

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006 年 9 月 14 日 (14.09.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/095757 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12M 1/34 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)  
C12Q 1/26 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)  
C12Q 1/32 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/304439
- (22) 国際出願日: 2006 年 3 月 8 日 (08.03.2006)
- (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2005-065820 2005 年 3 月 9 日 (09.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 富士写真フイルム株式会社 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2500193 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 健太郎 (NAKAMURA, Kentaro) [JP/JP]; 〒3518585 埼玉県朝霞市泉水 3 丁目 1 1 番 4 6 号 富士写真フイルム株式会社内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 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, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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: MULTILAYER ANALYTICAL ELEMENT

(54) 発明の名称: 多層分析要素

(57) Abstract: It is intended to provide a multilayer analytical element which shows little difference from lot to lot and within a single lot, can achieve a high measurement accuracy and can be downsized. Namely, a multilayer analytical element for analyzing a liquid sample comprising a water-impermeable flat support and a porous liquid sample-development layer consisting of at least one functional layer and at least a non-fibrous porous membrane which are layered and integrated on one face of the support in this order, characterized in that a dehydrogenase (a dehydration enzyme) is employed as an analyte or a coupled enzyme, an oxidized coenzyme, diaphorase and a formazan dye-forming tetrazolium salt are contained in the functional layer or the porous liquid sample-development layer or both of these layers, and the non-fibrous porous membrane is made of an organic polymer and has an average pore size of 2  $\mu$ m or more.

(57) 要約: 本発明の目的は、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化が可能な多層分析要素を提供することである。本発明によれば、水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも 1 つの機能層と少なくとも 1 つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化された液体試料分析用多層分析要素において、デヒドロゲナーゼ (脱水素酵素) をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を該機能層、該多孔性液体試料展開層またはその両方に含み、かつ該非繊維性多孔膜が平均孔径 2  $\mu$ m 以上の有機高分子であることを特徴とする液体試料分析用多層分析要素が提供される。

WO 2006/095757 A1

## 明 細 書

### 多層分析要素

### 技術分野

- [0001] 本発明は、臨床検査、食品検査、環境分析等に用いられる多層分析要素に関する。

### 背景技術

- [0002] 臨床検査、食品検査及び環境分析の分野では、迅速・簡便に検体を処理する要求が年々高くなっており、そのニーズ#に応えた乾式分析素子が汎用されている。分析要素の中で、血液の受容、展開、拡散を行わせる展開層には、特開昭55-164356号公報、特開昭57-66359号公報、特開昭60-222769号公報等に代表されるように、繊維質多孔性材料が用いられてきた。
- [0003] この繊維質多孔性材料は、液体試料点着時の展開が速く、製造時の取り扱い性にも優れている。また、全血のような粘性のある試料に対しても適用性があり、広く使用されている。
- [0004] しかし、この分野では、より高い精度(再現性)での測定が要求されるようになってきており、繊維質多孔性材料(布展開層)では、いくつか不具合がでてきている。その一つが、布自身のロット変動の問題である。通常、布展開層には、織物と編物があるが、その織り方、編み方にロット間差及びロット内差が見つかっている。具体的には、単位面積当たりの編目数、単位面積当たりの重量、厚みなどである。また、中間工程で、材料の洗浄工程があるが、その洗浄の程度により、布の親水性にロット間差、ロット内差がある。さらに、布展開層は、平滑ではないため、積層方式で、十分な接着力を確保して製造しようとする、下層に展開層を食い込ませざるをえない。これにより下層は乱れており、より高い精度での測定に対しては、好ましくない。さらに、布展開層は布自身及び下層の食い込み等の影響によって液体試料の下層への移行量を増加させることが難しく、高感度化できにくいという問題もある。また布は下層に布を接着する際に、その構造上伸びやすく、空隙体積の変化を起こしやすい。そのために液体試料点着時の展開面積が変化しやすく、ロット内差及び高精度測定が達成でき

ない原因となっている。また近年、より少ない試料で測定することが望まれているが、布展開層では、試料液量を少なくしていくと、編目の影響による反射光量のバラツキが顕著になり、高精度の測定ができなくなる。

[0005] 上述したような布展開層の欠点を解決する手段として、特公昭53-21677号公報、特公平1-33782号公報等にも示されるような非繊維質多孔性膜を展開層に用いた乾式分析素子が検討されている。ここで言う非繊維質多孔性膜は、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、酢酸セルロースなどの有機高分子の製膜原液を作製し、これを支持体上に、塗布、流延し、乾燥を行うことで製膜して作製したものである。ここでは、写真フィルムで培われた塗布技術が応用されており、その製膜精度は、5~10%程度であり、ロット間差、ロット内差なども十分に小さい。また、これら非繊維質多孔性膜は、布展開層に比べ、平滑で、かつ、比表面積が大きいことから、下層への食い込みは少ない状態で、下層と所望の強さでの接着が可能である。さらに、布展開層に代表される編目はなく、白色度も高いため、分析素子の面積を小さくしても、反射光量のバラツキは安定しており、高精度の測光が可能である。

[0006] このような非繊維質多孔性膜を展開層に用いた分析素子において、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を含む系(例えば、LDH、CPK、又はCKMBを分析する系)では展開層に用いる非繊維質多孔性膜の平均孔径により、検出感度が変わること、また検出感度の変化に伴い測定精度にも影響を及ぼすことがあることが分かってきた。

[0007] 特許文献1:特開昭55-164356号公報

特許文献2:特開昭57-66359号公報、

特許文献3:特開昭60-222769号公報

特許文献4:特公昭53-21677号公報

特許文献5:特公平1-33782号公報

特許文献6:特開昭62-205798号公報

特許文献7:特開昭63-32499号公報

特許文献8:特開平11-196号公報

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化が可能な多層分析要素を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を含む系(例えば、LDH、CPK、又はCKMBを分析する系)において測定精度の向上を達成できる多層分析要素を提供することを解決すべき課題とした。

### 課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を含む液体試料分析用多層分析要素において、多孔性液体試料展開層を構成する非繊維性多孔膜として、平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上の有機高分子を使用することによって、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0010] 即ち、本発明によれば、水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも1つの機能層と少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化された液体試料分析用多層分析要素において、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を該機能層、該多孔性液体試料展開層またはその両方に含み、かつ該非繊維性多孔膜が平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上の有機高分子であることを特徴とする液体試料分析用多層分析要素が提供される。
- [0011] 好ましくは、酸化型補酵素は $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ である。  
好ましくは、ホルマザン色素形成テトラゾリウム塩はニトロテトラゾリウムブルーである。
- [0012] 好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は非対称性多孔膜であり、非対称率は2.0以上である。  
好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は対称性多孔膜であり、非対称率は2.0未

満である。

- [0013] 好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、アクリレート共重合体、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリアクリロニトリル共重合体、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリウレタン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレンクロロトリフルオロエチレン共重合体、ポリエチレンテトラフルオロエチレン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニルデンジフルオライド、ポリフェニレンスルフィド、ポリフェニレンオキシド、ポリフルオロカーボネート、ポリプロピレン、ポリベンズイミダゾール、ポリメタクリル酸メチル、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体の鹼化物、ポリビニルアルコール、セルロースアセテート、セルロースアセテートの鹼化物、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートブチレートの鹼化物またはこれらの混合物である。さらに好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリエステルカーボネート、ポリフェニレンオキシド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、セルロースアセテート、セルロースアセテートの鹼化物またはこれらの混合物である。特に好ましくは、有機高分子からなる多孔膜はポリエーテルスルホン、ポリスルホン、またはこれらの混合物である。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0014] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の液体試料分析用多層分析要素は、水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも1つの機能層と少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化された液体試料分析用多層分析要素において、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を該機能層、該多孔性液体試料展開層またはその両方に含み、かつ該非繊維性多孔膜が平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上の有機

高分子であることを特徴とする。

- [0015] 本発明によれば、平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上の有機高分子の非繊維性多孔膜を展開層として用いることで、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を含む液体試料分析用多層分析要素において、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化可能となる。
- [0016] 本発明の液体試料分析用多層分析要素の構成例としては、(1)支持体上に、1または複数の機能層が設けられ、さらに該機能層の上に非繊維性多孔膜が設けられている液体試料分析用多層分析要素、並びに、(2)支持体上に、1または複数の機能層が設けられ、さらに該機能層の上に、試料分析用の試薬を含有する非繊維性多孔膜が設けられている液体試料分析用多層分析要素、が挙げられる。即ち、本発明における非繊維性多孔膜は、試料分析用の試薬を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。
- [0017] 多孔性液体試料展開層は、1層だけに限定する必要はなく、2層以上の非繊維性多孔膜を部分的に配置された接着剤により接着された積層物を用いることができる。また、少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層は特開昭57-66359に開示の物理的活性化処理、好ましくはグロー放電処理またはコロナ放電処理を非繊維性多孔膜の少なくとも片面に施すか、あるいは特開昭55-164356、特開昭57-66359等を開示の界面活性剤含浸処理、好ましくはノニオン性界面活性剤含浸処理、または親水性ポリマー含浸処理などの親水化処理、またはこれらの処理工程の二つ以上の組み合わせを逐次実施することにより非繊維性多孔膜を親水化し、下側(支持体に近い側)の機能層との接着力の強化、または展開面積のコントロールをすることができる。更に、目的とする検出反応を行うための試薬、該検出反応を促進するための試薬、あるいは干渉・妨害反応を低減又は阻止するための各種試薬、もしくはこれらの試薬の一部を含ませることができる。
- [0018] 本発明においては、上記非繊維性多孔膜として、平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上の有機高分子を用いる。有機高分子の平均孔径の上限は特に限定されないが、一般的には $50\mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは $30\mu\text{m}$ 以下であり、より好ましくは $20\mu\text{m}$ 以下であり、特に

好ましくは $10\mu\text{m}$ 以下である。本発明で言う平均孔径は、以下の方法により測定される平均孔径である。

1. 多孔質膜をエタノールに浸し、孔をエタノールで充満させ、液体窒素で凍結させる。
2. 断面を切出し、走査型電子顕微鏡(SEM)で断面の画像を撮影する。
3. 上記画像をLUZEX SE(自動画像処理解析装置、(株)ニレコ社製)により解析し、視野内の孔の孔径を面積換算で円相当径として算出し、円相当径の平均値を平均孔径とする。

[0019] 上記した有機高分子からなる非繊維性多孔膜は、対称性膜又は非対称性膜の何れも使用することができる。非対称性多孔膜の場合、非対称率は好ましくは2.0以上であり、対称性多孔膜の場合、非対称率は好ましくは2.0未満である。本明細書で言う非対称性多孔膜とは、一方の表面の平均孔径が他方の表面の平均孔径よりも大きい多孔膜のことであり、非対称率とは、大きい方の平均孔径を小さい方の平均孔径で割った値のことである。

[0020] 上記非繊維性多孔膜としては、6,6-ナイロン、6-ナイロン、アクリレート共重合体、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリアクリロニトリル共重合体、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリウレタン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレンクロロトリフルオロエチレン共重合体、ポリエチレンテトラフルオロエチレン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、ポリフェニレンスルフィド、ポリフェニレンオキシド、ポリフルオロカーボネート、ポリプロピレン、ポリベンズイミダゾール、ポリメタクリル酸メチル、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体の鹼化物、ポリビニルアルコール、セルロースアセテート、セルロースアセテートの鹼化物、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートブチレートの鹼化物またはこれらの混合物を用いることができ、好ましくは6,6-ナイロン、6-ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリア

クリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリエステルカーボネート、ポリフェニレンオキシド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、セルロースアセテート、セルロースアセテートの鹼化物またはこれらの混合物を用いることができ、さらに好ましくはポリエーテルスルホン、ポリスルホン、またはこれらの混合物を用いることができる。

[0021] また、試薬含有非繊維性多孔膜は、試薬を含有している膜を指すが、予め多孔膜を試薬溶液に浸漬後、乾燥させることにより試薬含有膜を作製できる。また、別法として多孔膜上に試薬溶液を塗布後乾燥させることにより試薬含有非繊維性多孔膜を作製できるが、特に手段は、限定しない。

[0022] さらに、本発明の液体試料分析用多層分析要素は、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、上記の非繊維性多孔膜またはこれと液体接触関係にある少なくとも1つの機能層またはその両方に、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩などの試薬を含む。

[0023] 本発明の多層分析要素が対象とする被検物質は特に限定されず、任意の液体試料(例えば、全血、血漿、血清、リンパ液、尿、唾液、髄液、膿液などの体液中の特定成分を分析することができる。例えば、クレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)、乳酸脱水素酵素(LDH)、クレアチンキナーゼMBアイソザイム(CKMB)などを分析することができる。

[0024] (1)クレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)の分析

血中のクレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)活性値は、心筋梗塞、進行性筋ジストロフィーやその他の筋肉疾患、並びに内分泌疾患などの臨床診断上の重要な指標として近年利用されている。CPKは、 $\text{ATP} + \text{クレアチン} \rightarrow \text{ADP} + \text{クレアチン酸}$ の可逆反応を触媒する。本発明の液体試料分析用多層分析要素においては、上記反応の逆反応を用い、さらに呈色色素を生成させる酵素系を導入したNADH比色法を使用している。CPK測定用の分析要素で使用する試薬の具体例としては、特開昭63-32499号公報に記載されているものを使用することができる。

[0025] 即ち、本発明の液体試料分析用多層分析要素を用いてCPKの分析を行う場合には、分析要素中には、クレアチンリン酸2ナトリウム、ニトロテトラゾリウムブルー、ADP

、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコース、 $\text{NAD}^+$ 、ヘキソキナーゼ、及びジアホラーゼが含まれる。上記した成分を含む多層分析要素に検体を点着すると、以下の反応により、ホルマザン色素が生成する。即ち、検体中のCPKは、分析要素中のクレアチンリン酸とADPとの反応を触媒する。反応の開始と共にATPは、共存するヘキソキナーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ジアホラーゼなどの酵素の働きでニトロテトラゾリウムブルーを還元し、ホルマザン色素が生成する。生成した色素による吸光度の増加を測定することにより生成速度が算出され、CPK活性値を求めることができる。

[0026] [化1]



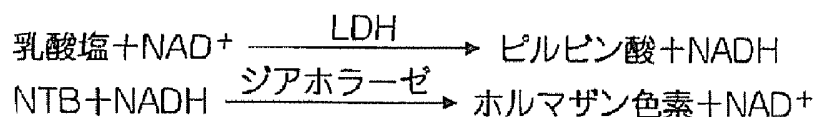
[0027] (2) 乳酸脱水素酵素 (LDH) の分析

血清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の上昇は、心・腎・肝などの各種疾患、白血病、悪性貧血などに見られる。本発明の液体試料分析用多層分析要素においては、乳酸を基質として用い、テトラゾリウム塩を発色試薬としたNADH比色法を使用している。LDH測定用の分析要素で使用する試薬の具体例としては、特開昭62-205798号公報に記載されているものを使用することができる。

[0028] 即ち、本発明の液体試料分析用多層分析要素を用いてLDHの分析を行う場合には、分析要素中には、乳酸リチウム、ニトロテトラゾリウムブルー、 $\text{NAD}^+$ 、ジアホラーゼ、及びアスコルビン酸オキシダーゼが含まれる。上記した成分を含む多層分析要素に検体を点着すると、以下の反応により、ホルマザン色素が生成する。即ち、検体中のLDHは、基質である乳酸塩と補酵素酸化型ニコチン酸アミドジヌクレオチド ( $\text{NAD}^+$ ) との反応を触媒する。生成した還元型補酵素 ( $\text{NADH}$ ) は、ジアホラーゼの触媒作用によりニトロテトラゾリウムブルーを還元し、ホルマザン色素が生成する。生成した色素による吸光度の増加を測定することにより生成速度が算出され、LDH活性

値を求めることができる。

[0029] [化2]



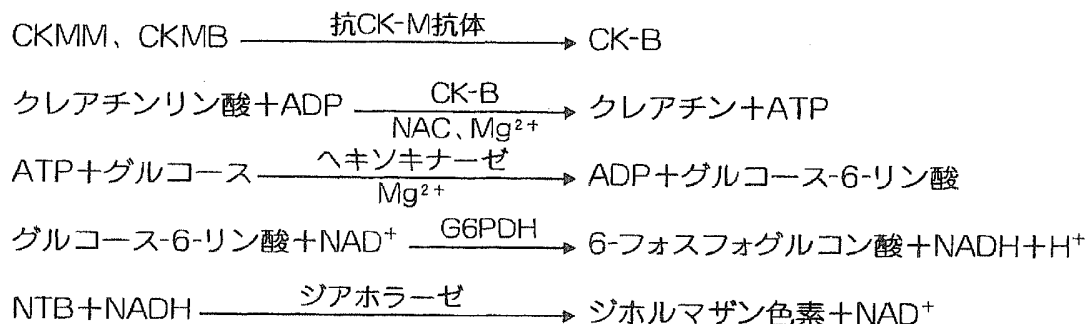
[0030] (3)クレアチンキナーゼMBアイソザイム(CKMB)の分析

クレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)のアイソザイムの一つであるCKMBは、その含有比率と含有量が心筋に著しく高いことが知られている。心筋に傷害が起こると血中CKMB活性が上昇するため、CKMBの測定が心筋梗塞に特異性の高い検出法として重要視されている。本発明の液体試料分析用多層分析要素においては、CK-M活性を阻害する抗体を用いた免疫阻害法を用い、さらに呈色色素を生成させる酵素系を導入したNADH比色法を使用している。CKMB測定用の分析要素で使用する試薬の具体例としては、特開平11-196号公報に記載されているものを使用することができる。

[0031] 即ち、本発明の液体試料分析用多層分析要素を用いてCKMBの分析を行う場合には、分析要素中には、抗ヒトCK-Mヒツジ抗体、クレアチンリン酸2ナトリウム、ニトロテトラゾリウムブルー、1, 5-ジ(アデノシン-5')5リン酸、NAC、AMP、アスコルビン酸オキシダーゼ、ADP、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコース、NAD<sup>+</sup>、ヘキソキナーゼ、及びジアホラーゼが含まれる。上記した成分を含む多層分析要素に検体を点着すると、以下の反応により、ホルマザン色素が生成する。即ち、検体中のCK-M活性は、抗CK-M抗体により阻害され、阻害作用を受けないCK-BサブユニットはN-アセチルシステイン(NAC)により活性化され、クレアチンリン酸とADPからクレアチンとATPを生成する反応を触媒する。この反応で生成したATPはヘキソキナーゼ(HK)の触媒作用でグルコースと反応し、グルコース-6-リン酸とADPに変化する。さらに、グルコース-6-リン酸は、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)の作用で酸化され、同時にニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド(NADH)が生成する。最終的には、NADHはジアホラーゼ(DI)の作用でニトロテトラゾリウムブルー(NTB)を還元し、ホルマザン色素が生成する。生成した色素による吸

光度の増加を測定することにより生成速度が算出され、CKMB活性値を求めることができる。

[0032] [化3]



[0033] 機能層の具体例としては、展開層と機能層を接着する接着層、液状試薬を吸水する吸水層、化学反応により生成した色素の拡散を防止する媒染層、ガスを選択的に透過させるガス透過層、層間での物質移動を抑制・促進させる中間層、内因性物質を除去する除去層、反射測光を安定に行うための光遮蔽層、内因性色素の影響を抑制する色遮蔽層、血球と血漿を分離する分離層、分析対象物と反応する試薬を含む試薬層、発色剤を含む発色層などが挙げられる。

[0034] 本発明の一例としては、例えば、支持体の上には、場合によっては下塗層等の他の層を介して、機能層として親水性ポリマー層を設けることができる。親水性ポリマー層としては、例えば、無孔性、吸水性かつ水浸透性の層であり、基本的に親水性ポリマーのみなる吸水層、親水性ポリマーをバインダーとし発色反応に直接関与する発色試薬の一部又は全部を含む試薬層、及び親水性ポリマー中に発色色素を固定し不動にする成分(例:媒染剤)を含有する検出層などを設けることができる。

[0035] 試薬層は水性液体中の被検成分と反応して光学的に検出可能な変化を生じる試薬組成物の少なくとも一部が親水性ポリマーバインダー中に実質的に一様に分散されている吸水性で水浸透性の層である。この試薬層には指示薬層、発色層なども含まれる。

[0036] 試薬層のバインダーとして用いることができる親水性ポリマーは、一般には水吸収時の膨潤率が30℃で約150%から約2000%、好ましくは約250%から約1500%の範囲の天然または合成親水性ポリマーである。そのような親水性ポリマーの例とし

ては、特開昭60-108753号公報等に記載されているゼラチン(例、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等)、ゼラチン誘導体(例、フタル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等)、アガロース、プルラン、プルラン誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等をあげることができる。

- [0037] 試薬層は架橋剤を用いて適宜に架橋硬化された層とすることができる。架橋剤の例として、ゼラチンに対する1, 2-ビス(ビニルスルホニルアセトアミド)エタン、ビス(ビニルスルホニルメチル)エーテル等の公知のビニルスルホン系架橋剤、アルデヒド等、メタリルアルコールコポリマーに対するアルデヒド、2個のグリシジル基含有エポキシ化合物等がある。
- [0038] 試薬層の乾燥時の厚さは約1  $\mu$  mから約100  $\mu$  mの範囲であることが好ましく、より好ましくは約3  $\mu$  mから約50  $\mu$  mの範囲である。また試薬層は実質的に透明であることが好ましい。
- [0039] 本発明の多層分析要素の試薬層やその他の層に含める試薬としては、被験物質に応じてその検出に適した試薬を選択することができる。
- [0040] 本発明の液体試料分析用多層分析要素における水不透過性平面支持体としては、従来公知の分析要素に用いられている水不透過性の支持体を用いることができる。水不透過性支持体の例としては、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカルボネート、ポリスチレン、セルロースエステル(例、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等)等のポリマーからなる厚さ約50  $\mu$  mから約1mm、好ましくは約80  $\mu$  mから約300  $\mu$  mの範囲のフィルムもしくはシート状の支持体を挙げることができる。
- [0041] 支持体の表面には必要により下塗層を設けて、支持体の上に設けられる機能層と支持体との接着を強固なものにすることができる。また、下塗層の代りに、支持体の表面を物理的あるいは化学的な活性化処理を施して接着力の向上を図ってもよい。
- 非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層を試薬層、吸水層または接着層等の機能層にラミネートするには特開昭55-164356、特開昭57-66359等に記載の方法に従うことができる。すなわち試薬層、吸水層または接着層等の機能層が塗布後未乾燥のうちに、または乾燥後の機能層に水、界面活性剤を含む水溶液、界

面活性剤と親水性ポリマーを含む水溶液、有機溶媒または有機溶媒を含有する水溶液等をワイヤーバー塗布装置及びダイを用いた塗布装置等で実質的に均一に供給し、機能層を膨潤または溶解させ、ついで非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層を膨潤または溶解している機能層の上に実質的に均一に軽く圧力をかけながらラミネートし、一体化する。機能層の膨潤または溶解に際しては、赤外線ヒーター等の輻射熱の照射による加温、支持体にヒーターを接触させ加温する方法等を用いることができる。

[0042] 本発明の多層分析要素は、公知の方法により調製することができる。溶血試薬は塗布または含浸される試薬水溶液に予め加えておけばよい。他の方法としては、単独又は界面活性剤・展開面積制御のための親水性ポリマーなどを含む水溶液、有機溶媒(エタノール、メタノールなど)溶液又は水-有機溶媒混合液溶液を展開層の上から塗布して含浸させることもできる。これを用いた被験物質の分析も公知の方法に従って行なうことができる。

[0043] 例えば、本発明の多層分析要素は、一辺約5mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-283331号公報(対応米国特許4, 169, 751)、実開昭56-142454号公報(対応米国特許4, 387, 990)、特開昭57-63452号公報、実開昭58-32350号公報、特表昭58-501144号公報(対応国際公:WO083/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることができ、これは製造、包装、輸送、保存、測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、又は小片を開口のある容器内に収めて用いたり、又は小片を開口カードに貼付または収めて用いたり、あるいは裁断した小片をそのまま用いることなどもできる。

[0044] 本発明の多層分析要素は、例えば約2  $\mu$ L～約30  $\mu$ L、好ましくは4  $\mu$ L～15  $\mu$ Lの範囲の水性液体試料液を、粒状構造物展開層に点着する。点着した多層分析要素を約20℃～約45℃の範囲の一定温度で、好ましくは約30℃～約40℃の範囲内の一定温度で1～10分間インキュベーションする。多層分析要素内の発色又は変色を支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の被験物質の量を求めることができる。

[0045] 測定操作は特開昭60-125543号公報、特開昭60-220862号公報、特開昭61-294367号公報、特開昭58-161867号公報(対応米国特許4,424,191)などに記載の化学分析装置により極めて容易な操作で高精度の定量分析を実施できる。なお、目的や必要精度によっては目視により発色の度合いを判定して、半定量的な測定を行ってもよい。

[0046] 本発明の多層分析要素は、分析を行うまでは乾燥状態で貯蔵・保管されるため、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないいわゆる湿式法より簡便性、迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる検査方法としても優れている。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

### 実施例

[0047] 実施例1:各種平均孔径のポリスルホン膜を用いたLDH分析用多層分析要素の感度及び精度比較

(1)平均孔径 $1.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法

ゼラチン下塗りされている $180\mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液( $\text{pH}=6.4$ )を、下記の被覆量になるように塗布、乾燥し発色層とした。

|                                |                           |
|--------------------------------|---------------------------|
| ゼラチン                           | $19.9\text{g}/\text{m}^2$ |
| ニトロテトラゾリウムブルー                  | $0.8\text{g}/\text{m}^2$  |
| ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンノニルフェニルエーテル | $0.4\text{g}/\text{m}^2$  |
| 1,2-ビス(ビニルスルホニルアセトアミド)エタン      | $0.2\text{g}/\text{m}^2$  |

[0048] 次に上記試薬層上に約 $15\text{g}/\text{m}^2$ の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、平均孔径 $1.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜(MMM0.8:ポール社製)を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。

[0049] 上記MMM0.8膜上に、下記組成の水溶液( $\text{pH}=8.0$ )を下記の被覆量になるよ

うに塗布、乾燥させ、平均孔径 $1.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素を作製した。

|        |                                        |                            |
|--------|----------------------------------------|----------------------------|
| [0050] | ポリアクリルアミド                              | $2.9\text{g}/\text{m}^2$   |
|        | KF353(信越化学社製ポリエーテル変性シリコーン)             | $0.8\text{g}/\text{m}^2$   |
|        | ポリエチレングリコール(40)オクチルフェニルエーテル            | $0.4\text{g}/\text{m}^2$   |
|        | トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン                    | $2.5\text{g}/\text{m}^2$   |
|        | L-グルタミン酸                               | $1.4\text{g}/\text{m}^2$   |
|        | 乳酸リチウム                                 | $1.1\text{g}/\text{m}^2$   |
|        | ジアホラーゼ                                 | $0.75\text{KU}/\text{m}^2$ |
|        | グルタミン酸ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ(GPT)           | $1.83\text{KU}/\text{m}^2$ |
|        | アスコルビン酸オキシダーゼ                          | $16.2\text{KU}/\text{m}^2$ |
|        | ニコチンアミドアデニンヌクレオチド酸化型( $\text{NAD}^+$ ) | $0.24\text{g}/\text{m}^2$  |

[0051] 上記の多層分析要素を $12\text{mm}\times 13\text{mm}$ 四方のチップに裁断し、スライド枠(特開昭57-63452号公報に記載)に収めて、LDH分析用スライド1(比較例)を作製した。

[0052] (2) 平均孔径 $2.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法

展開層に平均孔径 $2.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜(MMM2:ポール社製)を用いる以外は、(1)平均孔径 $1.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、LDH分析用スライド2(本発明)を作製した。

[0053] (3) 平均孔径 $2.6\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法

展開層に平均孔径 $2.6\mu\text{m}$ のポリスルホン膜(SEL200:富士写真フイルム社製)を用いる以外は、(1)平均孔径 $1.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、LDH分析用スライド3(本発明)を作製した。

[0054] (4) 平均孔径 $4.6\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法

展開層に平均孔径 $4.6\mu\text{m}$ のポリスルホン膜(MMM5:ポール社製)を用いる以外は、(1)平均孔径 $1.2\mu\text{m}$ のポリスルホン膜を展開層に用いたLDH分析用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、LDH分析用スライド3(本発明)を作製した。

[0055] (5)感度及び測定精度比較

上記LDH分析用スライド1、2、3、4に水及びLDH活性が $705\text{U/L}$ である管理血清を各々 $10\mu\text{L}$ 点着した。この後、各スライドを $37^\circ\text{C}$ でインキュベーションし、支持体側から $540\text{nm}$ の反射光学濃度を測定し、点着後1から2分後の反射光学濃度の変化量を求め、感度( $705\text{U/L}$ である管理血清を点着した時の反射光学濃度の変化量と水を点着した時の反射光学濃度の変化量の差( $\text{ddODr}(705\text{U/L}-0\text{U/L})$ ))を比較した。また、LDH活性が $705\text{U/L}$ の管理血清を $10\mu\text{L}$ で10回点着した時の精度(変動係数 $\%<\text{CV}>$ )を比較した。表1に感度比較結果、表2に精度比較結果を示す。

[0056] [表1]

表1：各種平均孔径展開層素材を用いたLDH分析用多層分析要素の感度比較

|                   | 感度 $\langle\text{ddODr}(705\text{U/L}-0\text{U/L})\rangle$ | 感度比  |
|-------------------|------------------------------------------------------------|------|
| LDH分析用スライド1 (比較例) | 0.100                                                      | 86%  |
| LDH分析用スライド2 (本発明) | 0.116                                                      | 100% |
| LDH分析用スライド3 (本発明) | 0.119                                                      | 103% |
| LDH分析用スライド4 (本発明) | 0.143                                                      | 123% |

[0057] [表2]

表2：各種展開層素材を用いたLDH分析用多層分析要素の精度(CV(%))比較

|                   | CV(%) |
|-------------------|-------|
| LDH分析用スライド1 (比較例) | 8.0   |
| LDH分析用スライド2 (本発明) | 2.1   |
| LDH分析用スライド3 (本発明) | 2.7   |
| LDH分析用スライド4 (本発明) | 0.5   |

[0058] 表1の結果から分かるように、平均孔径の増加に伴い感度が向上する。また、表2の結果から分かるように、平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上では感度向上に伴い測定精度の向上が達成された。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明によれば、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、

酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を含む系において、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化が可能な多層分析要素のための展開層を提供することができる。

## 請求の範囲

- [1] 水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも1つの機能層と少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化された液体試料分析用多層分析要素において、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)をアナライトまたは共役酵素とし、酸化型補酵素、ジアホラーゼ及びホルマザン色素形成テトラゾリウム塩を該機能層、該多孔性液体試料展開層またはその両方に含み、かつ該非繊維性多孔膜が平均孔径 $2\mu\text{m}$ 以上の有機高分子であることを特徴とする液体試料分析用多層分析要素。
- [2] 酸化型補酵素が $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ である、請求項1に記載の液体試料分析用多層分析要素。
- [3] ホルマザン色素形成テトラゾリウム塩がニトロテトラゾリウムブルーである、請求項1または2に記載の液体試料分析用多層分析要素。
- [4] 有機高分子からなる多孔膜が非対称性多孔膜であり、非対称率が2.0以上である、請求項1から3の何れかに記載の液体試料分析用乾式多層分析要素。
- [5] 有機高分子からなる多孔膜が対称性多孔膜であり、非対称率が2.0未満である、請求項1から3の何れかに記載の液体試料分析用乾式多層分析要素。
- [6] 有機高分子からなる多孔膜が6,6-ナイロン、6-ナイロン、アクリレート共重合体、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリアクリロニトリル共重合体、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリウレタン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレンクロロトリフルオロエチレン共重合体、ポリエチレンテトラフルオロエチレン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、ポリフェニレンスルフィド、ポリフェニレンオキシド、ポリフルオロカーボネート、ポリプロピレン、ポリベンズイミダゾール、ポリメタクリル酸メチル、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体の鹼化物、ポリビニルアルコール、セルロースアセテート、セルロースアセテートの鹼化物、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートブチレートの鹼化物またはこれらの混合物である、請求項1から5の何れかに

記載の液体試料分析用多層分析要素。

- [7] 有機高分子からなる多孔膜が、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリエステルカーボネート、ポリフェニレンオキシド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、セルロースアセテート、セルロースアセテートの鹼化物またはこれらの混合物である、請求項1から5の何れかに記載の液体試料分析用多層分析要素。
- [8] 有機高分子からなる多孔膜がポリエーテルスルホン、ポリスルホン、またはこれらの混合物である、請求項1から5の何れかに記載の液体試料分析用多層分析要素。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/304439

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>C12M1/34</b> (2006.01), <b>C12Q1/26</b> (2006.01), <b>C12Q1/32</b> (2006.01), <b>G01N21/78</b><br>(2006.01), <b>G01N33/52</b> (2006.01)<br><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                               |                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12M1/00-3/10, G01N31/22, C12Q1/00-3/00<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                               |                                                                                |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages            | Relevant to claim No.                                                          |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | JP 3-133396 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.),<br>06 June, 1991 (06.06.91),<br>(Family: none)     | 1-8                                                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | JP 64-073252 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.),<br>17 March, 1989 (17.03.89),<br>(Family: none)   | 1-8                                                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | JP 5-026875 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.),<br>02 February, 1993 (02.02.93),<br>(Family: none) | 1-8                                                                            |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | JP 1-185442 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.),<br>25 July, 1989 (25.07.89),<br>(Family: none)     | 1-8                                                                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                               |                                                                                |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                               |                                                                                |
| Date of the actual completion of the international search<br>12 June, 2006 (12.06.06)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                               | Date of mailing of the international search report<br>20 June, 2006 (20.06.06) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               | Authorized officer                                                             |
| Facsimile No.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                               | Telephone No.                                                                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/304439

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 7-055810 A (Miles Inc.),<br>03 March, 1995 (03.03.95),<br>& EP 0640392 A3 & US 6096269 A1 | 1-8                   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                     |                                                       |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））<br>Int.Cl. C12M1/34(2006.01), C12Q1/26(2006.01), C12Q1/32(2006.01), G01N21/78(2006.01), G01N33/52(2006.01)                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                     |                                                       |                  |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））<br>Int.Cl. C12M1/00-3/10, G01N31/22, C12Q1/00-3/00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                     |                                                       |                  |
| 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                     |                                                       |                  |
| 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<br>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<br>請求の範囲の番号 |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | JP 3-133396 A（富士写真フイルム株式会社）1991.06.06<br>（ファミリーなし）  |                                                       | 1-8              |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | JP 64-073252 A（富士写真フイルム株式会社）1989.03.17<br>（ファミリーなし） |                                                       | 1-8              |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | JP 5-026875 A（富士写真フイルム株式会社）1993.02.02<br>（ファミリーなし）  |                                                       | 1-8              |
| <input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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<br>「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<br>「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<br>「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）<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「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<br>「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<br>「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<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |                                                     |                                                       |                  |
| 国際調査を完了した日<br>1 2 . 0 6 . 2 0 0 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                     | 国際調査報告の発送日<br>2 0 . 0 6 . 2 0 0 6                     |                  |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（I S A / J P）<br>郵便番号100-8915<br>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）<br>長谷川 茜<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | 4 N 3 2 2 8      |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                 |                  |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | JP 1-185442 A (富士写真フイルム株式会社) 1989. 07. 25<br>(ファミリーなし)                          | 1-8              |
| A                     | JP 7-055810 A (マイルス・インコーポレーテッド) 1995. 03. 03<br>& EP 0640392 A3 & US 6096269 A1 | 1-8              |