



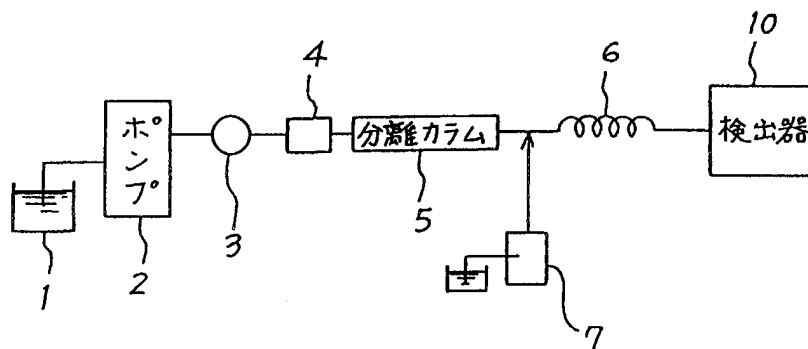
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 G01N 31/00, 21/77	A1	(11) 国際公開番号 WO98/46992 (43) 国際公開日 1998年10月22日 (22.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04568 (22) 国際出願日 1997年12月11日 (11.12.97) (30) 優先権データ 特願平9/116451 1997年4月17日 (17.04.97) JP 特願平9/262812 1997年9月9日 (09.09.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 エイコム(EICOM CORPORATION)[JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区下鳥羽円面田町24番2 Kyoto, (JP) (71) 出願人; および (72) 発明者 赤池孝章(AKAIKE, Takaaki)[JP/JP] 〒862 熊本県熊本市長嶺南6丁目14番28号 Kumamoto, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 西野博仁(NISHINO, Hirohito)[JP/JP] 〒525 滋賀県草津市南笠町536の53 Shiga, (JP)		(74) 代理人 弁理士 武石靖彦, 外(TAKEISHI, Yasuhiko et al.) 〒604 京都府京都市中京区御幸町通三条上る 丸屋町330番地の1 Kyoto, (JP) (81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書

(54)Title: **METHOD FOR DETECTING S-NITROSO COMPOUND**

(54)発明の名称 S-ニトロソ化合物検出方法



2 ... pump

5 ... separation column

10 ... detector

(57) Abstract

A mobile phase into which a sample has been injected is passed through a separation column (5) to separate an S-nitroso compound. An aqueous nonalkaline solution of a mercury, silver, or copper salt, etc. is added to the separated S-nitroso compound with a reactant feed pump (7) to liberate HNO_2 from the compound inside a reaction channel (6). The Griess reagent is added to the HNO_2 contained in the reaction mixture during or after the liberation process with a reactant feed pump (9) to generate a diazo compound. The concentration of the generated diazo compound is determined by absorptiometry with a detector (10). Alternatively, a fluorescent reagent comprising diaminonaphthalene or an analogue thereof is added to the S-nitroso compound together with a mercury, silver, or copper salt, etc. with the pump (7) to generate a fluorescent azo compound, to which a fluorescence developer is added with the pump (9). The resultant mixture is analyzed by fluorometry with the detector. Thus, the S-nitroso compound is determined.

(57)要約

本発明は、試料注入後の移動相を分離カラム5に通じてS-ニトロソ化合物を分離し、前記分離されたS-ニトロソ化合物に反応液ポンプ7より水銀、銀又は銅塩等を含む非アルカリ性の溶液を加え、反応流路6内において同化合物よりHNO₂を遊離させるとともに、この遊離工程中又は遊離工程を経た後に得られた液中のHNO₂に反応液ポンプ9よりグリース試薬を添加してジアゾ化合物を生成し、生成されたジアゾ化合物の濃度を検出器10により吸光測定するか、反応液ポンプ7より水銀、銀又は銅塩等とともにジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンに類似した蛍光試薬を添加し、蛍光体アゾ化合物を生成し、これに反応液ポンプ9より発蛍光化剤を添加して処理したのち、検出器により蛍光測定し、S-ニトロソ化合物を定量する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明 細 書

S－ニトロソ化合物検出方法

技術分野

本発明は、生体中で生成され、S－ニトロソ化された一酸化窒素（NO）を測定するための方法に関するものである。

背景技術

生体内では、一酸化窒素（NO）が細胞間伝達物質となることが認識され、特に血管系では血管内皮細胞及び支配神経から遊離されるNOがヘモグロビンなどのタンパク質と結合し、さらにヘモグロビンなどのタンパク質からS－ニトロソ化されたNOが解離して血管拡張作用を発揮するという仮説が提唱され、注目を集めている。

周知の通り、NOは反応性が強く、単体としての存在時間が1～2秒程度ときわめて短いため、特に血管系内では上述したようにS－ニトロソ化合物として存在し、持続的なNO源になると考えられている。そのため、生体内でのNOの挙動の解明に当たってはS－ニトロソ化合物の測定が不可欠であるが、現在とられている方法は、感度もしくは簡便性等の点で問題が多い。

すなわち、ニトロソ体は320nmの吸収ピークを有するが、この特性を用いて直接吸光測定しても感度が低く、挟雑物によるノイズやバックグラウンドの影響を排除できないため、信頼できる測定値を得ることはできないと考えられる。またニトロソ体の光分解によって生ずるNOとオゾンとが反応する際の化学発光を測定する方法も存在するが、オゾン発生源を必要とするほか操作が煩雑で、実際的ではない。

発明の開示

本発明の目的は、有効且つ簡便なS－ニトロソ化合物の測定方法及び装置を提

供することである。

上記の課題を解決するため、本発明は第1に、S-ニトロソ化合物を含む試料を移動相に注入し、前記試料注入後の移動相を分離カラムに通じてS-ニトロソ化合物を分離し、前記分離されたS-ニトロソ化合物に水銀、銀又は銅塩等を含む溶液を加えて HNO_2 を遊離させるとともに、この遊離工程中又は遊離工程を経た後において得られた液中の HNO_2 にグリース試薬を添加してジアゾ化合物を生成し、生成されたジアゾ化合物の濃度に応じた吸光光度を測定することからなるS-ニトロソ化合物の検出方法を構成したものである。

本発明は第2に、S-ニトロソ化合物を含む試料を移動相に注入し、前記試料注入後の移動相を分離カラムに通じてS-ニトロソ化合物を分離し、前記分離されたS-ニトロソ化合物に水銀、銀又は銅塩等を含む溶液を加えて HNO_2 を遊離させるとともに、この遊離工程中又は遊離工程を経た後において得られた液中の HNO_2 にジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンと類似した物質からなる蛍光試薬を添加して HNO_2 と反応させることにより蛍光体アゾ化合物を生成し、その蛍光光度を測定することからなるS-ニトロソ化合物の検出方法を構成したものである。

上記第1及び第2の構成において、ニトロソグルタチオン、ニトロソシステイン、システインのSH基に結合したタンパクS-NO等のS-ニトロソ化合物に、過剰の水銀塩(II)、銀塩又は銅塩を加える工程により、それらの金属イオンがS-ニトロソ化合物から HNO_2 を遊離させる。そして第1の構成では、試薬添加により生成されたジアゾ化合物の吸光光度を測定し、広い濃度範囲において測定感度及び直線性を得ることが可能となり、第2の構成では、ジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンに類似した物質からなる蛍光試薬の添加により生成された蛍光体アゾ化合物の蛍光発光を測定することにより十分に実用的なS-ニトロソ化合物の検出が可能となる。

一方、試料中の目的物質が高分子のS-ニトロソ化合物、例えばニトロソアル

ブミンやニトロヘモグロビンの場合、これらから HNO_2 を遊離した後の高分子化合物の本体もジアゾ化合物の吸収ピーク（540 nm）とほぼ等しい波長において吸収を生じ、これが吸光測定における無視できない誤差要因となる。また、この高分子化合物の吸収特性がジアゾ化合物と一部重複するという事実は、同じく HNO_2 から生成される蛍光体アゾ化合物の蛍光測定に対しても悪影響を与えるであろうことが予測される。

したがって、本発明は前記第1及び第2の方法において、金属塩の溶液を加えて遊離させた HNO_2 を含む液から高分子化合物をトラップし、その後で HNO_2 にグリース試薬又は蛍光試薬を加えるようにそれぞれ構成した高分子ニトロソ化合物の検出方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の第1の方法を基本的にも実施する装置構成例を示す流路ブロック線図である。

第2図は、本発明の第2の方法を高分子に対して実施する装置構成例を示す流路ブロック線図である。

第3図は、本発明の第3の方法を基本的にも実施する装置構成例を示す流路ブロック線図である。

第4図は、本発明の第4の方法を高分子に対して実施する装置構成例を示す流路ブロック線図である。

第5図は、S-ニトロソ化合物がニトロソグルタチオンである場合に測定された溶出クロマトグラム（a）と、ニトロソアルブミンである場合に測定された溶出クロマトグラム（b）である。

発明を実施する最良の形態

第1方法（吸光測定法）の基本的実施例

この実施例では、S-ニトロソ化合物として比較的低分子の化合物、例えばニトロソグルタチオンを分析するために、第1図の流路ブロック線図に示す装置構

成を用いる。第1図のフロー順において、1はカラム移動相用の液溜め、2は送液用ポンプ、3は送液流路中の移動相に試料を注入するためのインジェクタ、4は移動相に注入された試料から次のS-ニトロソ化合物分離用カラム5（以下「分離カラム」という。）で分離・溶出できない成分を除去するためのプレカラム、6は分離カラム5の溶出口に接続された金属イオン等反応流路としてのコイル、7は前記第1のコイル6の上流端よりこのコイル流路にHg(II)、Ag(I)又はCu(II)等のイオンを含む非アルカリ性の溶液を導入するための反応液ポンプ、10は反应用コイル流路からの流出相に光照射し、その生成物に応じた波長の吸光光度を測定するための測光系を含む検出器である。

移動相としては10mM酢酸緩衝液/メタノール(=93/7V/V、但し0.5mMジエチルトリアミンペンタン酢酸を含む、PH5.5)の液が、ポンプ2により0.5ml/minの流量で送られる。分離カラム5は逆相系カラムであって、この移動相により試料を展開してニトロソゲルタチオンを溶出することができる。

反応液ポンプ7からは、この場合、S-ニトロソ化合物のバンドから最も効率よくHNO₂を遊離させうるHg(II)イオンを含む1.75mMのHgCl₂を0.1mMのHClで調整した溶液と、グリース試薬とをいずれも0.2ml/min.の流量でコイル6(0.25mmφ×4m)に送り込み、このコイル6内で遊離したHNO₂は、同時にグリース試薬と反応してジアゾ化合物を生成する。グリース試薬としては、この場合1%のスルファニルアミドと0.1%のナフチルエチレンジアミンを含む2%リン酸溶液を採用した。なお、Hg(II)溶液と、グリース試薬の供給量の制御を厳密に行うこと等の理由により、ポンプ7からはHg(II)溶液のみをコイル6に送るものとし、その下流に専用の試薬ポンプと試薬反応コイルを追加してもよい。ジアゾ化合物は赤色を呈し540nm付近の吸収帯を有するため、検出器10はその波長を含む光源と受光素子を含む吸光光度計として構成され、これによりその吸収ピークの大きさを測定したと

ころ、微量のS-ニトロソ化合物 ($10^{-8} \sim 10^{-3} \text{M}$) について直線性ある応答が得られた。そのS-ニトロソ化合物がニトロソグルタチオンである場合に測定された溶出クロマトグラムは第5図(a)に示す通りである。

第1方法(吸光測定法)の高分子に対する実施例

S-ニトロソ化合物として比較的高分子のニトロソアルブミン等を分析する場合には、第2図に示すような装置構成が用いられる。第2図のフロー順において、1~7及び10は第1図に示したのと同じであるが、8は前記コイル6の下流端に接続された試薬反応流路としての第2のコイル、9は前記第2のコイル8の上流端よりこのコイル流路に試薬を導入するための第2の反応液ポンプ、12は前記第1のコイル6からの流出相中に存在する HNO_2 遊離後の高分子化合物を補足するためのトラップである。

S-ニトロソ化合物としてニトロソアルブミンを分析する場合、移動相としては0.5mMジエチルトリアミンペンタン酢酸を含む10mM酢酸緩衝液(PH5.5)の液が、ポンプ2により0.5ml/minの流量で送られる。分離カラム5はこの場合、分子量に応じてゲルフィルトレーション用カラムであって、この移動相により試料を展開してニトロソアルブミンを溶出することができる。

反応液ポンプ7からは、この場合、S-ニトロソ化合物のバンドから最も効率よく HNO_2 を遊離させうるHg(II)イオンを含む1.75mMの HgCl_2 を0.1mMのHClで調整した溶液を送り込み、これにより第1のコイル6(0.25mm $\phi \times 4\text{m}$)を経た液は、遊離 HNO_2 と、その遊離後の高分子化合物(アルブミン、ヘモグロビン等)を含んでおり、この高分子化合物はトラップ12により吸着・除去される。かくしてトラップ12を出た液中の HNO_2 は、第2のコイル8(0.25mm $\phi \times 4\text{m}$)内において試薬ポンプ9より供給されるグリース試薬と反応してジアゾ化合物を生成する。グリース試薬は、先の実施例と同様に、1%のスルファニルアミドと0.1%のナフチルエチレンジアミン

を含む2%リン酸溶液である。このようにしてジアゾ化合物と同様な540 nm付近の吸収帯を有するヘモグロビン等、高分子の妨害成分は除去され、検出器10は微量のS-ニトロソ化合物($10^{-8} \sim 10^{-3} \text{M}$)について正確かつ直線性ある応答を示した。S-ニトロソ化合物がニトロソアルブミンである場合に測定された溶出クロマトグラムは第5図(b)に示す通りである。

第2方法(蛍光測定法)の基本的実施例

本発明の第2の方法において、比較的低分子のS-ニトロソ化合物として、例えば第1の基本方法と同じS-ニトロソグルタチオンを分析する場合には、第3図に示す装置構成が用いられる。この装置構成の各要素1~9はその物理的機能において第2図の要素1~9と同じである。しかしながら、この実施例では高分子用トラップは必要なく、検出器11は第2のコイル流路8からの流出相に光照射(365 nm励起)し、これによって流出相中の蛍光体アゾ化合物が発する光(365 nm励起で450 nmピーク、380 nm励起で425 nmピーク)を測定する蛍光光度計として構成されたものである。

この方法において、移動相としては10 mM酢酸緩衝液/メタノール(=93/7 v/v)、但し0.5 mMエチレンジアミンを含む、PH5.5)の液を、ポンプ2により0.5 ml/minの流量で送り、分離カラム5は第1図の実施例と同様、試料を含む移動相を展開してS-ニトロソ化合物のバンドを含む溶離液を溶出することができる。

反応液ポンプ7からは、この場合、S-ニトロソ化合物のバンドから最も効率よく HNO_2 を遊離させうるHg(II)イオンを含む1.75 mMの HgCl_2 とジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンに類似する物質からなる蛍光試薬を含む水溶液を送り込み、これにより第1のコイル6内で HNO_2 を遊離すると同時に、この HNO_2 にジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンに類似する物質からなる蛍光試薬を反応させて蛍光体アゾ化合物(トリアゾール化合物)を生成せしめる。この蛍光体アゾ化合物はアルカリ化されることにより前述のよう

な励起発光特性を実際に発揮する。従って、第2のコイル8はそのための発蛍光流路として用いられ、ポンプ9からは発蛍光化剤としてのアルカリ性液、例えばカセイソーダ0.4mol (PH12)をこのコイル流路に送り込み、その流出相に対し検出器10の測光系により前記の励起波長を含む光を当て発生する蛍光のピーク強度を測定し、S-ニトロソ化合物量を決定するものである。これにより、微量のS-ニトロソ化合物 ($10^{-9} \sim 10^{-4} \text{M}$) について直線性ある応答が得られた。

第2方法（蛍光測定法）の高分子に対する実施例

本発明の第2の方法において、比較的高分子のS-ニトロソアルブミン等进行分析する場合には、第4図に示すような装置構成が用いられる。この構成では第1および第2のコイル6、8間に第2図に示したものと同一トラップ12が配置されるとともに、コイル8と検出器11の間に第3のコイル13を挿入し、かつコイル13の上流側に試薬ポンプ14を接続したものである。

この方法においては、第1の方法の高分子への適用の場合と同様、移動相としてはジエチルトリアミンペンタン酢酸を含む10mM酢酸緩衝液の液を、ポンプ2により0.5ml/minの流量で送り、分離カラム5は第2図の実施例と同様、試料を含む移動相を展開してS-ニトロソ化合物のバンドを含む溶離液を溶出することができる。

反応液ポンプ7からは、この場合も効率よく HNO_2 を遊離させうる $\text{Hg}(\text{II})$ イオンを含んだ1.75mMの HgCl_2 を0.2ml/min.の流量で第1のコイル6に送り、コイル6を出た HNO_2 遊離後の液はトラップ12を通過してアルブミン、ヘモグロビン等の高分子化合物を除去される。トラップ12を出た液は第2のコイル8に流入するが、同時にこのコイル8にはポンプ9によりジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンに類似する物質からなる蛍光試薬を含む水溶液を送り込み、液中の HNO_2 に蛍光試薬を反応させて蛍光体トリアゾール化合物を生成せしめる。前述の通り蛍光体トリアゾール化合物をアルカリ化し

て実際に励起発光特性を発揮するため、第3のコイル13がそのための発蛍光流路として用いられ、このコイル流路の上流側にはポンプ14から発蛍光化剤としてのアルカリ性液、例えばカセイソーダ0.4mol (PH12) が送り込まれ、その流出相に対し検出器11の測光系により前記の励起波長を含む光を当て発生する蛍光のピーク強度を測定し、S-ニトロソ化合物量を決定するものである。これにより、微量のS-ニトロソ化合物 ($10^{-9} \sim 10^{-4} \text{M}$) について直線性ある応答が得られた。なお、第3のコイル13も第1のコイル6及び第2のコイル8と同様の容量とすることができる。

産業上の利用可能性

本発明は以上のとおり、生体内においてS-ニトロソ化したNO量をオンライン測定により簡便且つ信頼性よく測定するための方法及び装置を提供するものであり、感度を重視する場合にはジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンに類似した蛍光試薬を添加する第2の方法を用い、安定性を重視する場合にはグリーンス試薬を添加する第1の吸光測定法を用いることが推奨される。

また、特に高分子の化合物を分析する場合には、 HNO_2 遊離後においてそれらの高分子等をトラップすることにより、正確な測定値を得ることができる。

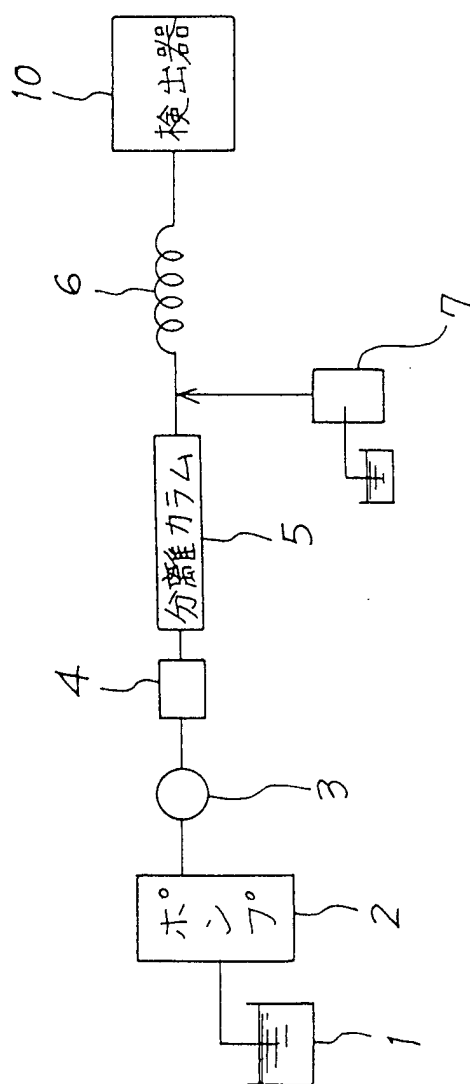
請 求 の 範 囲

1. S-ニトロソ化合物を含む試料を移動相に注入し、前記試料注入後の移動相を分離カラムに通じてS-ニトロソ化合物を分離し、前記分離されたS-ニトロソ化合物に水銀、銀又は銅塩等を含む溶液を加えて HNO_2 を遊離させるとともに、この遊離工程中又は遊離工程を経た後において得られた液中の HNO_2 にグリース試薬を添加してジアゾ化合物を生成し、生成されたジアゾ化合物の濃度に応じた吸光光度を測定することを特徴とするS-ニトロソ化合物の検出方法。
2. S-ニトロソ化合物を含む試料を移動相に注入し、前記試料注入後の移動相を分離カラムに通じて高分子S-ニトロソ化合物を分離し、前記分離された高分子S-ニトロソ化合物に水銀、銀又は銅塩等を含む溶液を加えて HNO_2 を遊離させ、この遊離工程を経た液から高分子化合物をトラップし、このトラップ後の液中に存在する HNO_2 にグリース試薬を添加してジアゾ化合物を生成し、生成されたジアゾ化合物の濃度に応じた吸光光度を測定することを特徴とするS-ニトロソ化合物の検出方法。
3. S-ニトロソ化合物を含む試料を移動相に注入し、前記試料注入後の移動相を分離カラムに通じてS-ニトロソ化合物を分離し、前記分離されたS-ニトロソ化合物に水銀、銀又は銅塩等を含む溶液を加えて HNO_2 を遊離させるとともに、この遊離工程中又は遊離工程を経た後において得られた液中の HNO_2 にジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンと類似した物質からなる蛍光試薬を添加して HNO_2 と反応させることにより蛍光体アゾ化合物を生成し、この蛍光体アゾ化合物を発蛍光化処理した後これに励起光を当て蛍光光度を測定することを特徴とするS-ニトロソ化合物の検出方法。
4. S-ニトロソ化合物を含む試料を移動相に注入し、前記試料注入後の移動相を分離カラムに通じて高分子S-ニトロソ化合物を分離し、前記分離された高

分子S-ニトロソ化合物に水銀、銀又は銅塩等を含む非アルカリ性の溶液を加えて HNO_2 を遊離させるとともに、この遊離工程を経た液から高分子化合物をトラップし、このトラップ後の液中に存在する HNO_2 にジアミノナフタレン又はジアミノナフタレンと類似した物質からなる蛍光試薬を添加して HNO_2 と反応させることにより蛍光体アゾ化合物を生成し、この蛍光体アゾ化合物を発蛍光化处理した後これに励起光を当て蛍光光度を測定することを特徴とするS-ニトロソ化合物の検出方法。

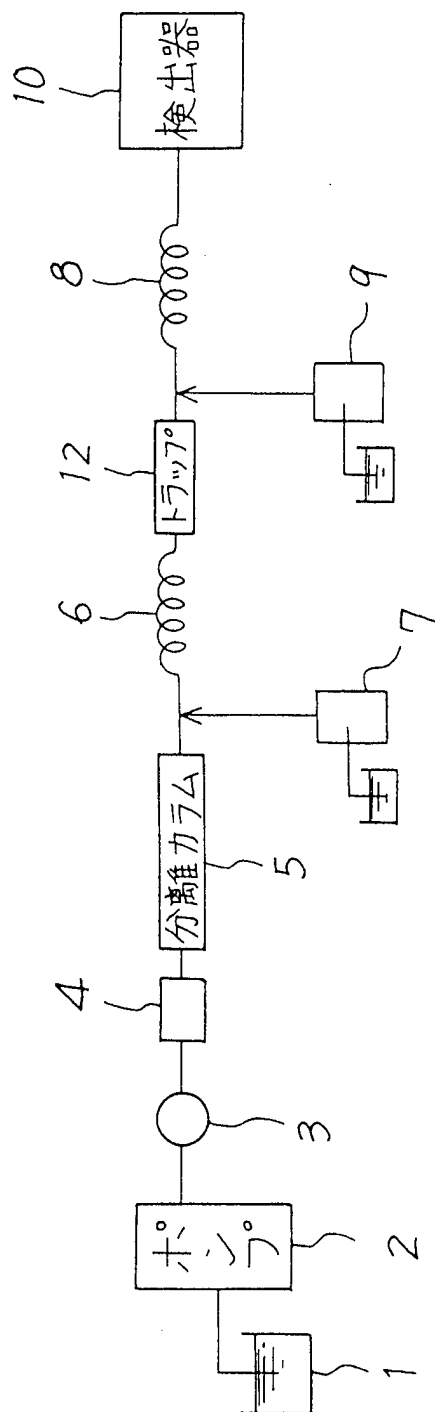
1/5

第 1 図



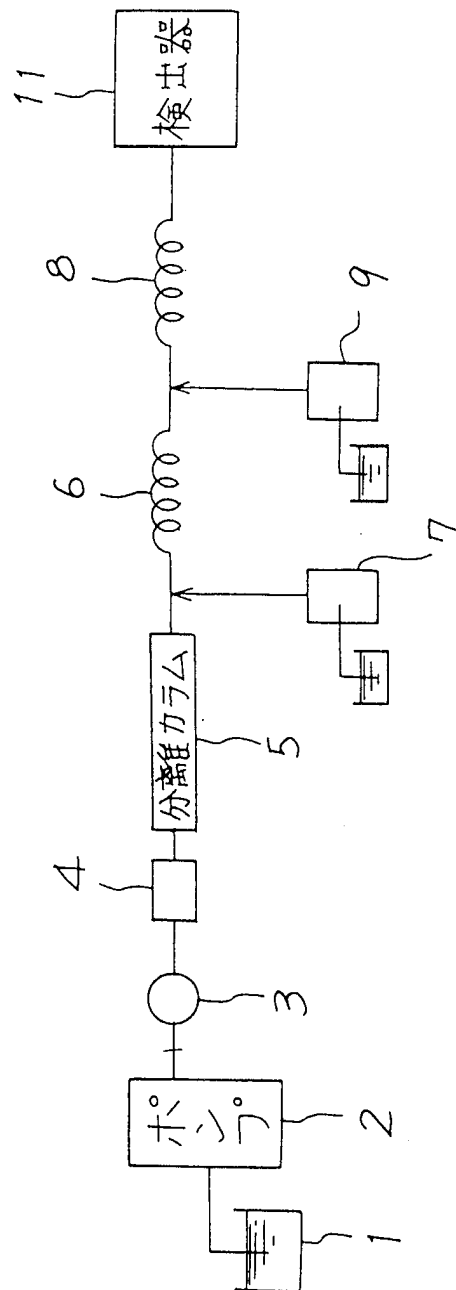
2/5

第 2 図



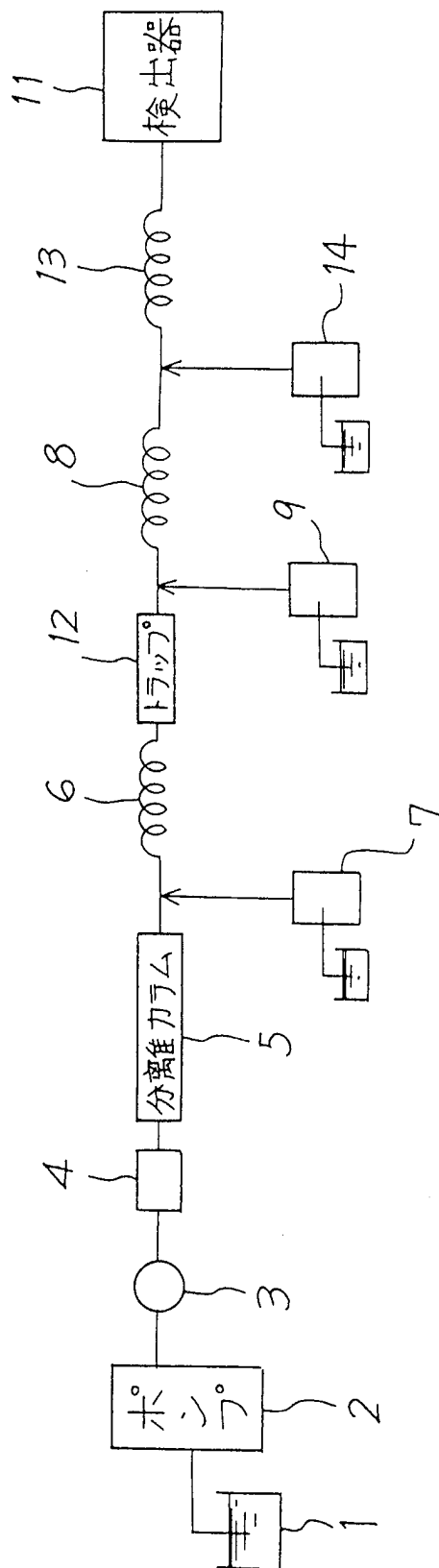
3/5

第 3 図



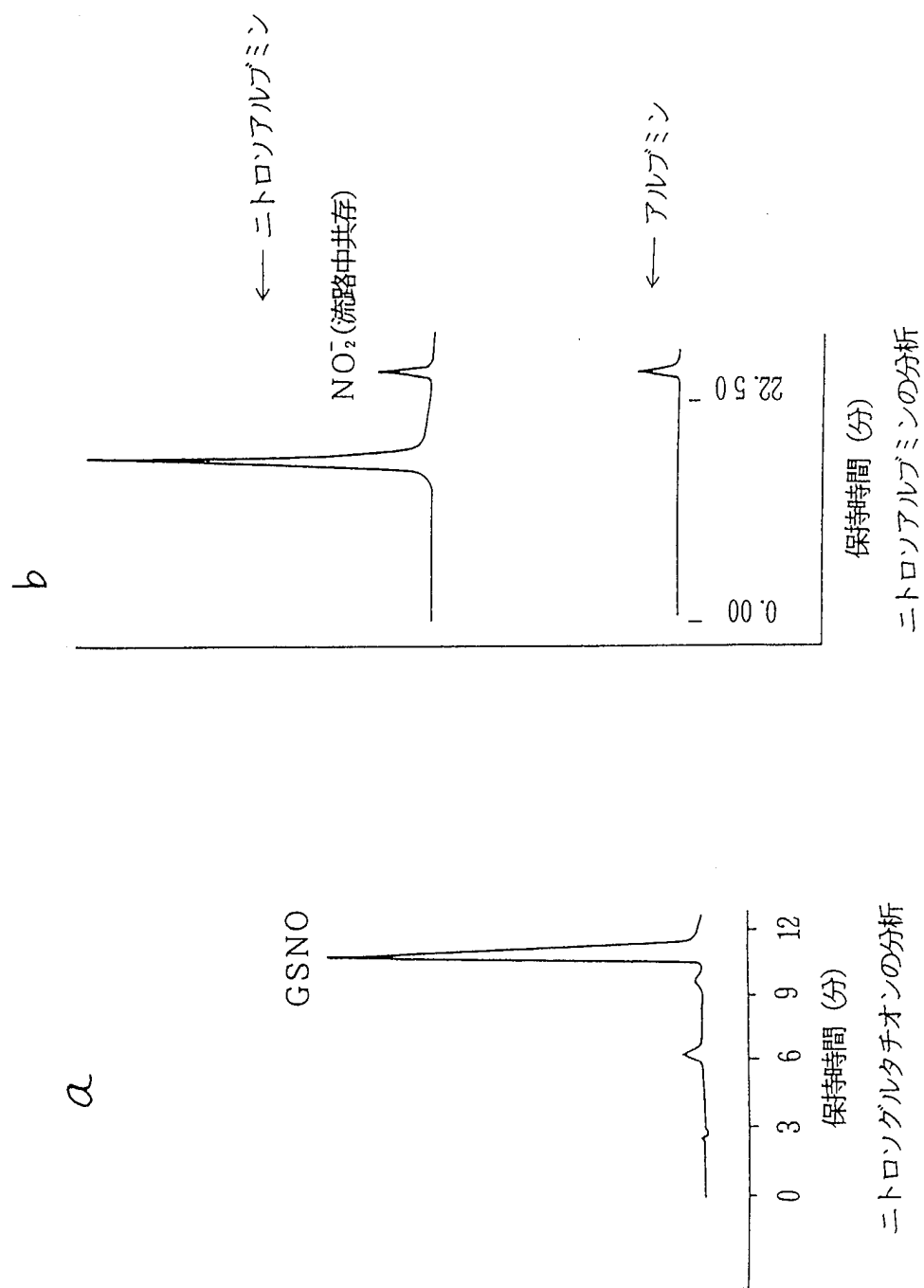
4/5

第 4 図



5/5

第 5 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/04568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ G01N31/00, G01N21/77

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.Cl⁶ G01N31/00, G01N21/77

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

Jitsuyo Shinan Koho 1940-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1996

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 47-149, A (National Research Development Corp.), January 6, 1972 (06. 01. 72) & GB, 1354287, A	1-4
A	JP, 52-37492, A (Thermo Electron Corp.), March 23, 1977 (23. 03. 77) & US, 3996004, A & DE, 2611048, A & GB, 1512124, A	1-4
A	JP, 9-43153, A (Tetsuo Nagano), February 14, 1997 (14. 02. 97) (Family: none)	1-4



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 document 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

March 3, 1998 (03. 03. 98)

Date of mailing of the international search report

March 17, 1998 (17. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N31/00, G01N21/77

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. Cl⁶ G01N31/00, G01N21/77

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 1940-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1996年
日本国登録実用新案公報 1994-1998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)

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
A	J P, 47-149, A (ナショナル リサーチ デベロップメン ト コーポレーション), 6. 1月. 1972 (06. 01. 7 2) & GB, 1354287, A	1-4
A	J P, 52-37492, A (サーモ エレクトロン コーポレー ション), 23. 3月. 1977 (23. 03. 77) & US, 3 996004, A & DE, 2611048, A & GB, 15121 24, A	1-4
A	J P, 9-43153, A (長野哲雄), 14. 2月. 1997 (14. 02. 97) (ファミリーなし)	1-4

☐ 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、一般的な技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、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
03. 03. 98

国際調査報告の発送日 17.03.98

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)
山村祥子

2 J 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3252