

(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  
2025年1月30日(30.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/023240 A1

(51) 国際特許分類:

CI2Q 1/32 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
CI2M 1/34 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)  
CI2N 9/02 (2006.01)

LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/026307

(22) 国際出願日: 2024年7月23日(23.07.2024)

(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 2023-119555 2023年7月24日(24.07.2023) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 阿部 義彦 (ABE Yoshihiko); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

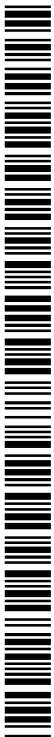
一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: DRY ANALYSIS ELEMENT FOR BILE ACID ANALYSIS AND METHOD FOR MEASURING BILE ACIDS

(54) 発明の名称: 胆汁酸分析用乾式分析要素および胆汁酸の測定方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a simple and inexpensive dry analysis element for bile acid analysis that can be used as a quantitative reagent for bile acid levels, not limited to sulfuric acid conjugates; and a method for measuring bile acids using the dry analysis element for bile acid analysis. Provided according to the present invention is a dry analysis element for bile acid analysis in which at least one water-soluble polymer layer and at least one development layer are provided in the stated order on a support, at least one of the water-soluble polymer layer and the development layer containing 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, thionicotinamide coenzyme, reduced nicotinamide coenzyme, and a buffer.

(57) 要約: 本発明の課題は、簡易で安価であり、しかも硫酸抱合型に限定せずに胆汁酸量の定量試薬として用いることが可能な胆汁酸分析用乾式分析要素、および上記胆汁酸分析用乾式分析要素を用いた胆汁酸の測定方法を提供することである。本発明によれば、支持体上に少なくとも一つの水溶性ポリマー層および少なくとも一つの展開層がこの順に設けられた乾式分析要素であり、上記水溶性ポリマー層および上記展開層の少なくとも一方が3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、チオニコチンアミド補酵素、還元型ニコチンアミド補酵素および緩衝剤を含む胆汁酸分析用乾式分析要素が提供される。



WO 2025/023240 A1

## 明 細 書

発明の名称：胆汁酸分析用乾式分析要素および胆汁酸の測定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、 $3\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、チオニコチンアミド補酵素および還元型ニコチンアミド補酵素を用いた胆汁酸分析用乾式分析要素および胆汁酸の測定方法に関する。

### 背景技術

[0002] 胆汁酸は、肝臓においてコレステロールの酸化反応により合成される。合成された胆汁酸はタウリンやグリシンや硫酸やグルクロン酸によって抱合を受け、様々な構造体となる。こうして合成された胆汁酸は、胆嚢に蓄えられ濃縮される。胆汁酸は、界面活性剤として作用するため、脂肪の吸収促進作用や細菌の殺菌作用や、コレステロール代謝調節などの役割を担っている。

[0003] 胆汁酸を肝臓や胆道系疾患のスクリーニングとして測定する臨床的意義は高く、一般に体液、例えば血液(全血、血漿、血清)、髄液、リンパ液、唾液、尿の測定が行われるが、肝臓の疾患や胆道系の疾患により胆汁酸が血液中に放出されることから、血液中の胆汁酸濃度の測定は肝機能検査に有用である。

[0004] 胆汁酸の測定は溶液中の測定方法(溶液法)で、酵素的サイクリングを用いて測定を行う方法が知られており、特許文献1には、 $3\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(以下「 $3\alpha$ -HSD」とも称す)と、補酵素として還元型ニコチンアミド補酵素類(以下「NADH類」と称す)、およびチオニコチンアミド補酵素(thio-NAD)(またはthio-NADP)を反応させて、生成するチオNADH類量を測定する方法が開示されている。一方、特許文献2には、硫酸抱合型胆汁酸のドライケミストリー試薬が記載されている。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開平3－224498号公報

特許文献2：特開平8－131193号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献1に記載の溶液法による胆汁酸の測定は、色素濃度で胆汁酸の量を定量するために、測定前に専用のキャリブレーションでキャリブレーション等の操作を行う必要があり、給水排水などの配管設備が必要となり大型で高価な測定装置が必要とされる。したがって、簡便で安価な胆汁酸の測定試薬の開発が望まれている。

[0007] しかしながら、特許文献2に記載の方法では、「硫酸抱合型」に限定しており、この「硫酸抱合型胆汁酸」は肝臓で合成されて主に尿中に排泄されるとされている。硫酸抱合型胆汁酸の測定は肝硬変等の疾患の検査に有用であるが、血中に存在する割合は血中胆汁酸全体の数%と指摘されており、急性肝炎、慢性肝疾患等の肝機能や腸管吸収検査には、硫酸抱合型胆汁酸以外の胆汁酸の検査が重要となる。さらに、特許文献2に記載の方法は、「硫酸抱合型胆汁酸」の定性測定には有望であるが、「硫酸抱合型胆汁酸」の量に対する検出するシグナル濃度の線形性（直線性）に乏しく定量試薬として用いることも困難であった。

[0008] 本発明は、簡易で安価であり、しかも硫酸抱合型に限定せずに胆汁酸量の定量試薬として用いることが可能な胆汁酸分析用乾式分析要素、および上記胆汁酸分析用乾式分析要素を用いた胆汁酸の測定方法を提供することを解決すべき課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、支持体上に少なくとも一つの水溶性ポリマー層および少なくとも一つの展開層がこの順に設けられ、かつこの水溶性ポリマー層および展開層の少なくとも一方が、 $3\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、チオニコチンアミド補酵素（ $\text{thio-NAD}$ ）、還元型ニコチンアミド補酵素（ $\text{NADH}$ ）および緩衝剤

を含む胆汁酸分析用乾式分析要素によって、給水排水設備が必要なく、しかも胆汁酸量の定量試薬として用いることが可能なドライケミストリー試薬を提供することができることを見出した。本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。本発明によれば、以下の発明が提供される。

- [0010] <1> 支持体上に少なくとも一つの水溶性ポリマー層および少なくとも一つの展開層がこの順に設けられた乾式分析要素であり、  
上記水溶性ポリマー層および上記展開層の少なくとも一方が3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、チオニコチンアミド補酵素、還元型ニコチンアミド補酵素および緩衝剤を含む胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <2> 上記水溶性ポリマー層が、ゼラチン層である、<1>に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <3> 上記緩衝剤が、pH 6.0~10.0の領域に緩衝能を有する緩衝剤である、<1>または<2>に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <4> 上記緩衝剤が、トリスヒドロキシアミノメタン、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン、またはグリシンである、<1>から<3>の何れかーに記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <5> チオニコチンアミド補酵素がチオNADであり、還元型ニコチンアミド補酵素がNADHである、<1>から<4>の何れかーに記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <6> チオニコチンアミド補酵素の含有量が、0.05~0.6 g/m<sup>2</sup>である、<1>から<5>の何れかーに記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <7> 還元型ニコチンアミド補酵素の含有量が、0.05~0.6 g/m<sup>2</sup>である、<1>から<6>の何れかーに記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <8> 3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの含有量が、3.0~12.0 KU/m<sup>2</sup>である、<1>から<7>の何れかーに記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- <9> <1>から<8>の何れかーに記載の胆汁酸分析用乾式分析要素に

、胆汁酸含有試料を点着し、発色を測定することを含む、胆汁酸の測定方法。

## 発明の効果

[0011] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素および胆汁酸の測定方法によれば、給水排水設備が必要なく、しかも胆汁酸量の定量試薬として用いることが可能なドライケミストリー試薬を提供することが可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、実施例1における胆汁酸濃度に対する $\Delta OD/min$ 値の関係を示す。

[図2]図2は、実施例2における胆汁酸濃度に対する $\Delta OD/min$ 値の関係を示す。

[図3]図3は、実施例3における胆汁酸濃度に対する $\Delta OD/min$ 値の関係を示す。

[図4]図4は、実施例4における胆汁酸濃度に対する $\Delta OD/min$ 値の関係を示す。

[図5]図5は、実施例5における胆汁酸濃度に対する $\Delta OD/min$ 値の関係を示す。

[図6]図6は、実施例6における胆汁酸濃度に対する $\Delta OD/min$ 値の関係を示す。

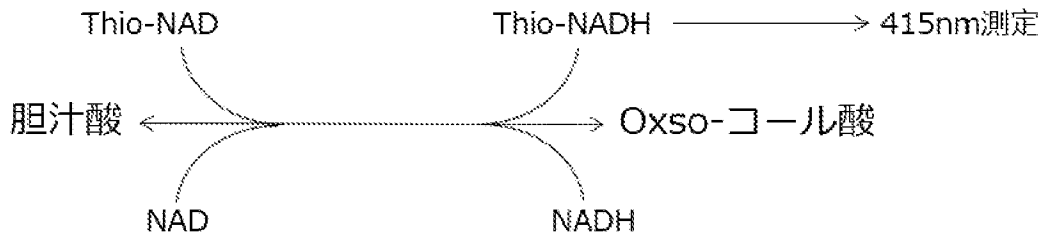
## 発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を意味する。

[0014] 本発明は、支持体上に少なくとも一つの水性ポリマー層および少なくとも一つの展開層がこの順に設けられた乾式分析要素であり、上記水性ポリマー層および上記展開層の少なくとも一方が $3\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、チオニコチンアミド補酵素、還元型ニコチンアミド補酵素および緩衝剤を含む胆汁酸分析用乾式分析要素に関する。

[0015] [化1]



[0016] 本発明の方法は、 $3\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ ( $3\alpha$ -HSD) が触媒として作用する反応系を利用する。上記に示すように、胆汁酸が存在すると、チオニコチンアミド補酵素 (thio-NAD) および還元型ニコチンアミド補酵素 (NADH) がそれぞれ、還元型チオニコチンアミド補酵素 (thio-NADH) およびニコチンアミド補酵素 (NAD) に変化する。上記の反応系では、thio-NADHの発色が、胆汁酸の反応量に相関することから、thio-NADHの発色を測定することにより、胆汁酸の量が定量可能となる。したがって、 $3\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ量 ( $3\alpha$ -HSD) を調整すれば、アナライトである胆汁酸量に応じ、アナライト量の反応速度が変動するため、レート法若しくは決まった時間の発色量 (OD) に差が生じることになる。このようにして、胆汁酸の定量が可能になる。

[0017] 本発明で用いられる水溶性ポリマー層とは、支持体上に有する水溶性のポリマーを含有する層を表す。水溶性ポリマー層は、後述する展開層に点着された胆汁酸を有する検体を水溶性ポリマー層が引き込むことで、検体を実質的に均一に分析要素中に広げる役割を果たす。水溶性ポリマー層が含む好ましい水溶性ポリマーとしては、ゼラチンが好ましい。即ち、水溶性ポリマー層は、好ましくはゼラチン層である。水溶性ポリマーは、特に膨潤する性能を有する。水溶性ポリマーの使用量は特に制限はないが、 $8.0\text{ g/m}^2$ 以上 $40.0\text{ g/m}^2$ 以下が好ましく、 $15.0\text{ g/m}^2$ 以上 $30.0\text{ g/m}^2$ 以下がより好ましい。

[0018] 本発明で用いられる展開層とは、胆汁酸分析用乾式分析要素の上側表面に点着供給された水性液体試料を、水性液体試料中に含有されている成分を実

質的に偏在させることなしに横方向に広げ、単位面積当たりほぼ一定容量の割合で吸水性の水溶性ポリマーを含む下層に供給する作用（メータリング作用）を有する層である。

[0019] 本発明で用いられる展開層としては、例えば、特開昭55-164356、特開昭57-66359等に記載の織物展開層（例えば、ブロード、ポプリン等の平織物）、特開昭60-222769等に記載の編み物展開層（例えば、トリコット編み物布地、ダブルトリコット編み物布地、ミラニーズ編み物布地等）、特開昭57-148250に記載の有機ポリマー繊維パルプ含有抄造紙からなる展開層、特公昭53-21677、米国特許第3,992,158等に記載のメンブランフィルタ（ブラッシュポリマー層）、ポリマーマイクロビーズ、ガラスマイクロビーズ、珪藻土が水溶性ポリマーバインダーに保持されてなる連続微空隙含有多孔性層等の非繊維等方的多孔性展開層、特開昭55-90859に記載のポリマーマイクロビーズが水で膨潤しないポリマー接着剤で点接触状に接着されてなる連続微空隙含有多孔性層（三次元格子状粒状構造物層）からなる非繊維等方的多孔性展開層等を用いることができる。展開層としては、編み物展開層（例えば、トリコット編み物布地、ダブルトリコット編み物布地、ミラニーズ編み物布地等）が好ましい。

[0020] また、支持体とその上に設ける層との間、並びに支持体の上に設けられる各層の間には、接着層などの中間層を設けることもできる。

[0021] 支持体としては、水不透過性支持体が好ましい。水不透過性支持体の材料としては、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例えば、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等）等のポリマーが好ましく、ポリエチレンテレフタレートが特に好ましい。支持体としては、厚さ約50 $\mu$ mから約1mm、好ましくは約80 $\mu$ mから約300 $\mu$ mの範囲の透明な、例えば、波長約200nmから約900nmの範囲内の少なくとも一部の範囲の波長の電磁放射線を透過させる、平滑平面状の支持体を用いることができる。支持体の表面には公知の下塗層または接

着層を設けて中間層との接着を強固にすることができる。

- [0022] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素は、水溶性ポリマー層および展開層の少なくとも一方が3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3 $\alpha$ -HSD）を含む。3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼとは、3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドを酸化する酵素であり、共役酵素である。3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3 $\alpha$ -HSD）の含有量としては、感度確保のために、3.0~12.0 KU/m<sup>2</sup>が好ましく、4.0~8.0 KU/m<sup>2</sup>がより好ましい。
- [0023] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素は、（酸化型）チオニコチンアミド補酵素を含む。（酸化型）チオニコチンアミド補酵素とは、ニコチンアミド補酵素と同様に各種酸化還元酵素と結合して働き、生体内の水素伝達に関わる補酵素であり、具体的にはチオNADまたはチオNADPを意味する。（酸化型）チオニコチンアミド補酵素の含有量としては、感度確保のために、0.05~1.0 g/m<sup>2</sup>が好ましく、0.05~0.6 g/m<sup>2</sup>がより好ましく、0.1~0.5 g/m<sup>2</sup>がさらに好ましい。（酸化型）チオニコチンアミド補酵素の含有量は、0.6 g/m<sup>2</sup>以下であるとバックグラウンドが低下するので好ましい。
- [0024] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素は、還元型ニコチンアミド補酵素を含む。還元型ニコチンアミド補酵素とは、様々な脱水素酵素の補酵素であり、具体的にはNADHまたはNADPHを意味する。還元型ニコチンアミド補酵素の使用量としては、感度確保のために、0.05~1.0 g/m<sup>2</sup>が好ましく、0.05~0.6 g/m<sup>2</sup>がより好ましく、0.1~0.5 g/m<sup>2</sup>がさらに好ましい。還元型ニコチンアミド補酵素の含有量は、0.6 g/m<sup>2</sup>以下であるとバックグラウンドが低下するので好ましい。
- [0025] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素は、緩衝剤を含む。
- 緩衝剤は、好ましくはpH 6.0~10.0の領域に緩衝能を有する緩衝剤であり、より好ましくはpH 7.0~9.0の領域に緩衝能を有する緩衝剤である。

[0026] 緩衝剤の種類としてはトリスヒドロキシアミノメタン、グリシン、リン酸塩、グッド (good) の緩衝剤など公知の緩衝剤をあげることができる。緩衝剤は、好ましくは、トリスヒドロキシアミノメタン (Trisとも言う)、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPESとも言う)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン (Tricineとも言う)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン (Bicineとも言う)、またはグリシンである。緩衝剤は、より好ましくは、トリスヒドロキシアミノメタン、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン、またはグリシンである。

[0027] 緩衝剤の含有量としては、検体のpHに影響を受けなければ特に制限はないが、1.0~10.0 g/m<sup>2</sup>が好ましく、3.0~8.0 g/m<sup>2</sup>がより好ましい。

[0028] 本発明においては、水溶性ポリマー層および展開層の少なくともいずれか一方に、3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3 $\alpha$ -HSD)、チオニコチンアミド補酵素、還元型ニコチンアミド補酵素、および緩衝剤を含むことで、胆汁酸量の定量が可能となる。即ち、3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、(酸化型)チオニコチンアミド補酵素、還元型ニコチンアミド補酵素、および緩衝剤は、水溶性ポリマー層に含まれていてもよく、展開層に含まれていてもよく、または水溶性ポリマー層および展開層の両方にも含まれていてもよい。より好ましくは、これらを展開層中に含む構成が好ましい。

[0029] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素は、更に、試薬層、反射層、光遮蔽層、濾過層、下塗り層、その他の層を含んだ分析要素でもよい。かような分析要素には米国特許第3992158号および米国特許第4042335号各明細書に開示のものがあるが、本発明の好ましい構成としては、光透過性-水不透過性の支持体上に、吸水機能を有する水溶性ポリマー層、および検体を横方向に広げる展開層を順次積層一体化して作製した一体型多層分析要素

が好ましい。

[0030] 本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素は、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、支持体上に、中間層塗布液として調合した塗布液を塗布して乾燥し、40 $\mu$ m厚程度の乾燥膜を作製し、その後、展開層の織布を貼合したものを作製する。その後、展開層の織布側から、試薬保持層液として調合した塗布液を塗布して乾燥することによって胆汁酸分析用乾式分析要素を作製することができる。胆汁酸分析用乾式分析要素は一辺約15mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの同形等の小片に裁断し、特公昭57-28331、実開昭56-142454、特開昭57-63452、実開昭58-32350、特表昭58-501144等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることが、製造、包装、輸送、保存、測定操作等諸種の観点から好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いること、または小片を開口のあるカードに貼付または収めて用いることなどもできる。

[0031] 本発明によれば、本発明の胆汁酸分析用乾式分析要素に、胆汁酸含有試料を点着し、発色を測定することを含む、胆汁酸の測定方法が提供される。

[0032] 例えば、約5 $\mu$ Lから約30 $\mu$ L、好ましくは約8 $\mu$ Lから約15 $\mu$ Lの範囲の全血、血漿、血清、リンパ液、尿等の水性液体試料を展開層に点着し、約20 $^{\circ}$ Cから約40 $^{\circ}$ Cの範囲の実質的に一定の温度で、好ましくは37 $^{\circ}$ C近傍の実質的に一定の温度で約1分から約10分、好ましくは約2分から約7分の範囲でインキュベーションし、支持体側から、胆汁酸分析用乾式分析要素内の色変化、発色などの検出可能な変化を反射測光し、比色測定法の原理により液体試料中の胆汁酸の含有量を求めることができる。本発明においては、胆汁酸の吸収極大波長またはその近傍の波長の光を用いて展開層の光学濃度を反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により液体試料中の胆汁酸含有量を求めることができる。点着する水性液体試料の量、インキュベーション時間と温度を一定にすることにより胆汁酸の定量分析を高精度で実施できる。測定操作は特開昭60-125543、特開昭6

0-220862、特開昭61-294367、特開昭58-161867等に記載の化学分析装置により極めて容易な操作で高精度の定量分析を実施できる。

[0033] 次に、本発明について実施例を挙げて説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

## 実施例

[0034] <実施例1>

(1) 塗布膜および乾燥スライドの作製

ゼラチン下塗りされている平滑な180 $\mu$ mの無色透明なポリエチレンテレフタレート(PET)フィルムに下記組成-1の水溶液を、乾燥後の厚さが40 $\mu$ mになるように塗布し乾燥して、吸水層を設けた。

[0035] 吸水層(組成-1)

ゼラチン17g/m<sup>2</sup>

界面活性剤0.2g/m<sup>2</sup>

ここで、界面活性剤は、ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンニルフェニルエーテル(Surfactant 10G, オーリン社製)を用いた。

[0036] 次に、上記フィルムの前面に約30g/m<sup>2</sup>の供給量で水を供給して湿潤させた後、軽く圧力をかけながら50デニール相当のポリエステル紡績糸トリコット編み物布地を湿式ラミネート法を用いて貼り合わせて展開層を設けた。

[0037] 次に、上記展開層の上に、下記組成の水溶液Aを各々の各成分が下記の量となるように塗布し、乾燥させて、本発明に係る胆汁酸分析用乾式分析要素を作製した。

[0038] 水溶液A

3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 $\alpha$ -HSD)(東洋紡社製)6.4KU/m<sup>2</sup>

チオ-NAD(オリエンタル酵母工業社製)0.32g/m<sup>2</sup>

NADH(オリエンタル酵母工業社製)0.32g/m<sup>2</sup>

トリスヒドロキシアミノメタン（富士フィルム和光純薬社製） $8.7 \text{ g/m}^2$   
 ポリビニルピロリドン（BASF社製） $10.9 \text{ g/m}^2$

[0039] 上記の胆汁酸分析用乾式分析要素を $12 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$ の大きさに裁断し、特開昭57-63452号公報に記載された方法に従ってスライドを調製し、胆汁酸分析用の乾式分析スライド（1）を作製した。

[0040] （2）胆汁酸濃度の測定

胆汁酸濃度が、 $48.9 \mu\text{mol/L}$ 、 $117.8 \mu\text{mol/L}$ 、 $185.8 \mu\text{mol/L}$ の濃度になるように調製したヒトプール血清検体と、胆汁酸濃度がゼロである測定試薬として7%HSA（ヒト血清アルブミン）水溶液とを準備し、上記実施例1で準備した乾式分析スライド（1）に、それぞれ $10 \mu\text{L}$ 点着し、 $37^\circ\text{C}$ に保温したまま、3分間にわたり、10秒おきに $415 \text{ nm}$ における反射濃度を富士ドライケム7000アナライザー（富士フィルム社製）により測定した。

[0041] 胆汁酸の濃度と、測定時間が $60 \text{ sec} \sim 180 \text{ sec}$ の間に上昇する反射濃度における1分あたりの反射濃度の変化量（ $\Delta\text{OD}/\text{min}$ ）とを表1にまとめ、胆汁酸の濃度を横軸にとり、 $\Delta\text{OD}$ 値を縦軸にとった胆汁酸濃度に対する $\Delta\text{OD}/\text{min}$ 値の関係を図1に示した。

[0042] [表1]

胆汁酸( $\mu\text{mol/L}$ )	$\Delta\text{OD}/\text{min}$
0	-0.0023
48.9	0.038
117.8	0.0724
185.8	0.1227

[0043] <実施例2>

（1）塗布膜および乾燥スライドの作製

ゼラチン下塗りされている平滑な $180 \mu\text{m}$ の無色透明なPETフィルムに下記組成-2の水溶液を、乾燥後の厚さが $40 \mu\text{m}$ になるように塗布し乾燥して、吸水層を設けた。

## [0044] 吸水層（組成－２）

ポリビニルアルコール 23 g / m<sup>2</sup>

界面活性剤 0.2 g / m<sup>2</sup>

ここで、界面活性剤は、ポリオキシ（２－ヒドロキシ）プロピレンノニルフェニルエーテル（Surfactant 10G, オーリン社製）を用いた。

[0045] 次に、実施例 1 記載と同様の方法で、約 50 デニール相当のポリエステル紡績糸トリコット編み物布地を湿式ラミネート法を用いて貼り合わせて展開層を設けた。

また、上記展開層の上に、実施例 1 に記載した水溶液 A を実施例 1 と同量となるように塗布し、乾燥させて、本発明に係る胆汁酸分析用の乾式分析スライド（２）を作製した。

## [0046] （２）胆汁酸濃度の測定

胆汁酸濃度が、48.9 μmol / L、117.8 μmol / L、185.8 μmol / L の濃度になるように調製したヒトプール血清検体と、胆汁酸濃度がゼロである測定試薬として 7% HSA 水溶液とを準備し、上記実施例 2 で準備した乾式分析スライド（２）に、それぞれ 10 μL 点着し、37 °C に保温したまま、3 分間にわたり、10 秒おきに 415 nm における反射濃度を富士ドライケム 7000 アナライザー（富士フイルム社製）により測定した。

[0047] 胆汁酸の濃度と、測定時間が 60 sec ~ 180 sec の間に上昇する反射濃度における 1 分あたりの反射濃度の変化量（ΔOD / min）とを表 2 にまとめ、胆汁酸の濃度を横軸にとり、ΔOD 値を縦軸にとった胆汁酸濃度に対する ΔOD / min 値の関係を図 2 に示した。

## [0048] [表 2]

胆汁酸(μmol/L)	ΔOD/min
0	-0.0059
48.9	0.0135
117.8	0.0256
185.8	0.0304

[0049] 実施例1および実施例2の結果より、胆汁酸分析用乾式分析要素としていずれも良好な直線性があり、胆汁酸を定量的に測定しうる検査薬として十分な性能を示すことがわかる。乾式分析要素中の吸水層として、ゼラチンを用いることにより、より大きなシグナル／ノイズ比（S／N）が獲得できることより、ゼラチンを用いることがより好ましい。

[0050] <実施例3～6>

緩衝剤として下記の水準を調製し、スライド化して確認した。

実施例1の水溶液Aを用いた再度の実験（実施例3）と、実施例3におけるトリスヒドロキシアミノメタン（Tris）を、HEPES（実施例4）、Tricine（実施例5）、Glycine（実施例6）に変更して、実施例1と同様に乾式分析スライドを作製した。実施例1と同様に、胆汁酸濃度（溶液法測定値）が、 $0\mu\text{mol/L}$ 、 $118\mu\text{mol/L}$ 、または $186\mu\text{mol/L}$ となるように、ヒトプール血清検体を調製し、上記の緩衝液を用いた乾式分析スライドに、それぞれ $10\mu\text{L}$ 点着し、 $37^\circ\text{C}$ に保温したまま、3分間にわたり、10秒おきに $415\text{nm}$ における反射濃度を富士ドライケム7000アナライザー（富士フイルム社製）により測定した。検体数は $N=2$ とした。

[0051] 胆汁酸の濃度と、測定時間が $60\text{sec}\sim 180\text{sec}$ の間に上昇する反射濃度における1分あたりの反射濃度の変化量（ $\Delta\text{OD}/\text{min}$ ）とを表3にまとめ、胆汁酸の濃度を横軸にとり、 $\Delta\text{OD}$ 値を縦軸にとった胆汁酸濃度に対する $\Delta\text{OD}/\text{min}$ 値の関係を図3～図6に示した。

[0052] [表3]

	Tris	HEPES	Tricine	Glycine
胆汁酸( $\mu\text{mol/L}$ )	$\Delta\text{OD}/\text{min}$	$\Delta\text{OD}/\text{min}$	$\Delta\text{OD}/\text{min}$	$\Delta\text{OD}/\text{min}$
0	0.001	0.000	0.002	0.002
118	0.095	0.091	0.099	0.098
186	0.130	0.124	0.127	0.124

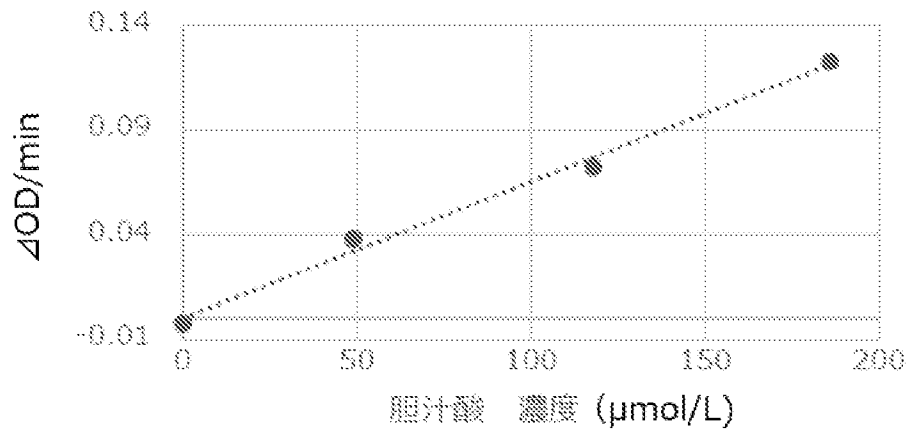
[0053] 実施例3～6の結果より、胆汁酸分析用乾式分析要素としていずれも良好

な直線性があり、胆汁酸を定量的に測定しうる検査薬として十分な性能を示すことがわかる。

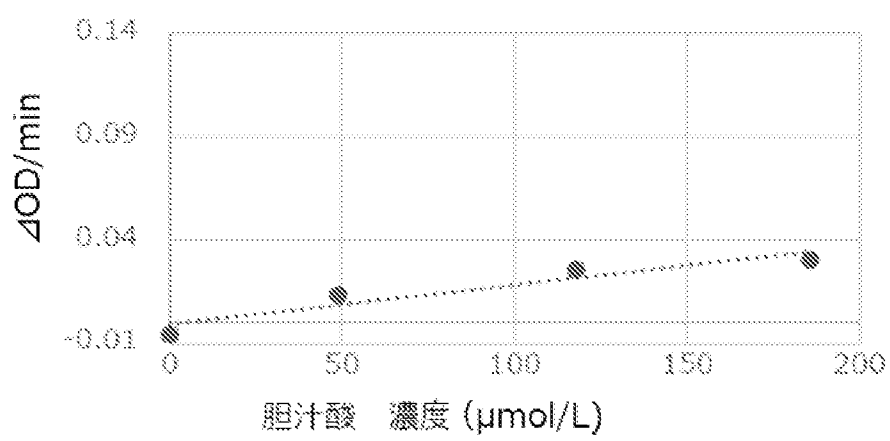
## 請求の範囲

- [請求項1] 支持体上に少なくとも一つの水溶性ポリマー層および少なくとも一つの展開層がこの順に設けられた乾式分析要素であり、前記水溶性ポリマー層および前記展開層の少なくとも一方が3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、チオニコチンアミド補酵素、還元型ニコチンアミド補酵素および緩衝剤を含む胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項2] 前記水溶性ポリマー層が、ゼラチン層である、請求項1に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項3] 前記緩衝剤が、pH6.0～10.0の領域に緩衝能を有する緩衝剤である、請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項4] 前記緩衝剤が、トリスヒドロキシアミノメタン、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン、またはグリシンである、請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項5] チオニコチンアミド補酵素がチオNADであり、還元型ニコチンアミド補酵素がNADHである、請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項6] チオニコチンアミド補酵素の含有量が、0.05～0.6g/m<sup>2</sup>である、請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項7] 還元型ニコチンアミド補酵素の含有量が、0.05～0.6g/m<sup>2</sup>である、請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項8] 3 $\alpha$ ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの含有量が、3.0～12.0KU/m<sup>2</sup>である、請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素。
- [請求項9] 請求項1または2に記載の胆汁酸分析用乾式分析要素に、胆汁酸含有試料を点着し、発色を測定することを含む、胆汁酸の測定方法。

[図1]

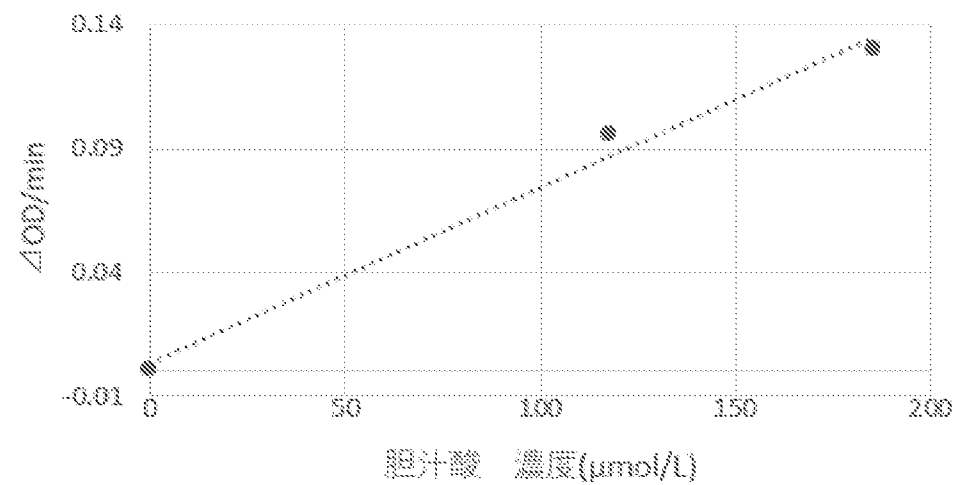


[図2]



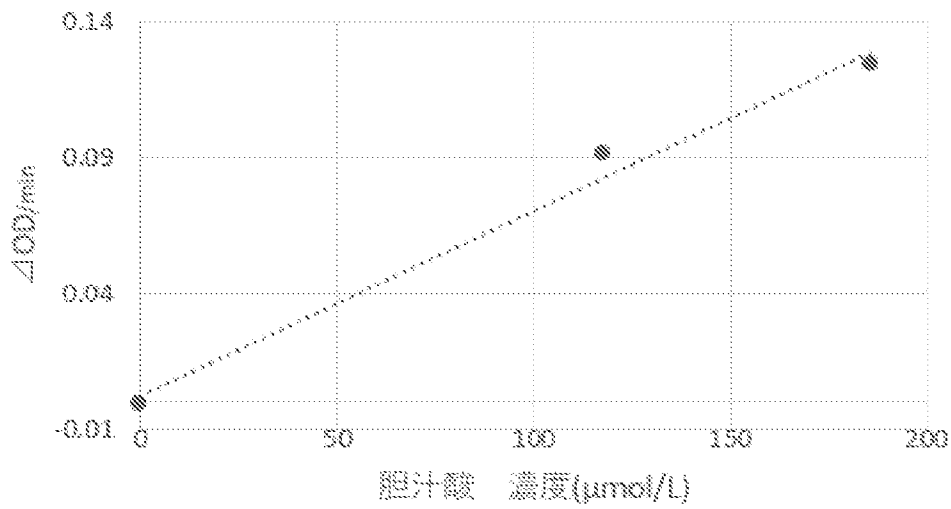
[図3]

Tris 0.1mol/L(pH8.0)



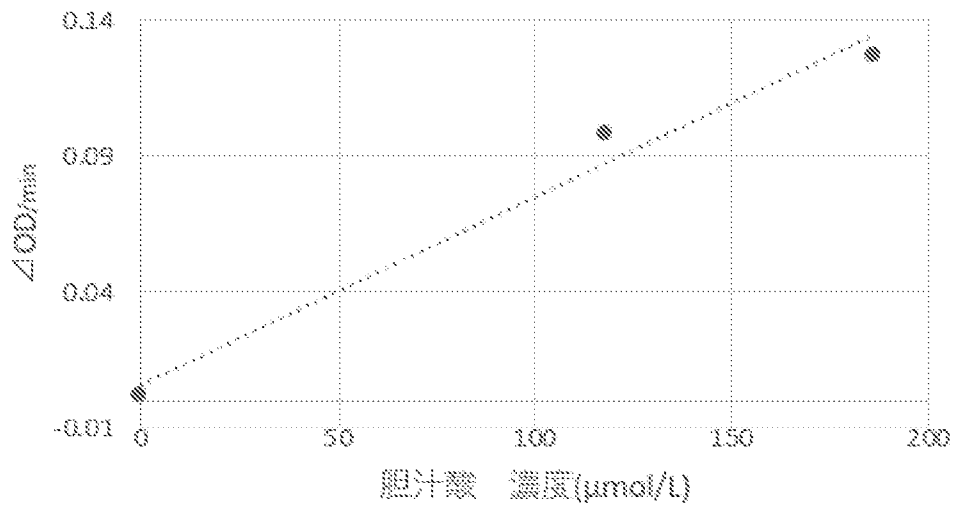
[図4]

HEPES 0.1mol/L(pH8.0)



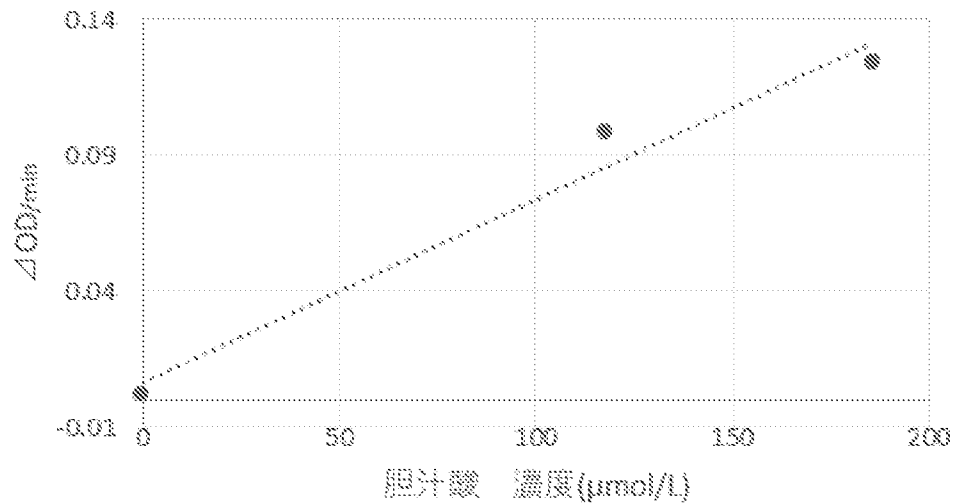
[図5]

Tricine 0.1mol/L(pH8.0)



[図6]

Glycine 0.1mol/L(pH8.0)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2024/026307**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12Q 1/32</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/34</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/02</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/50</i> (2006.01)n; <i>G01N 33/52</i> (2006.01)n FI: C12Q1/32; C12M1/34 E; C12N9/02; G01N33/50 S; G01N33/52 B		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/32; C12M1/34; C12N9/02; G01N33/50; G01N33/52		
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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 3-224498 A (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) 03 October 1991 (1991-10-03) claims 1, 4, page 5, lower left column to lower right column, page 8, upper left column, examples	1-9
Y	JP 8-131193 A (KDK CORP.) 28 May 1996 (1996-05-28) claims 1, 3, paragraphs [0004]-[0005], [0011]-[0013], [0015], [0017], examples	1-9
Y	JP 57-066359 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) 22 April 1982 (1982-04-22) page 4, upper right column to lower left column	2-9
A	JP 62-285799 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 11 December 1987 (1987-12-11) claims 9, page 2, lower right column to page 3, upper left column	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>13 August 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>27 August 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2024/026307</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 3-224498 A	03 October 1991	FR 2655352 A1 claims 1, 4, page 12, page 14, examples	
JP 8-131193 A	28 May 1996	US 5776779 A claims 1, 3, column 1, lines 41-67, column 2, line 58 - column 3, line 43, examples	
		EP 781852 A1	
JP 57-066359 A	22 April 1982	US 4783315 A column 5, lines 35-48	
JP 62-285799 A	11 December 1987	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/32(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)n; G01N 33/52(2006.01)n FI: C12Q1/32; C12M1/34 E; C12N9/02; G01N33/50 S; G01N33/52 B		
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）） C12Q1/32; C12M1/34; C12N9/02; G01N33/50; G01N33/52		
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 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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	JP 3-224498 A (旭化成株式会社) 03.10.1991 (1991-10-03) 特許請求の範囲 1、4、第5ページ左下欄～右下欄、第8ページ左上欄、実施例	1-9
Y	JP 8-131193 A (株式会社京都第一科学) 28.05.1996 (1996-05-28) 請求項 1、3、段落 0004-0005、0011-0013、0015、0017、実施例	1-9
Y	JP 57-066359 A (富士写真フイルム株式会社) 22.04.1982 (1982-04-22) 第4ページ右上欄～左下欄	2-9
A	JP 62-285799 A (積水化学工業株式会社) 11.12.1987 (1987-12-11) 特許請求の範囲 9、第2ページ右下欄～第3ページ左上欄	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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 13.08.2024	国際調査報告の発送日 27.08.2024	
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） 天野 皓己 4N 5084 電話番号 03-3581-1101 内線 3891	

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/JP2024/026307

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 3-224498 A	03.10.1991	FR 2655352 A1 Claims 1, 4, P12, P14, Examples	
JP 8-131193 A	28.05.1996	US 5776779 A Claims 1, 3, Column 1 L41-67, Column 2 L58- Column 3 L43, Examples EP 781852 A1	
JP 57-066359 A	22.04.1982	US 4783315 A Column 5 L35-48	
JP 62-285799 A	11.12.1987	(ファミリーなし)	