

(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
2008年9月4日 (04.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/105142 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01)

(74) 代理人: 速水進治 (HAYAMI, Shinji); 〒1410031 東京都品川区西五反田 7-9-2 五反田 T G ビル 9 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/000212

(22) 国際出願日: 2008年2月13日 (13.02.2008)

(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2007-050429 2007年2月28日 (28.02.2007) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 服部涉 (HATORI, Wataru) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号日本電気株式会社内 Tokyo (JP).

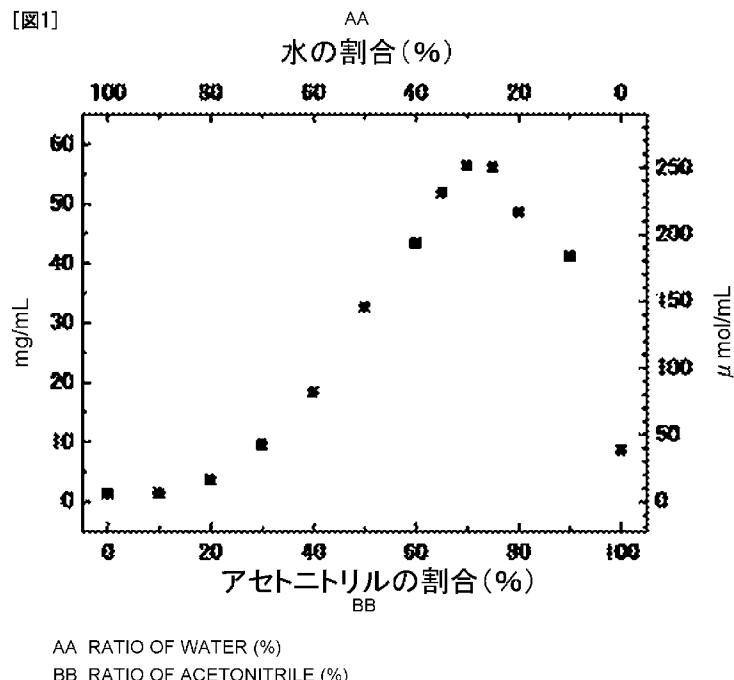
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

/ 続葉有 /

(54) Title: MATRIX SOLUTION

(54) 発明の名称: マトリックス溶液



(57) Abstract: Disclosed is a matrix solution which contains a liquid mixture of acetonitrile and water as a main solvent component. In this matrix solution, the volume ratio between acetonitrile and water (acetonitrile:water) is within the range from 6.5:3.5 to 8:2, and sinapic acid is contained as the matrix.

(57) 要約: マトリックス溶液は、アセトニトリルと水からなる混合液を主たる溶媒成分とし、アセトニトリルと水の体積比が、アセトニトリル6.5に対して水3.5の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲にあり、マトリックスとしてシナピン酸を含む。

WO 2008/105142 A1



IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調查報告書
— 補正書

明 細 書

マトリックス溶液

技術分野

[0001] 本発明は、小口径ノズルを通して吐出させるマトリックス溶液に関する。

背景技術

[0002] 近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計（MALDI-MS）を用いた質量分析イメージング技術の開発が盛んに行われている。質量分析イメージングは、組織切片や、チップやゲルで分離した試料のそれぞれの位置にレーザーを照射し、照射位置毎に質量分析を行う技術をいう。

この技術においては、レーザーを照射する前に、予めタンパク質等の試料のイオン化を促進するためのマトリックスと呼ばれる試薬を試料に添加し、マトリックスと共に試料が結晶化した状態を作成する必要がある。一般的なイメージング技術同様、この技術においても位置分解能は高ければ高いほど好ましいが、この位置分解能は下記の要因によって制限される。

[0003] 一つ目の要因は、照射するレーザースポットの径である。一般的なMALDI-MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法）ではこのレーザースポット径は100ミクロンから200ミクロン程度である。

[0004] 二つ目の要因は、マトリックス添加時の試料分布の乱れである。マトリックスは、通常、アセトニトリルという揮発性有機溶媒と水の混合溶媒に溶解された溶液の状態で組織切片やチップ基板などに添加され、溶媒の乾燥によってマトリックスが析出、結晶化する際に、その場にあるタンパク質等の試料を取り込む。この際に、マトリックスの液量が多いと、タンパク質等の試料を取り込んだマトリックス溶液が組織切片上、あるいはチップ上やゲル上を広範囲に流れ、タンパク質等の試料の位置情報は乱れてしまう。従って、マトリックス添加技術には、少量の溶液を小面積ごとに添加する技術が必要になる。

[0005] そこで、質量分析イメージングにおいては、液滴を小さくするために、小

口径ノズル、例えば、インクジェット、ディスペンサ、スプレー、エレクトロスプレー、超音波霧化装置等を用いてマトリックスを添加する。この際の液滴の径、あるいは小口径ノズルの内径は、MALDI-MSのレーザースポット径程度か、あるいはそれよりも小さいことが望まれる。このとき、マトリックス溶液の液滴の液量はnLレベルとなる。

[0006] 一方で、マトリックス溶液の濃度は十分高いことが要求される。マトリックスはmo1比でタンパク質やペプチド等の試料の1000倍程度の混合比で結晶を作成することが望ましいとされている。

[0007] マトリックスとしては、イメージング技術に用いる場合に限らず、通常の質量分析測定時においても、シナピン酸が汎用的に用いられている。このシナピン酸は、質量分析装置メーカーと試薬メーカーの推奨もあって、過飽和あるいは飽和溶液に近い10mg/mLの濃度に溶解して用いられる。溶媒には、体積比でアセトニトリル3に対して水7の混合液が用いられており、この溶媒は、0.1~1%のTFA (Trifluoroacetic acid) を含有することが多い。

[0008] シナピン酸の分子量は224.21であることから、シナピン酸濃度10mg/mLのマトリックス溶液1nLに含まれるシナピン酸の物質量は、44.6pmo1となる。したがって、この千分の一のmo1比に対応するタンパク質やペプチド等の試料の量は44.6fmolとなる。通常市販されている質量分析計の感度の下限が10fmolであることを考慮すると、この試料濃度は、安定的に検出できる下限に近い量となる。

[0009] 即ち、イメージング技術に適用する際にも、マトリックス溶液濃度を少なくとも10mg/mL程度にすることが必須となる。実際、質量分析イメージングを研究する多くのグループがこの通常条件のマトリックス溶液を使用している。

例えば、特許文献1には、0.1~1%のTFAを含有する、体積比でアセトニトリル1に対して水1の溶媒に20mg/mLの濃度でシナピン酸を溶解したマトリックス溶液を用いて質量分析イメージングを行った結果が記

載されている。

特許文献1：特開2006－337371号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] しかしながら、従来のマトリックス溶液を質量分析イメージングに用いた場合、下記に述べる問題を生じていた。

すなわち、従来のマトリックス溶液は、シナピン酸の飽和溶液であるか、飽和に極めて近い濃度の溶液である。そのため、小口径ノズルからマトリックス溶液を吐出させると、小口径ノズル中、あるいはノズルの吐出口でシナピン酸が析出し、結晶化して、小口径ノズルが詰まってしまうという問題を生じていた。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明によれば、小口径ノズルを通して吐出させるマトリックス溶液であって、アセトニトリルと水からなる混合液を主たる溶媒成分とし、アセトニトリルと水との体積比が、アセトニトリル6.5に対して水3.5の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲にあり、マトリックスとしてシナピン酸を含むことを特徴とするマトリックス溶液が提供される。

[0012] 本発明によれば、シナピン酸を溶解させたマトリックス溶液のアセトニトリルと水の体積比をアセトニトリル6.5に対して水3.5の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲とすることにより、高濃度のシナピン酸を含有するマトリックス溶液を得ることができる。また、本発明によれば、シナピン酸を析出させることなく、小口径ノズルを通してマトリックス溶液を吐出させることができる。したがって、液滴の小さいマトリックス溶液の添加が可能となり、位置分解能の高い質量分析イメージングを実現することができる。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、マトリックスとして多用されるシナピン酸溶液の濃度を

必要十分な濃度に維持しながら、小口径ノズルを通して吐出する際ににおいても、小口径ノズルが詰まりにくいまトリックス溶液が提供される。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本実施形態の効果を説明するグラフである。

[図2]本実施形態の効果を説明するグラフである。

[図3]本実施例の結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 本実施形態に係るマトリックス溶液は、小口径ノズルを通して吐出させるマトリックス溶液である。アセトニトリルと水からなる混合液を主たる溶媒成分とし、アセトニトリルと水の体積比が、アセトニトリル6.5に対して水3.5の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲にあり、マトリックスとしてシナピン酸を含む。

[0016] 本実施形態に係るマトリックス溶液の主たる溶媒成分は、体積比でアセトニトリル6.5、水3.5の割合からアセトニトリル8、水2の割合までの範囲からなるアセトニトリルと水との混合液である。

主たる溶媒成分とは、体積比として溶媒の90%以上を占める構成成分とすることができますが、97%以上を占める構成成分とするとより好ましい。

[0017] 本実施形態に係るマトリックス溶液の主たる溶媒成分は、さらに望ましくはアセトニトリル7、水3の割合からアセトニトリル8、水2の割合までの範囲からなるアセトニトリルと水との混合液とすることができます。

[0018] シナピン酸の濃度は、質量分析の感度によって影響されるものであり、質量分析の目的を達成できる量であれば特に限定されるものではないが、好ましくは、4.48mg/mL以上11.2mg/mL以下とすることができます。

[0019] 本実施形態に係るマトリックス溶液には、アセトニトリル及び水と混合可能な溶媒を含むことができる。この溶媒としては、たとえば、アルコール等の極性溶媒を用いることができる。

[0020] 本実施形態に係るマトリックス溶液には、酸が添加されていてもよい。

酸としては、例えばTFAを用いることができる。酸の濃度は、特に限定されるものではないが、例えば、TFAを用いた場合においては、0.1%以上1%以下にすることができる。

- [0021] 本実施形態に係るマトリックス溶液は、小口径ノズルを通して吐出させる。小口径ノズルの型式は特に制限されるものではないが、例示するとすれば、インクジェット、ディスペンサ、スプレー、エレクトロスプレーを用いることができる。
- [0022] 本実施形態に係るマトリックス溶液は、内径が0.18mm以下の小口径ノズルであっても、良好に吐出することができる。ノズルの内径の下限値は、マトリックス溶液が添加できる大きさであれば特に制限はないが、実用性、入手容易性、価格を考慮すると、0.10mm以上とすることができます。
- [0023] 吐出時の温度は、小口径ノズルの使用温度に適すれば、特に限定されないが、10～30°Cの範囲で吐出させることができが好ましく、20～25°Cの範囲で吐出させるとより好ましい。
- [0024] 以下に本実施形態の効果を説明する。

図1は、アセトニトリルと水の混合比を変えて作成した溶媒に対するシナピン酸の飽和濃度を室温で測定したグラフである。下軸にアセトニトリル濃度、上軸に水の濃度を体積%で示している。また、左軸にシナピン酸の濃度をmg/mLの単位で、右軸に対応するmoI濃度をμmoI/mLの単位で示している。

- [0025] 図1で示されるように、シナピン酸の飽和濃度はアセトニトリルと水の混合比により大幅に変化する。

アセトニトリル7、水3の割合の場合に最大値を取り、56.4mg/mLの値を取る。また、アセトニトリル6.5、水3.5の割合からアセトニトリル8、水2の割合までの範囲でほぼ50mg/mL以上の値を取り、通常の濃度10mg/mLの5倍の値を取る。したがって、シナピン酸を溶解して10mg/mLの溶液を作成しても、飽和濃度まで5倍の間隔があるため、シナピン酸は容易に析出できず、ニードルを詰まりにくくすることができます。

きる。

[0026] 図2は、アセトニトリルと水の温度ー蒸気圧曲線である。

この図では、横軸に温度(°C)、左軸に蒸気圧をmmHgの単位で、右軸に同じく対応する蒸気圧をkPaの単位で示している。

この図によれば、20°C近傍ではアセトニトリルは水の約4倍の蒸気圧を示す。したがって、小口径ノズル先端の気液界面ではこの割合に従って溶媒が蒸発する。

本実施形態に係るマトリックス溶液の主たる溶媒の体積比は、この蒸気圧比に近い値である。したがって、この体積比は、乾燥によりあまり変わらずに安定した条件といえる。

[0027] このような条件を総合すると、アセトニトリル7、水3の割合からアセトニトリル8、水2の割合までの範囲で混合して作成した溶媒にマトリックスとしてシナピン酸を溶解したマトリックス溶液を用いると、より安定して、小口径ノズルを詰まらせることなく従来と同濃度のシナピン酸溶液を滴下することが出来る。

[0028] また、シナピン酸濃度としては、通常市販されている質量分析計の感度下限10fmolの2倍のサンプル量に対応し、安定的に測定できる4.48mg/mL、即ち、20pmol/μL以上とすることができます。また、飽和濃度の5倍以下となる11.2mg/mL以下とすることができます。これにより、質量分析の目的となる試料に対し、十分な濃度のシナピン酸を添加でき、且つニードルを詰まりにくくすることができる。

実施例

[0029] <マトリックス溶液の調製>

アセトニトリルと水の体積比をアセトニトリル/水=3:7、6:4、6.5:3.5、7:3、8:2、8.5:1.5の条件でシナピン酸を溶解する溶媒を作成した。

各々の溶媒に、0.1~1%のTFAを混合し、シナピン酸を10mg/mLの濃度で溶解した。

[0030] <吐出能に関する実験>

室温にて、28G（内径0.18mm、外径0.36mm）のディスペンサ用金属ニードルを用いて上記調製したマトリックス溶液をそれぞれ滴下し、吐出能を調べた。また、時間を置いてマトリックス溶液を滴下し、マトリックス溶液の再吐出能についてそれぞれ調べた。

[0031] <タンパク質の溶解性に関する実験>

上記調製したマトリックス溶液に、タンパク質としてアポミオグロビンをシナピン酸の濃度に対し、m o l比で1000分の1になるように加え、アポミオグロビンの溶解性を調べた。

[0032] <信号検出強度の均一性に関する実験>

上記調製したアポミオグロビンを含有するマトリックス溶液を32G（内径0.10mm、外径0.23mm）のディスペンサ用金属ニードルを用い、室温にて直線状流路を有するチップ基板の流路に沿ってそれぞれ滴下した。質量分析計に掛けてアポミオグロビンの信号検出強度を測定して、信号検出強度の均一性を評価した。

[0033] <結果>

表1に結果を示す。○は良好、×は不良、△は良好な場合（○の場合）と不良な場合（×の場合）があり、結果で不安定であったことを示す。

[0034] [表1]

マトリックス溶液 の主たる溶媒成分 の体積比	アセト ニトリル	3	6	6.5	7	8	8.5
	水	7	4	3.5	3	2	1.5
吐出能	×	△	○	○	○	○	
再吐出能	×	△	△	○	○	△	
タンパク質の溶解性	○	○	○	○	○	×	
信号検出強度の均一性	×	×	○	○	○	—	

[0035] 吐出能に関する実験においては、アセトニトリル/水が3：7のマトリックス溶液を滴下しようとした場合、ニードル先の結晶を取り除いて1分もたたないうちに結晶が析出してニードルが詰まってしまった。また、滴下中にニードル

ドルが詰まってしまうという現象も見られた。一方、その他の体積比においては、特にニードルが詰まることなく滴下することが出来た。

[0036] 再吐出能に関する実験を繰り返し行ったところ、アセトニトリルと水の体積比を7：3と8：2としたものは安定した吐出を示した。

[0037] タンパク質の溶解性に関する実験においては、アセトニトリルと水の体積比を8.5：1.5とした溶媒では、有機溶媒の比が高すぎてアポミオグロビンがきれいに溶解しなかったが、その他の体積比からなるマトリックス溶液には、アポミオグロビンは、良好に溶解した。

[0038] 信号検出強度の均一性に関する実験においては、アセトニトリルと水の体積比を6：4とした条件では、均一性が明らかに他の条件より劣っていた。そこで、シナピン酸濃度を約8.5mg/mLの濃度になるよう薄めて実験を行ったところ、信号検出強度について良好な均一性が得られた。したがって、アセトニトリルと水の体積比を6：4とした条件では、他の条件と比較してニードル中に結晶が析出しやすいため、液の吐出量が不安定になりやすいことが判明した。

また、アセトニトリルと水の体積比を6：4とする条件では他の場合と比較して乾燥速度も遅く、液が流れやすいため、質量分析イメージングへの適用は難しいことがわかった。

[0039] アセトニトリルと水の体積比を6：4とした条件では、図1のグラフからシナピン酸の飽和濃度は、43mg/mLである。この条件においては、シナピン酸濃度を約8.5mg/mLとすれば、上記のように良好な信号強度が得られることから、シナピン酸濃度は飽和濃度の1/5以下にすべきであると考えられた。

そこで、シナピン酸をmO_l濃度で計算して溶液を作成し、アセトニトリルと水の体積比を7：3及び8：2からなるマトリックス溶液を用いて、質量分析計のアポミオグロビン検出感度実験を行ったところ、シナピン酸濃度を4.48mg/mL(20pmol/μL)以上にすると、きれいな信号が検出できることがわかった。

- [0040] このような実験により、マトリックス溶液の組成を最適化した結果、アセトニトリルと水の体積比を7：3と8：2とした条件の両方で、チップ中の流路に沿って滴下した場合のアポミオグロビンの信号検出強度のはらつきがほぼ±30%以下になる結果を得た。また、チップ中の流路で等電点分離したタンパク質のパターンを乱すことなく検出できることも確認した。
- [0041] 図3は、流路0.5mm単位で質量分析スペクトルを取り、並べたグラフである。横軸は分子量を示し、縦軸は信号強度を示す。
- 等電点電気泳動により、予めチップ中の流路内で分離されたトリプシンイシヒビター (Trypsin Inhibitor) とカルボニックアンヒドラーゼIII (Carbonic Anhydrase III) 、クリアチンfosフォキナーゼ (Creatin Phosphokinase) が特に流路中を広がらずに検出されていることがわかる。
- [0042] 以上、記したとおり、マトリックスとして多用されるシナピン酸溶液の濃度を必要十分な濃度に維持しながら、小口径ノズルを通して滴下する際ににおいても、ノズルが詰まりにくいマトリックス溶液が提供される。
- [0043] なお、本実施例においては、ディスペンサを用いて実験を行った結果を示したが、ディスペンサに限られるものではなく、小口径ノズルを使用したマトリックス溶液添加技術に一般的に適用できることはその構成上言うまでもない。
- [0044] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。
- [0045] この出願は、2007年2月28日に出願された日本出願特願2007-50429を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

請求の範囲

- [1] 小口径ノズルを通して吐出させるマトリックス溶液であって、アセトニトリル及び水からなる混合液を主たる溶媒成分とし、前記アセトニトリルと前記水との体積比が、アセトニトリル6.5に対して水3.5の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲にあり、マトリックスとしてシナピン酸を含むことを特徴とするマトリックス溶液。
- [2] 請求項1に記載のマトリックス溶液において、前記体積比が、アセトニトリル7に対して水3の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲にあることを特徴とするマトリックス溶液。
- [3] 請求項1又は2に記載のマトリックス溶液において、前記シナピン酸の濃度が4.48mg/mL以上11.2mg/mL以下であることを特徴とするマトリックス溶液。
- [4] 請求項1乃至3いずれかに記載のマトリックス溶液において、前記小口径ノズルの内径が0.18mm以下であることを特徴とするマトリックス溶液。

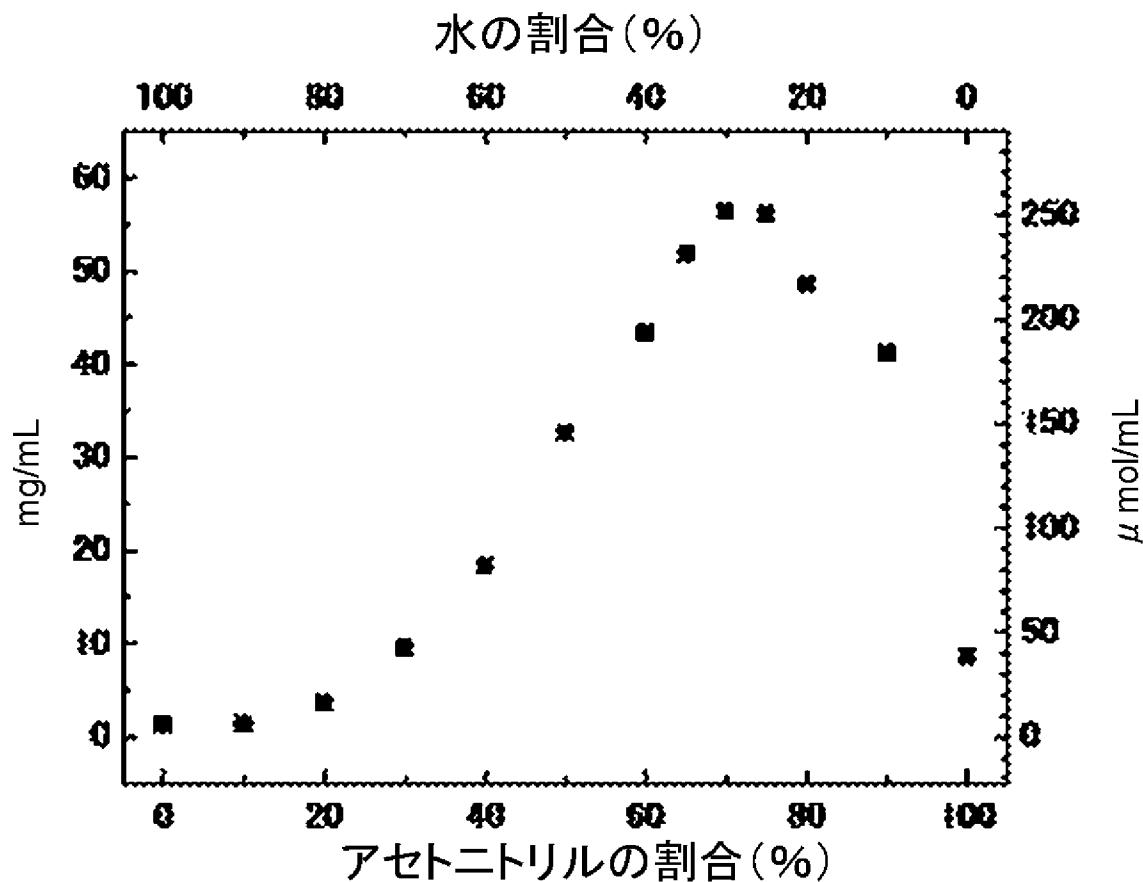
補正された請求の範囲

[2008年6月25日（25.06.2008）国際事務局受理]

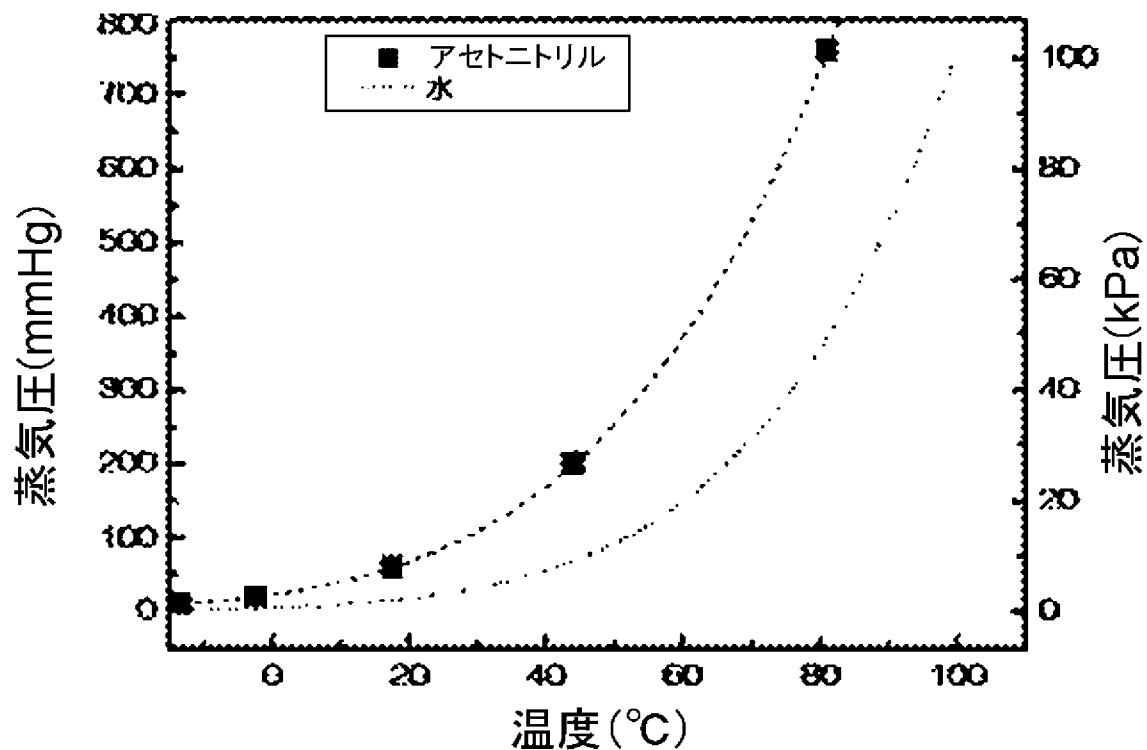
- [1] (補正後) 小口径ノズルを通して吐出されるマトリックス溶液であつて、
アセトニトリル及び水からなる混合液を主たる溶媒成分とし、
前記アセトニトリルと前記水との体積比が、アセトニトリル6.5に対して
水3.5の割合からアセトニトリル8に対して水2の割合の範囲にあり、
マトリックスとしてシナピン酸を含むことを特徴とするマトリックス溶液。
- [2] 請求項1に記載のマトリックス溶液において、
前記体積比が、アセトニトリル7に対して水3の割合からアセトニトリル
8に対して水2の割合の範囲にあることを特徴とするマトリックス溶液。
- [3] 請求項1又は2に記載のマトリックス溶液において、
前記シナピン酸の濃度が4.48mg/mL以上11.2mg/mL以下
であることを特徴とするマトリックス溶液。
- [4] 請求項1乃至3いずれかに記載のマトリックス溶液において、
前記小口径ノズルの内径が0.18mm以下であることを特徴とするマト
リックス溶液。

- [5] (追加) 請求項 1 乃至 4 いずれかに記載のマトリックス溶液において、
前記マトリックス溶液が、組織切片、または、チップもしくはゲルで分離
した試料に添加されることを特徴とするマトリックス溶液。
- [6] (追加) 小口径ノズルを通してマトリックス溶液を吐出させる方法であつて、
前記マトリックス溶液が、アセトニトリル及び水からなる混合液を主たる
溶媒成分とし、
前記アセトニトリルと前記水との体積比が、アセトニトリル 6. 5 に対して
水 3. 5 の割合からアセトニトリル 8 に対して水 2 の割合の範囲にあり、
マトリックスとしてシナピン酸を含むことを特徴とするマトリックス溶液
吐出方法。
- [7] (追加) 請求項 6 に記載のマトリックス溶液吐出方法において、
前記アセトニトリルと前記水との前記体積比が、
アセトニトリル 7 に対して水 3 の割合からアセトニトリル 8 に対して水 2
の割合の範囲にあることを特徴とするマトリックス溶液吐出方法。
- [8] (追加) 請求項 6 または 7 に記載のマトリックス溶液吐出方法において、
前記シナピン酸の濃度が 4. 48 mg / mL 以上 11. 2 mg / mL 以下
であることを特徴とするマトリックス溶液吐出方法。
- [9] (追加) 請求項 6 乃至 8 のいずれかに記載のマトリックス溶液吐出方法において、
前記小口径ノズルの内径が 0. 18 mm 以下であることを特徴とするマト
リックス溶液吐出方法。
- [10] (追加) 請求項 6 乃至 9 のいずれかに記載のマトリックス溶液吐出方法において、
前記マトリックス溶液が、組織断片、または、チップもしくはゲルで分離
した試料に添加されることを特徴とするマトリックス溶液吐出方法。

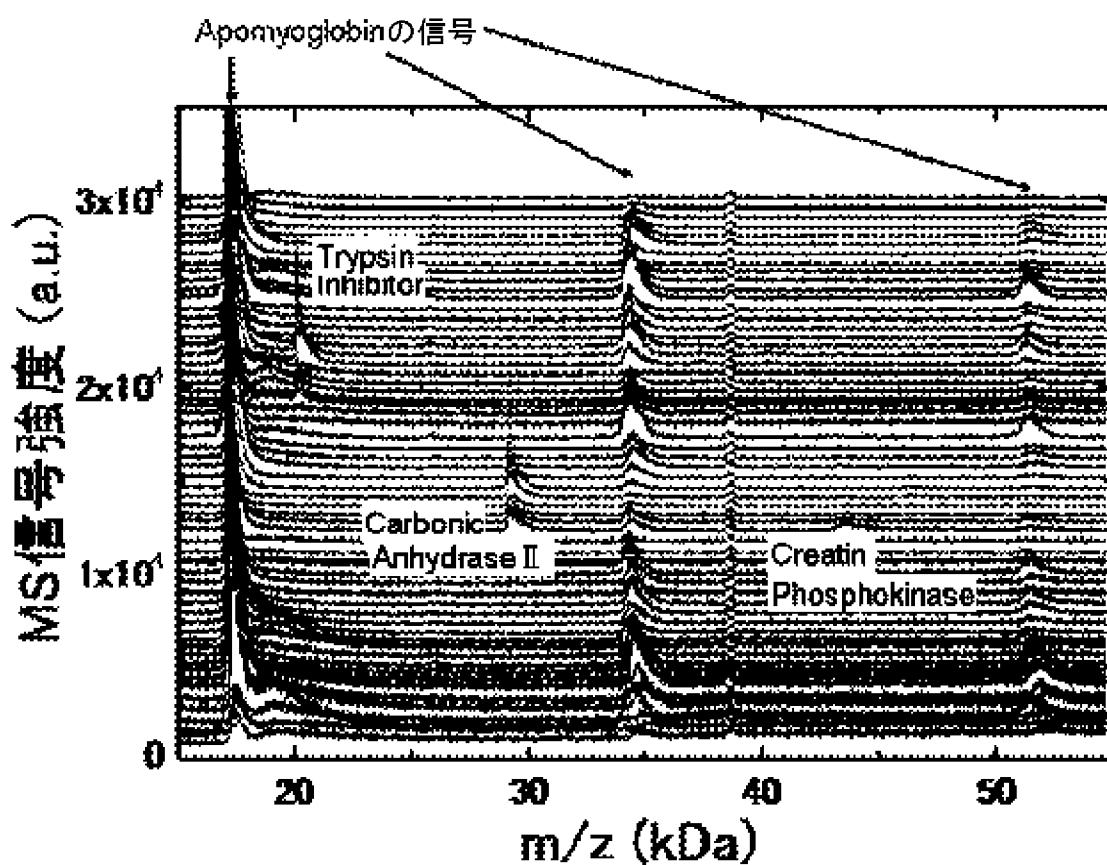
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/000212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N27/62 (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)
G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-503043 A (American Cyanamid Co.), 28 January, 2003 (28.01.03), Par. No. [0081] & WO 2001/000790 A1	1-4
X	JP 2006-292680 A (Toyo Kohan Co., Ltd.), 26 October, 2006 (26.10.06), Par. No. [0069] (Family: none)	1-4
X	JP 2004-514431 A (Cargil Inc.), 20 May, 2004 (20.05.04), Par. No. [0144] & WO 2002/042418 A2	1, 3, 4

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
 07 April, 2008 (07.04.08)

Date of mailing of the international search report
 15 April, 2008 (15.04.08)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. G01N27/62 (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. G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

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	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008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)

特許ファイル(PATOLIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-503043 A (アメリカン・サイアナミド・カンパニー) 2003.01.28, [0081] & WO 2001/000790 A1	1-4
X	JP 2006-292680 A (東洋鋼鉄株式会社) 2006.10.26, [0069] (ファ ミリーなし)	1-4
X	JP 2004-514431 A (カーギル インコーポレイテッド) 2004.05.20, [0144] & WO 2002/042418 A2	1, 3, 4

□ 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 07. 04. 2008	国際調査報告の発送日 15. 04. 2008
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 島田 英昭 電話番号 03-3581-1101 内線 3292 2W 3311