

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3961095号

(P3961095)

(45) 発行日 平成19年8月15日(2007.8.15)

(24) 登録日 平成19年5月25日(2007.5.25)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 A

請求項の数 11 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平10-14240	(73) 特許権者	596022226
(22) 出願日	平成10年1月27日(1998.1.27)		アベイクス
(65) 公開番号	特開平10-221336		ABX
(43) 公開日	平成10年8月21日(1998.8.21)		フランス国、F-34184 モントペリ
審査請求日	平成16年10月22日(2004.10.22)		エセデス、ビービー 7290、リュ
(31) 優先権主張番号	97 01090		ドゥ カドゥセー、128、パーク ユー
(32) 優先日	平成9年1月31日(1997.1.31)		ロメディスン
(33) 優先権主張国	フランス(FR)	(74) 代理人	100080001
			弁理士 筒井 大和
		(74) 代理人	100093023
			弁理士 小塚 善高
		(74) 代理人	100102853
			弁理士 鷹野 寧

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染色試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

反応後に細胞を標識することのできる染色剤を含むタイプの、血球、網状赤血球の定量用染色試薬であって、

更に、前記染色剤の細胞への浸透を促進することのできる添加剤を含み、前記添加剤は、イオン導通孔化合物(イオノフォア)と、前記イオノフォアと洗剤の混合物との中から選択されることを特徴とする染色試薬。

【請求項2】

請求項1に記載の染色試薬であって、前記添加剤が、イオノフォアを含むことを特徴とする染色試薬。

【請求項3】

請求項1に記載の染色試薬であって、前記添加剤が、イオノフォアと洗剤との混合物を含むことを特徴とする染色試薬。

【請求項4】

請求項1ないし3のいずれか1項に記載の染色試薬であって、前記イオノフォアが、
 モネンシン、すなわち2-[5-エチルテトラヒドロ-5-[テトラヒドロ-3-メチル-5-[テトラヒドロ-6-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-3,5-ジメチル-2H-ピラン-2-イル]-2-フリル]-2-フリル]-9-ヒドロキシ-メトキシ-, 2, 8-テトラメチル-1, 6-ジオキサスピロ[4,5]デカン-7-ブチル酸と、

10

20

ノナクチン、すなわち 2, 5, 11, 14, 20, 23, 29, 32 - オクタメチル
- 4, 13, 22, 31, 37, 38, 39, 40 - オクタオキサペンタシク
ロ [32, 2, 1, 1⁷, 1⁰, 1¹⁶, 1¹⁹, 1²⁵, 2⁸] - テトラコンタン -

3, 12, 21, 30 - テトロンと、

3, 5 - ジ - タート - ブチル - 4 - ヒドロキシ - ベンジリデンマロニトリルと、

カルボニルシアニド m - クロロフェニルヒドラゾンと、

カルボニルシアニド p - トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾンと、

テトラクロロサリチルアニリドと、

4, 5, 6, 7 - テトラクロロ - 2 - トリフルオロメチルベンジミダゾールと、

ペンタクロロフェノールと、

2, 4 - ジニトロフェノールと、

バリノマイシンと、

サリノマイシンと、

グラミシディン (S) と

の中から選択される プロトノフォア または抗生物質であることを特徴とする染色試薬。

【請求項 5】

請求項 1 または 3 に記載の染色試薬であって、

前記洗剤が、非イオン型または両性電解質型であり、

プロパンスルホン酸塩、3 - [(3 - クロラミドプロピル) - ジメチルアンモニオ]
- 1 - プロパン・スルホン酸塩と、

コーラミド類、N, N - ビス [3 - D - グルコナミドプロピル] - コーラミドと、

スルフォベタテン類と、

アルキル・グリコシド類およびアルキル・マルトシド類と、

ポリオキシエチレン・エーテル類と、

ポリオキシエチレン・ソルピタン類と、

ポリクリコール・エーテル類と

の中から選択されるものであることを特徴とする染色試薬。

【請求項 6】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の染色試薬であって、

前記染色剤が、蛍光染色剤であることを特徴とする染色試薬。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の染色試薬であって、

前記染色剤が、0.1 nm から 1 mm の間の波長の光により励起されるものであることを
特徴とする染色試薬。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の染色試薬であって、

前記染色剤が、青色光、488 nm の波長の光により励起されるものであることを特徴
とする染色試薬。

【請求項 9】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の染色試薬であって、前記染色剤が、

3, 3' - ジメチルオキサカルボシアニン・イオダイド (すなわち 3 - メチル - 2 - [3 - (3 - メチル - 2 (3 H) - ベンゾキサゾリリデン) - 1 - プロベニル] ベンゾキサ
ゾリウム・イオダイドと、

チアソール・オレンジ、すなわち 1 - メチル - 4 - [(3 - メチル - 2 - (3 H) - ベ
ンゾチアゾリリデン) メチル] キノリニウム p - トシレートと、

キノリニウム, 4 - [(3 - メチル - 2 - (3 H) - ベンゾチアゾリリデン) メチル]
- 1 - [3 - (トリメチルアンモニオ) プロピル] ジイオダイドと、

スチリル類、スチリル 7 と、

ニュー・メチレン・ブルーと、

ブリリアント・クレシル・ブルーと

10

20

30

40

50

の中から選択されるものであることを特徴とする染色試薬。

【請求項 10】

請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の染色試薬であって、更に、
塩類、ナトリウムまたはカリウム塩と、
キレート剤、EDTAと、
溶媒、アルコールと、
防腐剤と、
pH を 5 から 11 の間に保つバッファー系と
の中から選択される少なくとも一つの化合物を含むことを特徴とする染色試薬。

【請求項 11】

請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の染色試薬であって、
0.1 μ M から 0.5 M の間の濃度を有する染色剤と、
下記のものから選択された少なくとも一つの添加剤と、

【表 1】

化合物	濃度
イオノフォア	0~1M
イオノフォアと洗剤との混合物	イオノフォア：0~1M 洗剤：0~20%

10

20

下記のものの中の 1 種以上の化合物と、

【表 2】

化合物	濃度
塩類 (NaCl/KCl)	0~1M
キレート剤 (EDTA)	0~100mM
溶媒	0~15%
防腐剤	0~1%

30

pH を 5 から 11 の間に保つ、有機または無機のバッファー系と
からなることを特徴とする染色試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生物学的分析に関し、特に血液分析に関する。

【0002】

より詳細には、本発明は、反応後に細胞を標識することのできる染色剤を含むタイプの、
血球、特に網状赤血球の定量用染色試薬に関する。

【0003】

【従来の技術】

例えば、血球を特定することができ、選択された時間および温度の条件下での反応後に、
その細胞を標識または染色することのできる染色剤を含むタイプの染色試薬としては、既
に様々のものが知られている。

【0004】

40

50

そのような染色試薬は、一般に、反応後に染色細胞の計数を可能にするような蛍光染色または非蛍光染色を利用する。この計数は、顕微鏡下にその場で手で染色して実行してもよいし、外部的に染色しても、あるいは自動装置による染色を用いて実行してもよい。

【0005】

自動計数は、一般に、いわゆるフロー・サイトメトリー法によって実行される。この方法は、手技による計数より信頼性があり、速やかであることが判明している。

【0006】

血球、特に網状赤血球の定量に用いられ、手技または自動計数に用いることのできる染色剤は各種のものが既に知られている。

【0007】

そのような蛍光または非蛍光染色剤の中でも、特にピロニン Y、アクリジン・オレンジ、チオフラビン T、チアゾール・オレンジ、ニュー・メチレン・ブルー、ブリリアント・クレシル・ブルーなどは参考としてよいものである。

【0008】

染色試薬の実例は、特に下記の特許公報に記載されている。すなわち、カナダ特許第 2,024,166号、米国特許第 5,501,954号、米国特許第 4,325,706号、米国特許第 5,438,003号、米国特許第 5,075,556号、米国特許第 4,996,040号、米国特許第 4,883,867号、ヨーロッパ特許第 0,545,314号、ヨーロッパ特許第 0,545,315号、ヨーロッパ特許 0,430,719号、ヨーロッパ特許第 0,215,461号、ヨーロッパ特許第 0,226,272号、およびヨーロッパ特許第 0,114,462号である。

【0009】

特に赤血球、すなわち成熟赤血球の前駆体である網状赤血球の定量の場合、染色剤は、細胞に含まれる残存 RNA を染色または標識するのに役立つ。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

ところが、前記のような従来の染色試薬の欠点の一つとして、長い反応時間を必要とすることがある。このため、手技法ばかりでなく、特に自動化法において、それらの染色試薬を使用することが難しかった。

【0011】

特にチアゾール・オレンジは、5 マイクロリットルの血液と反応するのに室温で数十分の桁の反応時間を必要とする。

【0012】

このような反応時間は、工程を完全に自動化するにはあまりにも長すぎる。

【0013】

そこで、本発明の目的は、特に前記の欠点を克服することにある。

【0014】

すなわち、本発明の一つの目的は、血球、特に網状赤血球の定量用染色試薬であって、特に既知の染色試薬で可能な反応時間よりも更にずっと短い反応時間で、細胞を標識することを可能にする、そのような染色試薬を生産することにある。

【0015】

本発明の他の一つの目的は、特に反応時間を数分から数秒に短縮させることを可能とする、そのような染色試薬を生産することにある。

【0016】

本発明の前記ならびにその他の目的と新規な特徴は、本明細書の記述および添付図面から明らかになるであろう。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本願において開示される発明のうち、代表的なものの概要を簡単に説明すれば、下記の通りである。

【0018】

10

20

30

40

50

すなわち、本発明の、反応後に細胞を標識することのできる染色剤を含むタイプの染色試薬は、更に、前記染色剤の細胞への浸透を促進することのできる添加剤を含むものである。この添加剤は、イオン導通孔化合物（イオノフォア）と、洗剤と、それらの混合物との中から選択される。

【0019】

したがって、本発明の染色試薬は、染色剤と、その染色剤の細胞への浸透を促進する特別の添加剤とを混合したものであり、それ故、染色剤と細胞との間の反応に要する反応時間をかなり短縮することができる。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明は、反応後に細胞を標識することのできる染色剤を含むタイプの染色試薬であって、更に、前記染色剤の細胞への浸透を促進することのできる添加剤を含む染色試薬を提供するものである。この添加剤は、イオノフォアと、洗剤と、それらの混合物との中から選択される。

【0021】

したがって、本発明の染色試薬は、染色剤と、その染色剤の細胞への浸透を促進する特別の添加剤とを混合したものであり、それ故、染色剤と細胞との間の反応に要する反応時間は、かなり短縮される。

【0022】

本発明の主旨から、イオノフォア、すなわち細胞膜の透過性を増し、膜内外の交換を促進させることのできる化合物の使用が特に好ましい。

【0023】

このようなイオノフォアは、様々な特異性を有するある種のイオンに対して、細胞膜透過性を増す疎水性分子である。

【0024】

このイオノフォアは、移動性搬送体か、膜通過チャンネルを形成する分子であるかのいずれかである。これらの物質は、染色剤イオンの電荷をマスクし、それによって、膜の脂質二重層への浸透を促進する。

【0025】

更に、本発明の添加剤は、膜の透過性を増すことによって、染色剤の浸透を促進する洗剤から選択されたものであってもよい。そのような洗剤は、膜の蛋白質構造を壊して、不安定化を促進し、それが染色剤の浸透を更に増大させる。

【0026】

本発明の添加剤は、更に他の方法として、イオノフォアと洗剤との混合物であっててもよい。

【0027】

本発明のイオノフォアは、特にプロトフォアまたは抗生物質であっててもよい。

【0028】

本発明を実行するのに好適な、イオノフォアの実例には、ただし限定的なものではないが、次のものがある。すなわち、モネンシン、すなわち 2- [5-エチルテトラヒドロ-5- [テトラヒドロ-3-メチル-5- [テトラヒドロ-6-ヒドロキシ-6- (ヒドロキシメチル) -3,5-ジメチル-2H-ピラン-2-イル] -2-フリル] -2-フリル] -9-ヒロドキシ- -メトキシ- , , 2,8-テトラメチル-1,6-ジオキサスピロ [4,5]デカン-7-ブチル酸 (実験式 $C_{36}H_{62}O_{11}$ を有するポリエーテル抗生物質)、ノナクチン、すなわち 2,5,11,14,20,23,29,32-オクタメチル-4,13,22,31,37,38,39,40-オクタオキサベンタシクロ [32.2.1.1^{7,10}.1^{16,19}.1^{25,28}] -テトラコンタン-3,12,21,30-テロン (実験式 $C_{40}H_{64}O_{12}$ を有するマクロテトロライド抗生物質)、3,5-ジ-タート-ブチル-4-ヒドロキシ-ベンジリデンマロニトリル、カルボニルシアニド m-クロロフェニルヒドラゾン、カルボニルシアニド p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン、テトラクロロサリチルアニリド、4,5,6,7-テトラクロロ-2-トリフルオロメチルベンジミダゾール、ペンタクロロフェノー

10

20

30

40

50

ル、2,4-ジニトロフェノール、バリノマイシン（式 $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$ を有するシクロドデカデブシ・ペプチド抗生物質）、サリノマイシン（式 $C_{42}H_{70}O_{11}$ を有するポリエーテル抗生物質）、グラミシディン（S）（式 $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$ を有するポリペプチド）である。

【0029】

本発明の染色試薬に混合して使用できる洗剤は、非イオン型または両性電解質型であることが好ましい。

【0030】

本発明を実施するのに好適な洗剤の実例としては、ただし限定的なものではないが、次のものを挙げることができる、すなわち、プロパンスルホン酸塩、特に3- [(3-クロラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパン・スルホン酸塩、コーラミド類、特にN,N-ビス[3-D-グルコナミドプロピル]-コーラミド、スルフォベタートン類、アルキル・グリコシド類およびアルキル・マルトシド類、ポリオキシエチレン・エーテル類、ポリオキシエチレン・ソルビタン類、ポリクリコール・エーテル類である。

10

【0031】

本発明の染色試薬に混合して用いることのできる染色剤は、細胞内化合物、例えば、細胞の核酸、特にRNAを染めることによって標識することのできるマーカーである。

【0032】

蛍光染色剤が好ましく、特に網状赤血球用の蛍光染色剤が好ましいが、非蛍光染色剤の使用も本発明の範囲内に入る。

20

【0033】

蛍光染色剤を用いる場合には、染色剤は0.1nmから1mmの間の波長の光により励起されるものであることが好ましい。

【0034】

可能であれば、染色剤は、青色光、特に488nmの波長の光により励起されるものを用いることが好ましい。

【0035】

本発明を実施するのに用いることのできる染色剤の実例として、ただし限定的なものではないが、次のものを挙げることができる、すなわち、3,3'-ジメチルオキサカルボシアニン・イオダイド（すなわち3-メチル-2- [(3-メチル-2(3H)-ベンゾキサゾリリデン)-1-プロペニル]ベンゾキサゾリウム・イオダイド）、チアゾール・オレンジ、すなわち1-メチル-4- [(3-メチル-2(3H)-ベンゾチアゾリリデン)メチル]キノリニウム p-トシレート、キノリニウム、4- [(3-メチル-2(3H)-ベンゾチアゾリリデン)メチル]-1- [(3-(トリメチルアンモニオ)プロピル)ジイオダイド（登録商標TOPRO1の下に、Molecular Probes社によって市販されている）、スチリル類、特にスチリル7、ニュー・メチレン・ブルー、ブリリアント・クレシル・ブルーである。

30

【0036】

この既知の染色剤を、選択された割合で、イオノフォアおよび/または洗剤と混合すると、それはすぐに細胞膜を横断し、そのため、反応時間を顕著に短縮することができ、一般に、数十秒の値に引き下げることができる。

40

【0037】

したがって、チアゾール・オレンジの場合、その反応時間は、その染色剤だけを用いたものでは、室温で30分かかったものが、本発明では、25秒の桁の数値にまで短縮させることができる。

【0038】

本発明の染色試薬は、前述の染色剤や添加剤以外の化合物や物質を含んでもよい。

【0039】

したがって、前記染色試薬は、更に溶媒、特にメタノールのようなアルコールを含んでもよい。それらのアルコールは、染色剤の溶解を助けるばかりでなく、細胞の膜脂質の粒子化を助長するからである。

50

【0040】

他の方法として、または補助として、この染色剤に更に塩類、例えば、ナトリウムまたはカリウム塩を含んでもよい。

【0041】

実際、塩類の濃度は、いわゆる「イオン」力を誘起し、これは、濃度が十分に高くなると、膜の成分間の結合を変化させることによって細胞膜を不安定にすることが判明している。更に、塩類は細胞の容量にも作用することがある。

【0042】

本発明の染色試薬に加えてもよいその他の化合物として、キレート剤、特にEDTAと、防腐剤と、pHを5から11の間に保つバッファー系とが挙げられる。

10

【0043】

(実施例)

本発明の典型的な染色試薬は、下記のものを含む染色液または標識液である。すなわち、 $0.1 \mu\text{M}$ から 0.5M の間の濃度を有する染色剤と、下記のものから選択された少なくとも一つの添加剤、すなわち、

【0044】

【表3】

<u>化合物</u>	<u>濃度</u>
イオノフォア	0～1M
洗剤	0～20%

20

【0045】

と、下記のものの中の1種以上の化合物、すなわち、

【0046】

【表4】

<u>化合物</u>	<u>濃度</u>
塩類 (NaCl/KCl)	0～1M
キレート剤 (EDTA)	0～100mM
溶媒	0～15%
防腐剤	0～1%

30

【0047】

と、pHを5から11の間に保つ、有機または無機のバッファー系とからなる。

【0048】

本発明による染色試薬の1例は、下記のようなものである。すなわち、

【0049】

【表5】

40

<u>化合物</u>	<u>濃度</u>
チアゾール・オレンジ	2 μ M
バリノマイシン	1 μ M
ポリグリコール・エーテル	0.0003%
NaCl	155 mM
EDTA	2 mM
メタノール	1.5%

10

【0050】

である。用いたバッファー系は、染色液のpHを中性値に調節するリン酸バッファーである。

【0051】

次に、本発明を、添付図面を参照しながら説明することにする。これらの図は、フロー・サイトメーターにて得られた画像を表わし、各試行時に、参考染色剤にて得られた画像と、本発明による染色試薬で得られた画像の比較を行なっている。

【0052】

これらの画像は、蛍光(X軸)と回折(Y軸)とを表わす。これらの画像の各々に、三つの集団が見られる。それぞれ左から右に、赤血球集団(雲の形に見える)、網状赤血球集団(枠で囲った部分)、および白血球集団(ちりぢりの雲)である。

20

【0053】

図1Aおよび図1Bは、染色剤としてチアゾール・オレンジを用い、FACSCANフロー・サイトメーター(Becton Dickinson社の登録商標)にて得られた画像を示している。

【0054】

図1Aは、参考染色剤によって得られた画像である。要した反応時間は、室温にて30分であった。網状赤血球カウントは、4.55%であった。

【0055】

図1Bは、本発明の染色試薬によって得られた画像を示す。この場合、イオノフォア添加の下にチアゾール・オレンジを用いた。要した反応時間は、35で25秒であった。網状赤血球カウントは、4.89%であった。

30

【0056】

図2Aおよび図2Bは、染色剤として3,3'-ジメチルカルボシアニン・イオダイドを用い、FACSCANフロー・サイトメーターにて得られた画像を示している。本発明の染色試薬を用いた場合、イオノフォアおよび洗剤添加の下に3,3'-ジメチルカルボシアニン・イオダイドを用いた。

【0057】

この二つの染色操作は、35で行なった。等価的結果が、参考染色剤では5分(図2A)で、本発明による染色試薬では30秒(図2B)で得られた。

40

【0058】

図2Aおよび図2Bの画像における網状赤血球カウントは、それぞれ1.5%および1.3%であった。

【0059】

図3Aおよび図3Bは、染色剤としてTO-PRO1(Molecular Probes社の登録商標)を用い、青色光の照射の下に、FACSCANフロー・サイトメーターによって得られた画像である。

【0060】

図3Aの場合(参考染色剤)、反応時間は60分であり、網状赤血球カウントは2.22%であった。

50

【 0 0 6 1 】

図 3 B の場合 (イオノフォア添加の下に染色する)、反応時間は 5 分であり、網状赤血球カウントは 2 . 1 4 % であった。

【 0 0 6 2 】

図 4 A および図 4 B は、T O - P R O 3 (Molecular Probes 社の登録商標) 型の染色剤を用い、赤色光の照射の下に、F A C S C A N フロー・サイトメーター (Becton Dickinson 社の登録商標) によって得られた画像である。

【 0 0 6 3 】

図 4 A の場合 (参考染色剤)、反応時間は 3 0 分であり、網状赤血球カウントは 4 . 1 % であった。

10

【 0 0 6 4 】

図 4 B の場合、反応時間は 2 分であり、網状赤血球カウントは 4 . 9 % であった。

【 0 0 6 5 】

したがって、前記各実施例の染色試薬によれば、参考染色剤に比べて、反応時間を有意に短縮することができる。

【 0 0 6 6 】

以上、本発明者によってなされた発明を実施例に基づき具体的に説明したが、本発明は前記実施例に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲で種々変更可能であることはいうまでもない。

【 0 0 6 7 】

【 発明の効果 】

本願において開示される発明のうち、代表的なものによって得られる効果を簡単に説明すれば、下記の通りである。

20

【 0 0 6 8 】

すなわち、既知の染色試薬で可能な反応時間よりも更にずっと短い反応時間で、細胞を標識することができる。

【 0 0 6 9 】

特に、反応時間を数分から数秒に短縮させることができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 A 】染色剤としてチアゾール・オレンジを用い、F A C S C A N フロー・サイトメーターにて得られた画像であって、参考染色剤によって得られた画像を示す図である。

30

【 図 1 B 】染色剤としてチアゾール・オレンジを用い、F A C S C A N フロー・サイトメーターにて得られた画像であって、本発明の染色試薬によって得られた画像を示す図である。

【 図 2 A 】染色剤として 3,3'-ジメチルカルボシアニン・イオダイドを用い、F A C S C A N フロー・サイトメーターにて得られた画像であって、参考染色剤によって得られた画像を示す図である。

【 図 2 B 】染色剤として 3,3'-ジメチルカルボシアニン・イオダイドを用い、F A C S C A N フロー・サイトメーターにて得られた画像であって、本発明の染色試薬によって得られた画像を示す図である。

40

【 図 3 A 】染色剤として T O - P R O 1 を用い、青色光の照射の下に、F A C S C A N フロー・サイトメーターによって得られた画像であって、参考染色剤によって得られた画像を示す図である。

【 図 3 B 】染色剤として T O - P R O 1 を用い、青色光の照射の下に、F A C S C A N フロー・サイトメーターによって得られた画像であって、本発明の染色試薬によって得られた画像を示す図である。

【 図 4 A 】T O - P R O 3 型の染色剤を用い、赤色光の照射の下に、F A C S C A N フロー・サイトメーターによって得られた画像であって、参考染色剤によって得られた画像を示す図である。

【 図 4 B 】T O - P R O 3 型の染色剤を用い、赤色光の照射の下に、F A C S C A N フロ

50

ー・サイトメーターによって得られた画像であって、本発明の染色試薬によって得られた画像を示す図である。

【 図 1 A 】

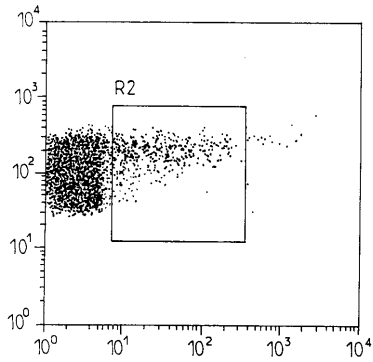


FIG.1A

【 図 2 A 】

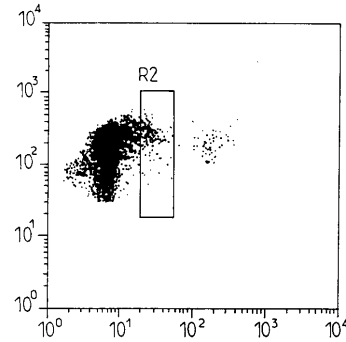


FIG.2A

【 図 1 B 】

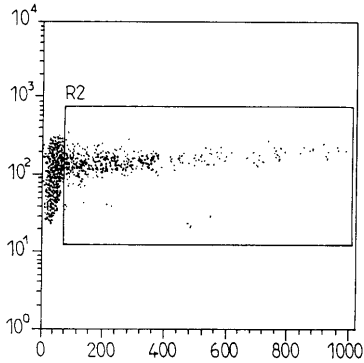


FIG.1B

【 図 2 B 】

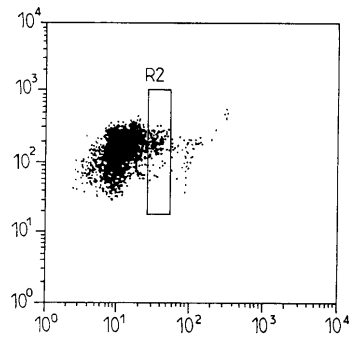


FIG.2B

【 3 A 】

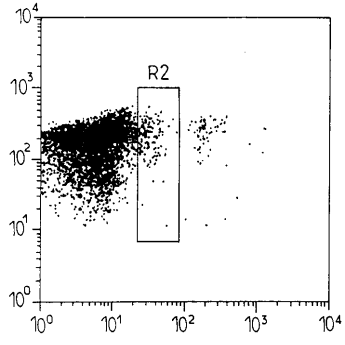


FIG.3A

【 4 A 】

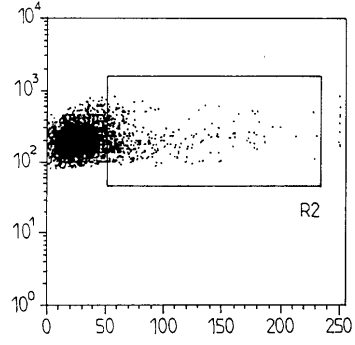


FIG.4A

【 3 B 】

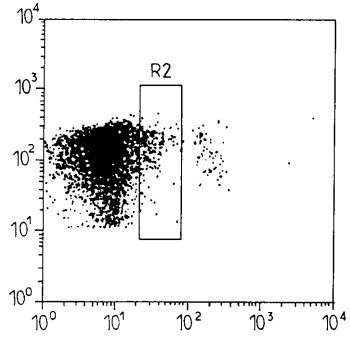


FIG.3B

【 4 B 】

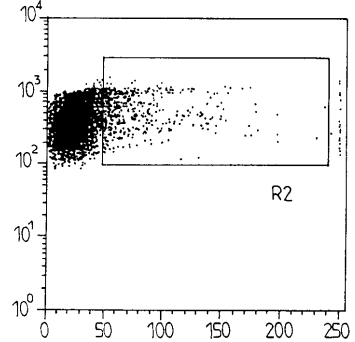


FIG.4B

フロントページの続き

(72)発明者 シルヴィ・ヴェリアック
フランス国、F - 3 4 0 7 0 モントペリエ、アヴニュー・ムッシュー・テスト、5 1 1、レ・ジャ
ルタン・ドゥ・ラランブラ

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 米国特許第0 4 6 7 0 4 0 2 (U S , A)
特開昭6 1 - 0 7 9 1 6 3 (J P , A)
特開平0 6 - 1 8 0 3 1 4 (J P , A)
特開平0 8 - 3 3 8 8 3 9 (J P , A)
国際公開第9 6 / 0 3 3 3 9 6 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
G01N 33/48
G01N 33/49