

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6053781号
(P6053781)

(45) 発行日 平成28年12月27日(2016.12.27)

(24) 登録日 平成28年12月9日(2016.12.9)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543

5 2 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53

U

GO 1 N 33/543

5 0 1 D

請求項の数 16 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2014-520730 (P2014-520730)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月19日 (2012.7.19)
 (65) 公表番号 特表2014-521102 (P2014-521102A)
 (43) 公表日 平成26年8月25日 (2014.8.25)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2012/051733
 (87) 國際公開番号 WO2013/011323
 (87) 國際公開日 平成25年1月24日 (2013.1.24)
 審査請求日 平成27年4月28日 (2015.4.28)
 (31) 優先権主張番号 1112395.7
 (32) 優先日 平成23年7月19日 (2011.7.19)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 514016832
 ザバイオナノセンター リミテッド
 イギリス NW1 3 BT ロンドン ユ
 ーストン ロード 338
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (72) 発明者 キャス, アントニー エドワード ジョー
 ジ
 イギリス NW1 3 BT ロンドン ユ
 ーストン ロード 338 バイオナノ
 コンサルティング

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ラテラルフローアフィニティーアッセイ用の装置及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 固相 ; 及び

(i i) 検出器

を含む、サンプル中の抗原を定量分析するための装置であって、
前記固相の表面が、

(a) サンプルがアプライされる第 1 の位置 ; 及び

(b) 前記第 1 の位置から離れた第 2 の位置

を含み、

前記抗原に結合する、封入レドックスプローブを放出できる第 1 の抗体が、前記第 1 の位置に沈着されているか、前記固相へのアプライ前にサンプルに添加され、

前記抗原に結合する第 2 の抗体が、前記第 2 の位置に固定化されており、

酵素が、前記第 2 の位置で固定化されて前記固定化抗体と共に局在しており、

前記検出器が、前記第 2 の位置の前記固定化抗体に近接して配置されている、装置であつて、

前記酵素の基質が、サンプル中に通常存在するものであるか、前記固相へのアプライ前にサンプルに添加されるか、サンプルアプライ前に前記固相上の前記第 1 の位置に沈着され、

前記酵素と前記基質との相互作用により、前記第 1 の抗体から前記レドックスプローブが放出される pH 变化が生じる、装置。

10

20

【請求項 2】

前記検出器による前記レドックスプローブの検出を前記サンプル中の抗原濃度の値へと変換するための手段を更に含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記検出器が電極である、請求項 1 又は 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記酵素がウレアーゼであり、前記基質が尿素である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 5】

前記固相がラテラルフローメンブレンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の装置。 10

【請求項 6】

基質含有サンプル中の標的抗原を定量的に検出する方法であって、

a) 封入レドックスプローブを放出できる第 1 の可溶性標識抗体及び第 2 の可溶性標識抗体をサンプルに溶解させて免疫複合体を形成させるステップ；

b) ステップ a) で形成された前記免疫複合体を固相にアプライするステップであって、表面が、

i) 前記免疫複合体がアプライされる第 1 の位置、及び

i i) 前記第 1 の位置から離れた第 2 の位置

を含み、

前記第 2 の抗体に結合する分子が、前記第 2 の位置に固定化されており、酵素が、前記第 2 の位置で固定化されて前記固定化分子と共に在してあり、検出器が、前記第 2 の位置の前記固定化分子に近接して配置されている、

ステップ；及び

c) 前記免疫複合体が前記第 2 の位置に輸送された時に前記検出器で前記レドックスプローブを検出するステップであって、前記レドックスプローブの検出が前記サンプルの前記標的抗原含有量に比例する、ステップ

を含み、

前記酵素と前記基質との相互作用により、前記第 1 の抗体から前記レドックスプローブが放出される pH 变化が生じる、方法。 30

【請求項 7】

前記第 2 の抗体がビオチンで標識されており、それに結合する、前記第 2 の位置に固定化されている分子がアビジンである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (c) が、局所的 pH 变化及びそれによる生じる前記レドックスプローブの放出による電流又は通過する電荷の変化を前記検出器で検出することを含む、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記レドックスプローブの酸化又は還元による前記電流が前記サンプル中の抗原含有量に比例する、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 10】

前記検出器が電極である、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記電極がスクリーン印刷電極である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記レドックスプローブがポリマー中に封入されている、請求項 6 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ポリマーがアルカリ性条件下で溶解する腸溶性コーティングである、請求項 12 に記載の方法。 50

【請求項 1 4】

前記ポリマーが酸性又はアルカリ性条件下で膨潤する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記サンプルが尿素含有サンプルである、請求項 6 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記酵素がウレアーゼである、請求項 6 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0 0 0 1】**

10

アフィニティーアッセイは、医学、食品、及び環境の研究に広く用いられており、標的分析物に試薬が結合するという原理に基づいている。結合相互作用は、分析物濃度にその大きさが比例する何らかの物理化学的变化によって検出される。多くの異なる試薬、例えば、限定されるものではないが、抗体、その他のタンパク質、核酸、及び合成受容体等が報告されている。

【0 0 0 2】

抗体は試薬として一般的に使用されており、抗体を用いる多くの異なるアッセイフォーマットが報告されている。これらは総称してイムノアッセイと呼ばれる。迅速抗原検査 (point of care test : POCT) に特に適したイムノアッセイの 1 つがラテラルフロー (LF) イムノアッセイ (免疫クロマトグラフィーアッセイともいう) である。

20

【0 0 0 3】

LF イムノアッセイは、抗原検出のための着実で良く確立された技術である。LF イムノアッセイは、テストストリップフォーマットに適するように単一の軸に沿って機能するようになっており、通常、サンドイッチ (2 部位 (two site)) ともいう。試薬過剰又は非競合) フォーマットを用いる。このフォーマットでは、2 種類の抗体の一方が標識され (典型的には色の付いた粒子を用いる) 、LF メンブレン (典型的には、疎水性二トロセルロース又は酢酸セルロースメンブレン) 上で可溶性調製物として乾燥される。この第 1 の抗体はサンプルに溶解する。一方、第 2 の抗体は第 1 の抗体からいくらかの短い距離を置いて LF メンブレンに固定化される。サンプル溶液がキャピラリーフローにより第 1 の抗体を第 2 の抗体に運び、このフロー中に形成される免疫複合体が第 2 の抗体によって捕捉されて可視性のラインが形成される。標識された過剰な第 1 抗体がこの「テストライン」を超えて運ばれ、コントロールラインで反応する。これにより定性的な読み取り値を得られる。

30

【0 0 0 4】

より近年になって、このフォーマットは、ビオチン標識された第 2 の抗体も可溶性にされ、ストレプトアビジンラインで捕捉される前に LF 中に溶液中でサンドイッチ複合体が形成されるように改変された。特許文献 1 は、分析物の第 1 のエピトープと反応した結合メンバー及び標識を含む標識されたコンジュゲート並びに分析物の第 2 のエピトープと反応する部位を有するビオチン化捕捉成分を含む、分析物を検出するデバイスを記載している。

40

【先行技術文献】**【特許文献】****【0 0 0 5】****【特許文献 1】米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 6 7 1 6 6 号明細書****【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 6】**

LF フォーマットの本質的な簡便性及び着実性 (robustness) を維持しつつ、感度を高めるため及び第 2 のラインで免疫複合体の量の数値による定量的読み取り値を得る

50

ために、このアッセイフォーマットを更に改変することが好ましい。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第1の態様では、サンプル中の分析物を定量分析するための装置は、

(i) 固相；及び

(ii) 検出器

を含み、

固相の表面は、

(a) サンプルがアプライされる第1の位置；及び

(b) 第1の位置から離れた第2の位置

を含み、

分析物に結合する、検出可能な分子種を放出できる第1の分子が、固相上に沈着しているか、固相へのアプライ前にサンプルに添加され、

分析物に結合する第2の分子が、第2の位置に固定化されており、

酵素が、第2の位置で固定化されて固定化分子と共に局在しており、

検出器は、第2の位置の固定化分子に近接して配置されている。

【0008】

本発明の第2の態様では、基質含有サンプル中の標的分子を定量的に検出する方法は以下のステップを含む：

a) 検出可能な分子種を放出できる第1の可溶性標識結合分子及び第2の可溶性標識結合分子をサンプルに溶解して複合体を形成させるステップ；

b) ステップa)で形成された複合体を固相にアプライするステップであって、

固相の表面が、

i) 複合体がアプライされる第1の位置；及び

ii) 第1の位置から離れた第2の位置

を含み、第2の標識結合分子に結合する分子が第2の位置に固定化されており、酵素が、第2の位置で固定化されて固定化分子と共に局在しており、検出器が第2の位置の固定化分子に近接して配置されている、

ステップ；及び

c) 検出可能な分子種を検出器で検出するステップであって、

前記分子種の検出が、サンプルの標的分子含有量に比例する、

ステップ。

【0009】

本発明の第3の態様では、本発明の第1の態様に記載の装置が、本発明の第2の態様に係る基質含有サンプル中の標的分子を定量的に検出する方法で使用される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】增幅電気化学的ラテラルフロー(LF)テストストリップの模式図である。

【図2】增幅電気化学反応の模式図である。

【図3】2 mM Tris/HClバッファー溶液中でのウレアーゼと尿素の酵素反応に対するpH変化をグラフで表した図である。

【図4】低緩衝能の溶液(2 mM MgCl₂を添加した2 mM Tris/HClバッファー)中でのピロリン酸とピロホスファーゼの酵素反応に対するpH変化をグラフで表した図である。

【図5】第1の封入(encapsulated)標識の放出に対する局所的pH上昇の影響を示すグラフである。

【図6】第1の標識としてフェロセンカルボン酸の代わりにフェリシアン化カリウムを用いた、図5と同様の影響を示す図である。

【図7】種々の時点におけるポリマービーズからのフェロセンカルボン酸放出に対する電流の発生を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、結合アッセイの感度を上昇させることを目的とし、ラテラルフロー（L F）イムノアッセイとの関連で詳細に説明される。本発明は、免疫複合体形成の視覚的評価を電気化学的測定に置き換えることにより、アッセイフォーマットの簡便さ及び着実性を維持しつつ、サンプル中に存在する免疫複合体の量の数値による定量的な読取値を提供する。

【0012】

これは、例えば、抗体であり得る2種類の結合分子の一方を、テストラインで検出される酸化還元試薬源として機能する粒子で標識することにより達成される。しかし、他のアプローチも効果的であり、そのようなアプローチには、限定されるものではないが、封入表面増強共鳴ラマン散乱（S E R R S）活性色素；蛍光分子とクエンチャーとの封入混合物；及びテストラインで発光させるための封入ルシフェラーゼ基質が含まれる。したがって、本発明はラテラルフロー・アッセイに関連して説明されているが、本発明の範囲はラテラルフロー・アッセイフォーマット又は抗体・抗原相互作用検出に限定されない。

【0013】

第1の態様では、本発明は、

(i) 固相；及び

(i i) 検出器

を含む、サンプル中の分析物を定量分析するための装置であって、

固相の表面が、

(a) サンプルがアプライされる第1の位置；及び

(b) 第1の位置から離れた第2の位置

を含み、

分析物に結合する、検出可能な分子種を放出できる第1の分子が、固相に沈着しているか、固相へのアプライ前にサンプルに添加され、

分析物に結合する第2の分子が、第2の位置に固定化されており、

酵素が、固定化されて第2の位置の固定化されている分子と共に局在しており、

検出器が、第2の位置の固定化分子に近接して配置されている、

装置を提供する。

【0014】

本発明において、「から離れて」という用語は、第2の位置が第1の位置に隣接していないことを意味する。好ましくは、第2の位置は、フローの方向で第1の位置の下流に位置する。

【0015】

本発明において、「近接して（c l o s e p r o x i m i t y）」という用語は、第2の位置での電流又は通過する電荷の変化を検出できるように第2の位置の固定化分子の十分近くに検出器が位置しなければならないことを意味する。好ましくは、検出器は第2の位置の固定化された分子に可能な限り近く配置される。

【0016】

固相は、任意の好適な固体材料又はメンブレン、例えば多孔性及び／又は非多孔性の表面、例えばケイ素、酸化ケイ素、金属及び金属被覆表面、ポリマー及び多糖表面であり得る。好ましくは、固相は、ポリマー系又はセルロース系、例えば疎水性ニトロセルロース又は酢酸セルロースであり得る、好ましくは発色性の媒体を含む、ラテラルフロー（L F）メンブレンである。

【0017】

第2の態様では、本発明は更に、基質含有サンプル中の標的分子を定量的に検出する方法を提供する。方法は以下のステップを含む：

a) 検出可能な分子種を放出できる第1の可溶性標識結合分子及び第2の可溶性標識結合分子をサンプルに溶解させて複合体を形成させるステップ；

10

20

30

40

50

b) ステップ a) で形成された複合体を固相にアプライするステップであって、固相の表面が、

- i) 複合体がアプライされる第 1 の位置；及び
- i i) 第 1 の位置から離れた第 2 の位置、
を含み、

第 2 の標識結合分子に結合する分子が、第 2 の位置に固定化されており、酵素が第 2 の位置で固定化されて固定化分子と共に局在しており、検出器が、第 2 の位置の固定化分子に近接して配置されている、

ステップ；及び

c) 検出可能な分子種を検出器で検出するステップであって、

前記分子種の検出が、サンプル中の標的分子の含有量に比例する、ステップ。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、標的分子は抗原であり、第 1 及び第 2 の標識された結合分子は抗体である。そのような実施形態では、形成される複合体は免疫複合体である。

【 0 0 1 9 】

ステップ(c)は、複合体が第 2 の位置に輸送される時に行われ得る。そのような輸送は、毛細管作用、マイクロフルイディクス、又は電気泳動移動によるものであり得る。

【 0 0 2 0 】

本発明の第 1 の態様に記載した装置は、本発明の第 2 の態様に係る基質含有サンプル中の標的分子を定量的に検出する方法において用いることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の装置及び方法を、表 1 に示す酵素及び基質の組合せで例示する。しかし、その他の多くの組合せも本発明の範囲内であり、それらは酵素学の分野の熟練者には明らかである。

【 0 0 2 2 】

【表 1】

表 1

酵素	基質
ウレアーゼ	尿素
グルコースオキシダーゼ	グルコース
ピロホスファターゼ	ピロリン酸
アルカリホスファターゼ	フェニルリン酸
β-ラクタマーゼ	ペニシリン

【 0 0 2 3 】

本方法では、サンプル中の基質の存在を利用して、第 2 の位置に固定化された対応する酵素の共沈着により、テストラインで局所的に pH を変化させる。当業者に理解されるように、「対応する酵素」という用語は、所与の基質との化学反応を触媒する実体を指す。固相メンブレン及びテストライン（すなわち、第 2 の位置）にアプライされる免疫複合体の組成物の例を図 1 に模式的に示す。

【 0 0 2 4 】

検出可能な分子種を放出できる第 1 の標識は好ましくはレドックスプローブであり、好ましくはポリマー中に封入されている。ポリマーは、pH 变化に晒された時に（典型的にはアルカリ条件下で）溶解する腸溶性コーティング材料であり得、あるいは、pH 变化に応答して膨潤する「スマート」刺激応答性ポリマーであり得る。

【 0 0 2 5 】

好適な腸溶性ポリマーとしては、酢酸フタル酸ポリビニル、ヒドロキシプロピルメチル

10

20

30

40

50

セルロースフタラート、メタクリル酸、トリメリト酸酢酸セルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、及び酢酸コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースが含まれる。

【0026】

好適なpH応答性「スマート」ポリマーとしては、ポリ(プロピルアクリル酸)及びキトサンが含まれる。

【0027】

好適なレドックスプローブは、好ましくは拡散律速的な、速い電子交換を検出器で受け、鉄、オスミウム、銅、及びルテニウムの錯体、並びに有機分子、例えばフラビン及び色素が含まれる。具体例としては、限定されるものではないが以下のものが含まれる：フェロセン及びその誘導体；鉄錯体、例えばヘキサシアニド；ルテニウム錯体、例えばヘキサミン；トリス(ビピリジル)としてのオスミウム錯体；チアジン色素；フェナジン色素；リボフラビン及びその誘導体；並びにテトラチアフルバレン及びその誘導体。更なる例は当業者に明らかである。10

【0028】

第2の結合分子は、好ましくはビオチンで標識されており、第2の位置に固定化されるビオチンに結合する分子は、好ましくはアビジン又はストレプトアビジンである。

【0029】

第2の位置の固定化分子に近接して配置される検出器は、好ましくはテストラインの下(すなわち、LFメンブレン上の第2の位置又はその下)に配置される。検出器は、好ましくは電極であり、好ましくはスクリーン印刷電極である。当業者には「スクリーン印刷電極」という用語は周知である。しかし、誤解を避けるために、これを、参照電極及び対向電極を組み込んだ、不活性支持体、例えばPVC、セラミック、及びアルミニナ又はポリエステル上に析出させた伝導性カーボンインク又は金属ペーストフィルムとして定義する。電極は、好ましくは、レドックスプローブの拡散律速還元及びサンプルからの最小限のバックグラウンド電流がある電位に保たれる。検出器は、電流又は通過した電荷の変化を検出できるように、第2の位置(すなわち、テストライン)の固定化分子に十分近接した位置でなければならない。20

【0030】

本発明の装置及び方法は、抗原、抗体、他のタンパク質、及び核酸増幅検査の生成物を始めとする多くの分析物のインピトロ定量分析に用いることができる。検査サンプルは、対象又は患者から得られる以下の非限定的な体サンプルの群から選択され得る：尿、唾液、血清、血漿、全血、大便、及び浸出物(例えば、傷又は又は病変からの)。あるいは、サンプルは、土壤、空気、水、又は食物等の非臨床材料であり得る。30

【0031】

本発明の装置及び方法は、診断及び患者管理を補助するツールとして用いることができる。例えば、アッセイは、症候性患者における疾患の同定、確認、又は除外、あるいは、治療薬の正確な処方及び処置のモニタリング、例えば糖尿病患者の血糖レベルのモニタリング、あるいは妊娠の判定に用いることができる。その他の用途として更に、健康プログラムの目標設定及び評価のための疾患の発生又は有病率を検出及びモニタリングするためにこの迅速なアッセイを用いることができる疫学並びに無症候性個体における疾患の有病率を決定するためのスクリーニングが含まれる。40

【0032】

「対象」及び「患者」という用語は本明細書において交換可能に用いられ、非靈長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、ラット、及びマウス)及び靈長類(例えば、サル及びヒト)を含む哺乳動物、好ましくはヒトを指す。

【実施例】

【0033】

例として、第1及び第2の結合分子が抗体であり、標的分析物が抗原であり、固相がラテラルフローメンブレンである、ラテラルフローイムノアッセイとして本発明の実施形態を説明する。50

【0034】

基質含有サンプル添加後、2つの抗体を溶解させ、ラテラルフローによりテストラインに運ばれる免疫複合体を形成させる。免疫複合体は、液体前部 (liquid front) と共に移動し、免疫複合体のビオチン成分とテストラインに存在するアビジン / ストレプトアビジンとの間の反応によってテストラインで捕捉される。基質がテストラインに達すると、検査サンプル内の基質の変換によって局所的な pH 变化が起こる。これは、使用される具体的な酵素に応じて、より酸性側の環境への変化（すなわち、pH 低下）から、よりアルカリ性側の環境への変化（すなわち、pH 上昇）であり得る。

【0035】

テストラインで起こる增幅電気化学反応を図 2 に模式的に示す。

10

【0036】

一実施形態では、基質含有サンプルは好ましくは尿であり、したがって、対応する酵素は好ましくはウレアーゼである。尿中の尿素濃度はウレアーゼの K_m 値の約 10 ~ 20 倍であるので、酵素は最大速度で働く。pH 变化により、レドックスプローブが還元され、酸化還元種が放出され、これが、下の電極で電流（又は通過した電荷）から検出される。放出された酸化還元種により生じる電流はサンプルの抗原含有量に比例する。したがって、電極で電流（又は通過する電荷）を測定することにより、サンプルの抗原含有量を定量的に決定することができる。図 3 に、低緩衝能溶液 (2 mM Tris / HCl バッファー) 中におけるウレアーゼと尿素の酵素反応に対する pH 变化を示す。

【0037】

20

あるいは、基質含有サンプルはピロリン酸であり得、したがって、対応する酵素は好ましくはピロホスファターゼである。図 4 に、低緩衝能溶液 (2 mM MgCl₂ を添加した 2 mM Tris / HCl バッファー) 中におけるピロリン酸とピロホスファターゼの酵素反応に対する pH 变化を示す。

【0038】

第 1 の封入標識（レドックスプローブ、具体的にはフェロセン誘導体）の放出に対する局所的 pH 上昇の影響が図 5 に示されている。このグラフは、アルカリ性 pH 9 における、時間に対する、ポリマービーズからのフェロセンカルボン酸放出の分光光度測定を示している。対照値から分かるように、pH が穏やかな酸性 pH 5 に維持されている時には、ポリマーは溶解せず、吸光度は上昇しない。

30

【0039】

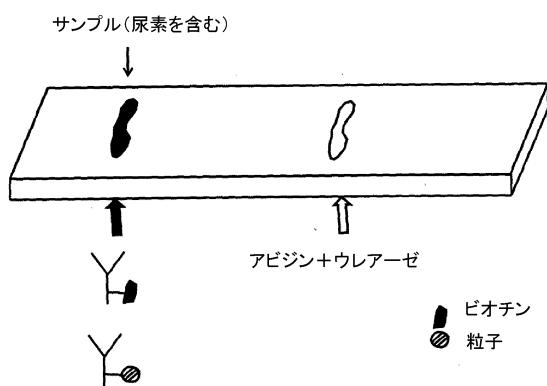
図 6 は同様な影響を示す図であるが、この実験ではレドックスプローブはフェリシアン化カリウムである。グラフは、アルカリ性 pH 約 9 における、時間に対する、ポリマービーズからの封入プローブ放出の分光光度測定を示している。対照値から分かるように、pH が穏やかな酸性 pH 5 に維持されている時には、ポリマーは溶解せず、吸光度は上昇しない。

【0040】

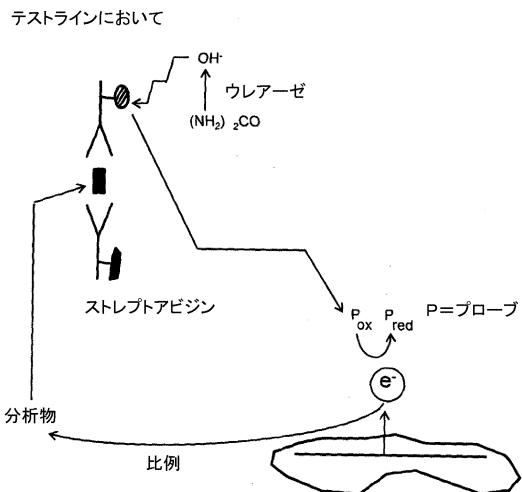
図 7 は、アルカリ性の検査 pH 9 及び穏やかな酸性対照 pH 5 における、種々の時点でのポリマービーズからのフェロセンカルボン酸放出に対する電流生成を示す図である。グラフは、pH 9 で、高 pH でのポリマー溶解に対してポリマービーズからより多くの電気活性分子が放出されたことを示している。この放出は、検出された電流の増加に反映されている。pH 5 では電流の増加は観察されなかった。

40

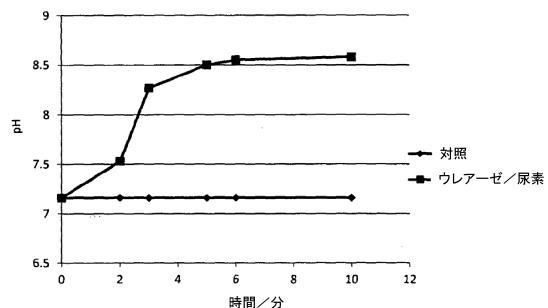
【図1】



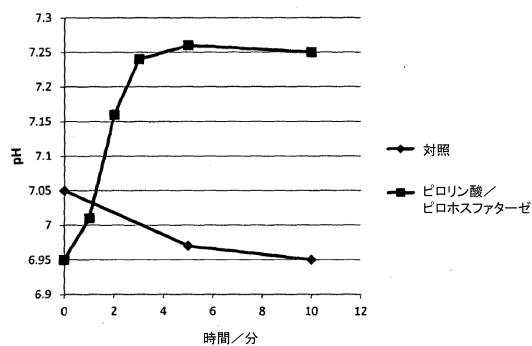
【図2】



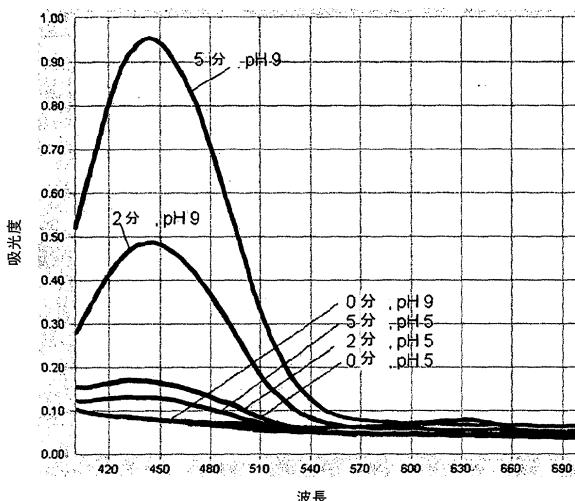
【図3】



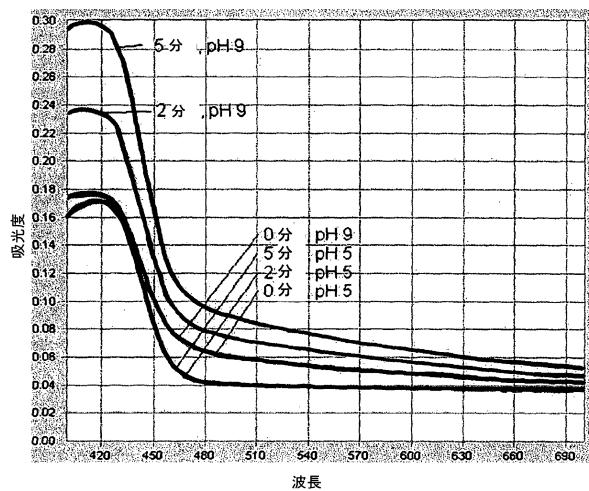
【図4】



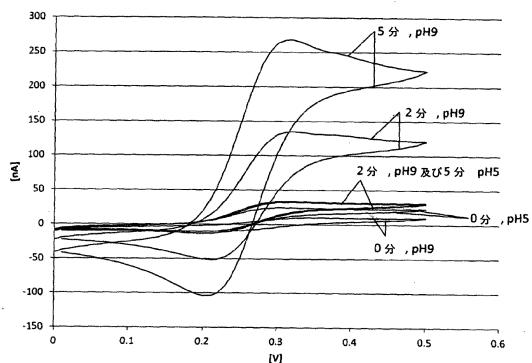
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 セラヤ サンフィッツ , アルムデナ
イギリス NW1 3 BT ロンドン ユーストン ロード 338 バイオ ナノ コンサルティング

(72)発明者 リハック , マリアン
イギリス NW1 3 BT ロンドン ユーストン ロード 338 バイオ ナノ コンサルティング

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開2005-221252(JP,A)
特表平08-510833(JP,A)
特開平04-231874(JP,A)
米国特許出願公開第2005/0112703(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98