

(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
2019年10月24日(24.10.2019)



(10) 国際公開番号

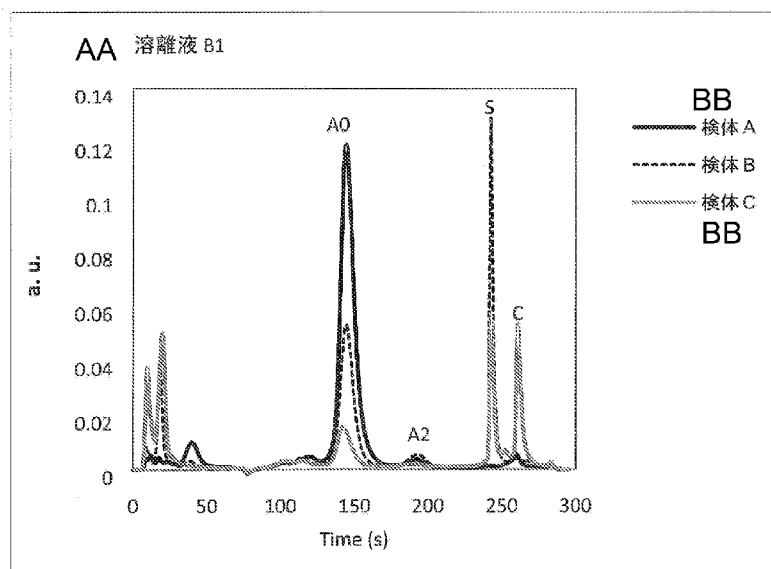
WO 2019/203302 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/88 (2006.01) *G01N 30/34* (2006.01)
G01N 30/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/016633
- (22) 国際出願日: 2019年4月18日(18.04.2019)
- (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 2018-079937 2018年4月18日(18.04.2018) JP
- (71) 出願人: 積水メディカル株式会社 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 太平 博暁 (TAIRA, Hiroaki); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 砂村 栄一郎 (SUNAMURA, Ei-ichiro); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 松田 康平 (MATSUDA, Kohei); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 與谷 卓也 (YOTANI, Takuya); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区

(54) Title: HAEMOGLOBIN ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: ヘモグロビン分析方法

【図1】



(57) Abstract: Provided is a method for separating and detecting various haemoglobins including an abnormal haemoglobin and a thalassaemia marker. This haemoglobin analysis method comprises separating haemoglobins in a sample by means of cation exchange chromatography, and for the separation of said haemoglobins, an eluent having a pH of 8.1 or more and osmotic pressure of 40 mOsm/kg or less is used.

(57) 要約: 異常ヘモグロビン及びサラセミアマーカを含む各種ヘモグロビンを分離及び検出する方法の提供。ヘモグロビン分析方法であって、カチオン交換クロマトグラフィーにより試料中のヘモグロビンを分離することを含み、該ヘモグロビンの分離において、pH 8.1以上、浸透圧40 mOsm/kg以下の溶離液が用いられる、方法。

【続葉有】



日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴
人形町ビル 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, 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, JO, JP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：ヘモグロビン分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヘモグロビンの分析方法に関する。

背景技術

[0002] ヘモグロビン（Hb）は、酸素と結合するヘム（色素部分）と、ヘムを抱えるグロビンからなる色素タンパク質であり、全身の細胞への酸素の運搬に関わる。正常ヒトグロビンのポリペプチドには、 α 、 β 、 γ 、 δ 鎖という4種類のサブユニットがあり、これらが2本の α 鎖と2本の非 α 鎖からなるテトラマーを構成する。正常ヒトHbにはHb A（ $\alpha_2\beta_2$ ）、Hb A₂（ $\alpha_2\delta_2$ ）及びHb F（ $\alpha_2\gamma_2$ ）の3種類が存在するが、その大部分はHb Aである。Hb Aには主にHb A₀と糖化したHb A_{1c}が含まれ、Hb A_{1c}は糖尿病などのマーカーとして使用される。

[0003] グロビンサブユニットの立体構造の異常は異常Hb症を、一方、グロビンサブユニットの形成不全はサラセミアを引き起こし、いずれも貧血や、さらに重症例では溶血、発育不全、骨変形などをもたらす。異常Hb症は、一般にHb S、Hb C、Hb E、Hb Dなどの異常Hbを検出することで診断される。サラセミアは、 α 鎖の形成不全による α サラセミアと β 鎖の形成不全による β サラセミアに大別され、一般にHb A₂、Hb Fなどの高値を指標に診断される。

[0004] 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いてヘモグロビンの異常を検出する方法がある。特許文献1には、リン酸1水素・2アルカリ金属塩（成分1）及びリン酸2水素・1アルカリ金属塩（成分2）を異なる比率で含む複数の溶離液を順次送液するグラジエント溶出を用いたHPLCにより、異常HbであるHb S、Hb C、Hb E及びHb Dや、サラセミアマーカーHb A₂及びHb Fを分離可能であることが記載されている。特許文献2には、イオン対試薬を含有し、pHが7.1～7.3の範囲にある溶離液を用

いたイオン交換液体クロマトグラフィーにより、Hb A₀、Hb S及びHb Cを分離したことが記載されている。特許文献3には、カチオン交換高速液体クロマトグラフィーにより、pH 6.88～7.50の溶離液を用いてヘモグロビンSを分析、又はpH 6.60～6.80の溶離液を用いてヘモグロビンA₂を分析する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2016-27326号公報

特許文献2：特開2010-237110号公報

特許文献3：国際公開公報第2011/096420号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、血液試料から、異常ヘモグロビン及びサラセミアマーカを含む各種ヘモグロビンを分離及び検出する方法に関する。

課題を解決するための手段

[0007] したがって、本発明は、以下を提供する。

〔1〕ヘモグロビン分析方法であって、

カチオン交換クロマトグラフィーにより試料中のヘモグロビンを分離することを含み、

該ヘモグロビンの分離において、pH 8.1以上、浸透圧40mOsm/kg以下の溶離液が用いられる、方法。

〔2〕前記溶離液が金属イオンを含まない緩衝剤を含有する、〔1〕記載の方法。

〔3〕前記緩衝剤がBicine、Tricine又はTESである、〔2〕記載の方法。

〔4〕前記溶離液中の前記緩衝剤の濃度が2～17mmol/Lである、〔

2〕又は〔3〕記載の方法。

〔5〕前記溶離液がヘモグロビン変性剤を含有する、〔1〕～〔4〕のいずれか1項記載の方法。

〔6〕前記溶離液を用いたグラジエント溶離によりヘモグロビンを分離する、〔1〕～〔5〕のいずれか1項記載の方法。

〔7〕前記グラジエントにおいて前記溶離液の割合が0%から100%まで増加する、〔6〕記載の方法。

〔8〕Hb S、Hb C、Hb E、Hb D、及びHb O-Arabからなる群より選択される少なくとも1種の異常ヘモグロビンを分離する、〔1〕～〔7〕のいずれか1項記載の方法。

〔9〕Hb A₂、Hb F、Hb H、Hb Bart'、及びHb Constant Springからなる群より選択される少なくとも1種のサラセミアマーカーを分離する、〔1〕～〔8〕のいずれか1項記載の方法。

〔10〕前記クロマトグラフィーが高速液体クロマトグラフィーである、〔1〕～〔9〕のいずれか1項記載の方法。

〔11〕pH 8.1以上、浸透圧40mOsm/kg以下である、カチオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離用溶離液。

〔12〕金属イオンを含まない緩衝剤を含有する、〔11〕記載の溶離液。

〔13〕前記緩衝剤がBicine、Tricine又はTESである、〔12〕記載の溶離液。

〔14〕前記溶離液中の前記緩衝剤の濃度が2～17mmol/Lである、

〔12〕又は〔13〕記載の溶離液。

〔15〕前記溶離液がヘモグロビン変性剤を含有する、〔11〕～〔14〕のいずれか1項記載の溶離液。

〔16〕pH 8.1以上、浸透圧40mOsm/kg以下である液体組成物の、カチオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離用溶離液としての使用。

〔17〕pH 8.1以上、浸透圧40mOsm/kg以下である液体組成物

の、カチオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離用溶離液の製造のための使用。

〔18〕前記液体組成物が金属イオンを含まない緩衝剤を含有する、〔16〕又は〔17〕記載の使用。

〔19〕前記緩衝剤がBicine、Tricine又はTESである、〔18〕記載の使用。

〔20〕前記液体組成物中の前記緩衝剤の濃度が2～17mmol/Lである、〔18〕又は〔19〕記載の使用。

〔21〕前記液体組成物がヘモグロビン変性剤を含有する、〔16〕～〔20〕のいずれか1項記載の使用。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、血液試料から、主要なヘモグロビンであるHbA0に加えて、HbA1c、異常Hb、サラセミアマーカなどを迅速かつ高感度に分離することができる。本発明は、異常Hb症又はサラセミアの簡便、迅速かつ高感度な診断に有用である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]TES含有溶離液を用いたカチオン交換クロマトグラフィーによる実施例1でのHbA0、HbA2、HbS及びHbCの分析結果。

[図2]Tricine含有溶離液を用いたカチオン交換クロマトグラフィーによる実施例2でのHbA0、HbA2、HbS及びHbCの分析結果。

[図3]Bicine含有溶離液を用いたカチオン交換クロマトグラフィーによる実施例3でのHbA0、HbA2、HbS及びHbCの分析結果。

[図4]比較例5でのHbA0、HbA2及びHbSの分析結果。

[図5]比較例6でのHbA0、HbA2及びHbSの分析結果。

[図6]比較例7でのHbA0、HbA2及びHbSの分析結果。

[図7]比較例8でのHbA0、HbA2及びHbSの分析結果。

発明を実施するための形態

[0010] 本明細書中で引用された全ての特許文献、非特許文献、及びその他の刊行

物は、その全体が本明細書中において参考として援用される。

- [0011] 本発明のヘモグロビン分析方法は、イオン交換クロマトグラフィーにより試料中のヘモグロビンを分離することを含む。当該本発明の方法に用いられる試料としては、通常のヘモグロビン分析に用いられるヘモグロビンを含む血液試料を用いることができる。例えば、ヒトから採取した血液を溶血又は希釈した血液試料を用いることができる。
- [0012] 本発明の方法で行われるクロマトグラフィーは、好ましくは液体クロマトグラフィーであり、より好ましくは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）である。本発明におけるイオン交換クロマトグラフィーは、公知の液体クロマトグラフィーシステム、すなわち、溶離液送液用のポンプ、サンプル、検出器等を備えたシステムに接続したイオン交換カラムを用いて行うことができる。
- [0013] 好ましくは、本発明の方法で行われるイオン交換クロマトグラフィーは、カチオン交換カラムを用いた、カチオン交換クロマトグラフィーである。本発明の方法で用いられるカチオン交換カラムは、カチオン交換基を有する固定相が充填されたカラムであればよい。該カチオン交換基としては、カルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基などが挙げられ、このうちスルホン酸基が好ましい。
- [0014] 該カチオン交換カラムの固定相としては、充填剤粒子、多孔質体等が挙げられ、充填剤粒子が好ましい。該充填剤粒子としては、無機系粒子、有機系粒子等が挙げられる。該無機系粒子としては、シリカ、ジルコニア等で構成される粒子が挙げられる。該有機系粒子としては、セルロース、ポリアミノ酸、キトサン等の天然高分子粒子や、ポリスチレン、ポリアクリル酸エステル等の合成高分子粒子が挙げられる。該カチオン交換基を有する固定相の好ましい例として、特開2011-047858号公報に開示されている、非架橋性の親水性アクリル系単量体とポリグリシジルエーテル類との混合物を重合して得られる架橋重合体粒子と、該架橋重合体粒子の表面に重合されたカチオン交換基を有するアクリル系単量体の層とを含む充填剤が挙げられる。

。

[0015] 本発明のヘモグロビン分析方法では、従来のイオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分析と同様に、試料中のヘモグロビンをイオン交換カラムに吸着させた後、該カラムに溶離液を流して該カラムからヘモグロビンを溶離させることにより、試料中のヘモグロビンを分離する。したがって、本発明のヘモグロビン分析方法で使用される溶離液は、イオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離のために使用される溶離液である。より好ましくは、該溶離液は、カチオン交換クロマトグラフィーにおいて、カチオン交換カラムからのヘモグロビンの溶離のために使用される溶離液である。

。

[0016] 本発明のヘモグロビン分析方法では、従来のヘモグロビン分析方法と比べて高pHかつ低浸透圧の溶離液を用いる。本発明で使用される該溶離液は、pH 8.1以上が好適である。より詳細には、該溶離液のpHは、好ましくは8.1以上、より好ましくは8.2以上であり、さらに好ましくは8.3以上であり、一方、好ましくは10.0以下、より好ましくは9.0以下、さらに好ましくは8.6以下である。該溶離液がpH 8.1未満であると、カラムからのヘモグロビン、特にHbCの溶出が不十分になることがあり、一方、pH 10を超えると、特にHbSとHbCの分離が不十分になることがある。本発明で使用される該溶離液のpH範囲としては、pH 8.1～10.0、pH 8.1～9.0、pH 8.1～8.6、pH 8.2～10.0、pH 8.2～9.0、pH 8.2～8.6、pH 8.3～10.0、pH 8.3～9.0、及びpH 8.3～8.6が挙げられる。一方、従来のヘモグロビン分析方法で用いられていた溶離液のpHは、通常pH 5.0～8.0程度である。

[0017] 本発明で使用される該溶離液の浸透圧は、40 mOsm/kg以下が好適である。より詳細には、該溶離液の浸透圧は、好ましくは40 mOsm/kg以下、より好ましくは37 mOsm/kg以下、さらに好ましくは36 mOsm/kg以下であり、一方、好ましくは15 mOsm/kg以上、より

好ましくは 19 mOsm/kg 以上、さらに好ましくは 26 mOsm/kg 以上である。該溶離液の浸透圧が 15 mOsm/kg 未満であると、ヘモグロビン、特に Hb A0 と Hb A2 の溶出が不十分になることがあり、一方、 40 mOsm/kg を超えると、ヘモグロビン種間、特に Hb A0 と Hb A2 との分離が悪くなる。本発明で使用する該溶離液の浸透圧の範囲としては、 $15 \sim 40 \text{ mOsm/kg}$ 、 $15 \sim 37 \text{ mOsm/kg}$ 、 $15 \sim 36 \text{ mOsm/kg}$ 、 $19 \sim 40 \text{ mOsm/kg}$ 、 $19 \sim 37 \text{ mOsm/kg}$ 、 $19 \sim 36 \text{ mOsm/kg}$ 、 $26 \sim 40 \text{ mOsm/kg}$ 、 $26 \sim 37 \text{ mOsm/kg}$ 、及び $26 \sim 36 \text{ mOsm/kg}$ が挙げられる。一方、従来のクロマトグラフィーによるヘモグロビン分離において、浸透圧調整の観点で溶離液の組成を設計することは行われておらず、また従来用いられていた溶離液の pH は、通常 $125 \sim 570 \text{ mOsm/kg}$ 程度である。本明細書における浸透圧の値は、凝固点降下法により測定された浸透圧の値をいう。浸透圧は、市販の浸透圧計、例えばオズモメーター 3250 (Advanced Instruments 製) 等を用いて測定することができる。また本明細書において、浸透圧の単位 mOsm/kg とは、 $\text{mOsm/kg H}_2\text{O}$ を意味し、これは mOsm/L 又は mOsm とも表記されることがある。

[0018] 上記の pH と浸透圧の範囲を有する溶離液を調製するために、本発明においては、該溶離液に金属イオンを含まない緩衝剤を含有させる。リン酸緩衝液等の従来の溶離液で一般に使用されている緩衝液は、金属イオンを含むため、高 pH 性と低浸透圧性を同時に実現することは困難である。該金属イオンを含まない緩衝剤の例としては、グッド緩衝剤が挙げられ、なかでも、Bicine (N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン)、Tricine (N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン)、又は TES (N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸) が好ましく、TES がより好ましい。

[0019] 本発明で使用する該溶離液における上述した緩衝剤の濃度は、後述する添加剤等の影響を考慮した上で、最終的な溶離液の pH 及び浸透圧を上記範

囲に調整できる濃度であればよい。該溶離液における該緩衝剤の濃度は、好ましくは 2 mmol/L 以上、より好ましくは 2.5 mmol/L 以上、さらに好ましくは 5 mmol/L 以上であり、一方、好ましくは 17 mmol/L 以下、より好ましくは 15 mmol/L 以下、さらに好ましくは 12.5 mmol/L 以下である。本発明で使用される該溶離液における該緩衝剤の濃度の範囲としては、 $2\sim17\text{ mmol/L}$ 、 $2\sim15\text{ mmol/L}$ 、 $2\sim12.5\text{ mmol/L}$ 、 $2.5\sim17\text{ mmol/L}$ 、 $2.5\sim15\text{ mmol/L}$ 、 $2.5\sim12.5\text{ mmol/L}$ 、 $5\sim17\text{ mmol/L}$ 、 $5\sim15\text{ mmol/L}$ 、及び $5\sim12.5\text{ mmol/L}$ が挙げられる。

[0020] 好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、緩衝剤としてBicine、Tricine又はTESを含有する溶液状の液体組成物である。該溶離液中の該緩衝剤の濃度は $2\sim17\text{ mmol/L}$ であり、該溶離液は、浸透圧が $15\sim40\text{ mOsm/kg}$ であり、かつpHが、好ましくは $8.1\sim10.0$ 、より好ましくは $\text{pH } 8.2\sim9.0$ 、さらに好ましくは $\text{pH } 8.2\sim8.6$ 、なお好ましくは $\text{pH } 8.3\sim8.6$ である。

[0021] より好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、緩衝剤としてBicine、Tricine又はTESを含有し、該溶離液中の該緩衝剤の濃度は $2.5\sim15\text{ mmol/L}$ であり、該溶離液は、浸透圧が $15\sim37\text{ mOsm/kg}$ であり、かつpHが、好ましくは $8.1\sim10.0$ 、より好ましくは $\text{pH } 8.2\sim9.0$ 、さらに好ましくは $\text{pH } 8.2\sim8.6$ 、なお好ましくは $\text{pH } 8.3\sim8.6$ である。

[0022] さらに好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、緩衝剤としてBicine、Tricine又はTESを含有し、該溶離液中の該緩衝剤の濃度は $5\sim15\text{ mmol/L}$ であり、該溶離液は、浸透圧が $19\sim37\text{ mOsm/kg}$ であり、かつpHが、好ましくは $8.1\sim10.0$ 、より好ましくは $\text{pH } 8.2\sim9.0$ 、さらに好ましくは $\text{pH } 8.2\sim8.6$ 、なお好ましくは $\text{pH } 8.3\sim8.6$ である。

[0023] さらにより好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、緩衝剤としてB

icine、Tricine又はTESを含有し、該溶離液中の該緩衝剤の濃度は5～15 mmol/Lであり、該溶離液は、浸透圧が26～36 mOsm/kgであり、かつpHが好ましくはpH8.2～9.0、さらに好ましくはpH8.2～8.6、なお好ましくはpH8.3～8.6である。

[0024] なお好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、緩衝剤としてBicine、Tricine又はTESを含有し、該溶離液中の該緩衝剤の濃度は5～12.5 mmol/Lであり、該溶離液は、浸透圧が26～36 mOsm/kgであり、かつpHがpH8.3～8.6である。

[0025] 本発明で使用される該溶離液は、上述した緩衝剤以外に、溶媒、及びヘモグロビン変性剤、三価ヘム鉄への結合剤、pH調整剤、界面活性剤などの添加剤を含有していてもよい。

[0026] 好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、ヘモグロビン変性剤を含有する。ヘモグロビン変性剤は、ヘモグロビンのヘム鉄を二価から三価に変化させ、メトヘモグロビンを生成することができる酸化剤であればよい。そのような酸化剤の例としては、亜硝酸塩、フェリシアン化カリウム、メチレンブルー、過酸化水素、アスコルビン酸、硫化水素などが挙げられる。このうち、亜硝酸塩が好ましく、亜硝酸ナトリウム又は亜硝酸カリウムがより好ましい。該溶離液における該ヘモグロビン変性剤の濃度は、好ましくは0.05～15 mmol/L、より好ましくは1.0～10 mmol/Lである。

[0027] また好ましくは、本発明で使用される該溶離液は、三価ヘム鉄への結合剤を含有する。該三価ヘム鉄への結合剤は、該ヘモグロビン変性剤により生成されたメトヘモグロビンを安定化させて、その溶出挙動を安定化させる。該三価ヘム鉄への結合剤の例としては、アジ化物、シアン化物等が挙げられる。アジ化物の例としては、アジ化ナトリウム、ジフェニルリン酸アジド、4-オードシルベンゼンスルフォニルアジド、4-アセチルアミノベンゼンスルフォニルアジド、アジ化カリウム、アジ化リチウム、アジ化鉄、アジ化水素、アジ化鉛、アジ化水銀、アジ化銅、アジ化銀等が挙げられる。シアン化物の例としては、シアン化カリウム、シアン化水素、シアン化ナトリウム、シ

アン化銀、シアン化水銀、シアン化銅、シアン化鉛、シアン化鉄、シアン化リチウム、シアン化アンモニウム等が挙げられる。好ましくは、該三価のヘム鉄への結合剤はアジ化物であり、より好ましくはアジ化ナトリウムである。該溶離液における該三価ヘム鉄への結合剤の濃度は、好ましくは0.05～15 mmol/L、より好ましくは0.5～10 mmol/Lである。

[0028] 該pH調整剤としては、公知の酸及び塩基が挙げられ、酸の例としては、塩酸、リン酸、硝酸、硫酸などが挙げられ、塩基の例としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化バリウム、水酸化カルシウムなどが挙げられる。

[0029] 該溶媒としては、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン等の水溶性有機溶媒が挙げられる。該溶媒の濃度は、塩等が析出しない程度であることが好ましく、例えば80% (v/v) 以下が好ましく、より好ましい範囲は0.1% (w/w) 以上50% (w/w) 以下である。

[0030] 好ましくは、本発明のヘモグロビン分析方法では、上記溶離液を用いたグラジエント溶離により、ヘモグロビンを分離する。好ましくは、本発明の方法では、上記溶離液を溶離液B（以下、B液、又は単にBと称する）とし、別の溶離液を溶離液A（以下、A液、又は単にAと称する）として、B液の割合が段階的に高くなるように、A液とB液の間でグラジエントをかける。

[0031] 溶離液Aは、公知の塩化合物を含む緩衝剤を含有するものであればよい。該溶離液Aに含まれ得る緩衝剤の例としては、有機酸又は無機酸を含む緩衝液が挙げられる。有機酸の例としては、クエン酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸等、及びこれらの塩が挙げられ、無機酸の例としては、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸、ホウ酸、酢酸、過塩素酸等、及びこれらの塩が挙げられる。該溶離液Aに用いられる緩衝液は、これらの有機酸及び無機酸のいずれか1種又は2種以上を組み合わせる含有することができる。このうち、リン酸塩、コハク酸塩、又は過塩素酸塩を含む緩衝液が好ましい。リン酸塩の例としては、ナトリウム塩及びカリウム塩などが挙げられ、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムが好ましい。コハク酸塩の例としては、ナトリウム塩及び

カリウム塩などが挙げられ、コハク酸一ナトリウム、コハク酸二ナトリウムが好ましい。過塩素酸塩の例としては、過塩素酸ナトリウムが挙げられる。これらのリン酸塩、コハク酸塩及び過塩素酸塩は、単独で用いられてもよく、2種以上で併用されてもよい。

[0032] 溶離液Aは、上述した緩衝剤以外に、上述した溶離液Bに含有され得るものと同様の溶媒、及び添加剤（例えば上述したヘモグロビン変性剤、三価ヘム鉄への結合剤、pH調整剤、界面活性剤など）を含有していてもよい。

[0033] 溶離液AのpHは、好ましくは5.0以上、より好ましくは5.2以上であり、好ましくは6.0以下、より好ましくは5.8以下である。溶離液AのpH範囲は、好ましくは5.0～6.0であり、より好ましくは5.2～5.8である。また、溶離液Aの浸透圧は、好ましくは130mOsm/kg以上、より好ましくは150mOsm/kg以上であり、好ましくは210mOsm/kg以下、より好ましくは190mOsm/kg以下である。溶離液Aの浸透圧の範囲は、好ましくは130～210mOsm/kgであり、より好ましくは150～190mOsm/kgである。好ましい実施形態において、溶離液Aは、pH5.0～6.0であり、かつ浸透圧が130～210mOsm/kg、より好ましくは150～190mOsm/kgである。より好ましい実施形態において、溶離液Aは、pH5.2～5.8であり、かつ浸透圧が130～210mOsm/kg、より好ましくは150～190mOsm/kgである。

[0034] 好ましくは、本発明の方法におけるグラジエント溶離では、まず、A液100%（B液0%）で通液し、次いでグラジエントをかけてB液の割合を増加させ、B液の割合を100%まで上げる。グラジエントの大きさは、カラムの性能等に合わせて適宜調整すればよく、特に限定されない。グラジエントの一例は、A:B=100:0 → Bの割合を50～98容量%（好ましくは70～95容量%）まで増加 → 段階的にBの割合をさらに増加 → A:B=0:100である。グラジエントの別の一例は、A:B=100:0 → 溶離液が全体でpH6.5～8.0、浸透圧20～100mO

s m / k g になるよう B の割合を増加 → 段階的に B の割合をさらに増加
→ A : B = 0 : 1 0 0 である。必要に応じて、この後に再び A : B = 1
0 0 : 0 の通液時間を設けてもよい。

[0035] 一実施形態において、本発明のヘモグロビン分析方法は、異常ヘモグロビンの検出に利用される。本発明の方法で検出される異常ヘモグロビンとしては、H b S、H b C、H b E、H b D、及びH b O - A r a b からなる群より選択される少なくとも 1 種が挙げられ、好ましくはH b C 及びH b S からなる群より選択される少なくとも 1 種である。本発明の方法においては、上記に挙げた異常ヘモグロビンの各々を、一度の分析で全て分離検出することが可能である。

[0036] 別の一実施形態において、本発明のヘモグロビン分析方法は、サラセミアマーカの検出に利用される。本発明の方法で検出されるサラセミアマーカとしては、H b A 2、H b F、H b H、H b B a r t '、及びH b C o n s t a n t S p r i n g からなる群より選択される少なくとも 1 種が挙げられ、好ましくはH b A 2 である。本発明の方法においては、上記に挙げたサラセミアマーカの各々を、一度の分析で全て分離検出することが可能である。

[0037] さらに、本発明のヘモグロビン分析方法においては、上記に挙げた異常ヘモグロビン及びサラセミアマーカの両方を検出することができる。さらに、該異常ヘモグロビン及び／又はサラセミアマーカを検出するとともに、H b A 0、又は糖化ヘモグロビンH b A 1 c を検出することができる。したがって、本発明のヘモグロビン分析方法により、試料中における異常ヘモグロビン及びサラセミアマーカの有無を一度に分析することができ、さらに試料中における異常ヘモグロビン、サラセミアマーカ、及びH b A 1 c の有無を一度に分析することも可能である。したがって、本発明の方法は、一度の分析で多種のヘモグロビンを検出することができるので、異常H b 症やサラセミアの簡便かつ迅速な診断を可能にする。

実施例

[0038] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0039] (参考例 1 : ヘモグロビン分離用カラムの調製)

非架橋性の親水性アクリル系単量体としてテトラエチレングリコールモノメタクリレート(日油社製) 200 g、及び、ポリグリシジルエーテル類としてポリエチレングリコールジグリシジルエーテル(日油社製) 200 gを混合した単量体混合物に、重合開始剤として過酸化ベンゾイル(ナカライテスク社製) 1.0 gを溶解した。得られた混合物を、4重量%のポリビニルアルコール(日本合成化学工業社製、「ゴーセノールGH-20」)水溶液5 Lに分散させ、攪拌しながら窒素雰囲気下で80℃に加温し、1時間重合反応を行なった。温度を30℃に冷却した後、カチオン交換基を有するアクリル系単量体として2-メタクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸(東亜合成社製) 100 gを反応系に添加し、再び80℃に加温して1時間重合反応を行なった。得られた架橋重合体粒子をイオン交換水及びアセトンで洗浄することにより、スルホン酸基が導入された架橋重合体粒子を得た。得られたヘモグロビン分離用カラム充填剤を、内径4 mm、長さ20 mmのステンレス製カラムに充填し、ヘモグロビン分離用カチオン交換カラムを調製した。

[0040] (参考例 2 : 検体の調製)

検体A : 健常人から採取した血液検体を0.1%トリトンX-100含有リン酸緩衝液(pH 7.00)で適宜希釈して検体を調製した。

検体B : L y p h o c h e c k (登録商標) H e m o g l o b i n A 2 C o n t r o l L e v e l 2 (Bio-Rad社製、HbA0、HbA2及びHbS含有)を0.1%トリトンX-100含有リン酸緩衝液(pH 7.00)で適宜希釈して検体を調製した。

検体C : A F S Cヘモコントロール(ヘレナ研究所社製、HbA0、HbS及びHbC含有)を0.1%トリトンX-100含有リン酸緩衝液(pH 7.00)で適宜希釈して検体を調製した。

検体D：Hemoglobin A2（Sigma Aldrich社製、HbA2含有）を0.1%トリトンX-100含有リン酸緩衝液（pH7.00）で適宜希釈して検体を調製した。

[0041]（試験1）

参考例2で調製した検体A～Cについてヘモグロビン分析を行った。分析条件を以下に示す。

HPLC装置：Prominence 20Aシリーズ（島津製作所社製）

検出器：SPD-M20A（島津製作所社製）

送液ポンプ：LC-20AD（島津製作所社製）

脱気ユニット：DGU-20A5R（島津製作所社製）

カラムオーブン：CTO-20AC（島津製作所社製）

オートサンプラー：SIL-20AC（島津製作所社製）

カラム：参考例1で作成したヘモグロビン分離用カチオン交換カラム

流速：1.1 mL/min

検出波長：415 nm

試料注入量：10 μL

溶離液

溶離液A：40 mmol/Lコハク酸ナトリウム、45 mmol/L過塩素酸ナトリウム、1 mmol/Lアジ化ナトリウムを含有する緩衝液（pH5.3、浸透圧170 mOsm/kg）

溶離液B：溶離液B1～B6（表1）

グラジエント：表2のとおり

pHメーター：F-52（堀場製作所製）

浸透圧計：オズモメーター3250（Advanced Instruments製）

[0042]

[表1]

	実施例 1	実施例 2	実施例 3
溶離液 B	B1	B2	B3
組成 (mmol/L)			
TES	10	—	—
Tricine	—	10	—
Bicine	—	—	10
亜硝酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0
アジ化ナトリウム	1.0	1.0	1.0
pH*	8.4	8.4	8.4
浸透圧 (mOsm/kg)	31	25	24

	実施例 4	実施例 5	実施例 6
溶離液 B	B4	B5	B6
組成 (mmol/L)			
TES	10	5.0	2.5
亜硝酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0
アジ化ナトリウム	1.0	1.0	1.0
pH*	8.5	8.5	8.5
浸透圧 (mOsm/kg)	31	23	19

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整

[0043]

[表2]

グラジエント

測定時間 (min)	溶離液 B 濃度 (容量%)		
	実施例 1-4	実施例 5	実施例 6
0	0	0	0
0.99	0	0	0
1	72.5	86.0	92.5
4.5	77.5	91.0	97.5
5.17	100	100	100
5.5	100	100	100
5.51	0	0	0
6	0	0	0

[0044] 実施例 1～6 での検体 A～C の分析結果を表 3 に示す。また、実施例 1、2 及び 3 で得られた検体 A～C のクロマトグラムを図 1、図 2、及び図 3 にそれぞれ示す。実施例 1～6 において、HbA0、HbA2、HbS、及び HbC がそれぞれ別個のピークとして検出された。本結果より、緩衝剤 T E S、T r i c i e n 又は B i c i n e を含む溶離液を用いることで、HbA0、HbA2、HbS、及び HbC を検出できることが示された。

[0045] [表3]

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6
溶離液 B	B1	B2	B3	B4	B5	B6
検出						
HbA0 (検体 A, B, C)	+	+	+	+	+	+
HbA2 (検体 A, B)	+	+	+	+	+	+
HbS (検体 B, C)	+	+	+	+	+	+
HbC (検体 C)	+	+	+	+	+	+

+ ピーク検出、- ピーク検出できず

[0046] (試験 2)

参考例 2 で調製した検体 A～C についてヘモグロビン分析を行った。溶離液 B 及びグラジエント条件以外の条件は、試験 1 と同様にした。溶離液 B としては、表 4～6 に記載の溶離液を用いた。グラジエント条件は、HbA0 を 2.1 min に溶出させるよう、溶離液 A と溶離液 B の混合割合を適宜決

定した。また、HbC溶出確認のため、溶離液B濃度100%の時間を適宜延長した。

[0047] 分析結果を表4～6に示す。表6に示すとおり、pH8.0の溶離液Bを用いた比較例1～3ではHbCが検出されなかった。また、浸透圧が40 mOsm/kgを超える溶離液Bを用いた比較例3～4では、HbA0のピークショルダーにHbA2が重なり、両種のピークが十分に分離されなかった。一方、表4～5に示すとおり、pHが8.0より高く、かつ浸透圧が40 mOsm/kg以下である実施例7～18では、HbA0、HbA2、HbS及びHbCがそれぞれ検出された。ただし実施例10、11では、HbA2の溶出がやや早くなり、HbA0とHbA2のピークが接近する傾向がみられた（データ示さず）。これらの結果より、pH8.1以上、かつ浸透圧40 mOsm/kg以下の溶離液Bが、各種ヘモグロビンの分析に適していることが示された。

[0048] [表4]

	実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10	実施例 11	実施例 12
溶離液 B	B7	B8	B9	B10	B11	B12
組成 (mmol/L)						
TES	2.5	5	10	15	17	10
亜硝酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
アジ化ナトリウム	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tween 20 (% , w/w)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
pH*	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.5
浸透圧 (mOsm/kg)	15	20	29	37	40	32
検出						
HbA0 (検体 A, B, C)	+	+	+	+	+	+
HbA2 (検体 A, B)	+	+	+	+	+	+
HbS (検体 B, C)	+	+	+	+	+	+
HbC (検体 C)	+	+	+	+	+	+

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整
+ ピーク検出、- ピーク検出できず

[0049]

[表5]

	実施例 13	実施例 14	実施例 15	実施例 16	実施例 17	実施例 18
溶離液 B	B13	B14	B15	B16	B17	B18
組成 (mmol/L)						
Tricine	10	10	10	—	—	—
Bicine	—	—	—	10	10	10
亜硝酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
アジ化ナトリウム	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tween 20 (% , w/w)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
pH*	8.2	8.4	8.6	8.2	8.4	8.6
浸透圧 (mOsm/kg)	26	27	28	25	26	27
検出						
HbA0 (検体 A, B, C)	+	+	+	+	+	+
HbA2 (検体 A, B)	+	+	+	+	+	+
HbS (検体 B, C)	+	+	+	+	+	+
HbC (検体 C)	+	+	+	+	+	+

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整
 + ピーク検出、— ピーク検出できず

[0050] [表6]

	比較例 1	比較例 2	比較例 3	比較例 4
溶離液 B	B0-1	B0-2	B0-3	B0-4
組成 (mmol/L)				
TES	10	15	20	20
亜硝酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0
アジ化ナトリウム	1.0	1.0	1.0	1.0
Tween 20 (% , w/w)	0.05	0.05	0.05	0.05
pH*	8.0	8.0	8.0	8.2
浸透圧 (mOsm/kg)	27	36	44	46
検出			A0 と A2 の 分離が不十分	
HbA0 (検体 A, B, C)	+	+		
HbA2 (検体 A, B)	+	+		
HbS (検体 B, C)	+	+	+	+
HbC (検体 C)	—	—	—	+

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整
 + ピーク検出、— ピーク検出できず

[0051] (試験3)

参考例2で調製した検体B及び検体Dについてヘモグロビン分析を行った。グラジエントと溶離液B以外の分析条件は、試験1と同じとした。溶離液Bには、表7に記載のpH及び浸透圧を有するリン酸ナトリウムと過塩素酸ナトリウムを含有する緩衝液を含む溶離液を用いた。なお、表7に記載の溶離液の組成は、従来のヘモグロビン分析で一般的に用いられているリン酸緩衝液を含む溶離液の組成を基にした。グラジエント条件は表8に示すとおりとした。

[0052] 分析結果を表7に示す。また比較例5～8のクロマトグラムを図4～7に示す。検体BにはHbA2が5～7質量%程度含有されていたが、比較例5～8では、HbA0のピークとHbA2のピークが重なり、両種のピークが十分に分離されなかった。この結果より、pH8.0以下、浸透圧が130 mOsm/kg以上であるような従来使用される溶離液では、HbA0とHbA2を十分に検出できないことが示された。

[0053] [表7]

	比較例 5	比較例 6	比較例 7	比較例 8
溶離液 B	B0-5	B0-6	B0-7	B0-8
組成 (mmol/L)				
リン酸ナトリウム	45	45	45	45
過塩素酸ナトリウム	100	20	10	0
亜硝酸ナトリウム	10	10	10	10
アジ化ナトリウム	10	10	10	10
pH*	7.7	7.7	7.7	7.7
浸透圧 (mOsm/kg)	330	170	150	130
検出 HbA0 (検体 B) HbA2 (検体 B, D)	A0 と A2 の分離が不十分			
HbS (検体 B)	+	+	+	+

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整
+ ピーク検出、- ピーク検出できず

[0054] [表8]

グラジエント

測定時間 (min)	溶離液 B 濃度 (容量%)
0	0
0.98	0
1	10
2.15	30
2.17	100
2.25	100
2.27	0
2.77	0

(試験4)

参考例2で調製した検体A～Cについて、表9に記載のリン酸緩衝液を含む溶離液Bを用いてヘモグロビン分析を行った。溶離液B以外の条件は試験2と同様にした。溶離液Bとしては、表9に記載のリン酸緩衝液を含む溶離液を用いた。

[0055] 分析結果を表9に示す。比較例9、10では、HbA0とHbA2とのピークの分離が十分でなく、さらにHbS及びHbCのいずれか又は両方が検出されなかった。比較例11～14では、HbS及びHbCは検出されたが、HbA0とHbA2とのピークの分離が十分でなかった。比較例9～14の溶離液Bは、上述した実施例の溶離液と比べて浸透圧が高く、またpHもより高いか又はより低くなり、pH8.0以上、浸透圧40mOsm/kg以下の条件を達成することができなかった。このことが、比較例9～14における不十分なヘモグロビン検出につながったと考えられた。

[0056]

[表9]

	比較例 9	比較例 10	比較例 11	比較例 12	比較例 13	比較例 14
溶離液 B	B0-9	B0-10	B0-11	B0-12	B0-13	B0-14
組成 (mmol/L)						
リン酸ナトリウム	20	20	10	20	20	20
亜硝酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
アジ化ナトリウム	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tween 20 (% , w/w)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
pH*	6.8	7.4	8.2	8.2	8.6	9.2
浸透圧 (mOsm/kg)	75	77	41	81	82	81
検出	A0 と A2 の分離が不十分					
HbA0 (検体 A, B, C)						
HbA2 (検体 A, B)						
HbS (検体 B, C)	—	+	+	+	+	+
HbC (検体 C)	—	—	+	+	+	+

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整
+ ピーク検出、— ピーク検出できず

[0057] (試験 5)

参考例 2 で調製した検体 A ~ C についてヘモグロビン分析を行った。溶離液 B 及びグラジエント条件以外の条件は試験 1 と同様にした。溶離液 B としては表 10 に記載の溶離液を用いた。グラジエント条件は表 11 のとおりとした。分析結果を表 10 に示す。実施例 19 及び 20 の両方で、HbA0 と HbA2 のピークが良好に分離され、かつ HbS と HbC のピークも良好に分離され、HbA0、HbA2、HbS 及び HbC を検出することができた。

[0058]

[表10]

	実施例 19	実施例 20
溶離液 B	B19	B20
組成 (mmol/L)		
TES	5.0	5.0
亜硝酸ナトリウム	5.0	2.5
アジ化ナトリウム	1.0	1.0
pH*	8.5	8.5
浸透圧 (mOsm/kg)	23	18
検出		
HbA0 (検体 A, B, C)	+	+
HbA2 (検体 A, B)	+	+
HbS (検体 B, C)	+	+
HbC (検体 C)	+	+

* 1N 水酸化ナトリウム水溶液で調整
 + ピーク検出、- ピーク検出できず

[0059] [表11]

グラジエント

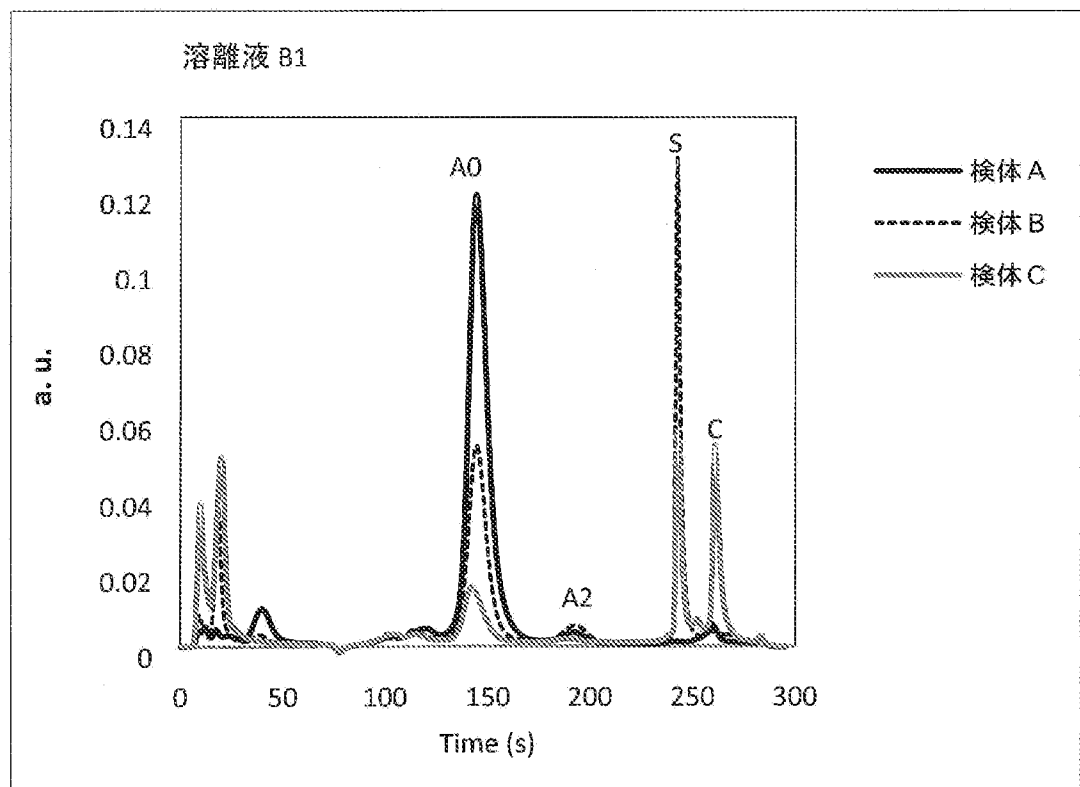
測定時間 (min)	溶離液 B 濃度 (容量%)	
	実施例 19	実施例 20
0	0	0
0.99	0	0
1	86.0	84.7
4.5	91.0	89.7
5.17	100	100
5.5	100	100
5.51	0	0
6	0	0

請求の範囲

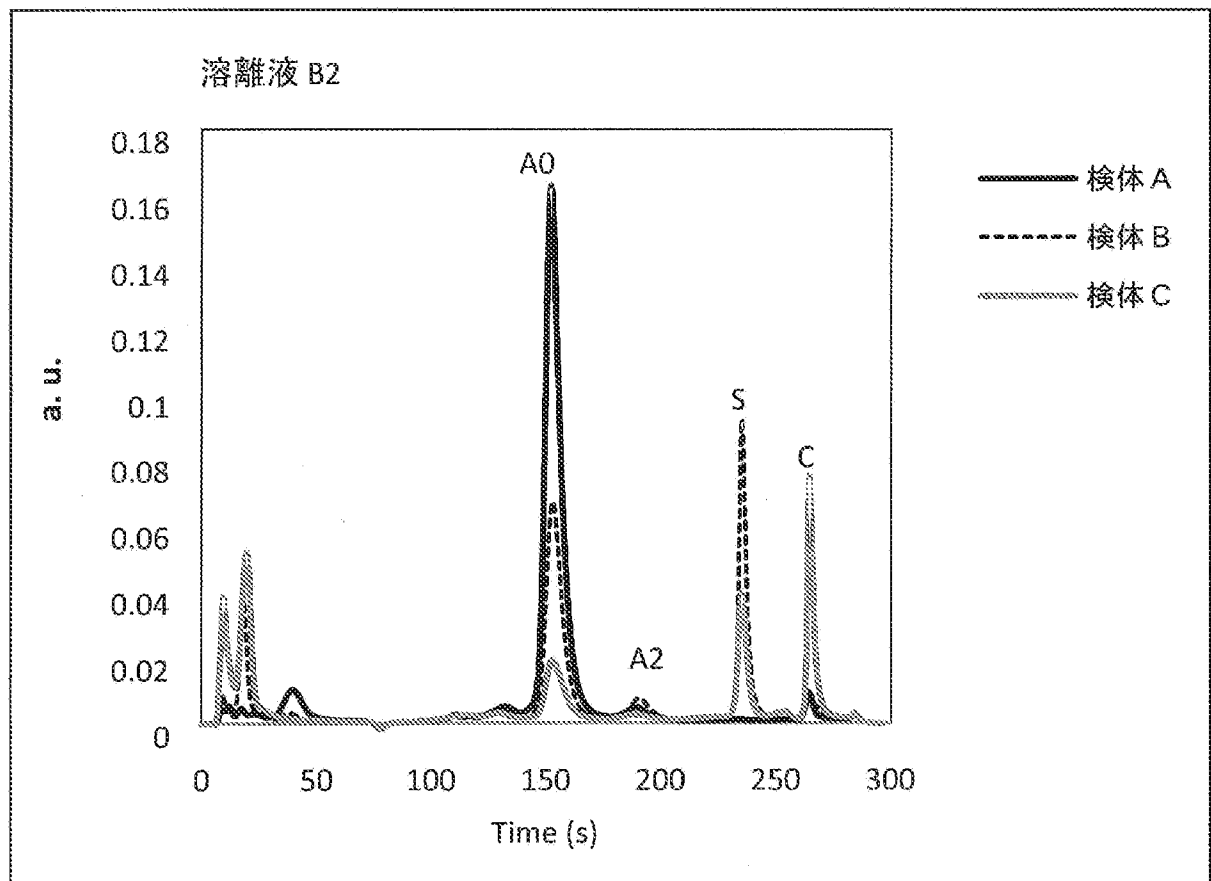
- [請求項1] ヘモグロビン分析方法であって、
 カチオン交換クロマトグラフィーにより試料中のヘモグロビンを分離することを含み、
 該ヘモグロビンの分離において、pH 8.1以上、浸透圧40 mOsm/kg以下の溶離液が用いられる、
 方法。
- [請求項2] 前記溶離液が金属イオンを含まない緩衝剤を含有する、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記緩衝剤がBicine、Tricine又はTESである、請求項2記載の方法。
- [請求項4] 前記溶離液中の前記緩衝剤の濃度が2～17 mmol/Lである、請求項2又は3記載の方法。
- [請求項5] 前記溶離液がヘモグロビン変性剤を含有する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] 前記溶離液を用いたグラジエント溶離によりヘモグロビンを分離する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
- [請求項7] 前記グラジエントにおいて前記溶離液の割合が0%から100%まで増加する、請求項6記載の方法。
- [請求項8] Hb S、Hb C、Hb E、Hb D、及びHb O-Arabからなる群より選択される少なくとも1種の異常ヘモグロビンを分離する、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。
- [請求項9] Hb A₂、Hb F、Hb H、Hb Bart'、及びHb Constant Springからなる群より選択される少なくとも1種のサラセミアマーカーを分離する、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。
- [請求項10] 前記クロマトグラフィーが高速液体クロマトグラフィーである、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

- [請求項11] pH 8.1以上、浸透圧40 mOsm/kg以下である、カチオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離用溶離液。
- [請求項12] 金属イオンを含まない緩衝剤を含有する、請求項11記載の溶離液。
- [請求項13] 前記緩衝剤がBicine、Tricine又はTESである、請求項12記載の溶離液。
- [請求項14] 前記溶離液中の前記緩衝剤の濃度が2～17 mmol/Lである、請求項12又は13記載の溶離液。
- [請求項15] 前記溶離液がヘモグロビン変性剤を含有する、請求項11～14のいずれか1項記載の溶離液。
- [請求項16] pH 8.1以上、浸透圧40 mOsm/kg以下である液体組成物の、カチオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離用溶離液としての使用。
- [請求項17] pH 8.1以上、浸透圧40 mOsm/kg以下である液体組成物の、カチオン交換クロマトグラフィーによるヘモグロビン分離用溶離液の製造のための使用。
- [請求項18] 前記液体組成物が金属イオンを含まない緩衝剤を含有する、請求項16又は17記載の使用。
- [請求項19] 前記緩衝剤がBicine、Tricine又はTESである、請求項18記載の使用。
- [請求項20] 前記液体組成物中の前記緩衝剤の濃度が2～17 mmol/Lである、請求項18又は19記載の使用。
- [請求項21] 前記液体組成物がヘモグロビン変性剤を含有する、請求項16～20のいずれか1項記載の使用。

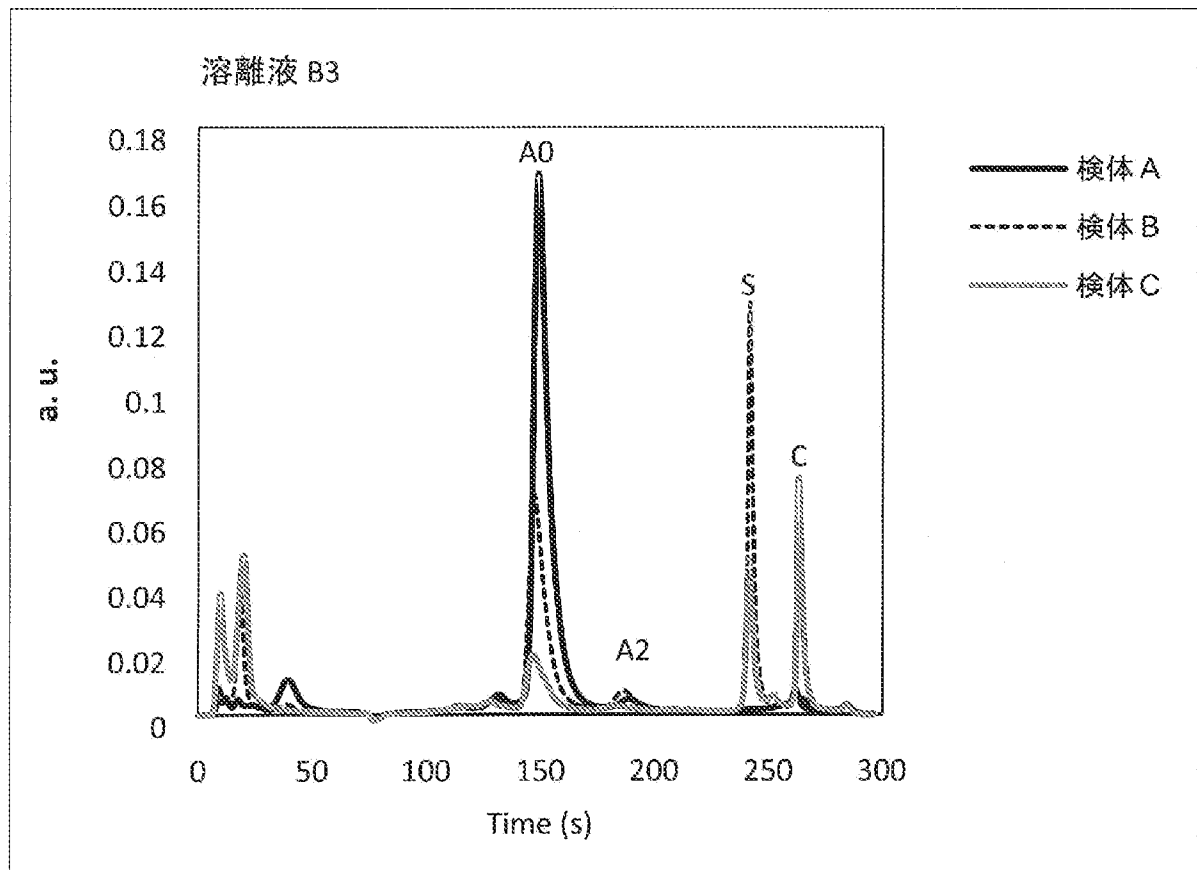
[図1]



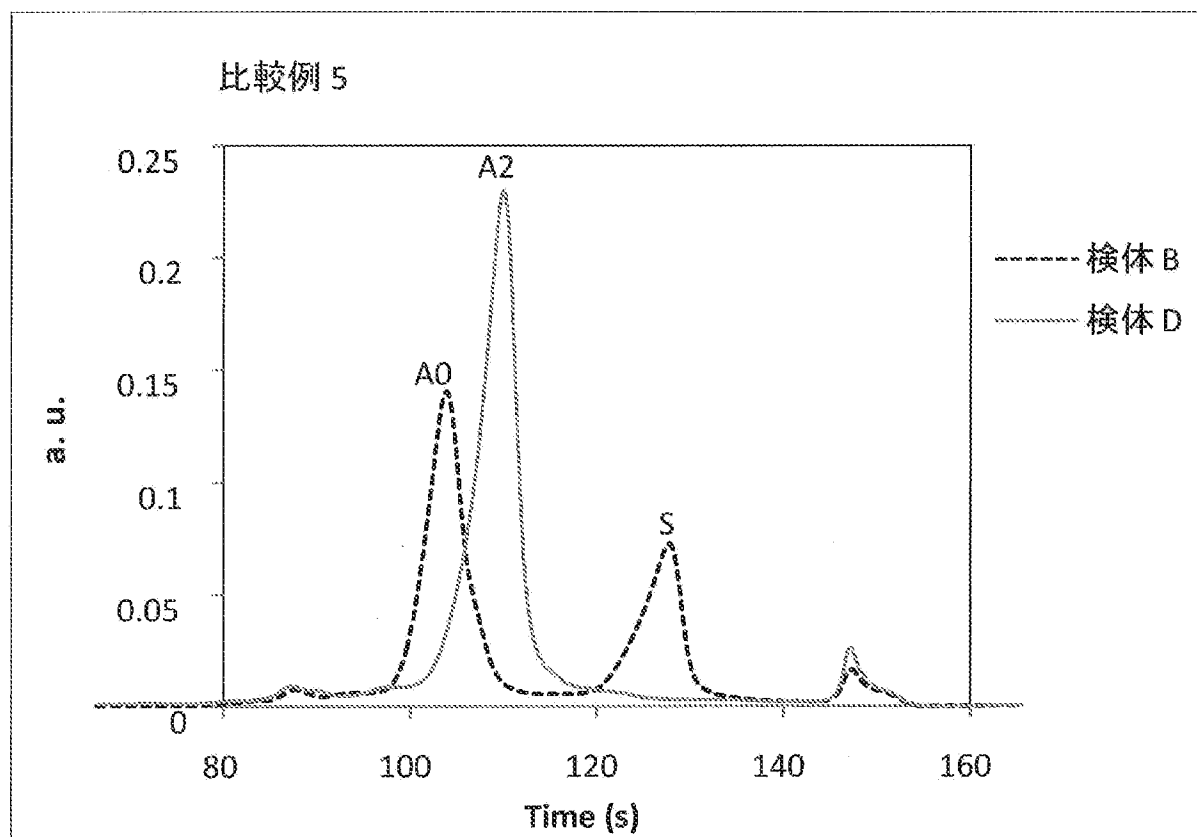
[図2]



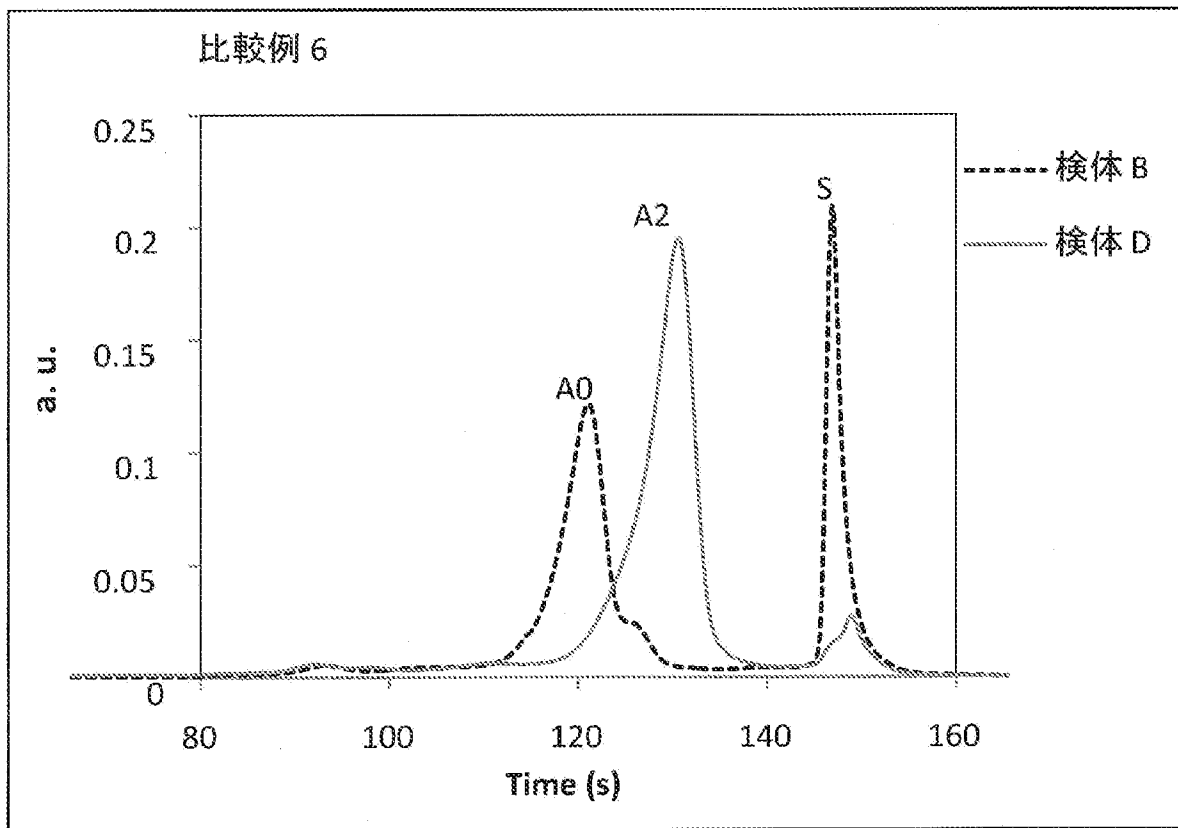
[図3]



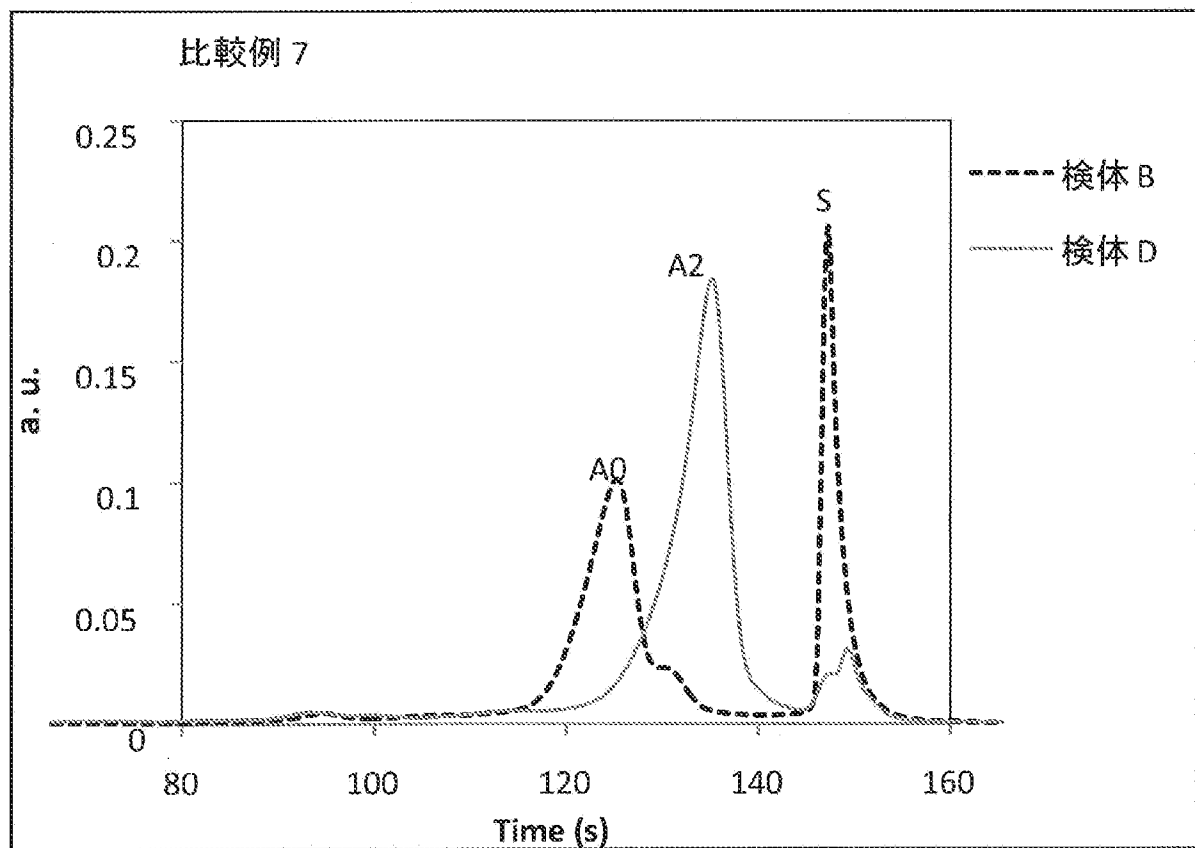
[図4]



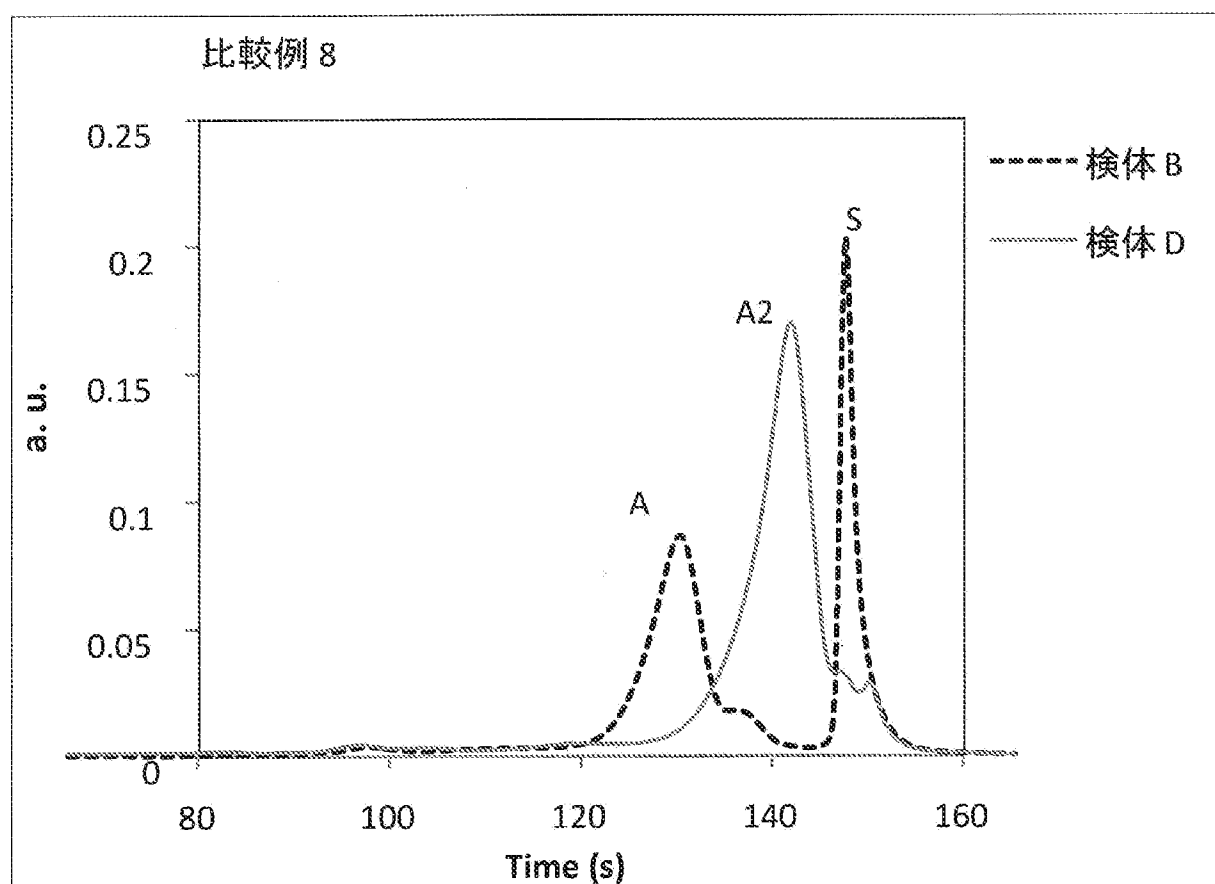
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/016633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N30/88 (2006.01) i, G01N30/02 (2006.01) i, G01N30/34 (2006.01) i

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. G01N30/88, G01N30/02, G01N30/34, G01N30/26, G01N33/72

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 1971-2019

Registered utility model specifications of Japan 1996-2019

Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-295286 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 29 October 1999, claims (Family: none)	1-21
A	JP 10-227780 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 25 August 1998, claims, paragraph [0030] (Family: none)	1-21
A	JP 2016-27326 A (ARKRAY INC.) 18 February 2016, claims & US 2015/0377846 A1, claims & EP 2960648 A1 & CN 105223299 A	1-21



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
09.07.2019

Date of mailing of the international search report
23.07.2019

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/JP2019/016633

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 2001-221788 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 17 August 2001, claims, paragraphs [0033]-[0035], [0061], [0068] (Family: none)	1-21
A	JP 2012-168055 A (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 06 September 2012, paragraph [0085] (Family: none)	1-21
A	JP 2012-168054 A (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 06 September 2012, paragraph [0079] (Family: none)	1-21
A	JP 2002-520338 A (BIOPURE CORPORATION) 09 July 2002, claims, paragraphs [0114], [0115] & US 6150507 A, claims, column 15, line 65 to column 16, line 10 & WO 2000/002921 A1 & EP 1097171 A1 & AU 4700399 A & CA 2336808 A1 & NZ 509257 A & HK 1037643 A1 & CN 1308636 A	1-21
A	US 5801053 A (PRIMUS CORP.) 01 September 1998, column 5, lines 5-8 & WO 1997/041771 A1 & AU 1077397 A	1-21
A	WO 2011/125484 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 13 October 2011, claims, paragraph [0011] & US 2013/0130391 A1, claims, paragraph [0019] & EP 2562539 A1 & CN 102893147 A & KR 10-2013-0054951 A	5, 15, 21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, G01N30/02(2006.01)i, G01N30/34(2006.01)i

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. G01N30/88, G01N30/02, G01N30/34, G01N30/26, G01N33/72

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
A	JP 11-295286 A (積水化学工業株式会社) 1999. 10. 29, [特許請求の範囲] (ファミリーなし)	1-21
A	JP 10-227780 A (積水化学工業株式会社) 1998. 08. 25, [特許請求の範囲]、[0030] (ファミリーなし)	1-21
A	JP 2016-27326 A (アークレイ株式会社) 2016. 02. 18, [特許請求の範囲] & US 2015/0377846 A1, Claims & EP 2960648 A1 & CN 105223299 A	1-21

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

09. 07. 2019

国際調査報告の発送日

23. 07. 2019

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)

倉持 俊輔

2 J

3209

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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
A	JP 2001-221788 A (積水化学工業株式会社) 2001. 08. 17, [特許請求の範囲]、[0033] – [0035]、[0061]、 [0068] (ファミリーなし)	1-21
A	JP 2012-168055 A (積水メディカル株式会社) 2012. 09. 06, [0085] (ファミリーなし)	1-21
A	JP 2012-168054 A (積水メディカル株式会社) 2012. 09. 06, [0079] (ファミリーなし)	1-21
A	JP 2002-520338 A (バイオピュア コーポレーション) 2002. 07. 09, [特許請求の範囲]、[0114] – [0115] & US 6150507 A, Claims, Column15 Line65-Column16 Line10 & WO 2000/002921 A1 & EP 1097171 A1 & AU 4700399 A & CA 2336808 A1 & NZ 509257 A & HK 1037643 A1 & CN 1308636 A	1-21
A	US 5801053 A (PRIMUS CORP.) 1998. 09. 01, 第5欄第5 – 8行 & WO 1997/041771 A1 & AU 1077397 A	1-21
A	WO 2011/125484 A1 (積水メディカル株式会社) 2011. 10. 13, [特許請求の範囲]、[0011] & US 2013/0130391 A1, Claims, [0019] & EP 2562539 A1 & CN 102893147 A & KR 10-2013-0054951 A	5, 15, 21