(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
2007 年4 月19 日 (19.04.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/043393 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01) *G01N 27/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/319774

(22) 国際出願日: 2006 年10 月3 日 (03.10.2006)

(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 2005-299195
2005 年10 月13 日 (13.10.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社バイオロジカ **(BIOLOGICA CO., LTD.)** [JP/JP]; 〒4600011 愛知県名古屋市中区大須３丁目３１番２２号 Aichi (JP). イビデン株式会社 **(IBIDEN CO., LTD.)** [JP/JP]; 〒5038604 岐阜県大垣市神田町二丁目一番地 Gifu (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 穴原 精二郎 **(ANAHARA, Seijiro)** [JP/JP]; 〒4600011 愛知県名古屋市中区大須３丁目３１番２２号 株式会社バイオロジカ内 Aichi (JP). 森山 昭彦 **(MORIYAMA, Akihiko)** [JP/JP]; 〒4801123 愛知県愛知郡長久手町東狭間２０４ Aichi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アイテック国際特許事務所 **(ITEC INTERNATIONAL PATENT FIRM)**; 〒4600008 愛知県名古屋市中区栄二丁目９－２６ポーラ名古屋ビル Aichi (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUPPORT FOR ANALYSIS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 分析用の保持体及びその利用

(57) Abstract: Provided is a support for an analysis object which contains a conductive material having a nonmetal matrix. The support for analysis is useful as a result for cases where voltage application is required to the support for supplying or holding or analyzing the analysis object due to the conductive material contained in the conductive material. For instance, the support for analysis can be used in place of a metal sample plate for mass analysis such as MALDI-TOFMS or as a part thereof.

(57) 要約: 非金属製マトリックスを有する導電性材料を含有する分析対象の保持体とする。この分析用の保持体は、導電性材料を含有するために、分析対象の供給、保持又は分析のために保持体への電圧の印加等が必要な場合の保持体として有用である。例えば、本発明の分析用保持体は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳなどの質量分析用の金属製サンプルプレートに替えてあるいはその一部として用いることができる。

WO 2007/043393 A1

明 細 書

分析用の保持体及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、分析用の保持体、分析対象が保持された保持体、質量分析方法及びアミノ酸配列の分析方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質、ペプチド、多糖類などの高分子化合物や有機化合物の解析において、レーザー脱離イオン化(LDI)やマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)及びこれを利用する飛行時間型質量分析(TOFMS)などの質量分析法は有用なツールとなっている。これらのイオン化手法、例えば、MALDIにおいては、通常、サンプルスライド上にシナピン酸などのマトリックスとタンパク質との混合物を載置し、この混合物に対してレーザー照射することでタンパク質をイオン化させている。こうしたイオン化工程において用いられるサンプルプレートはその後の質量分析工程のために導電性であるステンレスなどの金属製プレートが用いられている。

[0003] また、電気泳動によりあるいはインクジェット等の印刷手法により二次元的に整列された分子を液体透過性の保持体にブロットし、この保持体を金属製のサンプルプレートに導電性両面テープ等で貼り付けるなどしていた(例えば、特開2005－83784)。

発明の開示

[0004] 質量分析にあたっては、分析対象に対して化学修飾等がなされることが多いが、金属製のプレートでは、こうした化学修飾に対する耐性がなく、別途化学修飾を行った上、金属製サンプルプレートに修飾物を移す必要があった。また、上記した従来の保持体は、いずれもそれ自体導電性を有しているものではないため、金属製プレートに貼り付けるなどしても良好なイオン化は困難であった。さらに、金属製プレートに貼り付ける必要があるため、薄膜を用いざるを得ずそのため取り扱いが難しかった。

[0005] そこで、本発明は、LDIやMALDIなどにおけるイオン化に適した分析対象の保持体を提供することを一つの目的とする。また、本発明は、分析対象の化学修飾などを

容易化できる質量分析法を提供することを他の一つの目的とする。また、本発明は、配列解析のための化学修飾操作を容易化できるタンパク質又はペプチドの分析方法を提供することを他の一つの目的とする。

[0006] 本発明者らは、上記した課題を解決するために鋭意検討した結果、非金属性マトリックスを備える導電性材料をイオン化のための固相保持体として用いることにより、上記した課題の少なくとも一つを解決できることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明によれば、以下の手段が提供される。

[0007] 本発明者らは、少なくとも上記した一つの課題を解決するために以下の手段を創出した。

[0008] (1)非金属性マトリックスを備える導電性材料である、分析対象を保持するための分析用の保持体。

(2)前記導電性材料は導電性高分子材料である、(1)に記載の保持体。

(3)前記導電性高分子材料は、導電性材料を有機高分子マトリックスに分散保持する

複合導電性高分子材料である、(2)に記載の保持体。

(4)前記導電性材料は導電性セラミックス材料である、(1)に記載の保持体。

(5)前記導電性セラミックス材料はガラス状炭素又は熱分解炭素による表面処理層を有するグラファイト材料である、(4)に記載の保持体。

(6)酢酸、トリフルオロ酢酸及び無水酢酸からなる群から選択される酸に対する耐食性を備える、(1)～(5)のいずれかに記載の保持体。

(7)前記保持体は、液体透過性又は液体非透過性である、(1)～(6)のいずれかに記載の保持体。

(8)前記保持体は、フィルム状、プレート状及びマイクロタイタープレート状のいずれかである、(1)～(7)のいずれかに記載の保持体。

(9)ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質及び多糖類から選択される1種又は2種以上の分子又はこれらの誘導体を分析対象とする、(1)～(8)のいずれかに記載の保持体。

(10)質量分析用のサンプルプレート又はその一部である、(1)～(9)のいずれかに

記載の保持体。

(11)マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析用である、(10)に記載の保持体。

(12)飛行時間型質量分析用である、(11)に記載の保持体。

(13)エドマン反応に対する耐食性を備える、(1)～(12)のいずれかに記載の保持体。

(14)保持体上でのエドマン反応若しくはその類似反応の反応生成物及び反応中間体を保持するための、(13)に記載の保持体。

(15)アミノ酸配列解析用である、(1)～(14)のいずれかに記載の保持体。

(16)分析対象を保持するための分析用の保持体であって、

非金属性マトリックスを備える導電性材料であり、エドマン反応に対する耐食性を備えるとともにエドマン反応による被エドマン反応物を保持可能である、保持体。

(17)1種又は2種以上の分析対象が保持された保持体であって、

前記保持体は非金属製マトリックスに分散保持導電性高分子材料を含有している、保持体。

(18)前記1種又は2種以上の分析対象を保持する分析用の領域が複数個配列されている、(17)に記載の保持体。

(19)前記分析用の領域は、それぞれ固有の位置情報を伴っている、(18)に記載の保持体。

(20)前記分析対象はアミノ酸、ペプチド及びタンパク質から選択される、(17)～(19)のいずれかに記載の保持体。

(21)前記分析用の領域には、N末端アミノ酸残基の異なるタンパク質又はペプチドを保持している、(17)～(20)のいずれかに記載の保持体。

(22)前記分析用の領域には、エドマン反応若しくはその類似反応の反応生成物及び反応中間体を保持している、(17)～(20)のいずれかに記載の保持体。

(23)前記分析対象は電気泳動又は液体クロマトグラフィーを介して前記保持体に供給され保持されている、(17)～(22)のいずれかに記載の保持体。

(24)質量分析方法であって、

非金属製マトリックスを有する導電性材料である分析対象の保持体を用いるレーザー脱離イオン化工程を備える、方法。

(25)前記レーザー脱離イオン化工程は、マトリックス支援レーザーイオン化工程である、(24)に記載の方法。

(26)飛行時間型質量分析工程を備える、(24)又は(25)に記載の方法。

(27)前記イオン化工程は、(17)～(23)のいずれかに記載の分析対象の保持体を用いる工程である、(24)～(26)のいずれかに記載の方法。

(28)タンパク質又はペプチドの分析方法であって、

(a)タンパク質又はペプチドを、非金属製マトリックスを有する導電性材料である保持体に供給し保持させる工程と、

(b)前記保持体上のタンパク質又はペプチドの一部の末端アミノ酸残基を化学修飾するとともに切断する工程と、

(c)前記保持体上の前記(b)工程により得られる末端アミノ酸残基を欠くフラグメントと前記(b)工程において未切断の前記タンパク質又はペプチドとを質量分析する工程と、

を備える、方法。

(29)前記(b)工程はエドマン反応又はその類似反応による工程である、(27)に記載の方法。

(30)前記(b)工程及び前記(c)工程を前記タンパク質又はペプチドのN末端アミノ酸残基について順次に適数回繰り返し実施する、(28)又は(29)記載の方法。

(31)前記保持工程は、電気泳動による分離又は液体クロマトグラフィーによって溶離されたタンパク質又はペプチドを前記保持体に供給し保持させる工程である、(28)～(30)のいずれかに記載の方法。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明の分析用の保持体は、非金属製マトリックスを有する導電性材料からなることを特徴としている。本発明によれば、こうした導電性材料で構成されているために、サンプルの供給、保持又は分析のために保持体への電圧の印加等が必要な場合の保持体として有用である。例えば、本発明の分析用保持体は、MALDI－TOFMS

などの質量分析用の金属製サンプルプレートに替えてあるいはその一部として用いることができる。

[0010] また、本発明の分析用保持体は、非金属製マトリックスを有する導電性材料からなるため、金属製の保持体に比べて容易に耐食性を向上させることができる。このため、分析対象を修飾するための種々の化学反応を保持体上で容易に実施することができる。これにより、従来、質量分析に先だって別途行っていた修飾反応の生成物を質量分析用のサンプルプレートに塗布したりしていたが、そういった煩雑さは解消し、修飾反応と分析工程とを同一の保持体上で実施できるようになる。

[0011] 本発明の他の実施形態である質量分析方法及びタンパク質又はペプチドの分析方法においても、本発明の分析用保持体を備えあるいは使用することを特徴としており、これにより、その実施形態に応じたメリットが提供される。

[0012] 以下、本発明の分析用保持体について説明するとともに、本発明の他の実施形態である、質量分析方法及びペプチド分析方法についても順次説明する。

[0013] (分析用保持体)

本発明の分析用保持体(以下、単に保持体という。)に用いられる導電性高分子材料は、分析目的等に応じた形態を採ることができ、その形態は限定されない。例えば、ビーズ状、基板などのプレート状、フィルム状、1個又は複数個の分析対象領域を形成するウェルなどの凹部や隔壁を有するマイクロタイタープレート状であってもよい。例えば、プロティンシークエンサーや質量分析又は蛍光分析などに適用する場合には、プレート状、フィルム状、マイクロタイタープレート状等が好ましい。なお、ここで、プレート状の保持体とは、全体として取り扱い容易な程度の剛性を備えているものをいうものとする。いわゆる基板として従来使用されている程度の剛性であることが好ましい。保持体をプレート状とする場合には、それ単独で、サンプルプレートとして用いることができる。また、フィルム状保持体とは、それ自体では一定の三次元形態を維持することが困難な程度の可撓性又は柔軟性を有するものをいうものとする。こうしたフィルム状保持体は、非金属製マトリックスを有する導電性材料からなるプレートの表面に一体化して用いてもよいし、ステンレス、アルミニウム、チタン等の導電性を有する金属のプレートの表面に一体化して用いることもできる。なお、プレートに一体化

される場合には、フィルム本来の粘着性で一体化されることが好ましいが、導電性材料を含むテープ材や接着剤などを用いることもできる。

[0014] また、保持体は、多孔質性であるなど液体透過性であってもよいし、緻密質あるいは撥液性を有するなどにより液体不透過性であってもよいが、好ましくは、液体不透過性である。液体透過性であることにより、分析対象が保持体内部に保持されることになり、イオン化効率が低下し、また、質量分析の精度が低下する傾向がある。材料が緻密質であることにより液体不透過性である保持体であることがより好ましい。

[0015] 保持体の備える導電性は特に限定しない。例えば、TOFMSに用いられる場合においては、厚み方向の体積抵抗値(Ωcm)が2以上10000以下であるものを用いることができる。こうした体積抵抗値は、例えばJIS K7194によって測定することができる。

[0016] なお、保持体が非金属製マトリックスを有する導電性材料であることにより、それ自体質量分析、特にLDI－TOFMS又はMALDI－TOFMSのサンプルプレートとなりうる。また、本保持体は、MALDIによるイオン化工程を阻害することがないため、導電性材料は、MALDIに適した保持体であると考えられる。

[0017] また、保持体は、耐食性を備えていることが好ましい。耐食性を備えることが好ましい酸としては、硫酸、塩酸、硝酸などの無機酸並びに酢酸、トリフルオロ酢酸などのハロゲン化有機酸、有機スルホン酸などの有機酸が挙げられる。なかでも、ペプチドやタンパク質の解析を考慮すれば、一般にタンパク質やペプチドの修飾反応に用いられる有機酸に対する耐食性を備えていることが好ましい。典型的には、エドマン反応でのN末端アミノ酸の切断に用いる酢酸、トリフルオロ酢酸などのハロゲン化有機酸及び無水酢酸などの無水有機酸が挙げられ、こうした酸に対する耐食性を備えていることが好ましい。また、保持体は、メタノールやアセトニトリルなどに対する耐食性を備えていることが好ましい。

[0018] 非金属製マトリックスを有する導電性材料としては、導電性高分子材料が挙げられる。導電性高分子材料としては、例えば、置換又は置換されていないポリアセチレン、ジアセチレン重合体、置換又は置換されていないポリピロール、置換又は置換されていないポリチオフェン、ポリアニリンなどの本質的な導電性プラスチックのほか、プラ

スチックやシリコーンなど高分子材料に金属粉末や繊維又はカーボンブラックやグラファイトの粉末や繊維などの導電性材料を分散複合した複合導電性高分子材料が挙げられる。本発明においては、耐食性の観点から、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、ポリプロピレン等を用いることが好ましい。

[0019] 導電性高分子材料は、分析対象を保持するのに都合のよい官能基を備えることができる。こうした官能基は、予め高分子材料の合成時にモノマー等が備えることもできるし、合成後に保持体の表面に対して後修飾によって導入されてもよい。例えば、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、ホルミル基、ヒドロキシル基、カルボジミド基、活性エステル基を導入することが挙げられる。例えば、DNAやRNAなどの核酸を保持するのに好ましい官能基には、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド基、カルボジミド基、エポキシ基、ホルミル基などが挙げられ、ペプチドを保持するのに好ましい官能基には、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド基、カルボジミド基、エポキシ基、ホルミル基、金属キレートが挙げられる。

[0020] また、他の導電性材料としては、導電性セラミックス材料が挙げられる。例えば、炭化ケイ素（SiC）、グラファイトなどの非酸化物系セラミックスが挙げられる。また、絶縁性セラミックスのマトリックスに金属や導電性セラミックス材料の粒子を混合した複合導電性セラミックス材料なども挙げられる。

[0021] 好ましい導電性セラミックス材料は、グラファイトであり、より好ましくは、その表面にガラス状炭素又は熱分解炭素による表面処理層を有するグラファイトである。こうしたグラファイトによれば、グラファイトの離脱が抑制されるとともに、導電性のみならず耐溶剤性、繰り返し使用性に優れるサンプルプレートとして用いることができる。なかでも、熱分解炭素による表面処理層を有するグラファイトは、炭素粒子の脱落が一層抑制されるとともにアセトニトリルなどの溶剤に対する優れた耐溶剤性、酸やアルカリなどに対する耐腐食性及び強度、繰り返し使用性等を有しているため、より好ましい。これらの表面処理層を有するグラファイト材料は、いずれも、金属製プレートに貼着することなくそれ単独でMALDIに適したサンプルプレートを構成することができる。

[0022] ガラス状炭素による表面処理層を有するグラファイトとしては、ガラス状炭素をグラファイト表面及び内部にまで含侵させた材料を好ましく用いることができる。含侵深さは

、例えば、1mm以上であることが好ましく、より好ましくは10mm以下である。こうしたグラファイト材料は、例えば、VGI(イビデン株式会社の黒鉛製品)として入手することができる。また、熱分解炭素による表面処理層を有するグラファイトとしては、炭素の化学蒸着による皮膜を有するグラファイトを用いることができる。好ましくは、グラファイトは等方性黒鉛である。こうしたグラファイト材料は、例えば、パイロカーブ(イビデン株式会社の黒鉛製品)として入手することができる。

[0023] こうした保持体は、必要な耐食性を備えることにより保持体上でのエドマン反応を始めとする分析対象の調製や修飾のための反応が可能であるとともに、タンパク質，ペプチド及びアミノ酸あるいはこれらの誘導体を非共有結合性の結合により保持する傾向がある。したがって、本発明の保持体は、タンパク質やアミノ酸あるいはこれらの誘導体を生成させて保持体上においてそのまま質量分析などに供することができる。以上のことから、本発明の保持体は、LDI又はMALDIによる質量分析のための保持体となり得るほか、エドマン反応若しくはその類似反応によるアミノ酸配列解析装置用の分析対象の保持体を含むタンパク質やペプチドの化学修飾用保持体としても用いることができる。

[0024] さらに、この結果、この保持体上でエドマン反応などの化学反応を実施し反応生成物を保持しそのまま質量分析用の保持体、特に、サンプルプレートに電圧を印加する態様の質量分析工程を実施する質量分析方法におけるサンプルプレートあるいはその一部として用いることができる。すなわち、分析対象の合成、抽出、あるいは分析対象に対する修飾等の化学反応を実施後に、分析対象を質量分析用のサンプルプレートに移すことなくそのまま同一保持を用いて質量分析が可能となっている。したがって、本発明の保持体をこのように使用することで、従来のように、質量分析の分析対象に対する各種の反応後、金属製のサンプルプレートに反応生成物を移す必要もないし、また、反応生成物を保持させた膜を金属製サンプルプレートに貼着する必要もなくなる。

[0025] (分析対象)

保持体に保持する分析対象としては、特に制限なく、DNAやRNA、DNA／RNAキメラ、DNA／RNAハイブリッドなどの形態のポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチ

ド、ペプチド、タンパク質、多糖類、糖タンパク質、脂質、PNA(ペプチド核酸)などが挙げられる。このような生体高分子は分析のために化学修飾が施されて誘導体化されていてもよい。また、分析対象としては、こうした生体高分子のほか、天然又は人工の有機化合物が挙げられる。こうした分析対象は、細胞や菌体抽出物、発酵産物、無細胞系抽出物、PCR産物、人工的な合成産物、タンパク質の酵素処理物等に含まれている。また、本発明における分析対象は、本発明の保持体が質量分析に適していることから、質量分析、特に、MALDIによって分析可能なあるいは分析するのが適した化合物であることが好適である。

[0026] (分析方法)

本発明の分析方法は、分析対象が保持された保持体を用いることを特徴としている。すなわち、分析対象が保持された保持体をまず作製し、その後この保持体に対して各種の分析手法を実施して分析結果を得ることを特徴としている。以下、まず分析対象が保持された保持体及びその作製工程について説明する。

[0027] (分析対象が保持された保持体)

分析対象の保持体への保持とは、少なくとも保持体上の分析対象を分析するときまで一定位置に保持されていることを意味している。したがって、分析後の分析対象が洗浄等により容易に保持体から除去可能な程度の固定状態であっても、その分析対象は保持体に保持されているといえる。分析対象の保持形態は、特に限定されない。例えば、イオン結合、水素結合、静電的相互作用、疎水性相互作用、キレート等の非共有結合性の結合にて保持されていてもよいし、共有結合によって保持されていてもよい。また、こうした化学的結合以外であってもよく、保持体表面上の単に凹部に分析対象が存在している場合であっても、分析するときまで当該凹部に保持されている限り、この分析対象は保持されているといえる。固定形態は、分析対象の種類と保持体の材料や表面修飾等によって種々の形態がありうるが、質量分析におけるイオン化を考慮すれば非共有結合性の結合であることが好ましい。

[0028] 分析対象は、保持体の表面に直接に保持されてもよいが、間接的に、例えば、保持体の表面に直接保持された介在物を介して保持体に保持されていてもよい。例えば、保持体に、抗体又は抗原を保持しておき、この保持体に対して抗原又は抗体を

供給して抗原抗体反応を行うことで、分析対象たる抗体又は抗原を、抗原－抗体複合体の形態で、保持体に保持されていてもよい。また、ヌクレオチド鎖間の対合する塩基間の水素結合による複合体形成（ハイブリダイゼーション）により分析対象たるオリゴヌクレオチド又は核酸などハイブリダイズ可能な化合物が保持されていてもよい。この場合、保持体に対して一定のヌクレオチド配列を有する核酸等を保持しておく。こうした抗原－抗体間の特異的な相互作用、レセプター－リガンド相互作用、ハイブリダイゼーションなど、タンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質－核酸相互作用及びその他の各種相互作用、予め保持体に保持した介在物と分析対象との間の水素結合、親水性相互作用、疎水性相互作用、静電的相互作用及び、キレート作用等を利用して、分析対象が保持体に保持されてもよい。

[0029] また、分析対象は、必要に応じて化学修飾がなされていてもよい。化学修飾の種類は特に問わない。後段にて詳述するように、例えばタンパク質についてはエドマン法による反応生成物を分析対象として保持されていてもよい。

[0030] 1種又は2種以上の分析対象がまとまりをもって保持された保持体上の領域（スポット等）は、分析対象を含んでいるため、そのまま分析のためのセルを構成することができる。すなわち、保持体には、1種又は2種以上の分析対象が保持された分析用のセルを1個又は2個以上有することができる。なお、セルとは、1種又は2種以上の分析対象が保持された領域であり、分析方法の測定対象となる領域を意味している。

[0031] 2種以上の分析用セルを有している場合、これらの分析用セルは、配列されていることが好ましく、それぞれ固有の位置情報が関連付けられていることがより好ましい。すなわち、分析用セルのそれぞれの保持体上における位置が特定されていることが好ましい。分析用のセルが固有の位置情報に関連付けられて、その位置が特定されていることにより、分析工程を容易化することができるとともに、分析工程後の解析を容易化でき、結果として保持体上に多くの分析用セルを保持させたときの分析を高速化することができる。例えば、MALDIによる場合、保持体上に配列された分析用セルに順次レーザーを照射して、セルに含まれる分析対象を脱離・イオン化させることで、大量の分析用セルについて解析を容易にかつ迅速に行うことができる。

[0032] （分析対象が保持された保持体の作製）

分析対象を保持体上に直接保持するには、まず、分析対象を保持体上に供給する。分析対象は、保持体上で合成してもよいし、予め調製された分析対象を保持体上に供給してもよい。保持体上で直接分析対象を合成する場合としては、無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成する場合や、保持体上でオリゴヌクレオチドを合成する場合が挙げられる。また、分析対象を保持体に供給するには、例えば、インクジェット法やピン法等を用いることができる。

[0033] また、分析対象を含む混合物を電気泳動又はクロマトグラフィーなどの分離手法で分離した上で保持体に供給してもよい。特に、電気泳動やクロマトグラフィーで分離されたパターンに基づいて分離された成分を保持体に供給することが好ましい。こうすることで、各種分離手段によって分離された分析対象をその分離パターンに対応して個々に解析することができる。具体的には、電気泳動パターンは、ブロッティングを利用してそのまま保持体に転写することができる。この場合、保持体は液体浸透性であることが好ましい。また、液体クロマトグラフィーからの溶離液を一定量毎に保持体にドット状又はストリーム状に滴下させることにより、各種の溶離画分をその分離パターンに対応して保持できる。

[0034] なお、分析対象がペプチドやタンパク質などの高分子化合物である場合、質量分析で分析可能な分子量や得られる情報内容を考慮して、各種の分解酵素で適宜低分子化した上で保持体上に供給してもよい。例えば、タンパク質はトリプシンなどのプロテアーゼなどで処理すればよい。フラグメンテーションパターンについて解析できるほか、質量分析の精度が向上され、タンパク質の同定あるいはタンパク質の配列決定が容易化される。また、こうしてフラグメント化したタンパク質を電気泳動や液体クロマトグラフィーで分離した上、保持体に供給することが好ましい。

[0035] なお、電気泳動としては、アガロースゲル電気泳動、変性アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミド電気泳動、SDSポリアクリルアミド電気泳動、等電点電気泳動及び二次元電気泳動などが挙げられる。また、液体クロマトグラフィーとしては、マイクロキャピラリーあるいはナノキャピラリーを用いた液体クロマトグラフィーが好ましく用いられる。

[0036] こうして分析対象を保持体上に供給した後、分析対象は保持体に保持される。最も

簡易には、分析対象を供給する際に用いた水などの媒体を蒸発させ乾燥させることで分析対象を保持体に保持することができる。また、保持体あるいは保持体表面の官能基と分析対象とを共有結合を介して保持するときには、分析対象とともにあるいは別個に必要な試薬を保持体上に供給し反応させることで分析対象を保持体に保持できる。その他、保持形態に応じて必要な条件を付与する。

[0037] 分析対象を保持体上に供給した後あるいは保持した後、保持体上において分析対象に化学修飾を施すことができる。化学修飾が施される前の分析対象は、分析対象の前駆体ともいえる。修飾の種類や方法は特に限定されない。例えば、分析対象がタンパク質、ペプチド等の場合には、1－フルオロ－2，4－ジニトロベンゼン（FNDB）や5－ジメチルアミノナフタレン－1－スルホニルクロリド（ダンシルクロリド）との反応や、エドマン試薬（フェニルイソチオシアネート）と無水酸とによるエドマン法が挙げられる。

[0038] 本発明における分析対象としては、エドマン反応若しくはその類似反応の反応生成物及び反応中間体が挙げられる。例えば、エドマン法の変法を利用して、タンパク質等のN末端アミノ酸配列をいわゆるラダーシーケンス法で決定することができる。すなわち、ファニルイソチオシアネート(PITC)に数%のイソシアネート(ITC)、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）及びメチルイソチオシアネート（MITC）などのいずれかを加えてカップリングさせてN末端アミノ酸残基に対する修飾基を変化させ、その後のフルオロ酢酸などによるN末端アミノ残基の切断反応を抑制したり、あるいは切断反応時間を調整することでN末端アミノ酸残基の切断反応を抑制したりして、保持体の分析領域上に、（1）こうした分解反応生成物の一方である切断されたN末端アミノ酸残基の誘導体と、（2）他の一方であるN末端アミノ酸残基が切断されたフラグメント（被エドマン反応物）と、（3）カップリングされたが切断されていない未切断のタンパク質やペプチドの修飾体（カップリング体）が優勢に残存させるようにする。

[0039] ここで、上記（2）がエドマン反応又はその類似反応の反応生成物であり、上記（3）がエドマン反応又はその類似反応の反応中間体である。

[0040] これらのうち、（2）及び（3）は、N末端アミノ酸残基分が異なるだけであるので、これらのフラグメントの質量の差を質量分析工程において計測し、比較することで、N末

端アミノ酸残基を決定することができる。さらに、こうした反応工程と質量分析工程とを必要な回数繰り返し行うことで、N末端アミノ酸配列を決定することができる。

[0041] 以上のことから、ペプチドやタンパク質を保持体に保持させる操作及びこうした保持体の典型例として以下の例が挙げられる。すなわち、タンパク質をトリプシンなどのプロテアーゼで分解した後、マイクロあるいはナノキャピラリー液体クロマトグラフィーにて分離し、溶離液を保持体上に多数個のスポットとして配列して滴下し乾燥し、個々のスポットに対して、上記したようなエドマン法の変法を適用して反応させ、その後洗浄して乾燥する。こうすることで、タンパク質がトリプシンによって分解されて得られる1種又は2種以上のフラグメントを液体クロマトグラフィーによる分離パターンに対応して分配された1個又は2個以上の溶離液スポット(分析用のセル)として備えている保持体が得られる。また、同時に、エドマン法の変法の適用により、各溶離液スポットには、スポットに含まれるペプチドやタンパク質のN末端アミノ酸残基が切断された被エドマン反応物であるフラグメントと、カップリングされたがN末端が切断されていない未切断のカップリング体とが保持された保持体が得られる。

[0042] また、分析対象を間接的に保持体上に保持するには、まず、分析対象を間接的に保持するための介在物が保持された保持体を用意する。介在物とは、上記したように、例えば、タンパク質や核酸等である。こうした介在物を保持体上に供給し保持するには、上記のような方法を適宜用いることができる。また、分析対象を保持するには、こうして介在物を保持した保持体に対して、分析対象を含有する試料を供給し、意図した相互作用を生じさせて、分析対象を介在物を介して分析対象を保持体に保持する。

[0043] (分析工程)

分析対象が保持された保持体について分析工程を実施する。本分析工程においては、質量分析法を採用することが好ましい。質量分析工程におけるイオン化方法は、特に限定されないが、保持体をそのままイオン化に用いる観点からは、マトリックスを使用しないレーザー脱離イオン化(LDI)、マトリックスを使用するマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)を用いることが好ましい。なかでも、ペプチドやタンパク質などにはMALDIを用いることが好ましい。

[0044] MALDIに用いるレーザーとしては、N2、Nd－YAG、CWCO、TEA－CO2、アルゴンなどが用いられる。また、MALDIに用いるマトリックスとしては、特に限定しないが、ニコチン酸、2－ピラジンカルボン酸、シナピン酸、2，5－ジヒドロキシ安息香酸、5－メトキシサリチル酸、α－シアノ－4－ヒドロキシケイ皮酸、3－ヒドロキシピコリン酸、ジアミノナフタレン、2－（4－ヒドロキシフェニラゾ）安息香酸、ジスラノール、コハク酸、5－（トリフルオロメチル）ウラシル，グリセリンなどを用いることができる。マトリックスの分析対象に対する添加量等は特に限定しないで従来公知範囲で適宜設定することができる。

[0045] また、本質量分析方法における質量分析工程は、磁場偏光型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間型、フーリエ変換イオンサイクロン型、タンデム型などの各種の質量分析計による分析が可能である。なかでも、LDI及びMALDIよる場合には、飛行時間型分析計を用いる質量分析工程が好ましい。

[0046] 質量分析工程においては、保持体上の分析用セルに存在する1種又は2種以上の分析対象の質量を分析することができる。例えば、分析用セルにエドマン法の生成物が存在するとき、すなわち、エドマン反応生成物である末端アミノ酸残基の誘導体（ATZ誘導体又はPTH誘導体）と、被エドマン反応物である残余のフラグメントと、N末端にイソシアネート系カップリング剤がカップリングしたが切断されなかった未切断のンパク質又はペプチドの修飾体が存在するとき、LDI法やMALDI法によれば、被エドマン反応物である残余のフラグメントと未切断物の分子量を容易に測定することができ、これにより、全体の分子量とともにN末端アミノ酸を同定することができる。

[0047] なお、分析工程で実施する分析方法は質量分析のほか、各種の分析方法を実施することができる。また、分析対象が蛍光試薬や発色試薬等により標識されている場合には、保持体上のこうした蛍光や発色などを検出する方法を採用することができる。

実施例

[0048] 以下、本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。

[0049] （実施例1）

保持体として、耐食性導電性プラスチックフィルムと導電性シリコーンゴム(それぞれ三菱樹脂株式会社製)の2種類のフィルム(厚み:それぞれ80μm及び150μm)を準備した。なお、これらのフィルムの物性を以下の表に示す。

[0050] [表1]

項目		耐食性導電性プラスチック	導電性シリコーンゴム
厚み(μm)		80	150
厚み方向抵抗	抵抗値(mΩ)	2.0	14.0
	体積抵抗値(Ω・cm)	1.6	6.0
面方向抵抗	体積抵抗値(Ω・cm)	0.3	10.0
	表面抵抗率(Ω/sq)	60	440
比重		0.98	1.3
硬度		90	70

厚み方向抵抗:荷重1.89MPa、体積抵抗:抵抗値×測定電極面積/シート厚み

[0051] MALDI-TOF質量分析装置(ABI Voyager DE Pro MALDI TOF型質量分析計)の金属製サンプルプレートと同じ大きさに調製した導電性プラスチックフィルム上に、アンジオテンシン(angiotensin、MW1293)を0.5pmol塗布した上、前記金属製サンプルプレートに接着剤を用いずに貼り付けて、レーザー強度を1100、1000、700及び600として質量分析を行った。なお、マトリックスはシナピン酸を用いた。いずれのレーザー強度においても分子量1294のイオンを検出することができた。なかでも、レーザー強度1000の場合において最も安定したイオンを検出した。

[0052] 一方、導電性シリコーン製フィルムには、同様に金属製サンプルプレートと同じ大きさに調製した上、アンジオシテシン0.5pmol、0.25pmol、50fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolをそれぞれ塗布し、金属製サンプルプレートに接着剤を用いずに貼り付けてレーザー強度を1000とし、マトリックスとしてシナピン酸を用いて同様にMALDI-TOF質量分析装置にて質量分析を行った。いずれのサンプル塗布量でも分子量1294のイオンを検出することができたが、50fmol以上の濃度で安定したイオンを検出できることがわかった。

[0053] (実施例2)

本実施例では、導電性ポリ塩化ビニルプレート(導電性カーボン含有)(タキロン製、TND CV930)(厚み:1.5mm、厚み方向体積抵抗値(Ω・m)(JIS K7194):104、ロックウェル硬度(JIS K7112):88、比重(JIS K7202):1.35)を、MALDI-TOF質量分析装置(ABI Voyager DE Pro MALDI TOF型質量分析計)の金属製

サンプルプレートと同じ大きさに調製し、アンジオテンシン(angiotensin、MW1293)を1pmol、100fmol及び10fmol並びにダイノルフィン(Dynorphin)1pmol、100fmol及び10fmolを塗布した上、これらをそれぞれサンプルプレートとして用いてレーザー強度を1000として質量分析を行った。なお、マトリックスはシナピン酸を用いた。いずれのタンパク質についても、アンジオテンシン10fmolの場合を除いていずれの適用量でもそれぞれの分子量イオンを検出することができたが、なかでも、それぞれ1pmolにおいて最も安定したイオンを検出した。

[0054] (実施例3)

本実施例では、炭化ケイ素(SiC)のプレートをサンプルプレートとして用いた。すなわち、このセラミックスプレートをMALDI－TOF質量分析装置(ABI Voyager DE－STR MALDI TOF型質量分析計)の金属製サンプルプレートと同じ大きさに調製し、アンジオテンシン(angiotensin、MW1293)を1pmol塗布した上、これらをそれぞれサンプルプレートとして用いてレーザー強度を2142として質量分析を行った。なお、マトリックスは、α－シアノ－4－ヒドロキシケイ皮酸を用いた。SiCプレートによれば、バックグラウンドノイズも良好に低減されており、分子量イオンを検出することができた。

[0055] (実施例4)

本実施例では、VGIグラファイト及びパイロカーブ(いずれもイビデン株式会社製)のプレートをサンプルプレートとして用いた。すなわち、これらのグラファイトプレートをそれぞれMALDI－TOF質量分析装置(ABI Voyager DE－STR MALDI TOF型質量分析計)の金属製サンプルプレートと同じ大きさに調製し、アンジオテンシン(angiotensin、MW1293)を0．5pmol／μlを1μlを塗布した上、これらをそれぞれサンプルプレートとして用いてレーザー強度VGIについては2044、パイロカーブについては2010として質量分析を行った。なお、マトリックスは、α－シアノ－4－ヒドロキシケイヒ皮酸を用いた。いずれのプレートにおいても分子量イオンを検出することができ、バックグラウンドノイズも良好であった。

[0056] (実施例5)

本実施例では、実施例1で用いた導電性プラスチックフィルム上でエドマン反応を

行い、アミノ酸配列解析を行った。導電性プラスチックフィルム上にリゾチーム200pmolをスポットし、ペプチドシークエンサー(ABI 491 CLC ペプチドシークエンサー)のサンプル保持膜として使用した。4残基を分析したところ、十分に分析可能であった。以上のことから、実施例1で用いた導電性プラスチックフィルムは、エドマン法に用いるエドマン試薬や無水トリフルオロ酢酸などの無水酸などに対する十分な耐食性を備えているとともに、洗浄等に抵抗できる程度のタンパク質の保持能力を有していることがわかった。

[0057] また、同じ導電性プラスチックフィルム上に、アンジオシテシンを10pmolスポットして、上記と同様にして5残基を分析したところ、十分に分析可能であった。このことから、実施例1で用いた導電性プラスチックフィルムは、比較的低分子量のペプチドに対しても十分な保持能力を有していることがわかった。

[0058] 本出願は、2005年10月13日に出願された日本国特許出願第2005－299195号を優先権主張の基礎としており、その内容の全てが引用により本明細書中に含まれる。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明は、分析化学の分野、例えばプロティンシークエンサーや質量分析又は蛍光分析などに利用可能である。

請求の範囲

[1] 非金属性マトリックスを備える導電性材料である、分析対象を保持するための分析用の保持体。

[2] 前記導電性材料は導電性高分子材料である、請求項1に記載の保持体。

[3] 前記導電性高分子材料は、導電性材料を有機高分子マトリックスに分散保持する複合導電性高分子材料である、請求項2に記載の保持体。

[4] 前記導電性材料は導電性セラミックス材料である、請求項1に記載の保持体。

[5] 前記導電性セラミックス材料はガラス状炭素又は熱分解炭素による表面処理層を有するグラファイト材料である、請求項4に記載の保持体。

[6] 酢酸、トリフルオロ酢酸及び無水酢酸からなる群から選択される酸に対する耐食性を備える、請求項1～5のいずれかに記載の保持体。

[7] 前記保持体は、液体透過性又は液体非透過性である、請求項1～6のいずれかに記載の保持体。

[8] 前記保持体は、フィルム状、プレート状及びマイクロタイタープレート状のいずれかである、請求項1～7のいずれかに記載の保持体。

[9] ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質及び多糖類から選択される1種又は2種以上の分子又はこれらの誘導体を分析対象とする、請求項1～8のいずれかに記載の保持体。

[10] 質量分析用のサンプルプレート又はその一部である、請求項1～9のいずれかに記載の保持体。

[11] マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析用である、請求項10に記載の保持体。

[12] 飛行時間型質量分析用である、請求項11に記載の保持体。

[13] エドマン反応に対する耐食性を備える、請求項1～12のいずれかに記載の保持体。

[14] 保持体上でのエドマン反応若しくはその類似反応の反応生成物及び反応中間体を保持するための、請求項13に記載の保持体。

[15] アミノ酸配列解析用である、請求項1～14のいずれかに記載の保持体。

[16] 分析対象を保持するための分析用の保持体であって、

非金属性マトリックスを備える導電性材料であり、エドマン反応に対する耐食性を備えるとともにエドマン反応による被エドマン反応物を保持可能である、保持体。

[17] 1種又は2種以上の分析対象が保持された保持体であって、

前記保持体は非金属製マトリックスに分散保持導電性高分子材料を含有している、保持体。

[18] 前記1種又は2種以上の分析対象を保持する分析用の領域が複数個配列されている、請求項17に記載の保持体。

[19] 前記分析用の領域は、それぞれ固有の位置情報を伴っている、請求項18に記載の保持体。

[20] 前記分析対象はアミノ酸、ペプチド及びタンパク質から選択される、請求項17～19のいずれかに記載の保持体。

[21] 前記分析用の領域には、N末端アミノ酸残基の異なるタンパク質又はペプチドを保持している、請求項17～20のいずれかに記載の保持体。

[22] 前記分析用の領域には、エドマン反応若しくはその類似反応の反応生成物及び反応中間体を保持している、請求項17～21のいずれかに記載の保持体。

[23] 前記分析対象は電気泳動又は液体クロマトグラフィーを介して前記保持体に供給され保持されている、請求項17～22のいずれかに記載の保持体。

[24] 質量分析方法であって、

非金属製マトリックスを有する導電性材料である分析対象の保持体を用いるレーザー脱離イオン化工程を備える、方法。

[25] 前記レーザー脱離イオン化工程は、マトリックス支援レーザーイオン化工程である、請求項24に記載の方法。

[26] 飛行時間型質量分析工程を備える、請求項24又は25に記載の方法。

[27] 前記イオン化工程は、請求項17～23のいずれかに記載の分析対象の保持体を用いる工程である、請求項24～26のいずれかに記載の方法。

[28] タンパク質又はペプチドの分析方法であって、

(a) タンパク質又はペプチドを、非金属製マトリックスを有する導電性材料である保

持体に供給し保持させる工程と、

(b) 前記保持体上のタンパク質又はペプチドの一部の末端アミノ酸残基を化学修飾するとともに切断する工程と、

(c) 前記保持体上の前記(b)工程により得られる末端アミノ酸残基を欠くフラグメントと前記(b)工程において修飾されたが未切断の前記タンパク質又はペプチドとを質量分析する工程と、

を備える、方法。

[29] 前記(b)工程はエドマン反応若しくはその類似反応による工程である、請求項28に記載の方法。

[30] 前記(b)工程及び前記(c)工程を前記タンパク質又はペプチドのN末端アミノ酸残基について順次に適数回繰り返し実施する、請求項28又は29に記載の方法。

[31] 前記保持工程は、電気泳動による分離又は液体クロマトグラフィーによって溶離されたタンパク質又はペプチドを前記保持体に供給し保持させる工程である、請求項28～30のいずれかに記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/319774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N27/62(2006.01)i, *G01N27/64*(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 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-043014 A (Millipore Corp.), 13 February, 2003 (13.02.03), Par. Nos. [0002], [0011] to [0013], [0017] & EP 1274116 A2	1-3,6-13,15, 17,20,24-27 14,16,18,19, 21-23,28-31
X Y	JP 2001-013110 A (Applied Bio Systems Japan Kabushiki Kaisha), 19 January, 2001 (19.01.01), Par. Nos. [0014] to [0016] (Family: none)	1,4-13,15, 17,20,24-27 14,16,18,19, 21-23,28-31
Y	JP 2001-515209 A (Sequenom, Inc.), 18 September, 2001 (18.09.01), Par. Nos. [0151], [0243], [0258] & WO 1999/012040 A2	14,16,21,22, 28-30

☒ 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	Date of mailing of the international search report
25 December, 2006 (25.12.06)	09 January, 2007 (09.01.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/319774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-184137 A (NEC Corp.), 02 July, 2004 (02.07.04), Par. No. [0041]; Figs. 2, 3 & WO 2004/051253 A1	18,19,23,31

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３１９７７４

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, G01N27/64(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	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６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(JDream2)

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 2003-043014 A（ミリポール・コーポレイション）2003.02.13, 【0002】, 【0011】-【0013】, 【0017】 & EP 1274116 A2	1-3, 6-13, 15, 17, 20, 24-27
Y		14, 16, 18, 19, 21-23, 28-31

☑　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 ２５．１２．２００６	国際調査報告の発送日 ０９．０１．２００７
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）　2W　３３１１ 横井　亜矢子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２９２

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	関連する請求の範囲の番号
X	JP 2001-013110 A（アプライドバイオシステムズジャパン株式会社）2001.01.19, 【0014】-【0016】（ファミリーなし）	1,4-13,15,17,20,24-27
Y		14,16,18,19,21-23,28-31
Y	JP 2001-515209 A（シークエノム・インコーポレイテッド）2001.09.18, 【0151】,【0243】,【0258】& WO 1999/012040 A2	14,16,21,22,28-30
Y	JP 2004-184137 A（日本電気株式会社）2004.07.02, 【0041】,図 2,3 & WO 2004/051253 A1	18,19,23,31