ン)、HCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)、HPL(ヒト胎盤性ラクトゲン)、tPA  
I(組織プラスミノゲンアクチベータ・プラスミノゲンアクチベータインヒビター1複  
合体)、Dダイマー、SF(可溶性フィブリン)、PPI(PIC、プラスミン・プラス  
ミンインヒビター複合体)、TAT(トロンビン・アンチトロンビン複合体)、Cys C  
(シスタチンC)、PSA(前立腺特異抗原)、PG(ペプシノゲンI・II)、ヘモグロ  
20  
ピン、Tf(尿中トランスフェリン、便中トランスフェリン)、尿中BTA(膀胱腫瘍抗  
原)、IRI(インスリン)、E2(エストラジオール、エストロゲン)、E3(エスト  
リオール)、MMP-3(マトリックスメタロプロティナーゼ-3)、Mb(ミオグロビ  
ン)、H-FABP(ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白)、L-FABP(尿中L型脂肪酸結  
合蛋白)、KL-6(シアル化糖鎖抗原)、RBP(レチノール結合蛋白)、IV型コラ  
ーゲン、HCV抗体、HBs抗原、HBe抗原・抗体、HBc抗体、HIV抗体、HTL  
V-1抗体である、[1]~[3]のいずれかに記載の測定方法、

[5] 測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメント又は抗原、及び緩衝液を含む  
、免疫学的測定試薬であって、前記緩衝液の濃度が、抗原抗体反応時の反応液中の濃度と  
して $0.19\text{ mol/L}$ 以上となる濃度である、免疫学的測定試薬、

[6] 前記測定対象物質が、CRP、プロテインC、ヒアルロン酸、AFP( -フェト  
30  
プロテイン)、IgE、RF(リウマチ因子)、IRE(エラスターゼ1)、ASO(抗  
ストレプトリジンO)、アディポネクチン(ADN)、ATIII(アンチトロンピンIII)  
、 $2\text{ M}$ ( $2$  マイクログロブリン)、CEA(癌胎児性抗原)、第XIII因子(13  
因子、F13)、FDP(フィブリン・フィブリノゲン分解産物)、FRTN(フェリチ  
ン)、HCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)、HPL(ヒト胎盤性ラクトゲン)、tPA  
I(組織プラスミノゲンアクチベータ・プラスミノゲンアクチベータインヒビター1複  
合体)、Dダイマー、SF(可溶性フィブリン)、PPI(PIC、プラスミン・プラス  
ミンインヒビター複合体)、TAT(トロンビン・アンチトロンビン複合体)、Cys C  
(シスタチンC)、PSA(前立腺特異抗原)、PG(ペプシノゲンI・II)、ヘモグロ  
40  
ピン、Tf(尿中トランスフェリン、便中トランスフェリン)、尿中BTA(膀胱腫瘍抗  
原)、IRI(インスリン)、E2(エストラジオール、エストロゲン)、E3(エスト  
リオール)、MMP-3(マトリックスメタロプロティナーゼ-3)、Mb(ミオグロビ  
ン)、H-FABP(ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白)、L-FABP(尿中L型脂肪酸結  
合蛋白)、KL-6(シアル化糖鎖抗原)、RBP(レチノール結合蛋白)、IV型コラ  
ーゲン、HCV抗体、HBs抗原、HBe抗原・抗体、HBc抗体、HIV抗体、HTL  
V-1抗体である、[5]の免疫学的測定試薬、

[7] 測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメント又は抗原を固定化した不溶性  
担体を用いる、免疫学的測定において、 $0.19\text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下  
で抗原抗体反応を行う、前記測定における測定範囲の拡大方法、

[8] 前記測定対象物質が、CRP、プロテインC、ヒアルロン酸、AFP( -フェト  
50

プロテイン)、I g E、R F (リウマチ因子)、I R E (エラスターゼ1)、A S O (抗ストレプトリジンO)、アディポネクチン(A D N)、A T I I I (アンチトロンピンI I I)、 $2 M$  ( $2$  マイクログロブリン)、C E A (癌胎児性抗原)、第X I I I 因子(13 因子、F 13)、F D P (フィブリン・フィブリノゲン分解産物)、F R T N (フェリチン)、H C G (ヒト絨毛性ゴナドトロピン)、H P L (ヒト胎盤性ラクトゲン)、t P A I (組織プラスミノゲンアクチベータ・プラスミノゲンアクチベータインヒビター1複合体)、Dダイマー、S F (可溶性フィブリン)、P P I (P I C、プラスミン・プラスミンインヒビター複合体)、T A T (トロンピン・アンチトロンピン複合体)、C y s C (シスタチンC)、P S A (前立腺特異抗原)、P G (ペプシノゲンI・II)、ヘモグロビン、T f (尿中トランスフェリン、便中トランスフェリン)、尿中B T A (膀胱腫瘍抗原)、I R I (インスリン)、E 2 (エストラジオール、エストロゲン)、E 3 (エストリオール)、M M P - 3 (マトリックスメタロプロティナーゼ-3)、M b (ミオグロビン)、H - F A B P (ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白)、L - F A B P (尿中L型脂肪酸結合蛋白)、K L - 6 (シアル化糖鎖抗原)、R B P (レチノール結合蛋白)、I V 型コラーゲン、H C V 抗体、H B s 抗原、H B e 抗原・抗体、H B c 抗体、H I V 抗体、H T L V - 1 抗体である、[ 7 ] の拡大方法に関する。

10

#### 【発明の効果】

##### 【0013】

本発明の測定方法を用いることにより、低濃度域の感度を維持したまま、より高濃度域まで高精度に測定することができる。また、本発明の測定試薬を用いることにより、被検試料の希釈直線性が向上し、より広い測定範囲で正確に測定することができる。

20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0014】

【図1】Dダイマー測定時において、抗原抗体反応時のH E P E S 緩衝液濃度が $0.05 \text{ mol/L}$ である場合における、検量線と検体希釈プロットとの関係を示すグラフである。

【図2】Dダイマー測定時において、抗原抗体反応時のH E P E S 緩衝液濃度が $0.2 \text{ mol/L}$ である場合における、検量線と検体希釈プロットとの関係を示すグラフである。

【図3】Dダイマー測定時において、抗原抗体反応時のH E P E S 緩衝液濃度が $0.5 \text{ mol/L}$ である場合における、検量線と検体希釈プロットとの関係を示すグラフである。

30

【図4】フェリチン測定時において、抗原抗体反応時の緩衝液濃度が $0.05 \text{ mol/L}$ である場合における、検量線と検体希釈プロットとの関係を示すグラフである。

【図5】抗原抗体反応時の緩衝液濃度が $0.5 \text{ mol/L}$ である場合における、検量線と検体希釈プロットとの関係を示すグラフである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0015】

本明細書における以下の項において、測定方法、測定試薬、測定範囲の拡大方法について実施の一態様としてDダイマー測定を例に記載するが、本発明はこの範囲に限定されるものではない。

40

また、本明細書において、単に「Dダイマー」と称する場合には、前記「Dダイマー」は、安定化フィブリン(特にヒト安定化フィブリン)のプラスミン分解産物であるDダイマーを意味し、D D / E モノマー及びD D / E ポリマーを含む。

##### 【0016】

#### (1) 測定項目

本発明は、抗体またはその抗体に由来するフラグメント(以下、併せて、単に抗体と称することがあります)、あるいは、抗原を不溶性担体に固定化した免疫学的反応を利用した測定方法、測定試薬において使用することができる。後述する不溶性担体に抗体若しくはそのフラグメント又は抗原を固定化して免疫学的反応を行うものであれば、本発明を利用して希釈直線性の改善、測定範囲の拡大ができるため、測定項目は特に限定されない。

50

特に、後述するように抗体を固定化するラテックス粒子の粒径が比較的大きい場合に好ましく用いることができる。

#### 【0017】

本発明を好ましく使用できる項目は特に限定されるものではないが、血中濃度が低い等の理由から高感度を求められる項目において、特に有用である。ここで高感度とは、例えば数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を意味し、前記感度が必要とされる高感度が求められる項目では、測定の際に粒径の大きなラテックス粒子を使用する可能性が高いことが想定されるため、本発明を好ましく使用することができる。

具体的測定項目としては、例えば、CRP、プロテインC、ヒアルロン酸、AFP（  
-フェトプロテイン）、IgE、RF（リウマチ因子）、IRE（エラストーゼ1）、ASO（抗ストレプトリジンO）、アディポネクチン（ADN）、ATIII（アンチトロン  
ピンIII）、 $\alpha_2\text{M}$ （ $\alpha_2$ マイクログロブリン）、CEA（癌胎児性抗原）、第XIII因  
子（13因子、F13）、FDP（フィブリン・フィブリノゲン分解産物）、FRTN（  
フェリチン）、HCG（ヒト絨毛性ゴナドトロピン）、HPL（ヒト胎盤性ラクトゲン）  
、tPAI（組織プラスミノゲンアクチベータ・プラスミノゲンアクチベータインヒビタ  
ー1複合体）、Dダイマー、SF（可溶性フィブリン）、PPI（PIC、プラスミン・  
プラスミンインヒビター複合体）、TAT（トロンピン・アンチトロンピン複合体）、C  
ys C（シスタチンC）、PSA（前立腺特異抗原）、PG（ペプシノゲンI・II）、  
ヘモグロビン、Tf（尿中トランスフェリン、便中トランスフェリン）、尿中BTA（膀  
胱腫瘍抗原）、IRI（インスリン）、E2（エストラジオール、エストロゲン）、E3  
（エストリオール）、MMP-3（マトリックスメタロプロティナーゼ-3）、Mb（ミ  
オグロビン）、H-FABP（ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白）、L-FABP（尿中L型  
脂肪酸結合蛋白）、KL-6（シアル化糖鎖抗原）、RBP（レチノール結合蛋白）、I  
V型コラーゲン、HCV抗体、HBs抗原、HBe抗原・抗体、HBc抗体、HIV抗体  
、HTLV-1抗体などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

#### 【0018】

##### (2) 抗体または抗原

本発明において使用することができる抗体または抗原は、前記測定項目において測定対  
象とする物質に対して特異的に反応する抗体であり、測定対象と結合する抗体である限り  
、特に限定されるものではない。また、RF等抗体を不溶性担体に固定化して自己抗体を  
検出する免疫学的反応を行うが、抗原として抗体を利用する場合も含むものとする。

特に、本発明において使用されるDダイマーに対する抗体としては、少なくともDダイ  
マーと結合する抗体である限り、特に限定されるものではなく、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')<sub>2</sub>、又は  
Fv等も使用可能である。これらのフラグメントは、公知の方法に従って前記抗体から得  
ることができる。

#### 【0019】

##### (3) 不溶性担体

本発明において使用される不溶性担体としては、粒子、例えば、有機高分子粒子、無機  
物質粒子、若しくは赤血球、又はプレート、例えば、ELISA用プレートなどが挙げら  
れる。有機高分子粒子としては例えば、不溶性アガロース、不溶性デキストラン、セルロ  
ース、ラテックス粒子が挙げられる。好適にはラテックス粒子を挙げることができ、ポリ  
スチレン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル(メタ)アクリレ  
ート共重合体、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル  
酸重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エス  
テル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどの粒子を挙げることができる。また、無  
機物質粒子としてはシリカ、アルミナなどが挙げられる。また粒子の平均粒径は、測定機  
器などによって適宜選択されるが、0.05~0.50 $\mu\text{m}$ のものが挙げられる。

#### 【0020】

10

20

30

40

50

特に、粒径の大きなラテックス粒子を、抗体又は抗原を固定化する担体として使用している測定試薬の場合、その凝集のしやすさに影響されて標準品の検量線が高濃度域では寝る傾向が見られ、測定レンジが狭まる傾向が見られる。そのため、本発明は特に比較的粒径の大きなラテックス粒子を使用した測定試薬において、特に有用である。ここで粒径が大きいとは、例えば、粒径0.1 μm以上のラテックスを担体として使用した測定試薬の場合が好ましく、0.2 μm以上がより好ましい。また、粒径の上限は、0.50 μmまでであれば適宜選択して使用することができる。

#### 【0021】

抗体若しくはそのフラグメント又は抗原を不溶性担体に固定化させる方法としては、任意の公知の方法で実施することができ、不溶性担体に抗体又は抗原を物理的又は化学的に結合させることにより固定化することができる。

10

#### 【0022】

##### (4) 緩衝液

本発明における緩衝液の濃度は、抗原抗体反応時に0.19 mol/L以上の濃度であればよく、好ましくは0.2 mol/L以上、より好ましくは0.3 mol/L以上、更に好ましくは0.4 mol/L以上、最も好ましくは0.5 mol/L以上あるいは0.7 mol/L以上であることができ、好ましくは0.3~1.0 mol/Lである。

#### 【0023】

本発明において使用される緩衝液としては、分析対象物質を失活させることがなく、かつ免疫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。具体的には、pH5~10、特にpH6~9に緩衝作用をもつものが好ましく、例えば、弱酸であるホウ酸、炭酸、リン酸、カルボン酸、等で調製される緩衝液やグッド緩衝液が挙げられ、カルボン酸をもつ化合物の例としてギ酸、酢酸、クエン酸、フタル酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、マレイン酸などがあり、グッド緩衝液ではMES、PIPES、ACES、BES、TES、HEPES、などが挙げられる。一方、弱塩基では1級または2級または3級アミン、等で調製される緩衝液やグッド緩衝液が挙げられ、アミンをもつ化合物としてはエタノールアミン、Tris、Bis-Tris、Bis-Tris-Propane、バルピタール、イミダゾール、などがあり、グッド緩衝液ではADA、アセトアミドグリシン、トリシン、グリシンアミド、ピシン、コラミン塩酸、などが挙げられる。また、両性の化合物も緩衝作用があり、アミノ酸から調製されるグリシン緩衝液や、アセトアミドグリシン緩衝液、BSAのようなタンパク質もまたカルボキシル基やアミノ基をもつため、使用する濃度を調整すれば本発明に利用することができる。さらに、カルボン酸のポリマー体やアミンのポリマー体も本発明に使用でき、具体的にはポリグルタミン酸やポリリジンで調製した緩衝液などが挙げられる。好ましくは、抗原抗体反応に好適な中性付近に緩衝能を持つACES、PIPES、BES、TES、HEPES、MOPS、Tris、Bis-Tris緩衝液であり、特に好ましくは、HEPES、MOPS、Tris又はBis-Trisである。

20

30

当業者であれば、被検試料の希釈直線性を確認することで、適宜、最適な緩衝液の濃度及び種類を選択することができる。

#### 【0024】

本発明では、抗原抗体反応時に、0.19 mol/L以上の濃度の緩衝液を存在させることができる限り、反応実施前の試薬の緩衝液濃度は特に限定されない。また、本発明では、必要に応じて、緩衝液に公知の成分を組み合わせることができ、増感剤、非特異反応抑制剤、安定化剤、界面活性剤、無機塩などを適宜添加することができる。

40

#### 【0025】

増感剤としては特に限定されず、ポリビニルピロリドン、ポリアニオン、ポリエチレングリコール、多糖類等を挙げることができる。

非特異反応抑制剤としては、動物血清や抗体、抗体断片等を挙げることができる。

安定化剤としては、アルブミン、スキムミルク、ゼラチン等のタンパク質や、アジ化ナトリウム、チメロサーム、ケーソンCG、プロクリン等の防腐剤を挙げることができる。

50

界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両性界面活性剤が挙げることができる。

被検試料中の塩濃度の影響を抑えることなどを目的とし無機塩を添加することができる。無機塩としては塩化ナトリウム、塩化カルシウム等を挙げることができる。

【0026】

(5) 被検試料

本発明により分析可能な被検試料としては、例えば、液状生体試料、例えば、血液、血漿、血清、または尿等を挙げることができる。

【0027】

(6) 免疫学的に測定する方法

免疫学的に測定する方法としては、少なくとも  $0.19 \text{ mol/L}$  以上の濃度の緩衝液の存在下で免疫反応を行うことを除けば、公知の免疫学的測定方法を使用することができる。具体的には凝集反応法、特にラテックス凝集反応法、又はELISA法が挙げられる。

【0028】

ラテックス凝集反応法では、抗体（又は抗原）を感作したラテックス粒子（以下、単に「抗体感作ラテックス粒子」ともいう）を用いる。抗体感作ラテックス粒子は、被検試料中に存在する測定対象物質と抗原抗体反応を起こし、凝集を生ずる。従って、前記抗体感作ラテックスの一定量と被検試料の一定量とを混合し、一定時間後の吸光度の増大を適当な波長で光学的に測定することにより、被検試料中の測定対象物質の量を定量することができる。

【0029】

さらに、既知濃度の測定対象物質（例えば、Dダイマー）含有溶液と被検試料の各々について生じた凝集の度合を光学的に観察し比較することで、被検試料中の測定対象物質濃度が測定され得る。Dダイマーを例にとると、まず既知濃度のDダイマー溶液を二濃度（Dダイマー濃度が  $0 \mu\text{g/mL}$  の溶液を含むのが好ましい）以上測定し、得られた光学密度変化量とDダイマー濃度の関係から検量線を作成する。次に被検試料を測定しその光学密度変化量から検量線を利用して濃度を求め、その値をDダイマー濃度とする。抗体感作ラテックス粒子の凝集の度合を光学的に検出する方法においては、測定は散乱光強度、吸光度または透過光強度を測定する光学機器で行う。測定波長は  $300 \sim 2400 \text{ nm}$ 、好ましくは  $300 \sim 1000 \text{ nm}$ 、より好ましくは  $300 \sim 800 \text{ nm}$  の範囲から適切な波長が選択される。測定方法については公知の方法に従い、用いる抗体感作ラテックス粒子の大きさあるいは濃度の選択、反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度または透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行われる。また、これらの方法を併用することも可能である。

【0030】

免疫反応の条件は公知の条件が採用されるが、反応時の温度は  $10 \sim 50$ 、特に  $20 \sim 40$  が好ましい。反応時間は適宜決定することができる。

【0031】

(7) 免疫学的測定試薬

免疫学的測定試薬としては、1試薬からなる試薬形態の他、第一試薬と第二試薬からなる2試薬系等の複数の試薬からなる試薬形態（すなわち、キット）であってもよい。1試薬系の試薬の場合は、被検試料と混合した際に  $0.19 \text{ mol/L}$  以上となる濃度の緩衝液に、抗体又は抗原を固定化した不溶性担体を含む試薬であればよく、複数の試薬からなる試薬形態の場合は、免疫反応が開始される溶液中での緩衝液濃度が  $0.19 \text{ mol/L}$  濃度以上となるように、各試薬の緩衝液濃度を決定すればよい。好ましくは測定精度の観点などから第一試薬と第二試薬からなる2試薬系がよく、以下に例示する。

【0032】

第一試薬は抗原抗体反応時の条件を整えるための緩衝液からなり、第二試薬は測定対象物質に対する抗体又は抗原を固定化した不溶性担体からなる。好ましい例としては、第一

10

20

30

40

50

試薬は緩衝液、増感剤、非特異反応抑制剤及び無機塩からなり、第二試薬は抗体（又は抗原）感作ラテックス粒子からなる試薬が挙げられる。

各試薬に用いる緩衝液は、第一試薬と第二試薬とで同一の緩衝液を用いてもよいし、第一試薬と第二試薬とで異なる種類の緩衝液を用いてもよい。また、第二試薬には緩衝液を用いず、第一試薬にのみ緩衝液を用いてもよい。なお2種類以上の緩衝液を併用する場合には、個々の緩衝液の濃度の総和が $0.19\text{ mol/L}$ 以上となればよい。

各試薬の緩衝液濃度は、被検試料と第一試薬および第二試薬とを混合した際に、緩衝液の濃度が $0.19\text{ mol/L}$ 以上の濃度となるように決定すればよい。各試薬の液量は、測定に用いる自動分析装置によっても変動するが、当業者であれば、被検試料および第一試薬、第二試薬との液量比から、反応液中の緩衝液濃度が $0.19\text{ mol/L}$ 以上となるように、適宜、各試薬の緩衝液濃度を設定することができる。例えば、被検試料と第一試薬、第二試薬の液量比が、 $1/20 \sim 1/10 : 1 \sim 2 : 1$ の場合、第一試薬の緩衝液濃度は $0.1 \sim 1\text{ mol/L}$ であり、第二試薬の緩衝液濃度は $0 \sim 0.4\text{ mol/L}$ であることが好ましい。

#### 【0033】

上記測定試薬を用いて測定する場合は、第一試薬と被検試料を反応セル中で混合した後、第二試薬を添加して抗体感作ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に測定する方法や、第一試薬と第二試薬を反応セル中で混合した後、被検試料を添加して抗体感作ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に測定する方法等が採用される。

#### 【0034】

##### (8) 測定範囲の拡大方法

本発明の測定における測定範囲の拡大方法は、測定対象物質に対する抗体若しくはそのフラグメント又は抗原を固定化した不溶性担体を用いて、被検試料中の測定対象物質の免疫学的測定において、 $0.19\text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下で免疫反応を行うことによるものである。 $0.19\text{ mol/L}$ 以上の濃度の緩衝液の存在下で免疫反応を行うことにより、測定対象物質の測定範囲が高濃度側に拡大し、低濃度の感度を維持したまま、より高濃度域の測定対象物質を正確に測定することができる。

なお、測定範囲の決定は、公知の方法により行うことができ、例えば、高濃度の被検試料の希釈系列を作製・測定し、希釈直線性が得られる範囲を測定範囲と設定する方法などが挙げられる。

当業者であれば、測定しようとする濃度範囲において、被検試料の希釈直線性を確認することで、適宜、最適な緩衝液の濃度や種類を選択することができる。

#### 【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：ラテックス凝集法によるDダイマー測定試薬の作製》

##### (1) 第一試薬の調製

濃度を、 $0.1\text{ mol/L}$ 、 $0.2\text{ mol/L}$ 、 $0.4\text{ mol/L}$ 、 $0.6\text{ mol/L}$ 、 $1\text{ mol/L}$ に調製したH E P E S緩衝液（pH7.2）にウシ血清アルブミン（BSA）を添加したものを、第一試薬とした。

#### 【0037】

##### (2) 第二試薬の調製

抗Dダイマー抗体をM E S緩衝液（pH6.0）に懸濁し、この抗体液にポリスチレンラテックス（J S R社）を添加して4 にて一晚攪拌した。上記混合物に、BSAを含むトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を添加し、4 にて30分間攪拌した後、遠心分離を実施した。得られた沈殿物を、防腐剤を含む水に懸濁し、抗Dダイマー抗体感作ポリスチレンラテックス液（第二試薬）を得た。

#### 【0038】

### (3) Dダイマー標準液の調製

Dダイマーの調製は、主にStephanie A.OlexaとAndrei Z.Budzynskiの方法(1978)、Circulation, Suppl. 58, 119, Olexa et al.の方法(1979)、及びBiochim. Biophys. Acta 576, 39~50に準じて行った。ヒトフィブリノーゲン(Enzyme Research Laboratories社)に、ウシトロンピン(持田製薬社)および塩化カルシウムを加え、37℃で2時間反応させフィブリノーゲンをフィブリンに変換させた。これを遠心分離し、フィブリンを非凝固性物質から分離した。フィブリンは塩化カルシウムを含むトリス塩酸緩衝液pH7.8に浮遊させた。37℃環境下で浮遊液にヒトプラスミン(Chromogenix社)を添加した。アプロチニン(Pentapharm.社)を加えて分解反応を停止させた後、リジンセファロースカラムを通過させプラスミンを除去した。この通過液は分子量の異なるDダイマーの混合物である。

10

#### 【0039】

次に塩化カルシウムを含むトリス塩酸緩衝液pH7.5(溶液A)で平衡化したセファクリルS-300(S-300)カラムに先に得られた通過液を、溶液Aで展開する分子ふるいクロマトグラフィーによって分画した。この分画をSDS-PAGEによる電気泳動法、ウェスタンブロット法によってDダイマー分画を同定、分離して、精製Dダイマーを得た。

得られた精製Dダイマーを、0、2、8、32、48、60µg/mLとなるように、BSAを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)にて調製し、Dダイマー標準液とした。

#### 【0040】

20

《実施例2：緩衝液濃度の違いによる被検試料の希釈直線性の確認》

#### (1) 測定方法

実施例1(3)で調製したDダイマー標準液7µLに、HEPES緩衝液の濃度が異なる第一試薬を120µL添加混合して37℃で約5分間保持した後、第二試薬を120µL添加して攪拌し、約10分間経過するまでの間の吸光度変化を波長700nmにて測定し、検量線を作成した。上記吸光度測定は、全自動分析機日立7170を用いて行った。

次に、前記標準液の代わりに、BSAを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)にて血漿検体を2倍、4倍、8倍希釈したものを測定し、上記で作成した検量線を用いて測定値(検量線より導き出した被検試料中のDダイマーの濃度)を得た。結果を表1に示す。

#### 【0041】

30

【表 1】

	0.05mol/L			0.1mol/L			0.2mol/L			0.3mol/L			0.5mol/L		
	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%
8/8	37.63	—	—	39.13	—	—	43.36	—	—	44.85	—	—	47.24	—	—
4/8	24.20	48.40	77.7%	24.16	48.32	81.0%	23.49	46.98	92.3%	23.74	47.48	94.5%	24.28	48.56	97.3%
2/8	12.02	48.08	78.3%	11.76	47.04	83.2%	11.53	46.12	94.0%	11.64	46.56	96.3%	12.11	48.44	97.5%
1/8	5.47	43.76	86.0%	5.43	43.44	90.1%	5.54	44.32	97.8%	5.59	44.72	100.3%	5.96	47.68	99.1%

10

20

30

40

【0042】

なお、表 1 において、抗原抗体反応時の H E P E S 緩衝液の濃度を 0 . 0 5 m o l / L

50

、0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.5 mol/Lと表示しているが、抗原抗体反応時の正確な緩衝液濃度は、それぞれ0.048 mol/L (= 0.1 mol/L × [120 μL / (120 μL + 7 μL + 120 μL)] )、0.097 mol/L、0.19 mol/L、0.29 mol/L、0.49 mol/Lである。

【0043】

測定値に希釈率を乗じて算出した計算値を、希釈前の測定値と比較したところ、HEPES緩衝液の濃度が高いほどその差は小さくなり、免疫反応時の緩衝液濃度を0.2 mol/L (正確には0.19 mol/L) 以上にするることによって、測定値と計算値の差が±10%以内となった。HEPES緩衝液の濃度を0.5 mol/Lとして測定した際に得られた47.24 μg/mLという数値は、希釈試験における測定値と計算値の差が、10  
いずれの希釈率においても5%以内であることから、実験に供した血漿検体のDダイマー濃度をほぼ正確に算出していると考えられる。一方、HEPES緩衝液の濃度を0.05 mol/Lとして測定した際に得られた37.63 μg/mLという数値は、希釈試験における測定値と計算値の差が、いずれの希釈率においても10%以上あることから、実験に供した血漿検体のDダイマー濃度を正確に算出していると考え難い。以上のことから、測定系で使用する緩衝液の濃度を高くすることで希釈直線性が改善し、得られる測定値自体も高く変化して正しく算出されることが観察された。

【0044】

さらに、検量線の形状と被検試料の希釈系列のプロットの形状を確認した。まず、8倍希釈した血漿検体の測定値に希釈率を乗じた計算値を原液理論値とした。原液理論値を各希釈倍率で割り、各希釈倍率における理論値を算出した(表2)。その理論値を横軸に、吸光度を縦軸にプロットした(図1(0.05 mol/L)、図2(0.2 mol/L)、図3(0.5 mol/L))ところ、緩衝液濃度が0.05 mol/Lの場合、理論値が5.47 μg/mL及び10.94 μg/mLでは検量線上にプロットされるが、21.88 μg/mLでは検量線よりも高値となり、43.76 μg/mLでは検量線よりも低値となった。緩衝液濃度が高いほど検量線との距離が小さくなり、0.2 mol/L (正確には0.19 mol/L) 以上の緩衝液濃度では、理論値で5.54から44.32 μg/mLのすべての点が検量線上にプロットされた。緩衝液の濃度を高くすることで、検量線の形状に血漿検体の希釈特性が近づき、希釈直線性が改善されていることが分かった。これにより、より高濃度域まで測定範囲を拡大することができた。 20  
30

【0045】

【表2】

	0.05mol/L	0.1mol/L	0.2mol/L	0.3mol/L	0.5mol/L
	理論値	理論値	理論値	理論値	理論値
8/8	43.76	43.44	44.32	44.72	47.76
4/8	21.88	21.72	22.16	22.36	23.88
2/8	10.94	10.86	11.08	11.18	11.94
1/8	5.47	5.43	5.54	5.59	5.97

【0046】

《実施例3：緩衝液の違いによる被検試料の希釈直線性の確認》

HEPES緩衝液の代わりにトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を用い、抗原抗体反応時のトリス塩酸緩衝液の濃度が正確に0.05 mol/L、0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.5 mol/Lとなるように、以下のように第一試薬および第二試薬を調製した。それ以外は、実施例2と同様に測定を行った。なお、評価に用いた被検試料は実施例2と異なる血漿検体を用いた。

【0047】

10

20

30

40

【表 3】

	第一試薬の緩衝液濃度	第二試薬の緩衝液濃度
0.05 mol/L	0.1 mol/L	0.003 mol/L
0.2 mol/L	0.1 mol/L	0.312 mol/L
0.5 mol/L	1 mol/L	0.029 mol/L
1 mol/L	1 mol/L	1.058 mol/L

【0048】

結果を表 4 に示す。免疫反応時の緩衝液濃度を 0.2 mol/L 以上にするによって、測定値と計算値の差が ± 10 % 以内となり、血漿検体の希釈直線性が改善できることが確認できた。

【0049】

10

【表 4】

	0.05mol/L			0.2mol/L			0.5mol/L			1mol/L		
	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%
8/8	39.30	—	—	41.60	—	—	43.70	—	—	43.98	—	—
1/8	5.47	43.79	89.7%	5.69	45.55	91.3%	5.58	44.67	97.8%	5.35	42.78	102.8%

10

20

30

## 【0050】

40

《実施例 4：フェリチン測定試薬及びフェリチン標準液の調製》

## (1) 第一試薬の調製

濃度を、 $0.1\text{ mol/L}$ 、 $1\text{ mol/L}$ 、 $2\text{ mol/L}$ に調製したトリス塩酸緩衝液にウシ血清アルブミン (BSA) を添加して、 $\text{pH} 8.5$ に合わせたものを第一試薬とした。

## 【0051】

## (2) 第二試薬の調製

抗フェリチン抗体を MOPS 緩衝液 ( $\text{pH} 7.1$ ) に懸濁し、この抗体液にポリスチレンラテックスを添加して 4 にて一晩攪拌した。上記混合物に、BSA を含むトリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH} 8.0$ ) を添加し、4 にて 30 分間攪拌した後、遠心分離を実施した。得

50

られた沈殿物を、防腐剤を含む水に懸濁し、抗フェリチン抗体感作ポリスチレンラテックス液（第二試薬）を得た。

【0052】

（3）フェリチン標準液の調製

精製フェリチン（ccbiotech社）を0、50、200、400、700、1000 ng / mLとなるように、BSAを含むトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）にて調製し、フェリチン標準液とした。

【0053】

《実施例5：緩衝液濃度の違いによる被検試料の希釈直線性の確認》

（1）測定方法

フェリチン標準液 11  $\mu$ L に、トリス塩酸緩衝液の濃度が異なる第一試薬を 90  $\mu$ L 添加混合して 37 で約 5 分間保持した後、第二試薬を 90  $\mu$ L 添加して攪拌し、約 10 分間経過するまでの間の吸光度変化を主波長 570 nm、副波長 800 nm にて測定し、検量線を作成した。上記吸光度測定は、全自動分析機日立 7180 を用いて行った。

次に、前記標準液の代わりに、生理食塩水にて血漿検体を 4 / 5 倍、2 / 5 倍、1 / 5 倍に希釈したものを測定し、上記で作成した検量線を用いて測定値（検量線より導き出した被検試料中のフェリチン濃度）を得た。結果を表 5 に示す。

【0054】

【表 5】

	0.05mol/L			0.5mol/L		
	測定値	計算値	%	測定値	計算値	%
5/5	454	—	—	472	—	—
4/5	361	452	99%	376	469	100%
2/5	195	488	107%	195	487	103%
1/5	105	527	116%	103	515	109%

なお、表 5 において、抗原抗体反応時のトリス塩酸緩衝液の濃度を 0.05 mol / L、0.5 mol / L と表示しているが、抗原抗体反応時の正確な緩衝液濃度は、それぞれ 0.047 mol / L (= 0.1 mol / L  $\times$  [ 90  $\mu$ L / ( 90  $\mu$ L + 11  $\mu$ L + 90  $\mu$ L ) ] )、0.47 mol / L である。

【0055】

測定値に希釈率を乗じて算出した計算値を、希釈前の測定値と比較したところ、トリス塩酸緩衝液の濃度が高いほどその差は小さくなり、免疫反応時の緩衝液濃度を高くすることによって、いずれの希釈率においても測定値と計算値の差が小さくなった。トリス塩酸緩衝液の濃度が低い程、測定値と計算値の差が大きくなり、実験に供した血漿検体のフェリチン濃度を正確に算出していると考え難い。以上のことから、測定系で使用する緩衝液の濃度を高くすることで希釈直線性が改善し、得られる測定値自体も高く変化して正しく算出されることが観察された。

【0056】

さらに、検量線の形状と被検試料の希釈系列のプロットの形状を確認した。まず、5 倍希釈した血漿検体の測定値に希釈率を乗じた計算値を原液理論値とした。原液理論値を各希釈倍率で割り、各希釈倍率における理論値を算出した。その理論値を横軸に、吸光度を縦軸にプロットした（図 4（0.05 mol / L）、図 5（0.5 mol / L））ところ、緩衝液濃度が 0.05 mol / L の場合、理論値が 105 ng / mL 及び 195 ng / mL では検量線上にプロットされるが、361 ng / mL 以上では検量線から外れる結果となった。一方で、緩衝液濃度が高いほど検量線との距離が小さい結果となった。例えば、緩衝液濃度が 0.5 mol / L（正確には 0.47 mol / L）の場合には、理論値で 105 から 454 ng / mL のすべての点が検量線上にプロットされた。

また、上記検体とは別検体を使用して 1.0 mol / L（0.94 mol / L）の緩衝

10

20

30

40

50

液を使用して測定した場合においても、検量線の形状に検体の希釈特性が近付き、希釈直線性が改善される傾向が観察された。

【 0 0 5 7 】

以上より、緩衝液の濃度を高くすることで、検量線の形状に血漿検体の希釈特性が近づき、希釈直線性が改善されていることが分かった。これにより、より高濃度域まで測定範囲を拡大することができた。

【産業上の利用可能性】

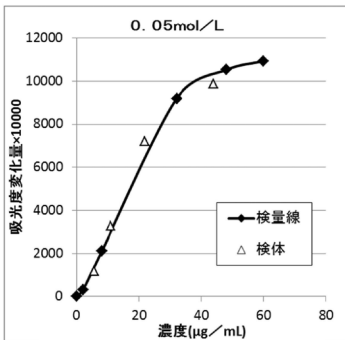
【 0 0 5 8 】

本発明の測定を用いることにより、広い測定範囲で正確に測定することが可能となる。特に、Dダイマーのような凝固線溶分野における検査試薬においては、深部静脈血栓症（DVT）の除外診断や播種性血管内凝固症候群（DIC）の診断に有用である。また、フェリチン測定試薬においては、貧血、リンパ腫、肝炎、リウマチ、腎疾患等の各種疾患の病態把握等において有用である。

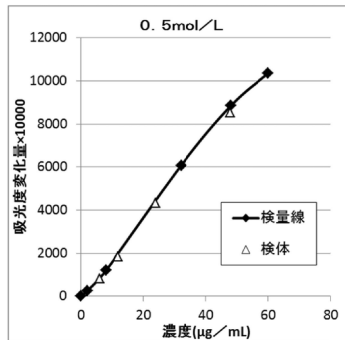
10

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。

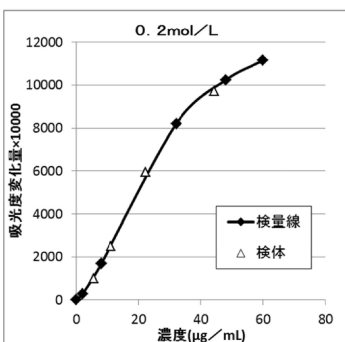
【 図 1 】



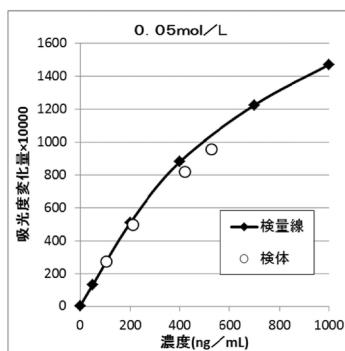
【 図 3 】



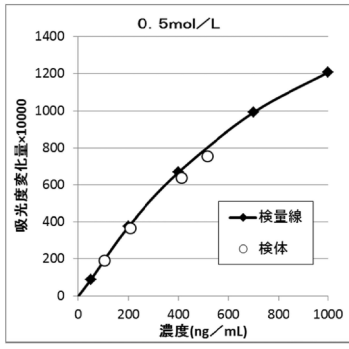
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 田代 茂  
東京都千代田区内神田一丁目13番4号 株式会社LSIメディエンス内
- (72)発明者 長濱 裕  
東京都千代田区内神田一丁目13番4号 株式会社LSIメディエンス内
- (72)発明者 櫻井 錠治  
東京都千代田区内神田一丁目13番4号 株式会社LSIメディエンス内

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 国際公開第2014/157723(WO, A1)  
中国特許出願公開第103777023(CN, A)  
国際公開第2004/086040(WO, A1)  
特開2013-125005(JP, A)  
国際公開第2016/136918(WO, A1)  
特開2006-234676(JP, A)  
特開平10-115615(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98