



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/543, 33/542</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/60401</p> <p>(43) 国際公開日 1999年11月25日(25.11.99)</p>												
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02442</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月12日(12.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/133995</td> <td>1998年5月15日(15.05.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/366818</td> <td>1998年12月24日(24.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/366819</td> <td>1998年12月24日(24.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/366820</td> <td>1998年12月24日(24.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒530-8565 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>横井正之(YOKOI, Masayuki)[JP/JP] 〒525-0031 滋賀県草津市若竹町3-7 Shiga, (JP)</p> <p>赤峰隆之(AKAMINE, Takayuki)[JP/JP] 〒569-0095 大阪府高槻市八丁西町3-19 Osaka, (JP)</p> <p>吉川勝己(YOSHIKAWA, Katsumi)[JP/JP] 〒573-0018 大阪府枚方市桜ヶ丘町45-2-403 Osaka, (JP)</p>		特願平10/133995	1998年5月15日(15.05.98)	JP	特願平10/366818	1998年12月24日(24.12.98)	JP	特願平10/366819	1998年12月24日(24.12.98)	JP	特願平10/366820	1998年12月24日(24.12.98)	JP	<p>(74) 代理人 宮崎主税, 外(MIYAZAKI, Chikara et al.) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町1丁目6番5号 西村ビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/133995	1998年5月15日(15.05.98)	JP												
特願平10/366818	1998年12月24日(24.12.98)	JP												
特願平10/366819	1998年12月24日(24.12.98)	JP												
特願平10/366820	1998年12月24日(24.12.98)	JP												
<p>(54)Title: IMMUNOASSAY REAGENTS AND IMMUNOASSAY METHOD</p> <p>(54)発明の名称 免疫測定試薬および免疫測定法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Immunoassay reagents by which an ultramicro constituent (for example, an antigen or an antibody) contained in a specimen can be assayed at a high sensitivity without requiring any operation for separating, for example, immunologically reacted components from unreacted ones, or while simplifying such an operation. These immunoassay reagents aim at quantitating an antigen or an antibody to be assayed in a specimen and contain an insoluble support carrying an antibody or an antigen against the above-mentioned antigen or antibody and an enzyme, an enzyme inhibitor inhibiting the activity of the above enzyme, and a substrate of the above enzyme.</p>														

(57)要約

試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定でき、免疫反応等により反応した成分と未反応成分との分離が必要でない、あるいはこのような分離を簡便化し得る、免疫測定試薬を得る。

試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であり、抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、上記酵素の基質とを含む免疫測定試薬。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE ギルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CC 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YC ユーゴスラビア
CCU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

## 免疫測定試薬および免疫測定法

## 5 技術分野

本発明は、不溶性担体を利用する免疫測定試薬および免疫測定法、特に、測定対象物質を高感度で測定可能な免疫測定試薬および免疫測定法に関する。

## 10 背景技術

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的な方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

免疫測定法としては、免疫比濁法（T I A法）、ラテックス比濁法（L I A法）、酵素免疫測定法（E I A法）、放射免疫測定法（R I A法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、T I A法やL I A法が使用されている。T I A法やL I A法では、測定される生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質（C R P）、抗ストレプトリジン-O抗体（A S O）、フィブリン分解産物（F D P）などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数 n g / m L 以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、

E I A法やR I A法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、 $\alpha$ フェトプロテイン（A F P）に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数 n g / m L 以下の場合に用いられる。

- 5 更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、E I A法やR I A法などが益々利用されてきている。しかしながら、T I A法やL I A法では測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置（以下、汎用自動分析装置）へ適用可能であるのに比べて、E I A法やR I A法では反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や放射
- 10 放射性同位元素の種類が多岐にわたる。従って、E I A法やR I A法は、特定の自動分析装置（以下、専用自動分析装置）においてのみ用いられることが多く、R I A法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種々の問題がある。

- 近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できる方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、L I A法やE I A法の変法または改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、L I A法やE I A法などでは従来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。
- 15

- 20 測定法自体の精度を上げる手法としては、L I A法の不溶性担体を着色する方法（特開平1-214760号公報）、E I A法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法（特開平5-34346号公報）などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平3-167475号公報に提案される方法
- 25 がある。

しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置

への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、E I A法やR I A法に代表される微量成分の測定法では、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なることによる。さらに、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法では、B / F分離と呼ばれる操作（Bは免疫反応等により結合した成分、Fは未反応の成分）が必ず必要であるため、B / F分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B / F分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

10 最近、特開平5-249112号公報、特開平7-179495号公報などにみられるように、B / F分離の不必要な測定法も提案、開発されている。しかしながら、感度不足や、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置にしか適用できないなどの問題がある。

15 一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声大きい。

20 以上のように、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザーの強い要望があるにもかかわらず、B / F分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

25 また、臨床現場では一つの生体試料より複数の項目を測定することが多く、そのため一つの生体試料を繰り返し違う方法で測定することが多々あり、測定時間がその分長くかかったり、測定者が生体試料に触れる機会が多くなり感染の危険があるという問題があった。

## 発明の要約

本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消し、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定することができ、B/F分離を必要としないか、あるいはB/F分離を簡便化して、簡便に上記超微量成分を測定することを可能とする免疫測定試薬および免疫測定法を提供することにある。

本願の第1の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a)上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、(b)上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、(c)上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第1の発明の特定の局面では、上記不溶性担体を含む第1の試薬と、上記酵素阻害剤及び上記基質を含む第2の試薬とが用意される。

本願の第2の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a)上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とが担持された不溶性担体と、(b)上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、(c)上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第2の発明に係る免疫測定試薬の特定の局面では、上記不溶性担体を含む第1の試薬と、上記酵素を含む第2の試薬と、上記基質を含む第3の試薬とが用意される。

第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、好ましくは、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有される。

また、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、上記抗体または抗原、酵素阻害剤及び酵素の組み合わせが複数用いられ、それによって複数種の抗原または抗体の量を測定することができる。

本願の第 3 の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a) 酵素阻害剤と化学結合された上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と、(b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、(c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第 3 の発明の特定の局面では、免疫測定試薬は、上記酵素阻害剤と化学結合された抗体または抗原を含む第 1 の試薬と、上記酵素を含む第 2 の試薬と、上記基質を含む第 3 の試薬からなる。

第 1 ～第 3 の発明に係る免疫測定試薬のある特定の局面では、上記酵素阻害剤として、酵素に対する抗体が用いられ、より特定の局面では、モノクローナル抗体が用いられる。

本願の第 4 の発明は、第 1, 第 2 または第 3 の発明に係る免疫測定試薬を用いた免疫測定法である。この免疫測定法では、測定対象物質である抗原または抗体を含む試料と、第 1, 第 2 または第 3 の発明に係る免疫測定試薬とが混合され、その結果、抗原抗体反応による凝集反応と酵素反応とが引き起こされる。そして、引き起こされたこれらの反応の度合いを測定することにより、抗原または抗体の量が測定される。

#### 発明の詳細な説明

第 1 の発明では、免疫測定試薬は、(a) 抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、(b) 酵素阻害剤と、(c) 基質とを含む。使用に際して、これらの成分を予め混合しておくこと、酵素と基質との反応が先に進んでしまったり、酵素阻害剤により酵素の活性が失われるおそれがある。そこで、通常、上記不溶性担体 (a) を含む第 1 の試薬と、酵素阻害剤及び基質を含む第 2 の試薬とに分けて用意される。

生体試料中の測定対象物質である抗原または抗体に対する抗体または

抗原と酵素とを担持させた不溶性担体を含む第1試薬と、上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤（以下、酵素阻害剤という）と上記酵素の基質を含む第2試薬とを、上記測定対象物質が含まれている生体試料と混合すると、以下の第1、第2の反応が進行する。第1の反応は、生体試料中の抗原または抗体と不溶性担体に担持された抗体または抗原との抗原抗体反応である。この第1の反応の原理はL I A法の原理と同じであり、第1の反応により、不溶性担体の凝集が起これ、濁度が上昇し吸光度変化が生じる。一方、第2の反応は酵素と基質とによる反応であり、この反応の原理はE I A法の検出と同じであり、基質が変化することにより、吸光度変化が生じる。

第1の反応と第2の反応は互いに独立してかつほぼ同時に起きるため、吸光度変化量はL I A法の場合に比べて大きくなり、生体試料中の微量成分の測定が可能となる。しかしながら、第1の反応では、生体試料中に含まれる抗原または抗体の量に依存して吸光度が変化するが、第2の反応は、酵素と基質の反応であるため、生体試料中に含まれる抗原または抗体の量に依存した反応ではない。

そこで、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、酵素阻害剤を該反応系に添加すれば、第2の反応が生体試料中の抗原または抗体の量に依存するようになることを見出した。酵素阻害剤は、酵素に結合されると、酵素の活性を失活または減少させる。生体試料中に抗原または抗体が含まれていない時は、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、酵素阻害剤が不溶性担体上の酵素に結合して酵素を失活させ、第2の反応による吸光度変化を生じさせない。これに対して、生体試料中に抗原または抗体が含まれると、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、凝集に関与している不溶性担体上の酵素と酵素阻害剤との結合が、凝集塊の立体障害のために起こりにくくなる。従って、酵

素が失活せず、基質と反応し、吸光度変化が生じる。

このようにして、酵素阻害剤を該反応系に添加することにより、第2の反応も生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応とすることができる。このように、第1の発明の免疫測定法では、第1の反応と第2  
5の反応が共に、生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応となるため、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離を必要としないか、簡易なB/F分離を得るだけでよい。

第2の発明においては、抗体または抗原と、酵素阻害剤とが担持された不溶性担体(a)、酵素(b)及び基質(c)を含む免疫測定試薬が  
10用いられるが、これらの成分を予め混合しておくこと、第1の発明の場合と同様に、酵素と基質との反応が進んだり、酵素が失活したりする。

従って、通常、第2の発明に係る免疫測定試薬では、不溶性担体を含む第1の試薬と、酵素を含む第2の試薬と、基質を含む第3の試薬とが  
15用意される。この場合、第1の試薬と上記測定対象物質が含まれている生体試料とを混合すると、生体試料中の抗原または抗体と不溶性担体に担持された抗体または抗原との抗原抗体反応(第1の反応)が起こり、不溶性担体の凝集が生じる。次に、第2の試薬を添加すると、第2の試薬中の酵素と不溶性担体に担持された酵素阻害剤との反応(第2の反  
20応)が起こるが、第2の反応は生体試料中の抗原または抗体の量に依存する。酵素阻害剤が酵素と反応すると、酵素活性を失活または減少させるが、生体試料中に抗原または抗体が含まれていない時は、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、不溶性担体上の酵素阻害剤が酵素と反応して酵素を失活させる。従って、第3の試薬を添加しても、第2の反応による吸光度変化は生じない。

25 これに対して、生体試料中に抗原または抗体が含まれていると、その含有量に応じて、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、

凝集に関与している不溶性担体上の酵素阻害剤と酵素との反応は、凝集塊の立体障害のため起こりにくくなる。従って、酵素がほとんど失活しないので、第3の試薬を添加すると、酵素が基質と反応し、吸光度変化を生ずる。

5       このようにして、酵素阻害剤を不溶性担体に担持させることにより、第2の反応も生体試料中の抗原または抗体の量に依存させることができるようになる。このように、第2の発明の免疫測定試薬および免疫測定法においても、第1の反応と第2の反応が共に、生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応となる。

10       また、上記のようにして、第1の発明の場合と同様に、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離が不要か、または簡便な免疫測定試薬および免疫測定法が得られる。

      また、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、不溶性担体中に磁性物質または可磁化物質が含有されていてもよい。不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されているものを用いると、反応が全て  
15       終わった後、反応容器下部から可磁化物質または磁石で不溶性担体を吸い寄せることにより、溶液と不溶性担体を分離することができる。このようにすれば、不溶性担体の濁度上昇の影響を受けることなく、溶液の発色程度のみを測定することができる。

20       さらに、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、上記抗体または抗原、酵素及び酵素阻害剤の組み合わせが複数種用いられてもよい。その場合には、複数種の抗原または抗体の量を測定することができる。

      加えて、上記のように、不溶性担体中に磁性物質または可磁化物質が含有されており、上記のように抗体または抗原、酵素及び酵素阻害剤の  
25       組み合わせが複数種用いられる場合には、不溶性担体の凝集による濁度上昇の変化に影響されず、それぞれの酵素の発色のみを測定することが

できるので、2種類以上の抗原または抗体の測定を一度に行うことができる。

5           なお、第1、第2の発明においては、免疫測定試薬を構成するにあたり、上記第1、第2の試薬あるいは第1～第3の試薬を組み合わせた形態とする必要は必ずしもない。すなわち、第1の発明に係る免疫測定試薬においては、試料と混合する際に、上記不溶性担体（a）、酵素阻害剤（b）及び基質（c）を一度に混合し、直ちに測定すべき試料とを混合してもよい。同様に、第2の発明においても、免疫測定試薬を構成する各成分を混合し直ちに測定試料と混合してもよい。このように、条件  
10           を整えれば、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬は、必ずしも、上述したように第1、第2の試薬あるいは第1～第3の試薬に分けて用意する必要はない。

          第3の発明に係る免疫測定試薬では、酵素阻害剤と抗体または抗原が化学結合されている。ここでは、まず第1の反応として、酵素阻害剤と  
15           化学結合されており、かつ生体試料中の測定対象物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原（以下、コンジュゲートという）と上記試料とが混合されることにより、上記抗体または抗原と試料中の抗原または抗体が反応することにより凝集反応が起こる。この凝集反応の結果、立体障害またはコンジュゲート中の酵素阻害剤のコンフォメーション変  
20           化が起こることにより、酵素阻害剤が失活し、酵素阻害作用が弱まる。すなわち、酵素阻害作用は抗原抗体反応の凝集の度合いに応じて弱くなる。

          次に、第2の反応として、酵素阻害剤はその活性に応じて、酵素の働きを阻害するので、系中に存在する酵素はその酵素阻害剤の活性に応じて失活する。  
25

          最後に、第3の反応として、酵素と基質の反応により発色するので、

その度合いを測定することにより、酵素の失活の度合いを知ることができる。すなわち、最終的に基質により酵素活性を測定することにより、凝集の度合いを検出することができる。

5 以上を要約すると、測定対象物質とコンジュゲートが抗原抗体反応を起こして凝集することにより、コンジュゲート中の酵素阻害剤の酵素阻害作用が弱まる。しかる後、凝集の度合いを反映して該酵素阻害剤の作用により酵素が失活するので、系中の酵素の活性を基質を添加することにより測定すれば、系中の測定対象物質の測定を行うことができる。

10 このように、本発明の免疫測定試薬および免疫測定法は、第1、第2、第3の反応が共に、生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応となるため、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離の必要がない新規な免疫測定試薬および免疫測定法となる。

15 なお、上記説明における第1～第3の反応は説明のために3段階に分けたが、実際の測定に用いられる試薬は3種類に分けておく必要はなく、適当な条件を選ぶことにより、適宜組み合わせで1又は2種類としてもよいし、あるいは、3種類以上としてもよい。

20 第1～第3の発明により測定される測定対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型、C型）由来抗原または抗体；HIV抗原または抗体；梅毒由来抗原または抗体； $\alpha$ -フェトプロテインに代表される癌マーカー；インシュリンに代表されるホルモン；オータコイドなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

25 また、第1、第2の発明において用いられる上記不溶性担体としては、例えば、有機高分子粉末、微生物、血球および細胞膜片等が挙げられる。有機高分子粉末としては、例えば、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉末；ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸（塩）共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、

- 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、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などの合成高分子粉末などが挙げられる。特に、合成高分子粉末を均一に懸濁させたラテックスが好ましい。上記不溶性担体は、その使用目的・
- 5 用途などにより異なるが、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基などを導入した不溶性担体も適宜使用可能である。上記ラテックスを用いる場合、そのラテックス粒子の粒径は、 $0.05 \sim 1.5 \mu\text{m}$ が好ましく、 $0.1 \sim 0.6 \mu\text{m}$ がより好ましい。
- 10 また、第1、第2の発明において、上記不溶性担体に磁性物質または可磁化物質を含有させる場合、磁性物質としてはフェライトなどを挙げることができ、可磁化物質としては酸化鉄などを挙げることができる。この可磁化物質が含有された不溶性担体の具体的な例としては、例えば、ベリタス社製、商品名：ダイナビーズを挙げることができる。
- 15 第1～第3の発明に係る免疫測定試薬において用いられる上記酵素としては、基質と反応して吸光度変化を生じるものであれば特に限定されない。例えば、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。酵素には、天然物から得られたもの、遺伝子工学的手法により得られたもの
- 20 などあるが、いずれも使用可能である。通常は、天然物から得られたものを使用すればよい。
- また、上記酵素を測定に使用する際は、適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、
- 25 使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。酵素の使用時の濃度としては、 $0.001 \sim 10 \text{ IU/mL}$ が好ましいが、使用する

酵素の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

次に、第1～第3の発明に係る免疫測定試薬で用いられる上記基質としては、使用する酵素と反応して吸光度変化を生じるものが用いられる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合は基質として過酸化水素水にN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリンを加えたもの、または、過酸化水素水にo-フェニレンジアミンやピロガロールを加えたもの、酵素としてアルカリフォスファターゼを使用する場合は基質としてp-ニトロフェニルリン酸、酵素としてβ-ガラクトシダーゼを使用する場合は基質としてo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドなどが挙げられるが、特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

上記の基質は、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。測定に使用する際は適当な緩衝液などに溶解・希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。基質の使用時の濃度としては、0.1～1000mMが好ましいが、使用する基質の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

また、第1～第3の発明に係る免疫測定試薬で用いられる酵素阻害剤としては、使用する酵素と結合して酵素活性を失活させるものであれば、特に、限定されず、例えば、ペプチド、抗体、フッ素化合物、イオウ化合物など、使用する酵素によりそれに対応した酵素阻害剤を用いる。

酵素阻害剤として、酵素に対する抗体（以下、抗酵素抗体という）を用いる場合は、抗体種としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく、また、製造方法についても、公知の方法のいずれでもよい。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、山羊、めん羊などの

動物に、使用する酵素を免疫して産生させればよい。モノクローナル抗体についても公知の方法を用いて得ることができる。

5 このようにして得られた抗体については公知のクロマトグラフィーなどによって適宜精製してもよいし、場合によっては特別の精製をせずに用いてもよい。また、測定に使用する際は適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G o o d緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。

10 酵素阻害剤の使用時の濃度としては、0.01～10 mg/mLが好ましいが、使用する酵素阻害剤の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

第1の発明で用いる、抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とを担持させた不溶性担体（a）を製造する方法について説明する。

15 不溶性担体への抗体または抗原及び酵素の結合方法は、使用する抗体または抗原及び酵素の種類により異なるが、通常、以下に示す方法で行う。抗体または抗原を含む溶液と酵素を含む溶液を同時に、または、順次、不溶性担体の懸濁液に添加し攪拌すると、物理的吸着により抗体または抗原と酵素とが不溶性担体に結合する。

20 また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されている不溶性担体については、適当な架橋剤を添加することにより、抗体または抗原と酵素を不溶性担体に結合させることができる。この場合、架橋剤で架橋できるように、抗体または抗原と酵素を修飾する必要がある。物理的に吸着させるか、架橋剤により結合させるかは、使用する抗体または抗原と酵素の物性や構造を考慮に入れ、適宜選択すればよい。

25 上記結合反応時のpHは3～10、温度は2～50℃が好ましい。pHがこの範囲をはずれると、抗体または抗原がタンパク質であるため変

性してしまうなどの問題がある。また、温度については、2℃未満であれば反応速度が遅く、所望の感度を有するものが得にくくなり、50℃を超えると、抗体または抗原が変性してしまうなどの問題がある。

5 なお、第2の発明では、第1の発明における不溶性担体(a)の調製に際し、酵素の代わりに酵素阻害剤を固定すればよい。

また、第3の発明に係る免疫測定試薬では、酵素阻害剤が抗体または抗原に化学結合されるが、このような酵素阻害剤と化学結合されている抗体または抗原の製造方法は、以下のとおりである。

10 測定対象物質である抗原に対する抗体または同じく測定対象物質である抗体に対する抗原と酵素阻害剤の化学結合方法は、使用する抗体または抗原および酵素阻害剤の種類により異なるが、公知の方法の中から適宜最適の方法を選択すればよい。例えば、カルボキシル基をクロル炭酸エチルまたはクロル炭酸ブチルと反応させ、活性を有する混合酸無水物に誘導し、相手方のアミノ基に反応させてアミド結合を形成する混合酸  
15 無水物法；カルボキシル基をカルボジイミド型縮合剤を使用して、活性エステル型に変えてから、相手方のアミノ基に反応させる活性エステル法；グルタルアルデヒドを用いる方法；過ヨウ素酸を用いる方法などが挙げられる。使用する抗体または抗原と酵素阻害剤の結合比率は、酵素阻害剤にポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用する場合  
20 は、(抗体または抗原)：(酵素阻害剤) = 20：1～1：1が好ましく、より好ましくは10：1～1：1、より好ましくは5：1～1：1である。

本発明に係る免疫測定方法では、第1～第3の発明に係る免疫測定試薬と、抗原または抗体を含む測定試料とが混合され、抗原抗体反応による凝集反応と酵素反応とが引き起こされる。そして、これらの反応の度  
25 合いを測定することにより、抗原または抗体の量が測定される。

ここで、上記反応の度合いを測定する方法については、特に限定されるわけではないが、通常、反応生成物の光学的性質を検出する方法が通常用いられる。光学的検出方法としては、最も汎用される吸光などによる色調変化の検出の他に、蛍光、化学発光、生物発光などが挙げられる。

5 光学的測定方法も波長測定の外、時間分解蛍光法なども挙げられるが特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

上記測定波長の一例を挙げると、250～1000 nm程度の波長を用いることができる。また、この測定法において、抗原抗体反応および酵素反応の条件は通常の場合と同様であり、反応媒体としては、各種緩衝液が用いられる。この緩衝液は、生体試料中の抗原または抗体を失活させることなく、かつ、抗原抗体反応および酵素反応を阻害しないようなイオン強度及びpHを有するものであればよい。例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液などが使用される。反応温度は、10～50℃、特に20～40℃が好ましい。

10

15

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1によって得られた検量線であり、縦軸は600 nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. / ml）を示す。

20 図2は、実施例2によって得られた検量線であり、縦軸は600 nmまたは420 nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. / ml）またはCRP濃度（mg / dl）を示す。

#### 実施例の説明

25 （実施例1）

##### （1）免疫測定試薬の調製

ポリスチレンラテックス（粒径0.4 $\mu$ m、積水化学工業社製）の0.02重量%リン酸緩衝液（pH5.0、50mM）分散液を25℃で保持したもの1mlに、抗ヒトHBs抗原ヤギ抗体の1mg/mlリン酸緩衝液（pH5.0、50mM）溶液の50 $\mu$ l、および、西洋ワサビペルオキシダーゼの1mg/mlリン酸緩衝液（pH5.0、50mM）溶液の50 $\mu$ lを添加し、25℃で1時間攪拌した。

次に、15000rpmで15分間、遠心分離を行い、上清を除き、沈殿物をリン酸緩衝液（pH5.0、50mM）1mlに分散させ第1試薬とした。

次に、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体の0.4mg/ml溶液の1ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンの1mg/ml溶液の1ml、2mMの4-アミノアンチピリン溶液の1ml、および、10mMの過酸化水素溶液の1.2mlをリン酸緩衝液（pH7.0、50mM）10mlに溶解し、第2試薬とした。

すなわち、本実施例の免疫測定試薬は、上記第1試薬と第2試薬とからなる。

(2) 次いで、この免疫測定試薬を用いて、標準HBs抗原による検量線を作成し、次いでHBs抗原陽性血清を検体として、その中のHBs抗原力価を測定した。

#### (2-1) 標準HBs抗原

HBs抗原を0, 10, 25, 50, 75, 100 I. U. /ml濃度で含むヒト血清を標準品として使用した。

#### (2-2) 検量線の作成

日立自動分析装置7150型を用いて測定した。上記(2-1)項の標準HBs抗原液20 $\mu$ lと上記第1試薬120 $\mu$ lとを混合し、37

℃で10分保持した後、上記第2試薬120 $\mu$ lを添加し、その後、1分および10分後に吸光度を波長600nmで測定した。この差を吸光度変化とした。標準HBs抗原力価と吸光度変化の関係の検量線を図1に示した。図1において、縦軸は600nmにおける吸光度変化量を、

5 横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. /ml）を示す。

(2-3) HBs抗原陽性血清の測定

(2-2) 検量線の作成の項における標準HBs抗原液20 $\mu$ lの代わりに、HBs抗原陽性血清20 $\mu$ lを用いたことの他は、(2-2)項と同様にして吸光度変化を求めた。得られた吸光度変化量を上記検量線にあてはめて、HBs抗原陽性血清中のHBs抗原力価を求めた。なお、HBs抗原陽性血清としては、6検体（検体名称A, B, C, D, E, F）について測定し、それぞれの血清について繰り返し回数5を行い、

10 平均値とその変動係数（CV）（%）求めた。結果を表1に示した。

表 1

15

患者名	血清中のHBs抗原力価 (I. U. /ml)	変動係数 (%)
A	8.5	7
B	6.3	8
C	8.9	8
D	10.5	4
E	5.4	9
F	3.2	9

20

25

表1の結果より、本発明の免疫測定法を用いると、10 I. U. /ml以下の微量な力価の血清も測定可能であることが分かる。

(実施例2)

## (1) 免疫測定試薬の調製

可磁化粒子 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 含有ポリスチレンラテックス (粒径  $0.4 \mu\text{m}$ 、ベリタス社製) の  $0.02$  重量%リン酸緩衝液 ( $\text{pH} 5.0$ 、 $50 \text{mM}$ ) 分散液を  $25^\circ\text{C}$  で保持したもの  $1 \text{ml}$  中に、抗ヒトHBs抗原  
5 ヤギ抗体  $0.05 \text{mg}$ 、および、西洋ワサビペルオキシダーゼ  $0.05 \text{mg}$  を添加し、 $25^\circ\text{C}$  で1時間攪拌した。

次に、 $15000 \text{rpm}$  で15分間、遠心分離を行い、上清を除き、  
沈殿物をリン酸緩衝液 ( $\text{pH} 5.0$ 、 $50 \text{mM}$ )  $1 \text{ml}$  に分散させ試薬  
Aとした。

10 可磁化粒子 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 含有ポリスチレンラテックス (粒径  $0.4 \mu\text{m}$ 、ベリタス社製) の  $0.02$  重量%リン酸緩衝液 ( $\text{pH} 5.0$ 、 $50 \text{mM}$ ) 分散液を  $25^\circ\text{C}$  で保持したもの  $1 \text{ml}$  中に、抗ヒトCRPヤギ  
抗体  $0.05 \text{mg}$ 、および、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ  $0.75 \text{mg}$  を添加  
し、 $25^\circ\text{C}$  で1時間攪拌した。

15 次に、 $15000 \text{rpm}$  で15分間、遠心分離を行い、上清を除き、  
沈殿物をリン酸緩衝液 ( $\text{pH} 5.0$ 、 $50 \text{mM}$ )  $1 \text{ml}$  に分散させ試薬  
Bとした。

上記試薬A及び試薬Bを1:1の比率で混合し、第1試薬とした。

次に、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体の  $0.4 \text{mg}$   
20  $\text{g/ml}$  溶液の  $1 \text{ml}$ 、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スル  
ホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンの  $1 \text{mg/ml}$  溶液の  $1 \text{ml}$ 、  
 $2 \text{mM}$  の4-アミノアンチピリン溶液の  $1 \text{ml}$ 、および、 $10 \text{mM}$   
の過酸化水素溶液の  $1.2 \text{ml}$  をリン酸緩衝液 ( $\text{pH} 7.0$ 、 $50 \text{mM}$ )  
 $10 \text{ml}$  に溶解し、試薬Cとした。

25 次に、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体の  $0.4 \text{mg/ml}$   
 $1 \text{ml}$ 、 $o$ -ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド  $0.$

1 gをリン酸緩衝液（pH 7.0、50 mM）10 mlに溶解し、試薬Dとした。

上記試薬C及び試薬Dを1：1の比率で混合し、第2試薬とした。

すなわち、本実施例の免疫測定試薬は、上記第1試薬と第2試薬とからなる。

（2）次いで、この免疫測定試薬を用いて、標準HBs抗原および標準CRPの両方を含むヒト血清検体を用いて測定し、標準HBs抗原および標準CRPによる検量線を作成し、次いでHBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清を検体として、その中のHBs抗原力価およびCRP濃度を測定した。

（2-1）標準HBs抗原および標準CRPの両方を含むヒト血清検体

HBs抗原を0 I. U. /ml、かつ、標準CRPを0 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を10 I. U. /ml、かつ、標準CRPを1 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を25 I. U. /ml、かつ、標準CRPを2.5 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を50 I. U. /ml、かつ、標準CRPを5 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を75 I. U. /ml、かつ、標準CRPを7.5 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を100 I. U. /ml、かつ、標準CRPを10 mg/dl含む血清検体を標準品として使用した。

（2-2）検量線の作成

日立分光光度計U3200型を用いて測定した。上記（2-1）項の標準HBs抗原および標準CRPの両方を含むヒト血清検体20  $\mu$ lと上記第1試薬120  $\mu$ lとを混合し、37℃で10分保持した後、上記第2試薬120  $\mu$ lを添加し、その10分後に、磁石を用いて不溶性担体を反応容器底部に引きつけ、上清の溶液の吸光度を600 nmと42

0 nmで測定した。

得られた測定値について、吸光度600 nmのものについては、標準HBs抗原を含有するそれぞれの血清で得られた値から、標準HBs抗原濃度0 I. U. /mlの血清で得られた値を差し引いて、吸光度変化値とした。

得られた測定値について、吸光度420 nmのものについては、標準CRPを含有するそれぞれの血清で得られた値から、標準CRP濃度0 mg/dlの血清で得られた値を差し引いて、吸光度変化値とした。

標準HBs抗原力価と吸光度変化の関係、および、標準CRPと吸光度変化の関係の検量線を図2に示した。図2において、縦軸は600 nmまたは420 nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価(I. U. /ml)またはCRP濃度(mg/dl)を示す。

(2-3) HBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清の測定

(2-2) 検量線の作成の項における標準HBs抗原および標準CRPの両方を含むヒト血清検体20 μlの代わりに、HBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清20 μlを用いたことの他は、(2-2)項と同様にして吸光度変化を求めた。得られた吸光度変化量を上記検量線にあてはめて、HBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清中のHBs抗原力価およびCRP濃度を求めた。なお、HBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清としては、6検体(検体名称A, B, C, D, E, F)について測定し、それぞれの血清について繰り返し回数5で行い、平均値とその変動係数(CV)(%)求めた。結果を表2および表3に示した。

表 2

5

10

患者名	血清中のHBs抗原力価 (I. U. /m l)	変動係数 (%)
A	8. 5	7
B	6. 3	8
C	8. 9	8
D	10. 5	4
E	5. 4	9
F	3. 2	9

表 3

15

20

患者名	CRP濃度 (m g / d l)	変動係数 (%)
A	0. 8	10
B	2	8
C	1	4
D	0. 5	14
E	0. 4	14
F	0. 2	18

表2及び表3の結果より、本発明の免疫測定法を用いると、HBs抗原力価が10 I. U. /m l以下の微量な力価の血清も、微量なCRP抗原濃度と同時に測定可能であることが分かる。

25 (実施例3)

(1) 試薬および材料

ラテックス：10% (W/V) ポリスチレンラテックス (粒径0. 4

μm、積水化学工業社製)

ラテックス希釈用緩衝液：50 mMの第1リン酸ナトリウムと50 mMの第2リン酸ナトリウムをpH 6.5となるように混合したもの

5 C型肝炎ウイルスコア抗原 (p 22) : 酵母菌で発現させた recombinant C型肝炎ウイルスコア抗原 (オーストラル・バイオロジカルズ社製) 抗原希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液に同じ

抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体：腹水から硫酸沈殿によりイムノグロブリン分画にまで精製した抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体

10 抗体希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液に同じ

酵素液 (R 3 液) : 西洋ワサビペルオキシダーゼ (257 U/mL、東洋紡社製) を上記ラテックス希釈用緩衝液にて0.3 U/mLに希釈したもの

15 基質液 (R 4 液) : 10 mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン (同仁化学社製) 8 μL、4 mM 4-アミノアンチピリン (和光純薬社製) 40 μL、12 mM過酸化水素水 (三徳化学社製) 3 μLを混合して使用した。

20 ブロッキング用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液にウシ血清アルブミン (Fraction V、Miles Corp. 社製) を1% (W/V) になるように、またNaN<sub>3</sub> を0.1% (W/V) になるように添加したもの。

検体希釈用希釈液 (R 1 液) : ブロッキング用緩衝液に、ポリエチレングリコール6000 (平均分子量7500、和光純薬社製) を1% (W/V) になるように添加したもの。

25 C型肝炎ウイルス検体：C型肝炎ウイルス陽性患者血清 (INTERGEN社製)

## (2) ラテックス試薬の調製

ポリスチレンラテックス1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3% (W/V) ラテックス液を得た。C型肝炎ウイルスコア抗原および抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体は、タンパク濃度が800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにそれぞれ抗原または抗体希釈用緩衝液で希釈し、抗原液および抗体液とした。

上記3.3% (W/V) ラテックス液300  $\mu\text{L}$ を25°Cのインキュベータ中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗原液および抗体液それぞれ100  $\mu\text{L}$ ずつを素早く添加し、25°Cにて1時間攪拌した。

次に、ブロッキング用緩衝液を0.5 mL添加し、25°Cにて続けて1時間攪拌した。次に、この混合液を15°C、18000 rpmで20分間、遠心分離を行った。得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、上記と同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬を得た。これを4°Cで保存した。

## (3) C型肝炎ウイルス検体の測定方法

上記のラテックス試薬 (C型肝炎ウイルスコア抗原という抗原と、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体という酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体)、酵素液および基質液からなる本発明の免疫測定試薬を用い、生化学用自動分析装置7170型 (日立製作所社製) を用いて以下のようにして、C型肝炎ウイルス検体の測定を行った。

上記(2)で得られた固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬をそのままR2液とした。測定条件は以下の通りである。

検体容量	20 $\mu\text{L}$
------	------------------

	検体希釈用希釈液 (R 1 液)	1 8 0 $\mu$ L
	ラテックス試薬 (R 2 液)	2 0 $\mu$ L
	酵素液 (R 3 液)	2 0 $\mu$ L
	基質液 (R 4 液)	2 0 $\mu$ L
5	測定波長	6 0 0 n m
	測定温度	3 7 $^{\circ}$ C

試薬の投入順序は、上記自動分析装置のセルに入れた検体に R 1 液を投入し、1 分後に R 2 液、その 4 分後に R 3 液、その 5 分後に R 4 液を投入する。基質液 (R 4 液) を添加してから、約 7 5 秒後の吸光度と約  
 10 7 3 0 秒後の吸光度の吸光度の差 ( $\Delta OD 6 0 0 n m$ ) を測定し、この吸光度の差を 1 0 0 0 0 倍したものを吸光度変化量とした。

#### (4) 測定結果

C 型肝炎ウイルス陽性患者血清 5 検体 (それぞれ検体名称を検体イ、  
 口, ハ, ニ, ホとする) を検体とし、2 段階希釈によって  $2^{10}$  倍まで希  
 15 釈したサンプルを用意した。上記 (3) の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、カットオフ値 (吸光度変化量の 4 0) 以上のものを +、カットオフ値未満のものを - とした。これらの測定結果を表 4 に示した。

#### (比較例 1)

20 (1) 試薬および材料

実施例 3 の「(1) 試薬および材料」と同様である。

#### (2) ラテックス試薬の調製

実施例 3 の「(2) ラテックス試薬の調製」においては、ポリスチレンラテックスに、C 型肝炎ウイルスコア抗原および抗西洋ワサビペルオ  
 25 キシダーゼモノクローナル抗体を担持させたが、比較例 1 では抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体を使用しなかったことの他は、

実施例 3 の「(2) ラテックス試薬の調製」と同様に操作し、C 型肝炎ウイルスコア抗原のみが担持されたラテックス試薬を調製した。

### (3) C 型肝炎ウイルス検体の測定方法

上記のラテックス試薬を用い、生化学用自動分析装置 7 1 7 0 型（日立製作所社製）を用いて以下のようにして、C 型肝炎ウイルス検体の測定を行った。

上記(2) で得られた固形分 0. 2 5 % (W/V) のラテックス試薬をそのまま R 2 液とした。測定条件は以下の通りである。

	検体容量	2 0 $\mu$ L
10	検体希釈用希釈液 (R 1 液)	2 1 0 $\mu$ L
	ラテックス試薬 (R 2 液)	3 0 $\mu$ L
	測定波長	7 0 0 nm
	測定温度	3 7 $^{\circ}$ C

試薬の投入順序は、上記自動分析装置のセルに入れた検体に R 1 液を投入し、5 分後に R 2 液を投入する。ラテックス試薬 (R 2 液) を添加してから、約 5.5 秒後の吸光度と約 300 秒後の吸光度の吸光度の差 ( $\Delta OD 700 \text{ nm}$ ) を測定し、この吸光度の差を 10000 倍したものを吸光度変化量とした。

### (4) 測定結果

実施例 3 で用いたものと同様の C 型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、2 段階希釈によって  $2^{10}$  倍まで希釈したサンプルを用意した。上記(3) の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、カットオフ値 (吸光度変化量の 80) 以上のものを +、カットオフ値未満のものを - とした。これらの測定結果を表 4 に示した。

### 25 (比較例 2)

#### (1) 試薬および測定方法

C型肝炎ウイルス抗体測定用E I Aキットとして、市販のE I Aキット（H C V ・ E I A II、ダイナボット社製）を用い、検体中の抗体量をキット添付の操作法に従って測定した。

（2）測定結果

- 5 実施例3で用いたものと同様のC型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、2段階希釈によって $2^{10}$ 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記（2）の測定方法に従って、各サンプルの吸光度を測定し、カットオフ値（キットに付属の陽性、陰性コントロールの吸光度から算出）以上のものを+、カットオフ値未満のものを-とした。これらの測定結果を
- 10 表4に示した。

15

20

25

表 4

			希 積 倍 率							
			2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>
5	イ	実施例 3	+	+	+	+	+	+	+	-
		比較例 1	+	+	+	+	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	+	+	-
10	ロ	実施例 3	+	+	+	+	+	+	-	-
		比較例 1	+	+	+	-	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	+	+	-
15	ハ	実施例 3	+	+	+	+	-	-	-	-
		比較例 1	+	-	-	-	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	-	-	-	-
20	ニ	実施例 3	+	+	+	+	+	+	+	-
		比較例 1	+	+	+	-	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	+	-	-
25	ホ	実施例 3	+	+	+	+	+	-	-	-
		比較例 1	+	+	-	-	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	-	-	-

表 4 から明らかなように、本発明の免疫測定試薬による測定結果（実施例 3）は、市販の E I A 法による測定結果（比較例 2）と同等であったが、従来のラテックス試薬による測定結果（比較例 1）とは、低濃度域および高濃度域のいずれにおいても一致しなかった。

（実施例 4）

（1）試薬および材料

以下に示すもの以外は、実施例3の「(1) 試薬および材料」に同じ。

可磁化物質含有ラテックス：可磁化物質 ( $Fe_2O_3$ ) 含有、10% (W/V) ポリスチレンラテックス (粒径  $0.4 \mu m$ 、ベリタス社製)

5 抗ヒトHBs抗体：山羊の抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製した山羊抗ヒトHBs抗体

抗ヒトCRP抗体：山羊の抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製した山羊抗ヒトCRP抗体

10 抗 $\beta$ ガラクトシダーゼモノクローナル抗体：腹水から硫酸沈殿によりイムノグロブリン分画にまで精製した抗 $\beta$ ガラクトシダーゼモノクローナル抗体

15 酵素液 (R3液)：西洋ワサビペルオキシダーゼ ( $257 U/mL$ 、東洋紡社製) を前記ラテックス希釈用緩衝液にて  $0.3 U/mL$  に希釈したものと、 $\beta$ ガラクトシダーゼ ( $500 U/mL$ 、東洋紡社製) を前記ラテックス希釈用緩衝液にて  $0.3 U/mL$  に希釈したものとを 1:1 で混合したもの

20 基質液 (R4液)：10 mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン (同仁化学社製)  $8 \mu L$ 、4 mM 4-アミノアンチピリン (和光純薬社製)  $40 \mu L$ 、12 mM 過酸化水素水 (三徳化学社製)  $3 \mu L$  を混合した溶液に、o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を 1% (W/V) 濃度となるように混合したもの

25 HBs標準品：ヒトプール血清から精製されたHBs標準品 ( $1000 I.U./mL$ 、 $1.7 \mu g/mL$ ) を生理食塩水にて 400、200、100、50、10 I.U./mL にそれぞれ希釈して使用した。また、HBs標準品を含まない生理食塩水のみのもものを  $0 I.U./mL$  として用いた。

CRP標準品：ヒトプール血清から精製されたCRP標準品（デンカ生研社製）40、20、10、5、1 mg/dLを使用した。また、CRP標準品を含まない生理食塩水のみのもものを0 mg/dLとして用いた。

5 反応停止液：リン酸一ナトリウム100 mM水溶液

### (2) ラテックス試薬の調製

可磁化物質含有ポリスチレンラテックス1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3% (W/V) ラテックス液を得た。抗ヒトHBs抗体、抗ヒトCRP抗体、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体および抗βガラクトシダーゼモノクローナル抗体は、タンパク濃度が1600 μg/mLになるようにそれぞれ抗体希釈用緩衝液で  
10 希釈し抗体液とした。

上記3.3% (W/V) ラテックス液300 μLを25℃のインキュベータ中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗体液  
15 それぞれ100 μLずつを素早く添加し、25℃にて1時間攪拌した。

次に、ブロッキング用緩衝液を0.5 mL添加し、25℃にて続けて1時間攪拌した。次に、この混合液を15℃、18000 rpmで20分間、遠心分離を行った。得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、上記と同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。  
20 洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬を得た。これを4℃で保存した。

### (3) ヒトHBs、ヒトCRP検体の測定方法

上記のラテックス試薬（抗ヒトHBs抗体および抗ヒトCRP抗体と  
25 いう抗体と、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体および抗βガラクトシダーゼモノクローナル抗体という酵素阻害剤とを担持さ

せた不溶性担体)、酵素液および基質液からなる本発明の免疫測定試薬を用い、分光光度計装置U-3200型(日立製作所社製)を用いて以下のようにして、ヒトH B s、ヒトC R P検体の測定を行った。

上記(2)で得られた固形分0.25%(W/V)のラテックス試薬をそのままR2液とした。測定条件は以下の通りである。

#### 1 検体当たりの試薬投入量

	検体容量	1 mL
	検体希釈用希釈液(R1液)	1.8 mL
	ラテックス試薬(R2液)	0.2 mL
10	酵素液(R3液)	0.2 mL
	基質液(R4液)	0.2 mL
	反応停止液	2 mL
	測定波長	600 nmおよび420 nm
	測定温度	37℃

15 試薬の投入順序は、検体容器に入れた検体にR1液を投入し、3分後にR2液、その10分後にR3液、その10分後にR4液、その10分後に反応停止液を投入する。反応停止液を投入してから、検体容器下部から磁石を用いて可磁化物質含有ラテックス粒子を吸い寄せ、検体容器下部に沈殿させる。しかる後、上清の吸光度を600 nmおよび420

20 nmで測定した。

得られた測定値について、吸光度600 nmのものについては、検体として以下に示すH B s標準品を含む標準品検体を用いて得られた値から、検体として生理食塩水のみを用いて得られた値を差し引いて吸光度変化量とした。

25 得られた測定値について、吸光度420 nmのものについては、検体として以下に示すC R P標準品を含む標準品検体を用いて得られた値か

ら、検体として生理食塩水のみを用いて得られた値を差し引いて吸光度変化量とした。

#### (4) 測定結果

5 試薬および材料の項に示したHBs標準品およびCRP標準品を用いて、HBs標準品およびCRP標準品の両方を含む以下の標準品検体を調製した。

10 HBs標準品を0IU/mL、かつ、CRP標準品を0mg/dL含むもの（すなわち、生理食塩水のみもの）；HBs標準品を10IU/mL、かつ、CRP標準品を1mg/dL含むもの；HBs標準品を50IU/mL、かつ、CRP標準品を5mg/dL含むもの；HBs標準品を100IU/mL、かつ、CRP標準品を10mg/dL含むもの；HBs標準品を200IU/mL、かつ、CRP標準品を20mg/dL含むもの。

15 HBs標準品およびCRP標準品の両方を含む標準品検体を検体として、上記(3)に従って、各濃度のそれぞれの標準品検体の吸光度変化量を測定した。得られた吸光度変化量(600nm)とHBs標準品濃度(IU/mL)との関係、および、吸光度変化量(420nm)とCRP標準品濃度(mg/dL)との関係を表5に示した。

表 5

20

HBs標準品濃度 (IU/mL)	10	50	100	200
吸光度変化 (600nm)	0.118	0.601	1.211	2.434
CRP標準品濃度 (mg/dL)	1	5	10	20
吸光度変化 (420nm)	0.101	0.214	1.041	2.112

25

表5の結果より検量線を作成した。

次いで、3種類の血清検体（検体名称としてA、B、Cとする）を用いて、上記（3）に従って、それぞれの血清検体の吸光度変化量を測定した。得られた吸光度変化量を上記の検量線にあてはめて、血清検体中のHBs濃度およびCRP濃度を求め、結果を表6に示した。

5

表 6

10

検体	HBs濃度 (IU/mL)	CRP濃度 (mg/dL)
A	2.4	1.2
B	5.8	2.3
C	13.3	4.1

この結果から、本実施例による測定試薬および測定方法は、汎用性が高く、簡便に同時多項目測定が可能なものであることが確認できた。

15

(実施例5)

## (1) 試薬作製

20

抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体（ウサギ由来ポリクローナル抗体）IgG 1mg/mL（水溶液）の1mLに、SMCC（N-サクシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-1-カルボキシレート）4mg/mL（ジメチルホルムアミド溶液）の20 $\mu$ Lを加えて、30 $^{\circ}$ Cで10分間攪拌し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体とSMCCを結合させた。

25

次いで、上記溶液に0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）を加えて全量10mLとなるまで希釈し、この溶液をファルマシア社製、PD-10カラムでゲル濾過し、最初の3mLを捨て、次の1.5mLを分取し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体とSMCC結合体（マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体）を取り出した。

次に、上記マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体画分1.5mL

1 に、0.1 mg の HCV (C 型肝炎ウイルス) C-100 抗原タンパクを添加し、30℃で60分間攪拌し、HCV C-100 抗原タンパクと抗β-ガラクトシダーゼ抗体コンジュゲートを生成し、試薬1とした。

5 次に、β-ガラクトシダーゼを1 mg/mlとなるように、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを10 ml 調製し試薬2とした。

更に、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド (ONPG) を、0.1 重量%の濃度となるように、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを10 ml 調製し試薬3とした。

10 即ち、本発明の免疫測定試薬は、上記試薬1 (酵素阻害剤である抗β-ガラクトシダーゼ抗体と化学結合した抗原)、試薬2 (上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素) および試薬3 (上記酵素の基質) とからなるものである。

15 (2) 測定

C型肝炎患者の検体A, B, C、および標準血清0, 1, 2, 4, 8, 16 COI (CUT OFF INDEX) を検体とし、検体100 μl に試薬1を100 μl 加え、37℃で10分放置し、その後、試薬2を200 μl 加え、37℃で10分放置し、さらに、試薬3を1000 μl 加えて37℃で10分放置した。その後、420 nmの吸光度を測定し、標準血清で得られた吸光度値と標準血清のCOIとから検量線を作成し、検体A, B, Cで得られた吸光度値を上記検量線にあてはめて、検体A, B, CのCOIを求めた。その結果、検体Aは8 COI、検体Bは4 COI、検体Cは5 COIであった。

25 (実施例6)

(1) 試薬作製

抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体 IgG 1 mg/ml (水溶液) の 1 ml に、SMCC 4 mg/ml (ジメチルホルムアミド溶液) の 20  $\mu$ l を加えて、30°C で 10 分間攪拌し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体と SMCC を結合させた。

- 5 次いで、上記溶液に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて全量 10 ml となるまで希釈し、この溶液をファルマシア社製、PD-10 カラムでゲル濾過し、最初の 3 ml を捨て、次の 1.5 ml を分取し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体と SMCC 結合体 (マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体) を取り出した。

- 10 次に、上記マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体画分 1.5 ml に、0.1 mg の HCV (C 型肝炎ウイルス) C-100 抗原タンパクを添加し、30°C で 60 分間攪拌し、HCV C-100 抗原タンパクと抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体コンジュゲートを生成し、試薬 1 とした。

- 15 次に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを 1 mg/ml となるように、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを 10 ml 調製し試薬 2 とした。

- 20 更に、*o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを、0.1 重量% の濃度となるように、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを 10 ml 調製し試薬 3 とした。

即ち、本発明の免疫測定試薬は、上記試薬 1 (酵素阻害剤である抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体と化学結合した抗原)、試薬 2 (上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素) および試薬 3 (上記酵素の基質) とからなるものである。

- 25 (2) 測定

C 型肝炎患者の検体 D, E, F、および標準血清 0, 1, 2, 4, 8,

16 COI (CUT OFF INDEX) を検体とし、検体 100  
μl に試薬 1 を 100 μl 加え、37℃で10分放置し、その後、試薬  
2 を 200 μl 加え、37℃で10分放置し、さらに、試薬 3 を 100  
0 μl 加えて 37℃で10分放置した。その後、420 nm の吸光度を  
5 測定し、標準血清で得られた吸光度値と標準血清の COI とから検量線  
を作成し、検体 D, E, F で得られた吸光度値を上記検量線にあてはめ  
て、検体 D, E, F の COI を求めた。その結果、検体 D は 2 COI、  
検体 E は 1.5 COI、検体 F は 9 COI であった。

## 10 発明の効果

本願の第 1 の発明に係る免疫測定試薬では、上記 (a) 抗体または抗  
原と酵素とが担持された不溶性担体、(b) 酵素阻害剤、及び (c) 基  
質を含むので、該免疫測定試薬を試料と混合し、抗原抗体反応による不  
溶性担体の凝集反応と酵素反応とを引き起し、生じたこれらの反応の度  
15 合いを測定することにより、試料中の抗原または抗体などの超微量成分  
を高感度で測定することができる。また、B/F 分離を必要としないの  
で、測定を簡便に行うことができる。

同様に、第 2 の発明に係る免疫測定試薬においても、(a) 抗体また  
は抗原と酵素阻害剤とが担持された不溶性担体と、(b) 酵素と、(  
20 c) 基質とを含むので、試料と混合し、抗原抗体反応による不溶性担体  
の凝集反応と酵素反応とを引き起し、これらの反応の度合いを測定する  
ことにより、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定  
することができる。第 2 の発明においても、測定に際し B/F 分離を必  
要としないか、あるいは B/F 分離を簡便化することができるので、簡  
25 便に測定を行うことができる。

さらに、第 3 の発明に係る免疫測定試薬は、上記 (a) 酵素阻害剤と

化学結合された抗体または抗原と、(b) 酵素と、(c) 基質とを含むので、試料と混合した場合に、抗原抗体反応と酵素反応とが生じ、これらの反応の度合いを測定することにより、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定することができる。

- 5       また、第3の発明に係る免疫測定試薬を用いた場合においても、B/F分離を必要とせず、あるいはB/F分離を簡便化し得るので、測定を簡便に行うことができる。

- 10       本発明に係る免疫測定法では、第1、第2または第3の発明に係る免疫測定試薬を用いるので、上述したように、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定でき、かつB/F分離を必要としないか、あるいは簡便化し得るので、測定を簡便に行うことができる。

15

20

25

## 請 求 の 範 囲

1. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、
  - 5 (a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、
  - (b) 上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、
  - (c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする、免疫測定試薬。
- 10 2. 上記不溶性担体を含む第1の試薬と、  
上記酵素阻害剤及び上記基質を含む第2の試薬とからなることを特徴とする請求項1に記載の免疫測定試薬。
3. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、
  - 15 (a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とが担持された不溶性担体と、
  - (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、
  - (c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする免疫測定試薬。
- 20 4. 上記不溶性担体を含む第1の試薬と、  
上記酵素を含む第2の試薬と、上記酵素の基質を含む第3の試薬とからなることを特徴とする請求項3に記載の免疫測定試薬。
5. 上記不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されていることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の免疫測定試薬。
- 25 6. 抗体または抗原、酵素及び酵素の基質の組み合わせが複数含有されていることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の免疫測定試薬。

7. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、

(a) 酵素阻害剤と化学結合されており、かつ上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と、

5 (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、

(c) 上記酵素の基質

とを含むことを特徴とする免疫測定試薬。

8. 上記酵素阻害剤と化学結合された抗体または抗原を含む第1の試薬と、上記酵素を含む第2の試薬と、上記酵素の基質を含む第3の試薬と

10 かなる請求項7に記載の免疫測定試薬。

9. 上記酵素阻害剤が、上記酵素に対する抗体である請求項1～8のいずれかに記載の免疫測定試薬。

10. 前記酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体である請求項9に記載の免疫測定試薬。

15 11. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定法であって、請求項1～10のいずれかに記載の免疫測定試薬と、試料とを混合し、抗原抗体反応による凝集反応と酵素反応を生じさせ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

20

25

図 1

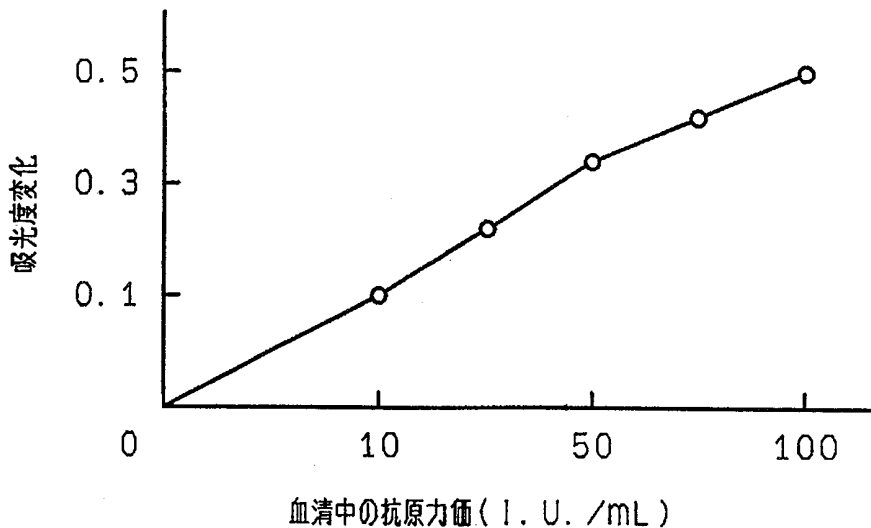
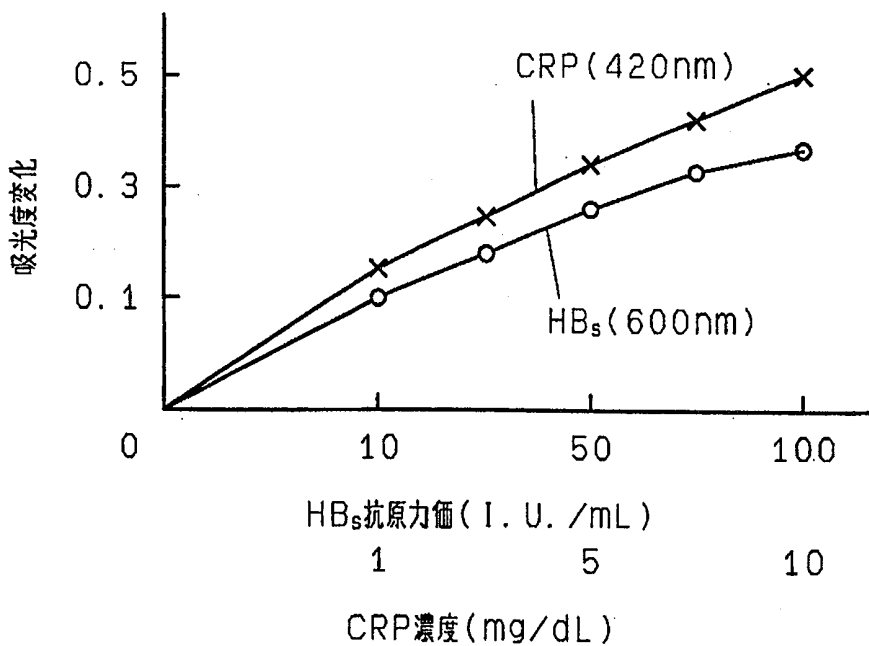


図 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>6</sup> G01N33/543, G01N33/542												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> G01N33/543, G01N33/542												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	JP, 60-067857, A (Fujirebio Inc.), 18 April, 1985 (18. 04. 85), Claims (Family: none)	1-6										
X	JP, 62-249061, A (Konica Corp.), 30 October, 1987 (30. 10. 87), Claims (Family: none)	3-6										
X	JP, 53-115814, A (F. Hoffmann-La Roche & Co., AG.), 9 October, 1978 (09. 10. 78), Claims & DE, 2811257, A & FR, 2384262, A & GB, 1595101, A	7-10										
A	JP, 63-049095, A (Unitika Ltd.), 1 March, 1988 (01. 03. 88), Claims & EP, 261781, A	9, 10										
A	JP, 1-311274, A (Nitto Denko Corp.), 15 December, 1989 (15. 12. 89), Claims (Family: none)	11										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"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 10 June, 1999 (10. 06. 99)		Date of mailing of the international search report 22 June, 1999 (22. 06. 99)										
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<sup>6</sup> G01N33/543, G01N33/542

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<sup>6</sup> G01N33/543, G01N33/542

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 1971-1999年
- 日本国登録実用新案公報 1994-1999年
- 日本国実用新案登録公報 1996-1999年

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 60-067857, A (富士レビオ株式会社) 18. 4月. 1985 (18. 04. 8 5) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
X	JP, 62-249061, A (小西六写真工業株式会社) 30. 10月. 1987 (3 0. 10. 87) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	3-6
X	JP, 53-115814, A (エフ・ホフマンーラ・ロシュ・ウント・コン パニー・アクチエンゲゼルシャフト) 9. 10月. 1978 (09. 10. 78) 特許請求の範囲&DE, 2811257, A&FR, 2384262, A&GB, 1595101, A	7-10
A	JP, 63-049095, A (ユニチカ株式会社) 1. 3月. 1988 (01. 03. 88) 特許請求の範囲&EP, 261781, A	9, 10
A	JP, 1-311274, A (日東電工株式会社) 15. 12月. 1989 (15. 12. 8 9) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	11

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  
10. 06. 99

国際調査報告の発送日  
22.06.99

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
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)  
加々美一恵 印  
2 J 9408  
電話番号 03-3581-1101 内線 3252