(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月16日(16.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/181987 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/28 (2006.01) *G01N 21/05* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 21/78* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/004922

(22) 国際出願日： 2021年2月10日(10.02.2021)

(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 2020-041753 2020年3月11日(11.03.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ Fukuoka (JP). ウシオ電機株式会社 (**USHIO DENKI KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1008150 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 Tokyo (JP).

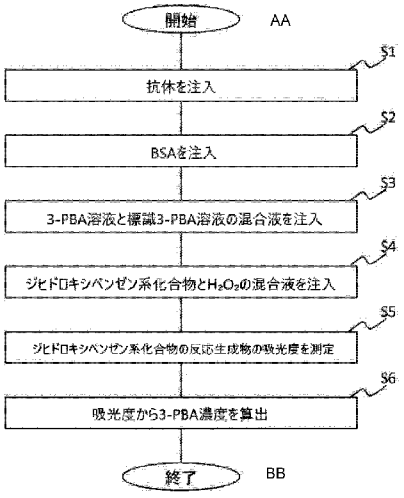
(72) 発明者: 石松 亮一 (**ISHIMATSU,Ryoichi**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 森田 金市 (**MORITA,Kinichi**); 〒1008150 東京都千代田区丸の内１丁目６番５号 ウシオ電機株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所 (**UNIUS PATENT ATTORNEYS OFFICE**); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島５丁目１３－９ 新大阪ＭＴビル１号館２階 Osaka (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** METHOD FOR DETERMINING QUANTITY OF ENDOCRINE DISRUPTOR AND LIKE

(54) 発明の名称： 内分泌攪乱物質等の定量方法



S1 Inject antibody
S2 Inject BSA
S3 Inject mixture of 3PBA solution and labeled 3-PBA solution
S4 Inject mixture of dihydroxybenzene-based compound and H2O2
S5 Measure absorbance of reaction product of dihydroxybenzene-based compound
S6 Calculate 3-PBA concentration from absorbance
AA Start
BB End

(57) **Abstract:** A quantitative method for determining the quantity of an object component that is included in a sample solution, using an antigen-antibody reaction, the method including: an antigen-antibody reaction step A for adding an enzyme-labeled antigen or an enzyme-labeled antibody labeled with an enzyme to a reaction part including an antibody that corresponds to the enzyme-labeled antigen or an antigen that corresponds to the enzyme-labeled antibody, and causing an antigen-antibody reaction; a reaction step B for adding a dihydroxybenzene-based compound to the reaction part and reacting in the presence of an enzyme to generate a reaction product; an absorbance measurement step C for measuring the absorbance of the reaction product generated in the reaction step B; and a quantity determination step D for determining the quantity of an object component from the absorbance obtained in the absorbance measurement step.

WO 2021/181987 A1

[続葉有]

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約:抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量方法。酵素で標識されている酵素標識抗原又は酵素標識抗体を、酵素標識抗原に対応する抗体又は酵素標識抗体に対応する抗原が入っている反応部に加え、抗原抗体反応をさせる抗原抗体反応工程Aと、ジヒドロキシベンゼン系化合物を反応部に加え、酵素の存在下で反応させることにより反応生成物を生成する反応工程Bと、反応工程Bで生成された反応生成物の吸光度を測定する吸光度測定工程Cと、吸光度測定工程で得られた吸光度から、対象成分を定量する定量工程Dとを含む。

明　細　書

発明の名称 ： 内分泌攪乱物質等の定量方法

技術分野

[0001] 本発明は、内分泌攪乱物質等の定量方法及び定量装置に関するものである。

背景技術

[0002] 内分泌攪乱物質（所謂、環境ホルモン）による環境汚染が注目されている。内分泌攪乱物質は、土壌、河川、海洋などの環境に排出された農薬等の化学物質が前記環境に生息する微生物により代謝毒性化したものである。近年、環境中における農薬等の化学物質や当該化学物質に由来する内分泌攪乱物質（以下、「内分泌攪乱物質等」とする。）の測定・分析に対する要請が高まってきた。

[0003] 内分泌攪乱物質等の定量方法としては、従来より、ガスクロマトグラフ質量分析（例えば、高分解能ガスクロマトグラフ分析：ＨＲＧＣ／ＭＳ，高分解能質量分析ＨＲＧＣ／ＨＲＭＳ）法や、液体クロマトグラフ（例えば、高速液体クロマトグラフ：ＨＰＬＣ）法、ＥＬＩＳＡ等の光学測定が用いられてきた（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表２０１８－５１２０７１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、従来の内分泌攪乱物質等の定量方法は、測定精度や感度は高いものの、比較的大型の装置を必要とするため、基本的には研究所等の分析拠点にて実施されることを前提としていて、内分泌攪乱物質等の採取現場において実施することは困難であった。

[0006] なお、内分泌攪乱物質等の定量方法において使用される蛍光物質や発色基

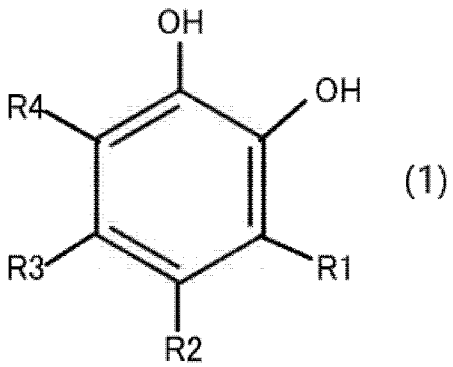
質は、測定精度や感度は高いものについては光や熱に不安定なものが多く、一方、光や熱に安定な化合物を使用した場合は測定精度や感度が低いことが多い。

[0007] 本発明は係る事情によりなされたものであって、内分泌攪乱物質等のような環境試料検体を採取した現場で安定的にかつ高精度で実施できる定量方法等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

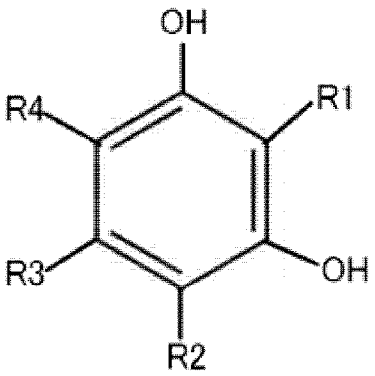
[0008] 本発明の第１の観点は、抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量方法であって、酵素で標識されている酵素標識抗原又は酵素標識抗体を、前記酵素標識抗原に対応する抗体又は前記酵素標識抗体に対応する抗原が入っている反応部に加え、抗原抗体反応をさせる抗原抗体反応工程Ａと、下記一般式（１）～（３）からなる群より選択される少なくとも１種のジヒドロキシベンゼン系化合物を前記反応部に加え、前記酵素の存在下で反応させることにより反応生成物を生成する反応工程Ｂと、前記反応工程Ｂで生成された前記反応生成物の吸光度を測定する吸光度測定工程Ｃと、前記吸光度測定工程Ｃで得られた吸光度から、前記対象成分を定量する定量工程Ｄとを含む、定量方法。

[化1]



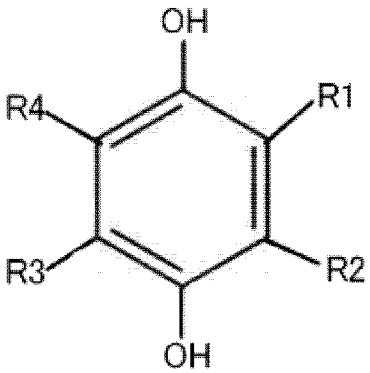
(1)

[化2]



(2)

[化3]



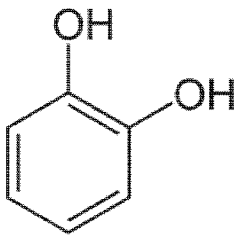
(3)

（前記一般式（１）～（３）中、Ｒ１～Ｒ４は、互いに独立して、水素原子、炭化水素基、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アセチル基、置換基を有してもよいアミノ基もしくは塩酸塩、置換基を有してもよいスルホン酸基もしくはスルホン酸塩基、チオール基、ニトロ基、シアノ基、カルボニル基、カルボキシル基またはハロゲン原子、ヒドロキシル基、カルボキシル基もしくはアミノ基で置換されていてもよい、炭素数１～２０のアルキル基、炭素数１～２０のアルコキシル基、炭素数１～２０のアルキルチオ基、炭素数２～２０のアルケニル基、炭素数２～２０のアルキニル基、炭素数６～２０のアリール基もしくは炭素数２～２０のヘテロアリール基を表す。）

[0009] 本発明の第２の観点は、第１の観点の定量方法であって、前記酵素が西洋ワサビペルオキシターゼであり、前記ジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化電位のピーク電位が１Ｖ以下である。

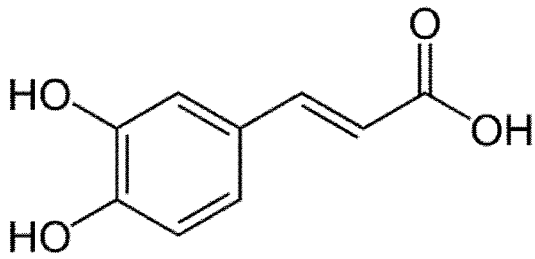
[0010] 本発明の第３の観点は、第１または第２の観点の定量方法であって、前記ジヒドロキシベンゼン系化合物が、下記式（１ａ）～（１ｄ）からなる群より選択される少なくとも１種の化合物である。

[化4]



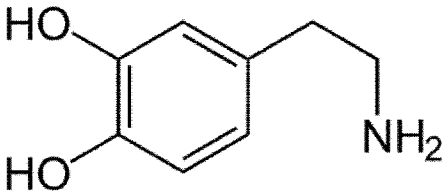
(1a)

[化5]



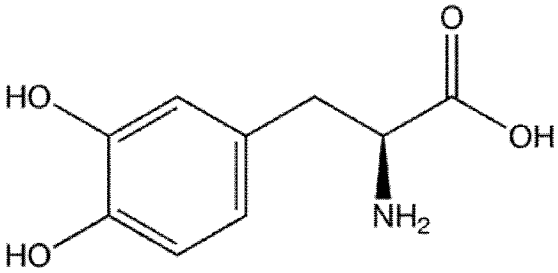
(1b)

[化6]



(1c)

[化7]



(1d)

発明の効果

[0011] 本発明の各観点によれば、内分泌攪乱物質等の採取現場において吸光度を測定し、内分泌攪乱物質等を安定的にかつ高精度で定量することが可能になる。

[0012] また、本発明の各観点によれば、酵素により触媒される反応が酸化反応および／または重合反応であるため、蛍光基質や発色基質を用いる従来のＥＬＩＳＡに比べて、光や熱による影響を受けにくく、屋外での測定に適した定量方法等を提供することが可能になる。また、酸化反応または重合反応の反応時間は短いため、短時間で内分泌攪乱物質等を定量することが可能になる。

[0013] 本発明の各観点によれば、反応時間が短いジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化反応および／または重合反応を利用しているため、短時間で定量することが可能になる。また、ジヒドロキシベンゼン系化合物は酵素存在下で酸化および／または重合させることにより生成する反応生成物の吸光度の変化幅が大きい（ダイナミックレンジが大きい）ため、吸光度測定工程Ｃにおける測定精度に優れる。このような効果が得られる理由は明らかではないが、ジヒドロキシベンゼン系化合物は水に溶け易く、高濃度の着色物が得られることが考えられる。より具体的には、以下の理由が考えられる。

[0014] ジヒドロキシベンゼン系化合物は、ベンゼン環上の２つのヒドロキシル基の配置および他の置換基の存在如何により、反応工程Ｂにおいて、酸化反応および／または重合反応が進行する。反応工程Ｂにおいて、ジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化反応が進行する場合は、酸化されることによりジヒドロキシベンゼン系化合物は発色する性質があり、さらにジヒドロキシベンゼン系化合物は水に溶け易いので、高濃度で使用することができる。その結果、ジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化反応により生成する反応生成物は吸光度の変化幅が大きくなるものと考えられる。

[0015] 一方、反応工程Ｂにおいて、ジヒドロキシベンゼン系化合物の重合反応が進行する場合は、重合反応により共役系が広がり、ＨＯＭＯ－ＬＵＭＯエネ

ルギーギャップが小さくなることによって、反応生成物の吸収波長が長波長側にシフトする。また、重合反応の進行程度により、分子量の異なるポリマー（反応生成物）が混在することによって、様々な波長の光を吸収することになる。さらに、重合反応が進むと、見掛け上、ポリマーの吸光度は増加する。ジヒドロキシベンゼン系化合物のうち、重合反応が進行し易い化合物、例えば後述するカテコールアミン系化合物は水に溶け易く、さらに重合反応により生成するポリマーも同様に水に溶け易い性質を有する。このため、特にカテコールアミン系化合物は重合反応が進行し易く、結果として、ポリマー（反応生成物）の吸光度の変化幅が大きくなるものと考えられる。

[0016] また、ジヒドロキシベンゼン系化合物は、従来のＥＬＩＳＡで用いる蛍光基質に比べ、光や熱に対して安定であるため、本発明の定量方法は屋外測定に適している。さらに、ジヒドロキシベンゼン系化合物は安価であるため、従来のＥＬＩＳＡのような高価な蛍光試薬は不要である。

[0017] 本発明の第２の観点によれば、酸化電位のピーク電位が１Ｖ以下であるジヒドロキシベンゼン系化合物を使用することにより、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ｈｏｒｓｅ　Ｒａｄｉｓｈ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ：ＨＲＰ）を用いたＥＬＩＳＡを好適に実施することができる。

[0018] 本発明の第３の観点によれば、後述する実験結果が示すとおり、式（１ａ）～（１ｄ）からなる群より選択される少なくとも１種の化合物は、酵素存在下で酸化および／または重合させることにより生成する反応生成物の吸光度の変化幅が大きいため、吸光度測定工程Ｃにおける測定精度に特に優れる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の内分泌攪乱物質等の定量方法のフロー図である。

[図2]本発明の内分泌攪乱物質等の定量装置の構成の一例である。

[図3]０～１００ｐｐｂで変量したＨＲＰと、１ｍＭのH_2O_2と、１０ｍＭのカテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩またはレボドパとをそれぞれ反応させた場合の吸光度の時間変化を表すスペクトルを示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、図面を参照して、本発明の実施例について述べる。なお、本発明の実施の形態は、以下の実施例に限定されるものではない。

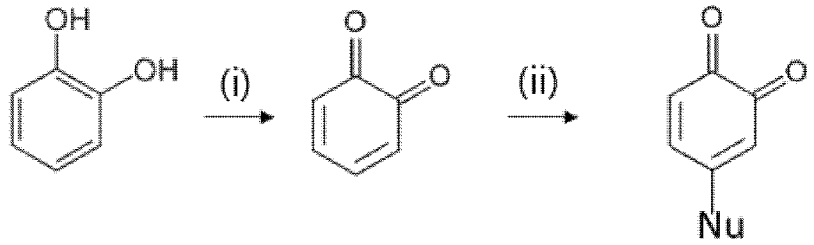
[0021] ［実施例１］

図１に、本発明の内分泌攪乱物質等の定量方法のフロー図を示す。本実施例では、定量対象をジフェニルエーテル系除草剤の代謝物質の一種である３－フェノキシ安息香酸（３－ｐｈｅｎｏｘｙｂｅｎｚｏｉｃ ａｃｉｄ：３－ＰＢＡ）とした。また、酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ｈｏｒｓｅ Ｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ：ＨＲＰ）を用いた。なお、末端にＣＯＯＨ基又はNH_2基を有する化学物質であれば、ＨＲＰにより標識可能である。また、各溶液の溶媒には、リン酸緩衝液（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ）を用いた。

[0022] まず、３－ＰＢＡと特異的に結合する抗３－ＰＢＡ抗体を反応セル（請求項記載の「反応部」の一例）に注入し、反応セル内の基板に吸着させる（Ｓ１）。次に、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を反応セルに注入する（Ｓ２）。ＢＳＡは、次のステップで注入する標識抗原が基板に非特異的に吸着することを抑制するためのブロッキング剤である。続いて、定量対象の３－ＰＢＡ溶液（請求項記載の「試料溶液」の一例）と、標識３－ＰＢＡ溶液（請求項記載の「酵素標識抗原」の一例）との混合液を反応セルに注入する（Ｓ３、請求項記載の「抗原抗体反応工程Ａ」の一例）。ここで、標識３－ＰＢＡ溶液は、抗原である３－ＰＢＡをＨＲＰで予め標識した標識３－ＰＢＡを含む溶液であって、標識３－ＰＢＡの濃度は既知である。３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液の混合液が注入されると、標識されていない３－ＰＢＡと標識３－ＰＢＡが競合的に基板上の抗体により補足され、抗原抗体反応が起こる。そして、洗浄後、ジヒドロキシベンゼン系化合物と過酸化水素（H_2O_2）とを反応セルに注入する（Ｓ４、請求項記載の「反応工程Ｂ」の一例）。すると、基板上の抗体に補足された標識３－ＰＢＡのＨＲＰにより、下記の酸化反応が触媒され、ジヒドロキシベンゼン系化合物から、反応生成物であ

るベンゾキノン系化合物が生成する。

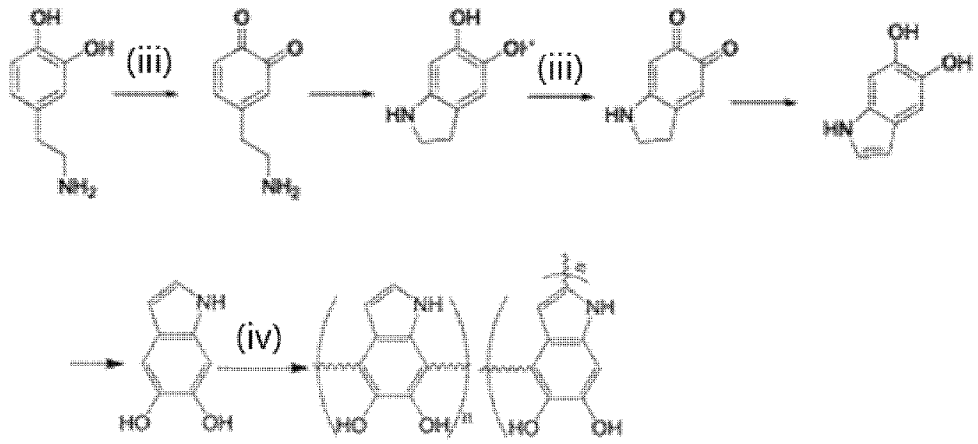
[0023] [化8]



（前記（ｉ）はジヒドロキシベンゼン系化合物がＨＲＰとH_2O_2存在下で酸化され、ベンゾキノン系化合物が生成する酸化反応を示し、前記（ｉｉ）はさらにベンゾキノン系化合物が受ける求核反応を示す。）

[0024] また、ジヒドロキシベンゼン系化合物がアミノ基を有するカテコールアミン系化合物である場合、ジヒドロキシベンゼン系化合物は酸化反応に加え重合反応が触媒され、ジヒドロキシベンゼン系化合物から、反応生成物であるポリマーが生成する。

[0025] [化9]



（前記（ｉｉｉ）はジヒドロキシベンゼン系化合物がＨＲＰとH_2O_2存在下で酸化され、ベンゾキノン系化合物が生成する酸化反応を示し、前記（ｉｖ）はさらにジヒドロキシベンゼン系化合物またはその誘導体の重合反応を示す。）

[0026] 前記酸化反応、または酸化反応および重合反応の後、反応生成物の吸光度

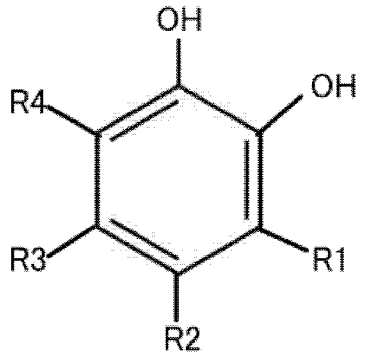
を測定する（Ｓ５、請求項記載の「吸光度測定工程Ｃ」の一例）。最後に、得られた吸光度に基づいて、３－ＰＢＡの濃度を算出する（Ｓ６、請求項記載の「定量工程Ｄ」の一例）。得られた吸光度に基づく３－ＰＢＡの濃度の算出方法としては、例えば複数の異なる濃度の３－ＰＢＡサンプルを用意し、これらサンプルを使用して本発明に係る定量方法を実施し、各濃度での吸光度に基づき予め作成した検量線を利用して、測定サンプルの濃度を算出する方法が挙げられる。

[0027] このように、本定量方法は、ジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化反応、または酸化反応および重合反応を利用しているため、定量にかかる時間を従来のＥＬＩＳＡに比べて大幅に短縮できる。従来のＥＬＩＳＡの酵素反応にかかる時間は数分であるのに対し、本定量方法の酸化反応、または酸化反応および重合反応にかかる時間は数秒である。また、ジヒドロキシベンゼン系化合物は、従来のＥＬＩＳＡで用いていた蛍光基質や発色基質に比べて、光や熱に対してはるかに安定であるため、オンサイト分析に適している。さらに、従来のＥＬＩＳＡで用いていた基質に比べ、ジヒドロキシベンゼン系化合物は安価である。つまり、本定量方法によれば、迅速、安全かつ安価に、内分泌攪乱物質等のオンサイト分析を行うことが可能になる。

[0028] なお、本発明においてはジヒドロキシベンゼン系化合物が酸化反応の後に重合する反応（（ｉｖ）に示す反応）を「重合反応」と表すが、その重合度は特に問題でなく、後述のとおり、ジヒドロキシベンゼン系化合物が反応（重合）してポリマーが生成することにより、ジヒドロキシベンゼン系化合物には見られない可視光領域での吸収スペクトルが検出される程度に反応（重合）すればよい。

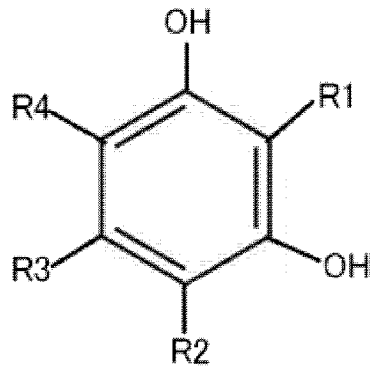
[0029] ジヒドロキシベンゼン系化合物としては、下記一般式（１）により表されるカテコール系化合物、下記一般式（２）により表されるレゾルシノール系化合物、および下記一般式（３）により表されるヒドロキノン系化合物が挙げられる。

[化10]



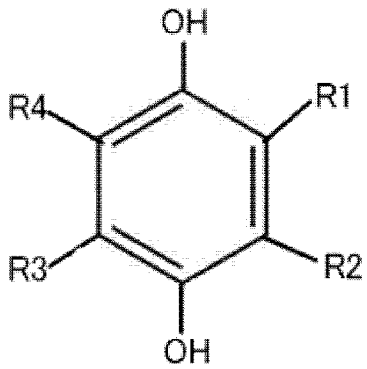
(1)

[化11]



(2)

[化12]



(3)

（前記一般式（１）～（３）中、Ｒ１～Ｒ４は、互いに独立して、水素原子、炭化水素基、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アセチル基、置換基を有してもよいアミノ基もしくは塩酸塩、置換基を有してもよいスルホン酸基もしくはスルホン酸塩基、チオール基、ニトロ基、シアノ基、カルボニル基、カ

ルボキシル基またはハロゲン原子、ヒドロキシル基、カルボキシル基もしくはアミノ基で置換されていてもよい、炭素数１～２０のアルキル基、炭素数１～２０のアルコキシル基、炭素数１～２０のアルキルチオ基、炭素数２～２０のアルケニル基、炭素数２～２０のアルキニル基、炭素数６～２０のアリール基もしくは炭素数２～２０のヘテロアリール基を表す。）

[0030] 炭化水素基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等の炭素原子数１～１０のアルキル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等の炭素原子数３～８のシクロアルキル基；フェネチル基、フェニルプロピル基等の炭素原子数１～６のアルキル基にアリール基が結合したアラルキル基が挙げられる。なお、これらの基は、各種異性体を含む。Ｒ１ないしＲ４は、互いに結合して環を形成していても良く、結合して形成される環としては、例えば、炭素原子数１～３のアルキレン基を含むメチレンジオキシ環、エチレンジオキシ環、プロピレンジオキシ環等が挙げられる。

[0031] 上記ハロゲン原子の具体例としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子もしくはヨウ素原子、またはメタンスルホニルオキシ基、トリフルオロメタンスルホニルオキシ基、ノナフルオロブタンスルホニルオキシ基等の（フルオロ）アルキルスルホニルオキシ基；ベンゼンスルホニルオキシ基、トルエンスルホニルオキシ基等の芳香族スルホニルオキシ基等が挙げられる。

[0032] 炭素数２～２０のアルケニル基の具体例としては、エテニル基、ｎ－１－プロペニル基、ｎ－２－プロペニル基、１－メチルエテニル基、ｎ－１－ブテニル基、ｎ－２－ブテニル基、ｎ－３－ブテニル基、２－メチル－１－プロペニル基、２－メチル－２－プロペニル基、１－エチルエテニル基、１－メチル－１－プロペニル基、１－メチル－２－プロペニル基、ｎ－１－ペンテニル基、ｎ－１－デセニル基またはｎ－１－エイコセニル基等が挙げられる。

[0033] 炭素数２～２０のアルキニル基の具体例としては、エチニル基、ｎ－１－

プロピニル基、ｎ－２－プロピニル基、ｎ－１－ブチニル基、ｎ－２－ブチニル基、ｎ－３－ブチニル基、１－メチル－２－プロピニル基、ｎ－１－ペンチニル基、ｎ－２－ペンチニル基、ｎ－３－ペンチニル基、ｎ－４－ペンチニル基、１－メチル－ｎ－ブチニル基、２－メチル－ｎ－ブチニル基、３－メチル－ｎ－ブチニル基、１，１－ジメチル－ｎ－プロピニル基、ｎ－１－ヘキシニル基、ｎ－１－デシニル基、ｎ－１－ペンタデシニル基またはｎ－１－エイコシニル基等が挙げられる。

[0034] 炭素数６～２０のアリール基の具体例としては、フェニル基、１－ナフチル基、２－ナフチル基、１－アントリル基、２－アントリル基、９－アントリル基、１－フェナントリル基、２－フェナントリル基、３－フェナントリル基、４－フェナントリル基または９－フェナントリル基等が挙げられる。

[0035] 炭素数２～２０のヘテロアリール基の具体例としては、２－チエニル基、３－チエニル基、２－フラニル基、３－フラニル基、２－オキサゾリル基、４－オキサゾリル基、５－オキサゾリル基、３－イソオキサゾリル基、４－イソオキサゾリル基、５－イソオキサゾリル基、２－チアゾリル基、４－チアゾリル基、５－チアゾリル基、３－イソチアゾリル基、４－イソチアゾリル基、５－イソチアゾリル基、２－イミダゾリル基、４－イミダゾリル基、２－ピリジル基、３－ピリジル基または４－ピリジル基等が挙げられる。

[0036] 前記アルコキシル基としては、例えば、メトキシル基、エトキシル基、プロポキシル基等の炭素原子数１～２０のアルコキシル基が挙げられる。なお、これらの基は、各種異性体を含む。

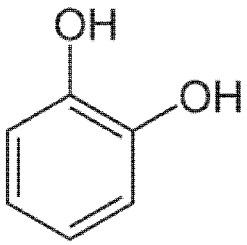
[0037] 前記アルキルチオ基としては、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、プロピルチオ基等の炭素原子数１～２０のアルキルチオ基が挙げられる。なお、これらの基は、各種異性体を含む。

[0038] 前記ジヒドロキシベンゼン系化合物の中でも、特に酸化電位のピーク電位が１Ｖ以下であるジヒドロキシベンゼン系化合物は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ｈｏｒｓｅ　Ｒａｄｉｓｈ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ：ＨＲＰ）および過酸化水素（H_2O_2）を用いたＥＬＩＳＡを好適に実施することができる

。ジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化電位の測定方法については後述する。

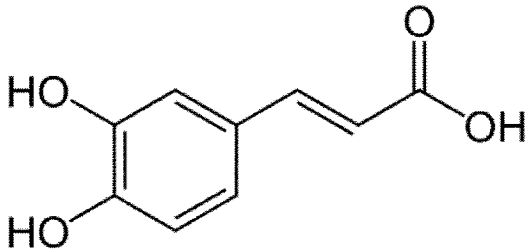
[0039] 酵素存在下で酸化反応、または酸化反応および重合反応させることにより生成する反応生成物の吸光度の変化幅が大きく、吸光度測定工程Ｃにおける測定精度に特に優れることから、本発明においては、ジヒドロキシベンゼン系化合物の中でも前記一般式（１）により表されるカテコール系化合物が好ましい。さらにカテコール系化合物の中でも、下記式（１ａ）で表されるカテコール、下記式（１ｂ）で表されるコーヒー酸、下記式（１ｃ）で表されるドーパミン塩酸塩、および下記式（１ｄ）で表されるレボドパを使用することが好ましい。

[化13]



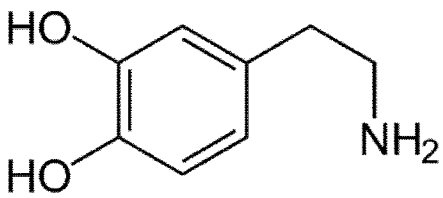
(1a)

[化14]



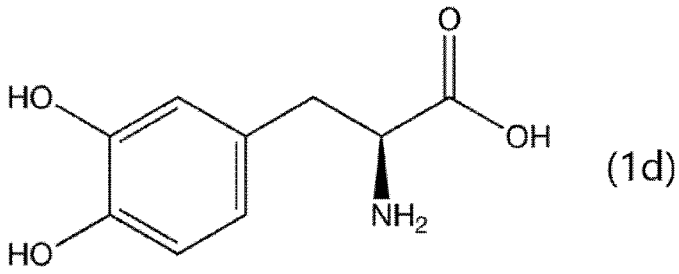
(1b)

[化15]



(1c)

[化16]



(1d)

[0040] 本発明においては、式（１ａ）～（１ｄ）で表されるカテコール系化合物以外に、例えばアドレナリン、ノルアドレナリン、３’，４’－ジヒドロキシアセトフェノン、２，３－ジヒドロキシ安息香酸、３，４－ジヒドロキシ安息香酸、３，４－ジヒドロキシベンジルアルコール、３，４－ジヒドロキシフェニル酢酸、３－メトキシカテコール、４－メトキシカテコール、４－ニトロカテコール、タイロンなどのカテコール系化合物；さらにはレゾルシノールなどのレゾルシノール系化合物、あるいはヒドロキノンなどのヒドロキノン系化合物を使用可能である。

[0041] なお、本発明の吸光度測定工程Ｃにおける測定精度に特に優れるジヒドロキシベンゼン系化合物として、反応生成物の吸光度の変化幅が大きいことが好ましいことは前記のとおりである。さらに、特定濃度のH_2O_2およびジヒドロキシベンゼン系化合物に対し、ＨＲＰ濃度を種々変量しつつ反応させた場合の吸光度の時間変化を表すスペクトルを測定した場合に、ＨＲＰ濃度にかかわらず、吸光度の時間変化が比例関係（直線関係）にある場合は、吸光度測定工程Ｃにおける測定精度に特に優れるため好ましい。また、特定濃度のＨＲＰ、H_2O_2およびジヒドロキシベンゼン系化合物を反応させ、吸光度の測定波長をある一定の範囲（例えば４００～７００ｎｍ）で変化させたとき、複数の波長領域で吸光度の時間変化が現れるジヒドロキシベンゼン系化合物は、本発明の吸光度測定工程Ｃにおける測定精度が特に優れる、あるいは測定条件の変更が柔軟に可能となるため好ましい。

[0042] 本発明に係る定量方法は、例えば下記定量装置により実施可能である。抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量装置であ

って、前記抗原抗体反応の反応場とする反応部と、前記試料溶液を保持するための第１容器と、酵素で標識されていて、かつ、前記抗原抗体反応の抗原又は抗体である酵素標識物を含む酵素標識物溶液を保持するための第２容器と、前記酵素により促進される重合反応の基質溶液を保持するための第３容器と、前記第１容器内の前記試料溶液を前記反応部に導く第１流路と、前記第２容器内の前記酵素標識物溶液を前記反応部に導く第２流路と、前記第３容器内の前記基質溶液を前記反応部に導く第３流路と、前記反応部内の溶液を外部に導く第４流路と、前記重合反応により生成される重合体が吸収する波長を含む光を発する光源部と、光を検出する光検出部と、前記光源部が発する光を前記第４流路の一部である測定部に導光する第１導光路と、前記測定部からの光を前記光検出部に導光する第２導光路と、前記第１導光路及び前記第２導光路の周囲を包囲する、光を吸収する吸光部とを備える、定量装置。

[0043] 前記定量装置において、前記吸光部が、光を吸収する顔料を含有する顔料含有シリコーン部材からなることが好ましい。

[0044] 前記定量装置において、前記第１導光路、前記第２導光路、及び、前記吸光部は、屈折率が同一のシリコーン樹脂を素材とすることが好ましい。

[0045] 前記定量装置において、前記第１流路と、前記第２流路とは、前記反応部よりも上流で合流していることが好ましい。

[0046] 前記定量装置において、前記抗原抗体反応に用いる抗体溶液を保持するための第４容器と、前記第４容器内の前記抗体溶液を前記反応部に導く第４流路とを備え、前記酵素標識物は、酵素標識された抗原である酵素標識抗原であることが好ましい。

[0047] 図２に、本発明の定量方法を実施するための定量装置１の構成例を示す。定量装置１は、流れ分析法（例えば、Ｆｌｏｗ Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ）による分析を可能としたものである。

[0048] 定量装置１は、定量対象である３－ＰＢＡ溶液を保持するための抗原用容器３（前記記載の「第１容器」の一例）と、標識３－ＰＢＡ溶液を保持する

ための標識抗原用容器５（前記記載の「第２容器」の一例）と、抗体溶液を保持するための抗体用容器７（前記記載の「第４容器」の一例）と、ＢＳＡなどのブロッキング剤を保持するためのブロッキング剤用容器９と、過酸化水素水（H_2O_2）を保持するためのH_2O_2用容器１１と、ジヒドロキシベンゼン系化合物含有溶液を保持するためのジヒドロキシベンゼン系化合物用容器１３（前記記載の「第３容器」の一例）と、ランニングバッファを保持するためのランニングバッファ用容器１５と、抗原抗体反応の反応場となる反応セル１７（前記記載の「反応部」の一例）と、各容器から反応セル１７に溶液を導く導入流路１９と、導入流路１９中の溶液を流すためのポンプＰ１－Ｐ７と、導入流路１９に設けた開閉制御可能な三方バルブＶ１－Ｖ７と、反応セル１７から外部に溶液を導く光学測定用流路２１（前記記載の「第４流路」の一例）と、ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物の吸光度を測定する吸光度測定部２３とを有する。なお上記した三方バルブの開閉制御は、流体の流れ方向の切り替え制御、流体の流れのＯｎ・Ｏｆｆ制御を含むものとする。

[0049] 各容器（抗原用容器３、標識抗原用容器５、抗体用容器７、ブロッキング剤用容器９、H_2O_2用容器１１、ジヒドロキシベンゼン系化合物用容器１３、ランニングバッファ用容器１５）は、導入流路１９（19_1、19_2、19_3、19_4、19_5、19_6、19_7）を通じてポンプＰ１－Ｐ７に接続され、ポンプＰ１－Ｐ７の駆動により各容器内の溶液が導入流路１９内を流れ、反応セル１７に入る。ポンプＰ１－Ｐ６の下流側には、開閉制御可能な三方バルブＶ１－Ｖ６が設けられている。後述する合流点Ｃ３と反応セル１７の間の導入流路19_{10}には、バルブＶ７が設けられ、もう一方が廃液入れ２５に接続している。なお、図２においては、理解を容易にするため、各バルブ個別に示されているが、各バルブを集約して１つの構造体を成すバルブ制御機構であってもよい。

[0050] 抗原用容器３より３－ＰＢＡ溶液が流れる導入流路19_1（前記記載の「第１流路」の一例）と、標識抗原用容器５より標識３－ＰＢＡ溶液が流れる導

入流路１９$_2$（前記記載の「第２流路」の一例）とは、合流部Ｃ１で合流する。すなわち、ポンプＰ１及びＰ２が動作し、バルブＶ１が図面横方向のみ開状態のときに流れる３－ＰＢＡ溶液と、バルブＶ２が図面横方向のみ開状態のときに流れる標識３－ＰＢＡ溶液とが合流部Ｃ１に流れ込むと、当該合流部Ｃ１の下流側の導入流路１９$_8$には、３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液の混合液が流れる。

[0051] この混合液が流れる導入流路１９$_8$は、第１混合コイル部２７の上流と接続される。３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液の混合液は、第１混合コイル部２７を流れることにより十分に混合される。第１混合コイル部２７を設けることにより、短い流路で３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液を混合できるため、コンパクトな定量装置１を提供することが可能になる。

[0052] 第１混合コイル部２７の下流側の導入流路１９$_8$は、合流点Ｃ３において、ポンプＰ３が動作し、バルブＶ３が図面横方向のみ開状態のとき抗体用容器７より抗体溶液が流れる導入流路１９$_3$と、ポンプＰ４が動作し、バルブＶ４が図面横方向のみ開状態のときブロッキング剤用容器９よりＢＳＡが流れる導入流路１９$_4$と、後で説明するように、H_2O_2及びジヒドロキシベンゼン系化合物溶液の混合液が流れる導入流路１９$_9$と合流する。そして、合流部Ｃ３の下流側の導入流路１９$_{10}$は、反応セル１７に連結される。

[0053] H_2O_2用容器１１よりH_2O_2が流れる導入流路１９$_5$と、ジヒドロキシベンゼン系化合物溶液用容器１３よりジヒドロキシベンゼン系化合物含有溶液が流れる導入流路１９$_6$（前記記載の「第３流路」の一例）は、合流部Ｃ２で合流する。すなわち、ポンプＰ５及びＰ６が動作し、バルブＶ５が図面横方向のみ開状態のときに流れるH_2O_2と、バルブＶ６が図面横方向のみ開状態のときに流れるジヒドロキシベンゼン系化合物溶液とが合流部Ｃ３に流れ込むと、当該合流部Ｃ２の下流側の導入流路１９$_9$には、H_2O_2及びジヒドロキシベンゼン系化合物溶液の混合液が流れる。

[0054] 合流部Ｃ２の下流側の導入流路１９$_9$には、第２混合コイル部２９が設けられ、第２混合コイル部２９の下流側は、合流点Ｃ３に合流する。すなわち、

合流部Ｃ２を通過したH_2O_2及びジヒドロキシベンゼン系化合物溶液の混合液は、第２混合コイル部２９を流れることにより十分に混合される。

[0055] 反応セル１７内には、抗体定着部が設けられている。抗体定着部としては、例えば、プラスチック基板（例えば、ＰＤＭＳ基板）が用いられる。

[0056] 反応セル１７の下流側の光学測定用流路２１は、光透過性材料からなる。この光学測定用流路２１の周囲には、ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物の吸光度を測定するための吸光度測定部２３が設けられる。吸光度測定部２３は、吸光度測定用の光を放出する光源３１（前記記載の「光源部」の一例）と、光源３１から放出される光を光学測定用流路２１に導光する投光用導光路３３（前記記載の「第１導光路」の一例）、光学測定用流路２１内のジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物含有溶液を通過した光を導光する受光用導光路３５（前記記載の「第２導光路」の一例）、受光用導光路３５により導光される光を受光する受光センサ３７（前記記載の「光検出部」の一例）を含む。

[0057] ここで、投光用導光路３３及び受光用導光路３５には、外光等のノイズ光（迷光）が侵入しうる。この外光の影響を抑制するために、光源３１、投光用導光路３３、受光用導光路３５及び受光センサ３７は、光吸収性材料（例えば、カーボンブラック等の顔料を含有するシリコーン樹脂）からなる遮光部材３９（前記記載の「吸光部」の一例）により包囲される。

[0058] 投光用導光路３３又は受光用導光路３５に侵入するノイズ光のうち、投光用導光路３３、受光用導光路３５の光軸と同方向に進む成分は非常に少なく、大部分は、投光用導光路３３と遮光部材３９との界面、受光用導光路３５と遮光部材３９との界面から遮光部材３９へ入射する。このとき、遮光部材３９へ入射したノイズ光は、遮光部材３９が含有する光吸収部材により吸収される。したがって、光学測定の測定結果に対するノイズ光（迷光）の影響を効果的に低減することが可能である。

[0059] 投光用導光路３３及び受光用導光路３５は、遮光部材３９に設けられた空洞部として構成されるが、上記投光用導光路３３は、光源３１から放出され

る光に対して透明な樹脂（例えば、シリコーン樹脂）により構成することもできる。同様に、受光用導光路３５は、ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物から放出される光に対して透明な樹脂（例えば、シリコーン樹脂）により構成することもできる。

[0060] ここで、投光用導光路３３、受光用導光路３５を構成する透明な樹脂と、遮光部材３９を構成する顔料を含有する樹脂との材質を同じにすると、前記両樹脂の屈折率が同じであるので、当該両樹脂の界面での反射及び散乱が抑制される。すなわち、この場合、投光用導光路３３、受光用導光路３５が空洞である場合と同様に、遮光部材３９へ入射した迷光は遮光部材３９が含有する上記顔料により吸収されるが、さらに、投光用導光路３３、受光用導光路３５と遮光部材３９との界面での反射及び散乱が抑制されるので、遮光部材３９へ入射した迷光は投光用導光路３３、受光用導光路３５にはほとんど戻らない。よって、迷光の複雑な多重反射がほとんど発生しない。

[0061] なお、バルブＶ１－Ｖ７（バルブ制御機構）、ポンプＰ１－Ｐ７、光源、受光センサへの給電は図示を省略した給電手段により行われる。同様に、バルブＶ１－Ｖ７（バルブ制御機構）の開閉制御、ポンプＰ１－Ｐ７、光源、受光センサの制御は、図示を省略した制御部により行われる。

[0062] 本定量装置１における３－ＰＢＡの定量は以下のように行われる。まず、ポンプＰ３を動作させ、バルブＶ３を図面横方向のみ開状態として、抗体用容器７より抗体溶液が、合流点Ｃ３を通過して、反応セル１７内に導入される。反応セル１７内に導入された抗体溶液中の抗体は、プラスチック基板上に吸着される（Ｓ１）。

[0063] 上記基板上に抗体が吸着された後、ポンプＰ３の動作を停止し、バルブＶ３を閉状態とする。その後、ポンプＰ４を動作させ、バルブＶ４を図面横方向のみ開状態として、ブロッキング剤用容器９よりＢＳＡが、合流点Ｃ３を通過して、反応セル１７内に導入される（Ｓ２）。反応セル１７内にＢＳＡを導入するのは、後に反応セル１７内に導入される標識３－ＰＢＡが、抗体に認識されずに基板上に非特異的に吸着するのを抑制するためである。

[0064] 反応セル１７内にＢＳＡを導入後、ポンプＰ４の動作を停止し、バルブＶ４を閉状態とする。その後、ポンプＰ１及びＰ２を動作させ、バルブＶ１及びＶ２を図面横方向のみ開状態として、抗原用容器３からの３－ＰＢＡ溶液と標識抗原用容器５からの標識３－ＰＢＡ溶液との混合液が、第１混合コイル部２７により十分混合されて合流部Ｃ３を通過後、反応セル１７内に導入される。導入された上記混合液は、基板上に吸着されて固定化された抗体に捕捉される（Ｓ３）。

[0065] 抗原抗体反応を起こした後、ポンプＰ１及びＰ２の動作を停止し、バルブＶ１及びＶ２を閉状態とする。次に、ポンプＰ５及びＰ６を動作させ、バルブＶ５及びＶ６を開状態として、H_2O_2容器１１からのH_2O_2とジヒドロキシベンゼン系化合物溶液用容器１３からのジヒドロキシベンゼン系化合物含有溶液との混合液が、第２混合コイル部２９により十分混合されて合流部Ｃ３を通過後、反応セル１７内に導入される。すると、反応セル１７にて、ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物が生成され（Ｓ４）、反応セル１７の下流側の光学測定用流路２１には、ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物含有溶液が流れる。

[0066] そして、反応セル１７の下流側の光学測定用流路２１の周囲に設けられた吸光度測定部２３において、ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物の吸光度が測定され（Ｓ５）、その吸光度に基づいて３－ＰＢＡの濃度が算出される（Ｓ６）。なお、導入流路１９及び反応セル１７は、各工程の間に適宜ランニングバッファを流すことにより洗浄される。例えば、ジヒドロキシベンゼン系化合物溶液が流れる導出流路19_6、19_9、19_{10}の一部については次のように洗浄する。ポンプＰ７を動作させ、バルブＶ６のジヒドロキシベンゼン系化合物用容器１３に接続している栓のみを閉状態とし、他の二つの栓を開状態とすると、ランニングバッファ用容器１５よりランニングバッファが、合流点Ｃ２、第２混合コイル２９及び合流点３を通過するよう導かれ、バルブＶ７の下方の被廃液入れに流れる。

[0067] 以上のように、本発明の定量装置１によれば、流れ分析法による分析を可

能としたので、流れ系において、競合的な抗原抗体反応やジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物の生成を行うことが可能となり、分析において迅速性・簡便性・省試料（試薬）化を実現できる。また、吸光度測定部２３において、投光用導光路３３及び受光用導光路３５を遮光部材３９で包囲した構造としたので、ノイズ光の抑制を容易に実施することができ、従来のようにノイズ光対策のための大がかりな構造を必要としない。結果的に本発明の定量装置１は、小型化・携帯化が可能となり、かつ、屋外の測定環境に比較的安定で、迅速な測定を実現することができる。

[0068] 以下において、ジヒドロキシベンゼン系化合物の一例として、カテコール系化合物であるカテコール（式（１ａ）記載の化合物）、コーヒー酸（式（１ｂ）記載の化合物）、ドーパミン塩酸塩（式（１ｃ）記載の化合物）、およびレボドパ（式（１ｄ）記載の化合物）を挙げて本発明を説明する。

[0069] カテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩およびレボドパの酸化電位の測定方法について以下に説明する。３電極式電気化学セル（参照極：銀／塩化銀（飽和ＫＣＬ）、対極：白金コイル、作用極：グラッシーカーボンディスク電極（ｄ＝３．０ｍｍ））内にリン酸バッファー液（ｐＨ＝７）を１０ｍＭ濃度で充填した状態で酸化電位と電流密度とを測定する酸化電位測定工程Ｅを実行する。カテコール系化合物のうち、酸化電位測定工程Ｅで得られる前記酸化電位と電流密度との相関関係を示す二次曲線における酸化電位のピーク電位が１Ｖ以下である化合物は、ＨＲＰおよび過酸化水素の存在下で酸化可能であるため、酵素によりカテコール系化合物を反応させることで反応生成物を生成する反応工程Ｂを好適に実行することができる。カテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩およびレボドパの酸化電位のピーク電位は以下のとおりである。カテコール：０．６２Ｖコーヒー酸：０．６５Ｖドーパミン塩酸塩：０．５４Ｖレボドパ：０．６５Ｖ

上記のとおり、カテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩およびレボドパの酸化電位のピーク電位はいずれも１Ｖ以下であり、ＨＲＰおよび過酸化水素の存在下で酸化可能であるため、酵素によりカテコール系化合物を反応

させることで反応生成物を生成する反応工程Ｂを好適に実行することができる。

[0070] 図３に、０、１０、２０、５０、１００ｐｐｂのＨＲＰと、１ｍＭのH_2O_2と、１０ｍＭのカテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩またはレボドパとをそれぞれ反応させた場合の吸光度の時間変化を表すスペクトルを示す。カテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩およびレボドパのいずれにおいても、吸光度スペクトル曲線は、ＨＲＰの濃度が高くなるに従い吸光度が高くなっている。このように、カテコール、コーヒー酸、ドーパミン塩酸塩またはレボドパとこれらの反応生成物との吸収スペクトルが大きく異なるため、反応後の吸光度から各反応生成物の濃度及び目的成分の濃度を精度よく算出することができる。

[0071] なお、定量する対象成分は、土壌に含まれる内分泌攪乱物質に限るものではなく、河川、海洋などの環境に存在するものであってもよい。

[0072] また、上記実施例においては、抗体用容器から反応セルに抗体溶液を流し、反応セル内の基板に抗体を吸着させたが、予め抗体を吸着させた基板を反応セル内に設置してもよい。

[0073] また、実施例の定量装置ではランニングバッファ用容器は１つであるが、反応セル内のｐＨを酵素反応と抗原抗体反応のそれぞれの最適ｐＨに調整するために、複数のランニングバッファ用容器を備えてもよい。

[0074] なお、測定波長は、ジヒドロキシベンゼン系化合物、特にはカテコール系化合物の吸光度を適切に測定できる波長であればよく、具体的には４００ｎｍ－６００ｎｍであれば好ましく、４００ｎｍ－４７０ｎｍであればさらに好ましい。

[0075] また、上記実施例では、ＥＬＩＳＡの競合法を用いた例を示したが、直説法、間接法、又は、サンドイッチ法を用いてもよい。例えば、ＥＬＩＳＡのサンドイッチ法では、抗体を基板に吸着させた後に、抗原を加えて１回目の抗原抗体反応をさせ、さらにそこに標識抗体を加えて２回目の抗原抗体反応をさせる。一方、競合法では、実施例に示す通り、抗原抗体反応は１回のみ

である。そのため、ＥＬＩＳＡの競合法を用いることにより、少ない工程で定量できるため、測定者の作業負担が軽減され、また、定量にかかる時間が短縮され、オンサイト分析に適した定量方法を提供することが可能になる。

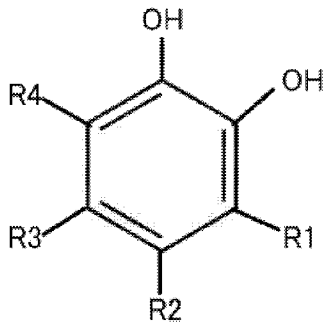
符号の説明

[0076] １　定量装置３　抗原用容器５　標識抗原用容器７　抗体用容器９　ブロッキング剤用容器１１　H_2O_2用容器１３　ジヒドロキシベンゼン系化合物用容器１５　ランニングバッファ用容器１７　反応セル１９　導入流路Ｐ１－Ｐ７　ポンプＶ１－Ｖ７　三方バルブ２１　光学測定用流路２３　吸光度測定部２５　廃液入れ２７　第１混合コイル部２９　第２混合コイル部３１　光源３３　投光用導光路３５　受光用導光路３７　受光センサ３９　遮光部材

請求の範囲

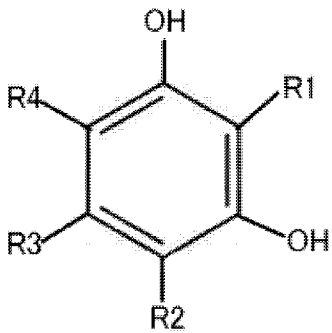
[請求項1] 抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量方法であって、酵素で標識されている酵素標識抗原又は酵素標識抗体を、前記酵素標識抗原に対応する抗体又は前記酵素標識抗体に対応する抗原が入っている反応部に加え、抗原抗体反応をさせる抗原抗体反応工程Ａと、下記一般式（１）～（３）からなる群より選択される少なくとも１種のジヒドロキシベンゼン系化合物を前記反応部に加え、前記酵素の存在下で反応させることにより反応生成物を生成する反応工程Ｂと、前記反応工程Ｂで生成された前記反応生成物の吸光度を測定する吸光度測定工程Ｃと、前記吸光度測定工程Ｃで得られた吸光度から、前記対象成分を定量する定量工程Ｄとを含む、定量方法。

[化1]



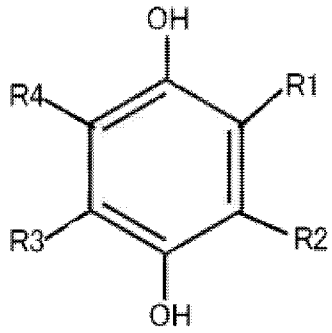
(1)

[化2]



(2)

[化3]



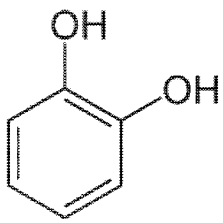
(3)

（前記一般式（１）～（３）中、Ｒ１～Ｒ４は、互いに独立して、水素原子、炭化水素基、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アセチル基、置換基を有してもよいアミノ基もしくは塩酸塩、置換基を有してもよいスルホン酸基もしくはスルホン酸塩基、チオール基、ニトロ基、シアノ基、カルボニル基、カルボキシル基またはハロゲン原子、ヒドロキシル基、カルボキシル基もしくはアミノ基で置換されていてもよい、炭素数１～２０のアルキル基、炭素数１～２０のアルコキシル基、炭素数１～２０のアルキルチオ基、炭素数２～２０のアルケニル基、炭素数２～２０のアルキニル基、炭素数６～２０のアリール基もしくは炭素数２～２０のヘテロアリール基を表す。）

[請求項2] 前記酵素が西洋ワサビペルオキシターゼであり、前記ジヒドロキシベンゼン系化合物の酸化電位のピーク電位が１Ｖ以下である、請求項１記載の定量方法。

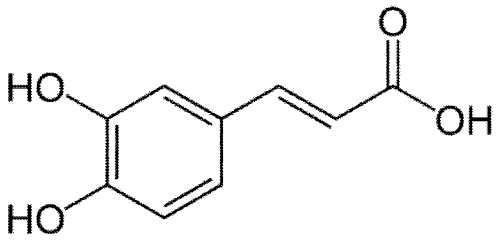
[請求項3] 前記ジヒドロキシベンゼン系化合物が、下記式（１ａ）～（１ｄ）からなる群より選択される少なくとも１種の化合物である、請求項１または２に記載の定量方法。

[化4]



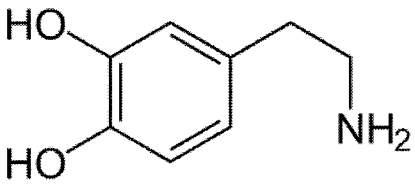
(1a)

[化5]



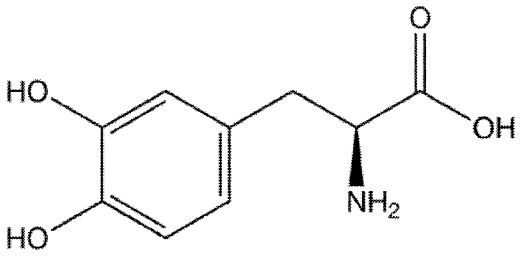
(1b)

[化6]



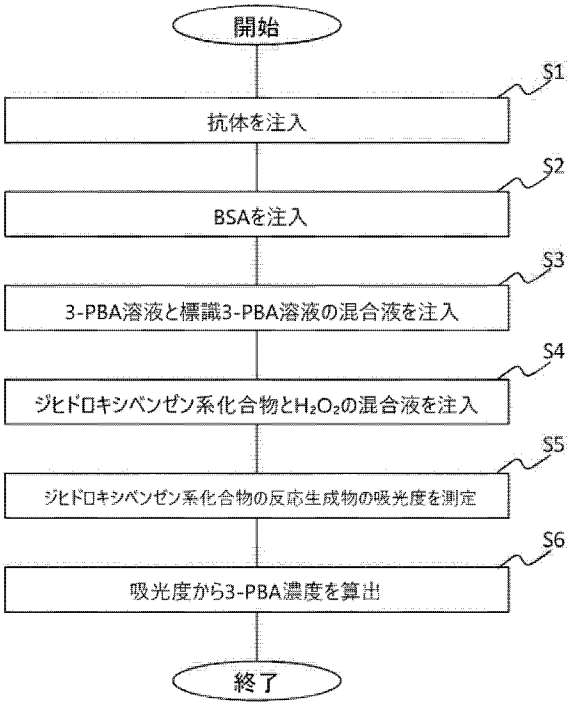
(1c)

[化7]

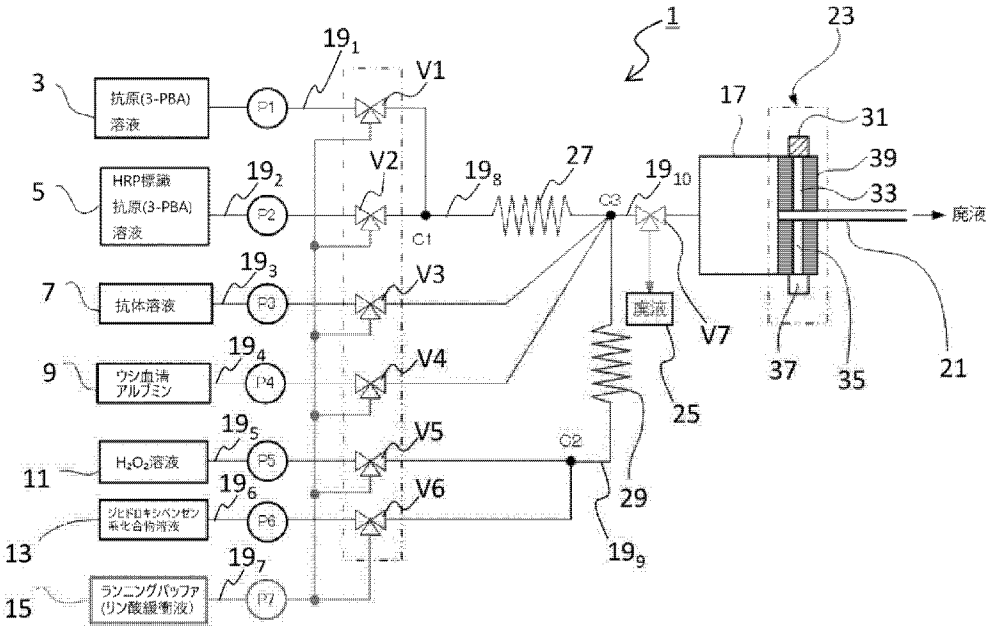


(1d)

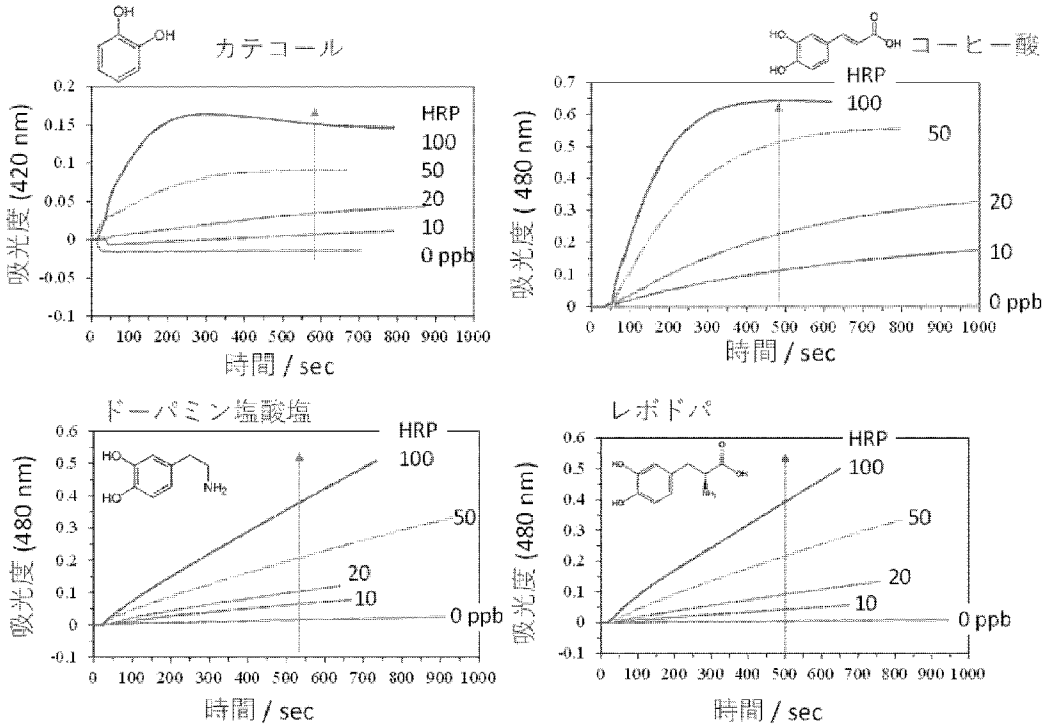
[図1]


開始
S1
抗体を注入
S2
BSAを注入
S3
3-PBA溶液と標識3-PBA溶液の混合液を注入
S4
ジヒドロキシベンゼン系化合物とH2O2の混合液を注入
S5
ジヒドロキシベンゼン系化合物の反応生成物の吸光度を測定
S6
吸光度から3-PBA濃度を算出
終了

[図2]


1
23
17
31
39
33
廃液
21
37
35
3
抗原(3-PBA)溶液
P1
19 1
V1
5
HRP標識抗原(3-PBA)溶液
P2
19 2
V2
19 8
27
19 10
C3
C1
7
抗体溶液
P3
19 3
V3
9
ウシ血清アルブミン
P4
19 4
V4
廃液
V7
25
11
H2O2溶液
P5
19 5
V5
C2
13
ジヒドロキシベンゼン系化合物溶液
P6
19 6
V6
29
19 9
15
ランニングバッファ(リン酸緩衝液)
P7
19 7

[図3]


カテコール
吸光度 (420 nm)
時間 / sec
HRP
100
50
20
10
0 ppb
コーヒー酸
吸光度 (480 nm)
ドーパミン塩酸塩
吸光度 (480 nm)
レボドパ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/004922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12Q1/28(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i
FI: G01N21/05, G01N21/78Z, C12Q1/28, G01N33/543551A
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. G01N21/05, G01N21/78, C12Q1/28, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	清水慎一 他，ジフェニルエーテル系除草剤の代謝物の定量分析を目的としたポリアニリン生成に基づくフロー吸光 ELISA 法の開発，日本分析化学会第 67 年会講演要旨集，日本分析化学会，29 August 2018，目的，実験，考察，fig. 1，(SHIMIZU, Shinichi et al.), non-official translation (Development of flow absorption ELISA method based on polyaniline production for quantitative analysis of metabolites of diphenyl ether herbaceous agents, Proceedings of the 67th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry, The Japan Society for Analytical Chemistry, purpose, experiment, consideration)	1-3
Y	MOLAEI RAD, A. et al., Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor, Analytical Biochemistry, 20 December 2006, vol. 362/no. 1, pp. 38-43, abstract, materials an	1-3

☒ 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 15 April 2021	Date of mailing of the international search report 11 May 2021
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/004922

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-031024 A (FRONTIER KENKYUSHO KK) 12 February 2009 (2009-02-12), paragraphs [0043]-[0045]	1-3
A	JP 2007-147539 A (HITACHI, LTD.) 14 June 2007 (2007-06-14), entire text, all drawings	1-3
A	JP 2009-510485 A (COMBIMATRIX CORPORATION) 12 March 2009 (2009-03-12), entire text, all drawings	1-3
P, A	WO 2020/054300 A1 (KYUSHU UNIVERSITY) 19 March 2020 (2020-03-19), entire text, all drawings	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/004922

JP 2009-031024 A	12 February 2009	(Family: none)
JP 2007-147539 A	14 June 2007	(Family: none)
JP 2009-510485 A	12 March 2009	US 2007/0231794 A1 entire text, all drawings WO 2008/051196 A2 EP 1951913 A2 CN 101400800 A
WO 2020/054300 A1	19 March 2020	JP 2020-41909 A

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/004922

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/28(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 21/05(2006.01)i; G01N 21/78(2006.01)i
FI: G01N21/05; G01N21/78 Z; C12Q1/28; G01N33/543 551A

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））

G01N21/05; G01N21/78; C12Q1/28; G01N33/543

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS

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	関連する請求項の番号
Y	清水慎一 他，ジフェニルエーテル系除草剤の代謝物の定量分析を目的としたポリアニリン生成に基づくフロー吸光ELISA法の開発，日本分析化学会第67年会講演要旨集，日本分析化学会，2018.08.29 目的，実験，考察，図1	1-3
Y	MOLAEI RAD, A. et al., Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2006.12.20, Vol.362/No.1, p.38-43 Abstract, Materials an methods, Results	1-3
A	JP 2009-031024 A (株式会社フロンティア研究所) 12.02.2009 (2009-02-12) [0043]-[0045]	1-3
A	JP 2007-147539 A (株式会社日立製作所) 14.06.2007 (2007-06-14) 全文，全図	1-3
A	JP 2009-510485 A (コンビマトリックス・コーポレイション) 12.03.2009 (2009-03-12) 全文，全図	1-3

☑ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
15.04.2021	11.05.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
西浦　昌哉 2J 5704

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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	関連する請求項の番号
P, A	WO 2020/054300 A1 (国立大学法人九州大学) 19.03.2020 (2020-03-19) 全文, 全図	1-3

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/004922

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2009-031024 A	12.02.2009	（ファミリーなし）	
JP 2007-147539 A	14.06.2007	（ファミリーなし）	
JP 2009-510485 A	12.03.2009	US 2007/0231794 A1 全文，全図 WO 2008/051196 A2 EP 1951913 A2 CN 101400800 A	
WO 2020/054300 A1	19.03.2020	JP 2020-41909 A	