

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/019155 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 15/14, 33/48 市 中央町1丁目9番1-2号 Shizuoka (JP). 磯合 綾子 (ISOAI,Ayako) [JP/JP]; 〒416-0944 静岡県 富士市 横割5-4-1 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08614
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002) (74) 代理人: 藤野 清也, 外(FUJINO,Seiya et al.); 〒160-0004 東京都 新宿区 四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (30) 優先権データ:
特願2001-256425 2001 年 8 月 27 日 (27.08.2001) JP
特願2002-6547 2002 年 1 月 15 日 (15.01.2002) JP
特願2002-6859 2002 年 1 月 16 日 (16.01.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-8205 大阪府 大阪市 北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka (JP). (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 坂野 さくら (SAKANO,Sakura) [JP/JP]; 〒417-0052 静岡県 富士

/続葉有/

(54) Title: METHOD OF ANALYZING INTERACTION BETWEEN MATERIAL AND BIOLOGICAL SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 材料と生体関連物質との相互作用の分析方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of analyzing an interaction between a medical material and a biological substance. This method comprises bringing particles having a material to be evaluated at least on the surface thereof into contact with a biological substance to thereby form composite particles, bonding the biological substance directly or indirectly to a fluorescent label, and then measuring the fluorescent strength of the bounded matter with a flow cytometer to thereby analyze the interaction between the material and the biological substance. Based on the extent of this interaction, it can be judged whether or not the material is usable as a medical material for artificial vessels and so on.

(57) 要約:

本発明は、医療用材料と生体関連物質との相互作用の分析方法の提供するものである。評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子と、生体関連物質を接触させて複合化粒子を作成し、生体関連物質を直接、あるいは間接的に蛍光標識物質を結合させることで、結合体の蛍光強度をフローサイトメーターによって測定することによって材料と生体関連物質との相互作用を分析する方法である。この相互作用の程度に基づいてその材料を人工血管等の医療用材料として用いることの適否を判断することができる。



WO 03/019155 A1



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。

明細書

材料と生体関連物質との相互作用の分析方法

技術分野

本発明は、合成高分子等の材料と、血漿タンパク等の生体関連物質との相互作用を分析する方法および該方法を用いて選択された医療用材料に関する。

本発明の分析方法は血液透析器、輸血用白血球除去フィルター、人工血管等の各種医療用具に最適な材料を選択する際に用いられる。本発明の医療用材料は血液透析器、輸血用白血球除去フィルター、人工血管等の各種医療用具の製造に用いることができる。

従来技術

血液透析器、輸血用白血球除去フィルター、人工血管等の各種医療用具は、いわゆる生体適合性材料から構成されている。この生体適合性材料に要求される性質は、各々によって異なり、たとえば、血液透析器の主体部分である中空糸は血液中の血漿タンパクや細胞（白血球、赤血球、血小板）を吸着しない材料を用いるのが好ましく、血小板製剤用白血球除去フィルターの主体部分であるフィルター材では白血球は吸着し、血小板は吸着しない材料が望まれる。昨今、これらのそれぞれの材料に要求される性質はより高度になり、新たな材料の研究開発が盛んに行われている。ところで、材料を設計、試作した場合（通常、一種類ではなく多数同時に設計、試作する）、その性質をまず、シンプルな *in vitro* の系で評価し、次のステップ（例えば、材料を実際に使用される形状に成型し、器具として組み立てて、より実使用条件に近い形でのステップ）に進む選抜（スクリーニング）のための評価を行う。このシンプルな *in vitro* の系で評価は当該材料を平板にコーティングして、例えば、血漿タンパクや血小板などの吸着を評価することが通常であった。ところがこの方法では吸着させる表面積が小さいこと、吸着反応系に3次元的なずり応力（剪断応力）等のストレス付加を掛けにくいという問題があった。Ishihara ら (Polymer Chemistry 34, 188 - 205, 1996) は当

該材料を粒子状にしてフィブリノーゲン吸着量の分析を、230 nm の UV 吸収の減少を見ることで、間接的に行っている。このように、材料を粒子にすることで、平板を用いるよりも吸着表面積を大きくすることができる。しかしながら、蛋白質の濃度変化による間接的な測定は単一の指標でしか評価できず、同時にしかも多種類の材料を、多項目の指標で評価するのは困難であった。

ところで、1970 年代に欧米で相次いで開発され発展をとげた「フローサイトメーター」は、現在、生物学、免疫学等の基礎科学分野のみならず、白血病の診断等、臨床検査分野においても必須の分析装置となっている。フローサイトメーターとは細胞（あるいは染色体などの細胞成分）を浮遊液の状態にして、流体系の中を高速で通過させ、途中に設置された検出部を通して得られる光学的あるいは電気的信号により、各細胞の物理的・生物学的特徴を解明して行く装置の総称である（高本滋、医学書院刊「応用サイトメトリー」、20 頁）。

前述のように、フローサイトメーターは細胞（あるいは細胞成分）の解析には極めて幅広く活用されているが、フローサイトメーターに、細胞の代わりに材料を流し、該材料の評価に用いることは当業者では到底想定し得ない全く異なる技術思想である。特開平 11-83724 号公報には細胞を模した、特定粒子径、特定単分散度の合成高分子製球状粒子をフローサイトメーターに流すことが開示されているが、この目的はフローサイトメーターの校正用に合成高分子製球状粒子を用いるというものであり、生体適合性材料のスクリーニングに用いる本発明とは全く異なるものである。また、WO 99/64867 号公報では医薬品に用いる生理活性物質の選択におけるフローサイトメーターの使用が開示されているが、医薬品等の低分子生理活性物質と本発明が目的としている医療用材料とはその機能、性質、構造も全く異なるものである。

発明の開示

本発明の目的は、多様な環境下で材料の使用を想定し、同時に多種類の材料を多種類の指標でその材料と生体関連物質との相互作用を簡便かつ迅速に分析することのできる方法を提供することにある。

本発明者らは、かかる課題を解決すべく鋭意検討を進めた結果、材料評価とは

全く異分野で用いられている前述のフローサイトメーターを利用することによって本発明の課題と解決する糸口を見出した。すなわち、予め評価対象材料を細胞と同様な球状粒子にして、同粒子を評価対象物質である生体関連物質に接触させれば、細胞の代わりに同球状粒子をフローサイトメーターに流すことで、細胞と同様な各種の評価ができるのではないかという仮説を立て、これを実証することで本発明を完成させた。

本発明はフローサイトメーターを用いる、材料と生体関連物質との相互作用の分析方法に関する。また本発明はこの分析方法を用いて選択された医療用材料に関する。

すなわち、本発明は、評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子と生体関連物質との相互作用をフローサイトメーターを用いて分析して材料と生体関連物質との相互作用を分析する方法に関する。

さらに具体的には、評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子と生体関連物質との相互作用とは、両者を接触させることによる反応のことで、その結果、調製される生体関連物質複合化粒子を分析する方法である。生体関連物質複合化粒子の分析は、生体関連物質に直接あるいは間接的に蛍光標識することで可能となる。

本発明における評価に供する材料には、医薬品を除く医療用材料がある。

また、本発明は前記の分析方法を用いて選択された医療用材料に関する。

さらに、本発明は、評価に供する複数の医療用材料から、生体関連物質と該材料との相互作用が予め定められた基準を満たすものを選択して得られた医療用材料に関する。

評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子は、基材からなる粒子の表面に高分子材料を物理吸着により被覆することにより製造することができる。このようにして作製された高分子被覆粒子の表面特性は、X線光電子分光法により表面の元素組成比が高分子材料の元素組成比と実質的に一致するか、または、飛行時間型二次イオン質量分析法により基材粒子元素由来の質量ピーク強度が高分子材料由来のそれと比べて 10%以下になることで、これらの場合には、粒子表面が該材料の特性を均質に有していると判断される。該粒子は分散媒体中で分散す

ることができるものである。該粒子の基材粒子の粒径は $0.1\mu\text{m}$ 以上 $100\mu\text{m}$ 以下で真球度が 0.50 以上であり、被覆される高分子材料の平均分子量は 1000 以上 300 万以下である。また、該粒子の製造工程には、基材からなる粒子を、高分子材料を溶媒に溶解させた溶液に懸濁させて物理的振動を与え、さらに粒子を高分子材料及び基材粒子に対して貧溶媒である洗浄液を用いて洗浄し、真空乾燥あるいは凍結乾燥させる工程を含む。

あるいは、評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子は、官能基変換が可能な側鎖をもつ高分子を少なくとも表面に有する合成高分子構造体基材粒子に、官能基を有する化合物の官能基と該側鎖とを結合させて製造することができる。具体的には、官能基変換が可能な側鎖をもつアクリル系もしくはメタクリル系高分子を少なくとも表面に有する合成高分子構造体基材粒子に、官能基を有する化合物の官能基と該側鎖とを結合させることで製造できる。

図面の簡単な説明

図 1 は、比較例 1 の粒子表面を飛行時間型二次イオン質量分析法により測定し、全イオン像（左側）に対するスチレン由来の質量ピークの分布状態を示す。

図 2 は、実施例 1 の粒子表面を飛行時間型二次イオン質量分析法により測定し、全イオン像（左側）に対するスチレン由来の質量ピークの分布状態を示す。

図 3 は、比較例 1 の全イオン像（左側）に対する HEMA 由来の質量ピークの分布状態を示す。

図 4 は、実施例 1 の全イオン像（左側）に対する HEMA 由来の質量ピークの分布状態を示す。

図 5 は、比較例 1 の分散性をフローサイトメーターの前方散乱光（FSC Height）で解析した結果のヒストグラムを示す。M1 派単分散粒子のリージョンを示す。

図 6 は、実施例 1 の分散性をフローサイトメーターの前方散乱光（FSC Height）で解析した結果のヒストグラムを示す。M1 は単分散粒子のリージョンを示す。

図 7 は、実施例 1 の材料粒子のフローサイトメーター解析図を示し、上端図はネガティブコントロールを示す。(a) ～ (d) は、各材料の共重合体の DM 重量%がそれぞれ 0, 3, 6, 10% の場合を示す。縦軸は Alexa Fluor 647 の蛍光

強度によるフィブリノーゲン吸着の相対値、横軸は FITC の蛍光強度による IgG 吸着の相対値を示す。

図 8 は、比較例 2 の粒子とフィブリノーゲンの吸着を示すヒストグラムを示す。フィブリノーゲン吸着を間接的に FITC 標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体で検出した結果で、FITC の蛍光強度を示す。図中のリージョン (M1) は、ネガティブコントロールに対するポジティブの領域を示している。

図 9 は、実施例 2 の粒子とフィブリノーゲンの吸着を示すヒストグラムを示す。フィブリノーゲン吸着を間接的に FITC 標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体で検出した結果で、FITC の蛍光強度を示す。図中のリージョン (M1) は、ネガティブコントロールに対するポジティブの領域を示している。

図 10 は、比較例 2 のフィブリノーゲンおよびアルブミンの結合状態を示すフローサイトメーターのドット・プロットを示す。縦軸は、PE の蛍光強度を示し、粒子に吸着したアルブミンに、ビオチン標識ヤギ抗ヒトアルブミン抗体を結合させ、さらに PE 標識アビジンを結合させることにより、間接的に検出している。横軸は、FITC の蛍光強度で示し、粒子に吸着したフィブリノーゲンに、FITC 標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体を結合させることにより間接的に検出している。図中の線はネガティブコントロールに対するポジティブ領域を示す。

図 11 は、実施例 2 のフィブリノーゲンおよびアルブミンの結合状態を示すフローサイトメーターのドット・プロットを示す。縦軸は、PE の蛍光強度を示し、粒子に吸着したアルブミンに、ビオチン標識ヤギ抗ヒトアルブミン抗体を結合させ、さらに PE 標識アビジンを結合させることにより、間接的に検出している。横軸は、FITC の蛍光強度で示し、粒子に吸着したフィブリノーゲンに、FITC 標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体を結合させることにより間接的に検出している。図中の線はネガティブコントロールに対するポジティブ領域を示す。

図 12 は、実施例 3 の血小板吸着フローサイトメーター解析図を示す。縦軸は、PerCP の蛍光強度を示し、PerCP 標識 CD61 の結合を検出している。横軸は、FITC の蛍光強度で示し、FITC 標識 PAC-1 抗体の結合を検出している。左上図はネガティブコントロールを示す。(a) ~ (e) は、HEMA および DM、あるいはメチルメタクリレートを様々な重量%で重合したポリマー粒子の結果の一部を示す。図

中のゲートは、単分散した材料粒子の中で、血小板を吸着しているものを示し、図中の数字は、その割合を示す。

図13は、実施例4のフィブリノーゲンおよびIgGの結合状態を示すフローサイトメーター解析図を示す。縦軸は、PEの蛍光強度を示し、粒子に吸着したIgGに、ビオチン標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を結合させ、さらにPE標識アビジンを結合させることにより、間接的に検出している。横軸は、FITCの蛍光強度を示し、粒子に吸着したフィブリノーゲンに、FITC標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体を結合させることにより間接的に検出している。左上図はネガティブコントロールを示す。(a)～(c)は、実施例3で調製した粒子を実施例4に供した結果の一部を示す。図中の線はネガティブコントロールに対するポジティブ領域を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明でいうフローサイトメーターとは細胞を浮遊液の状態にして、流体系の中を高速で通過させ、途中に設置された検出部を通して得られる光学的あるいは電気的信号により、各細胞の物理学的・生物学的特徴を解析する装置のことで、Becton Dickinson (BD) 社がFACS、COULTER社がEPICSの商品名で販売している。

本発明でいう材料とは、合成高分子化合物、天然高分子化合物、無機化合物、金属を問わず、何らかの目的により生体関連物質との相互作用の評価に供するもののことをいう。合成高分子化合物としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスルホン、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリメトキシエチルアクリレート、メタクリロイルホスフォリルコリンを含む共重合ポリマー等やこれらの誘導体があげられ、天然高分子化合物としては、セルロース（その誘導体を含む）、キチン、キトサン、アルギン酸塩等があげられ、いずれもこれらに限定されるものではない。また、無機化合物としては、チタニア、アルミナ、シリカ、窒化ケイ素などのセラミックス、ヒドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムの種々の組成のガラスなどがあげられ、金属としてはステンレス、チタンなどがあげられるが、いずれもこれ

らに限定されるものではない。また、低分子有機化合物を金属や無機材料の表面修飾として用いた材料も、本発明の評価対象となる。

このような材料としては血液透析器、輸血用白血球除去フィルター、人工血管等の多種医療用具に用いられる材料が例示される。

本発明でいう生体関連物質とは、前記材料との相互作用を評価する際の対象となる物質で、たとえばアルブミン、フィブリノーゲン、グロブリンなどの血漿タンパク、インターロイキン、インターフェロンなどのサイトカイン、インスリン、HGF、VEGF などの成長因子、ラミニン、コラーゲンなどの細胞外マトリックス、血小板、白血球などの各種細胞のことをいい、目的に応じ適宜選択する。すなわち、例えば白血球除去フィルターの材料のスクリーニングに用いる場合は、血漿タンパク、血液細胞などが、また再生医療用細胞培養基材のスクリーニングに用いる場合は、各種生理活性物質が生体関連物質として用いられるというように目的に応じて適宜選択される。

本発明でいう相互作用とは材料のスクリーニングの際の指標となるもので、主に、生体関連物質の材料への吸着のことをいい、したがってその分析は吸着量（率）を測定することが主になるが、単なる吸着量（率）だけでなく吸着による生体関連物質の構造および／または機能変化の分析なども含まれる。

本発明の分析方法では、評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子に、該材料との相互作用を評価する生体関連物質を接触させて生体関連物質複合化粒子を調製する。

該生体関連物質複合化粒子をフローサイトメーターで分析するために、生体関連物質を直接あるいは間接的に蛍光標識する。生体関連物質自体の蛍光標識とは、生体関連物質に直接、蛍光色素を化学結合させることで、たとえば、もっとも一般的な蛍光色素の一つである Fluorescein isothiocyanate (FITC) や、スクシニミジル エステルの部位を有する Oregon Green 488 (Molecular Probes, 米国) や Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, 米国) 等、蛋白質のアミンと蛋白質 1 分子当たり 1～数個の比率で結合することで為し得る。間接的な蛍光標識の場合は、特異的に親和性を有する物質を介して生体関連物質を蛍光標識させることで、該親和性物質には抗体やレクチンがある。これらの物質は、予め蛍光標識

されたものや、ビオチン標識あるいは未標識のものを用いることができる。ビオチン標識あるいは未標識の該親和性物質は、本発明の生体関連物質複合化粒子との反応の後に、さらに二次的に蛍光標識することになる。

評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子は、粒子全体が評価に供する材料からなっているか、あるいは表面だけが評価に供する材料かのいずれかで、評価に供する材料で粒子を作製するか、または、芯になる粒子（評価に供する材料と同一であっても、異なってもよい。）にコーティング、グラフト重合などにより表面に評価に供する材料を存在させる。

本発明の評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子は、基材からなる粒子の表面に高分子材料を物理吸着により被覆することにより製造することができる。

本発明でいう基材粒子には、いかなる構成成分からも選択することができる。具体的にはポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート等の合成高分子及びこれらの共重合体、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ヒドロキシアパタイト、シリカ、アルミナ、チタニア、ガラス等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属があげられる。

本発明の基材粒子の真球度は 0.50 以上であることが好ましい。真球度とは（真球度）＝（粒子の短径）／（粒子の長径）で表され、特に好ましくは真球度 0.80 以上である。高分子微粒子の真球度が 0.50 未満の場合、粒子が不定形になり、粒子表面のエネルギー分布が場所により異なる結果、高分子材料を均質に被覆することができなくなるおそれがある。

本発明の基材粒子の粒径は、 $0.1\mu\text{m}$ 以上 $100\mu\text{m}$ 以下が好ましく、より好ましくは $1\mu\text{m}$ 以上 $50\mu\text{m}$ 以下である。

本発明でいう高分子材料とは、平均分子量が 1000 以上 300 万以下で、水やエタノールを始めとする広範な種類の有機溶媒のいずれかに溶解する高分子のことである。分子量が 1000 未満の場合、被覆高分子材料の吸着安定性が低下するため、基材粒子から脱着するおそれがあり 300 万を超えると高分子溶液の粘度が高

くなるため、高分子溶液中に添加した時の基材粒子の分散あるいは高分子材料の特性を均質に有する粒子表面の調製が困難になるおそれがありいずれも好ましくない。

本発明でいう物理吸着とは、基材表面と高分子材料間に電子の授受や共有による化学結合以外の結合や相互作用が働くことにより生じる吸着のことをいい、具体的には疎水結合や水素結合、双極子相互作用、ロンドン分散力、静電的相互作用、ファンデルワールス力、電荷移動相互作用などのエネルギー的な結合や相互作用が挙げられる。

以下に、本発明で基材粒子の表面に高分子材料を均質に物理吸着させるための高分子被覆粒子の製造方法を詳細に説明する。

高分子材料の溶液濃度は溶媒中で高分子鎖同士が接触しない濃度、具体的には高分子濃度が 0.001 重量%以上 20 重量%以下、好ましくは 0.01 重量%以上 10 重量%以下になるように調製する。溶媒の種類は、基材粒子を溶解させず、高分子材料のみを溶解させるものでなければならない。すなわち、基材粒子にとっては貧溶媒、被覆に用いる高分子材料にとっては良溶媒の性質を有している必要がある。例えばポリスチレン製の基材粒子の場合、貧溶媒は水やアルコール類、エーテル類、炭化水素類等で、ポリヒドロキシメチルメタクリレートのような高分子材料にとって良溶媒はアルコール類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド等であるため、高分子溶液にはアルコール類を選択することが好ましい。すなわち、基材粒子と高分子材料の溶解性に対応する溶媒であればいずれの有機溶媒でも用いることができる。このように調製した高分子溶液中に基材粒子を懸濁させ、物理的振動を与えることで基材粒子へ高分子の物理的吸着は成し遂げられる。物理的振動とは例えば、超音波照射による方法、スターラー等の攪拌による方法、振とう機やローターによる方法などがあげられる。いずれの方法でも高分子溶液中で粒子を分散させる効果が期待できるが、さらに超音波照射では粒子同士の凝集をほぐして分散させる効果が、スターラーや振とう機、ローター等では高分子溶液自体を流動させる効果が期待できるため、この両者を組み合わせることもできる。

物理的振動を与える時間としては 10 秒間以上であればいかなる時間でもよく、

好ましくは1分から48時間の範囲である。10秒間以下では粒子の分散性、基材粒子と高分子溶液との混和が不十分である可能性がある。吸着反応時に加温する温度は、0℃以上200℃以下、好ましくは10℃以上150℃以下である。200℃を超えると高分子材料が分解し、溶媒が蒸発して高分子溶液濃度の制御が困難になるおそれがある。また、0℃未満では高分子材料の相分離もしくは析出が起こることが懸念される。吸着反応後に粒子を高分子溶液から分離する方法は、遠心分離法や濾過法等のいずれの方法でも可能である。

粒子懸濁液からポリマー溶液を完全に除去するための洗浄工程では、基材粒子と高分子材料の両方にとって貧溶媒としての性質を有する液体にて行う必要がある。例えばポリスチレン製の基材粒子と高分子材料のポリヒドロキシメチルメタクリレートにとっては洗浄液として蒸留水を用いることが望ましい。洗浄後の粒子は、真空乾燥あるいは凍結乾燥させることにより、高分子材料を基材粒子表面に安定させることができる。

本発明の高分子被覆粒子の表面が高分子材料の特性を均質に有していることの確認は、X線光電子分光法もしくは飛行時間型二次イオン質量分析法を用いた表面分析測定により、高分子材料に特有な元素や部分構造を検出することで成し得る。本発明でいう均質とは、当該粒子表面の全体が平均的に高分子材料の性質を示すことであり、好ましくは高分子材料が粒子表面を隈なく被覆している状態をいうがこれに限定されるものではない。

X線光電子分光法とは試料に単色化されたX線を照射して表面から放出された光電子の運動エネルギーを分析する方法であり、試料表面の深さ数十Åに存在する元素組成を定性および定量することができる。さらに各元素のスペクトルには隣接する元素の影響を受けて化学シフト、電荷移動遷移に基づくとされるサテライト、多重項結合による内殻順位の分裂等が出現することから、各元素の化学状態の情報が得られる。すなわち、X線光電子分光法で得られるスペクトルにおいて基材粒子と高分子材料に特有な元素または部分構造を比較することにより高分子材料の被覆状態を知ることができる。比較点としては、基材粒子にはある元素が含まれ、高分子材料には含まれないあるいはその反対、ある共通の部分構造の元素組成比が基材粒子と高分子材料で異なっていることを選択するのが好ましい。

当該高分子被覆粒子をX線光電子分光法により解析すると、得られるスペクトルや元素組成が高分子材料の特徴を反映していることにより当該粒子が高分子材料の特性を均質に有していることが示される。しかし、この方法で得られる元素組成は元素による検出感度の違いや使用するX線源の種類、試料から放出される光電子の放出角度（測定深さ）などに影響を受けることを考慮しなければならない。

K. B. Lewis らの報告 (J. Colloid Interface Sci., vol. 159, 77, 1993) では、スチレンとヒドロキシエチルメタクリレートとの共重合体を上記方法での光電子の放出角度すなわち分析深さについて元素組成を検討した場合、ランダム共重合体である場合はバルクと表面の組成はほぼ等しいが、ブロック共重合体である場合は表面がスチレンに富んだ組成となることが示されている。さらに光電子分光スペクトルは電子流の強度すなわち計数として扱われるため、統計的な誤差が存在する。また、当該粒子は粉体状であるため板状試料に比べて信号強度が弱くなったり、構成成分が絶縁物である場合は一般的に正の帯電を生じて光電子の検出に影響を与える等の可能性がある。すなわち当該粒子表面をX線光電子分光法で解析することにより高分子材料の元素組成比と実質的に一致するということは、高分子材料の構成分子による理論的な元素組成とは必ずしも一致しないことがあることを考慮した上で、高分子材料と当該粒子の元素組成を比較した場合にほぼ一致するということである。

好ましくは、粒子の被覆に用いた高分子材料を同じ分析条件で測定して得られる元素組成比と当該粒子の元素組成比が 15%以下の相違となること、あるいは基材粒子にのみ特有な元素の割合が 10%以下に減少することであるが、必ずしもこれに限定されるものではない。

飛行時間型二次イオン質量分析法とは試料に一次イオンを衝突させることにより放出される試料からのイオン(二次イオン)を電場で加速、飛行時間を計測することにより多元素同時質量分析を行う方法であり、試料表面の数Åから数十Åの分析が可能で、得られる情報の約 90%以上が最表面の原子層に由来する情報であるといえる。さらに各分子に特有の質量ピークの強度分布をイメージ図として観察することにより、サブミクロン領域で材料表面の化学構造の分布状態を観察することができる。すなわち、得られる質量スペクトルにおいて基材粒子と高分

子材料に特徴的な質量ピークやその強度分布イメージ図を比較することにより、高分子被覆粒子最表面の分子分布状態を評価することが可能である。当該高分子被覆粒子を飛行型二次イオン質量分析法により解析すると、基材粒子元素由来の質量ピーク強度に比べて高分子被覆粒子の基材粒子元素の質量ピーク強度が 10%以下の検出強度の場合、基材粒子が高分子材料の特性を均質に有していることが示される。

当該高分子被覆粒子が分散媒体中で単分散することは、電気インピーダンス法、或いは光散乱法を原理とする分析装置によって測定することができ、例えばフローサイトメーターによって、80%以上が単分散していることを示すことができる。

本発明の評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子の、上記とは別の製造方法として、官能基変換が可能な側鎖をもつアクリル系もしくはメタクリル系高分子を少なくとも表面に有する合成高分子構造体基材粒子に、官能基を有する化合物の官能基と該側鎖とを結合させる方法がある。

本発明でいう官能基変換が可能な側鎖とは、種々の分子と反応させることにより多様に官能基を変換できる側鎖のことをいう。具体的にはカルボキシ基やアミノ基の他に、ヒドロキシル、アンモニウム、ケトン、カルボキシラートイオン、ニトロ、チオール、アルデヒド、ニトリル、イソシアネート、エポキシ等のヘテロ環化合物等、反応性官能基からなる側鎖のことである。

これら官能基変換が可能な側鎖を有する高分子として、側鎖の官能基が変換可能な単一高分子、あるいは分子中に少なくとも側鎖の官能基が変換可能な構成単位を少なくとも 1 種類含む共重合体高分子を使用することができる。

具体的には、例えばポリアクリル酸およびポリメタクリル酸、アクリル酸の塩、メタクリル酸の塩、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、アクリルアミド類、メタクリルアミド類、ポリ塩化ビニル、ポリアクリロニトリル、スチレン系ポリマー、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルピリジン、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキサイド、親水性ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、デキストラン、キサンタン、ヒドロキシプロピルセルロース、N-ビニルピロリドン、N-ビニルラクタム、N-ビニルブチロラクタム、N-ビニルカプロラクタム、極性ペンダント基を有する他のビニル化合物、

エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、硝酸セルロース、酢酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸プロピオン酸セルロース、天然または合成エラストマー、ゴム、アセタール、ナイロン、ポリエステル、スチレンポリブタジエン、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニルアセテート、ポリ塩化ビニリデン、ポリカーボネート、ビニル化合物等の単一高分子またはこれらの組み合わせからなる共重合体である。

官能基変換が可能な側鎖がカルボキシル基の場合はエステルやアミド、ハロゲン化アルカノイルや酸無水物、アルデヒドやアルコール、ケトン、イミドやラクタム等に、アミノ基の場合はアミド、イミンやエナミン、ニトロ基等に変換することで、機能性材料の候補材料を合成高分子複合体として調製することができる。

本発明でいう合成高分子構造体とは常温の水溶液中で固体状態にあるものを言い、高分子で被覆される土台となる材質は有機または無機のいずれであってもよい。具体的には例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、テトラフルオロエチレン、ポリスチレン、アクリル系樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン、ポリビニルアセテート、ポリビニルアセタール、ゴム、ラテックスゴム、シリコーン等の合成高分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ヒドロキシアパタイト、シリカ、アルミナ、チタニア、ガラス、マイカ、カーボンブラック等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属があげられる。この担体の形状はいずれの形状にあってもよく、具体的には例えば球状、粒子状、粉体状、チップ状、繊維状、平膜状、フィルム状、不織布状等があげられる。

官能基変換が可能な側鎖を有する高分子を合成高分子構造体表面に被覆させる方法としては、構造体となる高分子の重合中に目的とする候補材料のモノマーを添加して被覆層を作製する方法、物理吸着により吸着させる方法、化学的あるいは放射線やガンマ線、電子線を用いてのグラフト法等がある。

評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子の形状は球状、それも粒子径がなるべく揃ったものが好ましく、粒子径としては好ましくは $2\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ 、より好ましくは $5\mu\text{m}$ ～ $50\mu\text{m}$ である。粒子径が $100\mu\text{m}$ より大きいとフローサイ

トメーターの流路を詰まらせる可能性があるので好ましくない。

本発明の分析方法では、前記粒子を相互作用を評価する生体関連物質を接触させて生体関連物質複合化粒子を調製するが、その接触方法は材料の用途を想定した様々な方法が可能である。例えば体外循環型医療機器や人工血管を想定した材料では、生体関連物質の溶液中、材料粒子をある流速で攪拌し、ずり応力（剪断応力）を付加させた条件下で接触反応を実施することができる。また、白血球除去フィルター等の分離膜を想定した材料では、材料粒子を充填したカラムに、生体関連物質の溶液を濾過により接触反応させる方法が考えられる。

実施例

以下に、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

実施例 1

評価に供する材料粒子の調製

ポリヒドロキシエチルメタクリレート（pHEMA）およびヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）とジメチルアミノメチルメタクリレート（DM）の様々な重量％で重合したポリマーを、40℃に加温したエタノール中に溶解させることにより、2重量％の高分子溶液を調製した。その高分子溶液 1 ml 中に直径 10 μ m のポリスチレン粒子（PolybeadTM Polystyrene Microspheres, Poly Science 社、米国）10 mg を分散させることにより、粒子濃度が 1 重量％の懸濁液を調製した。この粒子懸濁液に、40℃にて超音波を 5 分間照射した。その後、粒子懸濁液の入った容器をローテーター（小型回転培養機 RT 5、TAITEC、日本）に取り付けて、毎分 3.4 m の速度で回転させたまま恒温装置内で 40℃に加温し、55 分間反応させた。反応後は遠心分離にて粒子を分離し、得られた粒子を水にて洗浄した後、凍結乾燥させることにより pHEMA あるいは HEMA と DM の共重合ポリマーで被覆された粒子を得た。

これら粒子表面を X 線光電子分光装置（ESCA 5400, Perkin Elmer, Inc., 米国）にて pHEMA で被覆された実施例 1 の粒子及び比較例 1 として基材粒子であるポリスチレン粒子を分析したところ、表 1 に示すように比較例 1 の粒子は約 9

9%が炭素で構成されているのに対し、実施例1の粒子はポリヒドロキシエチルメタクリレートを構成する炭素原子及び酸素原子の元素組成比に近い値を示すことが確認され、HEMAとDMの共重合ポリマーにおいても同様だった。なお、表1の表面元素組成であるC%、O%は、構成元素を100%とした時に炭素、酸素原子の存在する割合である。また、参考としてHEMAの構造式から求めた炭素、酸素の組成割合を示した。

さらに、飛行時間型二次イオン質量分析装置 (TRIFT II, Physical Electronics, Inc., 米国) にて最表面の分子分布状態を観察した。ここで、図1から4は、各左側が上記装置にて検出された全イオンの分布図、右側がスチレンあるいはHEMA由来のイオンの質量ピークを選択して描かせた強度分布イメージ図となる。図1で検出した基材粒子成分のスチレン由来のイオンによる質量ピークは図2ではほとんど検出されず、図3の比較例1の基材粒子には検出されなかったHEMA由来のイオンによる質量ピークは図4に示すように実施例1の粒子では検出され、当該粒子表面全体に分布していることが確認された。さらに表2に示すように、基材粒子成分であるスチレン由来のイオンによる質量ピークの検出強度は質量ピーク番号48及び49において、いずれも5%以下であったことが確認された。HEMAとDMの共重合ポリマーにおいては、HEMA由来の質量ピーク以外に、DM由来のものも確認された。

表 1

試料		表面元素組成	
		C %	O %
比較例 1	ポリスチレン粒子	98.5	1.3
実施例 1	ポリスチレン粒子 +pHEMA 被覆	67.5	32.2
参考	HEMA 組成	66.7	33.3

表 2

試料		比較例 1	実施例 1
		ポリスチレン粒子	pHEMA 被覆粒子
質量ピーク強度	48	2994	82
	49	3463	178
全イオン数		695190	1195959
質量ピーク強度 /全イオン数	48	4307	69
	49	4981	148
比較例 1 由来	48	—	1.6
元素存在率 (%)	49	—	3.0

ポリスチレン粒子由来の質量ピークは質量番号 48 および 49 に強く見られた。

また、比較例 1 及び実施例 1 の粒子の分散性を、乾燥後の粒子をそれぞれ水に再分散させ、これらの懸濁液をフローサイトメーター (FACSCalibur, Becton Dickinson, 米国) を用いて調べたところ、これらの懸濁液の前方散乱光のヒストグラムは、比較例 1 と実施例 1 をそれぞれ図 5 と図 6 に示すように、ほとんど同等に単分散していることが確認できた。

生体関連物質の蛍光標識

ヒトイムノグロブリン G (IgG; SI; GMA, 米国) を Phosphate Buffered Saline (PBS) にて 10 mg/ml に調製し、この 0.2 ml と、1M NaHCO₃ を 20 μ l、Dimethyl sulfoxide に溶解した 10 mg/ml FITC (FITC-1; Molecular Probes, 米国) 27 μ l を混合し、遮光してスターラーを回転させながら室温にて 1 時間反応させた。その後、未反応の FITC をレジンに吸着させることで除去処理を行った後に、標識された蛋白量と FITC のそれぞれの吸収が 280 nm と 494 nm であることから最終産物の各吸光度を測定し、IgG1 分子につき約 7 個の FITC が結合したことを確認した。また、ヒトフィブリノーゲン (American Diagnostica, 米国) は Alexa Fluor 647 の Protein Labeling Kit (Molecular Probes, 米国) を用いて蛍光標識を行い、この蛍光色素の吸収が 650 nm であることから同様に調べた結果、フィブリノーゲン 1 分子につき約 8 個の同色素の結合が確認できた。

材料粒子と生体関連物質の接触反応およびフローサイトメーター測定

各種ポリマーを表面に有した粒子は、1%ヤギ血清（ICN Pharmaceuticals, 米国）存在下、蛍光標識 IgG およびフィブリノーゲンがそれぞれ 0.2 mg/ml 混在する溶液中にて懸濁して接触反応を行った。フローサイトメーターは FACSCaliber（BD, 米国）を用い、データ収集解析ソフトウェアは CELLQuest（BD, 米国）を用いた。前方および側方散乱光検出系と蛍光検出系のネガティブコントロールの感度設定には蛍光未標識の生体関連物質複合化材料粒子を用い、コンペンセーションの調整には蛍光標準粒子の CaliBRITE Beads（BD, 米国）を用いて電圧とアンプゲインの調整を行った。フローサイトメーター測定に供する粒子は、凝集塊を除く目的で孔径 100 μ m のナイロン・メッシュに通した後に測定を行った。

フローサイトメーターによる分析

図 7 の上端図（Negative control）は IgG およびフィブリノーゲンと接触反応させなかったポリマー粒子のネガティブコントロールで、それから次第に（（a）から（b）になるほど）HEMA と DM の共重合ポリマーの DM 重量%が増加した、フローサイトメーター解析図である。DM 重量%は、それぞれ、0、3、6、10%で用いられる。各材料間で、フィブリノーゲンと IgG の吸着状態に差が見られることが示された。

実施例 2

材料粒子の調製

実施例 1 と同様の方法で HEMA および DM のとも重合ポリマー粒子を調製し、いずれも十分に被覆されていることが確認された。なお、ポリマーを含まない溶媒のみで同処理を施した粒子を未コーティング粒子として比較例 2 とした。

材料粒子と生体関連物質の接触反応

ヒトフィブリノーゲン（American Diagnostica, 米国）0.2 mg/ml とヒトアルブミン（化血研, 日本国）20 mg/ml の 2 種類の混合タンパク質溶液中に材料粒子を添加し、室温にて 3.4 m/分の速度でローテーター（TAITEC, 日本）にて振とう混和し、接触反応を行った。

生体関連物質複合化粒子の調製

材料粒子と生体関連物質の接触反応後、未反応の生体関連物質を除去するために 12000 rpm, 5 分間の遠心を行い、次いで蒸留水を加え同遠心で材料粒子を洗

浄し、生体関連物質複合化粒子を得た。

生体関連物質複合化粒子の蛍光標識

生体関連物質複合化粒子に、FITC 標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体 (ICN Pharmaceuticals, 米国) とビオチン標識ヤギ抗ヒトアルブミン抗体 (AMERICAN QUALEX Antibodies, 米国) を 4℃にて 20 分間、抗原抗体反応させ、次いで Phycocerythrin 標識アビジン (BD, 米国) にてビオチン・アビジン反応させることで、2 種類の蛍光色素を標識したフィブリノーゲン及びアルブミン複合化材料粒子が生成された。

フローサイトメーターによる分析

実施例 1 と同様に設定したフローサイトメーターにて、材料粒子とフィブリノーゲン及びアルブミンの吸着を測定した。図 8 と図 9 は、フィブリノーゲンを吸着した粒子のヒストグラムで、フィブリノーゲンを間接的に標識した FITC の蛍光強度で示される。図 8 の比較例 2 に比べると、図 9 の実施例 2 はフィブリノーゲンを吸着させにくい粒子表面といえる。

図 10 と図 11 は、比較例 2 と実施例 2 のそれぞれのフィブリノーゲンとアルブミンの 2 種類の結合状態を 2 次元プロットを示し、このように、2 項目を同時解析することができる。

実施例 3

評価に供する材料粒子の調製

実施例 1 と同様の方法で HEMA および DM, あるいはメチルメタクリレートを様々な重量%で重合したポリマー粒子を調製し、いずれも十分に被覆されていることが確認された。

材料粒子と生体関連物質の接触反応およびフローサイトメーター測定

実施例 3 では、生体関連物質として末梢血全血を材料粒子の分析に供した。

健康人から採取した末梢血は PBS にて 10 分の 1 に希釈し、材料粒子を懸濁させることで、接触反応を行った。なお、末梢血全血を一部取り、ポリエチレンテレフタレート不織布フィルターに通すことにより、血小板を 99%以上除去した血液を調製し、これをネガティブコントロールとして以下同様の操作を行った。次に血小板マーカー抗体として Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) 標

識 CD61 (BD, 米国) と、活性化血小板マーカーである FITC 標識 PAC - 1 抗体 (BD, 米国) を材料粒子懸濁液に添加し、実施例 1 と同様に設定したフローサイトメーターにて、材料粒子と血小板の吸着を測定した。

フローサイトメーターによる分析

図 1 2 の左上図は血小板除去血液を用いた結果で、図 1 2 (a) ~ (e) は、それぞれ組成物や組成比の異なるポリマー材料粒子のフローサイトメーター解析図の一部を示す。各材料間で、血小板の吸着特性を比較分析できた。

実施例 4

実施例 3 で調製した材料粒子を、未標識の IgG およびフィブリノーゲンと接触反応させ、間接的な蛍光標識を行うことで材料間の比較を行った。

生体関連物質複合化粒子の蛍光標識

材料粒子と生体関連物質の接触反応は、実施例 1 で用いた IgG およびフィブリノーゲンの蛍光標識前のものを生体関連物質とし、実施例 2 と同様に材料粒子との接触反応を行った。反応後、未反応の生体関連物質を除去するために 12000 rpm, 5 分間の遠心を行い、次いで蒸留水を加え同遠心で材料粒子を洗浄して生体関連物質複合化粒子を得た。この粒子浮遊液 100 μ l に対し、FITC 標識ヤギ抗ヒトフィブリノーゲン抗体 (ICN Pharmaceuticals, 米国) とビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals, 米国) を添加し、4℃にて 20 分間、抗原抗体反応させ、洗浄後、次いで Phycoerythrin (PE) 標識アビジン (BD, 米国) にてビオチン・アビジン反応させ、未反応のアビジン除去のための洗浄工程後、フローサイトメーターによる分析を行った。

フローサイトメーターによる分析

図 1 3 の左上図は IgG およびフィブリノーゲンと接触反応させずに、抗体のみを添加し、以降の操作を同様に行った結果で、図 1 3 (a) ~ (c) は、それぞれ組成物や組成比の異なるポリマー材料粒子のフローサイトメーター解析図の一部を示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、簡便かつ迅速に、多様な接触反応条件下で、同時に多種類の

材料を多種類の指標で評価することができるので、医療用材料開発における材料選定に役立てることができ、医療機器産業の発展に貢献すること大である。

請 求 の 範 囲

1. 評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子と生体関連物質との相互作用をフローサイトメーターを用いて分析することを特徴とする材料と生体関連物質との相互作用の分析方法。
2. 評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子と生体関連物質を接触させて生体関連物質複合化粒子を調製し、該生体関連物質複合化粒子をフローサイトメーターを用いて分析することを特徴とする請求項 1 に記載の分析方法。
3. 生体関連物質に直接あるいは間接的に蛍光標識することで生体関連物質複合化粒子をフローサイトメーターを用いて分析することを特徴とする請求項 2 に記載の分析方法。
4. 評価に供する材料が医療用材料である請求項 1 から 3 に記載の分析方法。
5. 請求項 4 の分析方法を用いて選択されたものであることを特徴とする医療用材料。
6. 複数の評価に供する医療用材料から、請求項 4 の分析方法を用い、生体関連物質と該材料との相互作用が予め定められた基準を満たすことで選択されたものであることを特徴とする医療用材料。
7. 評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子として、基材からなる粒子の表面に高分子材料を物理吸着により被覆した高分子被覆粒子を用いることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の分析方法。
8. 高分子被覆粒子の表面の特性が、次の条件の少なくともいずれかである請求項 7 に記載の分析方法。
 - 1) X線光電子分光法により表面の元素組成比が高分子材料の元素組成比と実質的に一致する。
 - 2) 飛行時間型二次イオン質量分析法により基材粒子元素由来の質量ピーク強度が高分子材料由来のそれと比べて 10%以下である。
9. 高分子被覆粒子が分散媒体中で分散することができるものである請求項 7 または 8 に記載の分析方法。

10. 高分子被覆粒子の基材粒子の粒径が $0.1\mu\text{m}$ 以上 $100\mu\text{m}$ 以下である、請求項7から9のいずれかに記載の分析方法。
11. 高分子被覆粒子の基材粒子の真球度が 0.50 以上である、請求項7から10のいずれかに記載の分析方法。
12. 高分子材料の平均分子量が 1000 以上 300 万以下である、請求項7から11のいずれかに記載の分析方法。
13. 高分子被覆粒子は、基材からなる粒子を、高分子材料を溶媒に溶解させた溶液に懸濁させ、物理的振動を与える工程を含む方法で製造されたものであることを特徴とする請求項7から12のいずれかに記載の分析方法。
14. 高分子被覆粒子は、物理的振動を与える工程を行った後、さらに粒子を高分子材料及び基材粒子に対して貧溶媒である洗浄液を用いて洗浄し、真空乾燥あるいは凍結乾燥させる工程を含む方法で製造されたものであることを特徴とする請求項13記載の分析方法。
15. 評価に供する材料を少なくとも表面に有する粒子が、官能基変換が可能な側鎖をもつ高分子を少なくとも表面に有する合成高分子構造体基材粒子に、官能基を有する化合物の官能基と該側鎖とを結合させて製造されたものであることを特徴とする請求項1から4に記載の分析方法。
16. 官能基変換が可能な側鎖を有する高分子が、アクリル系もしくはメタクリル系高分子である請求項15記載の分析方法。

図1

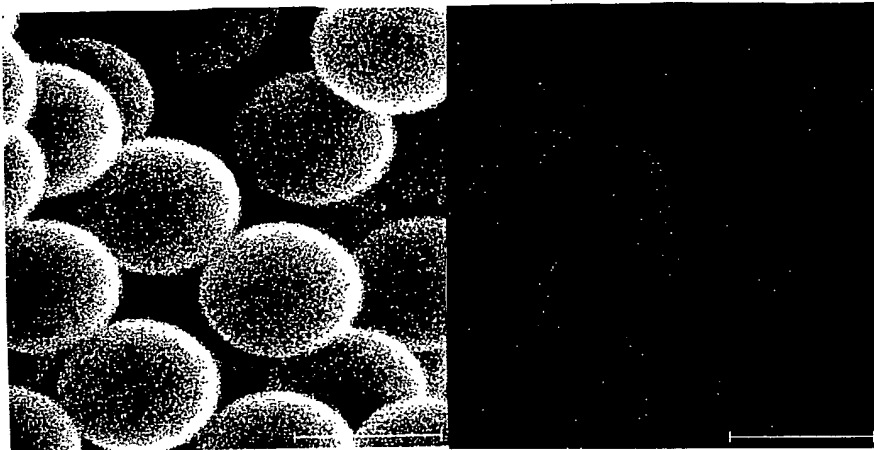


図2

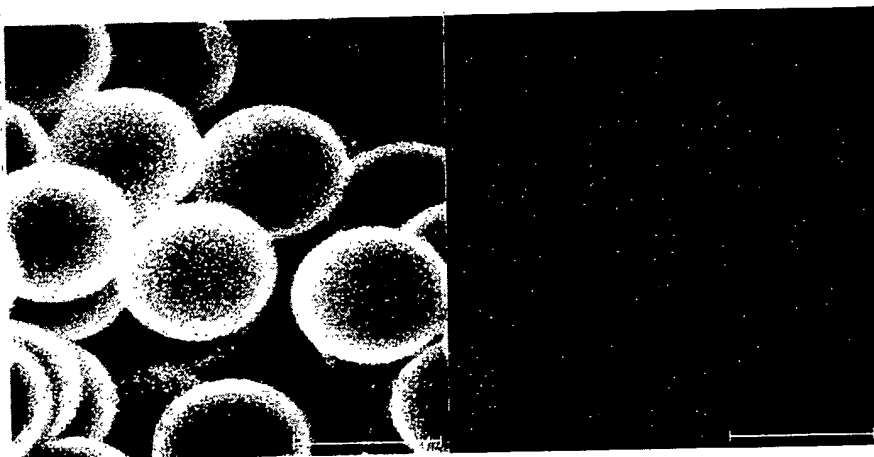


図3

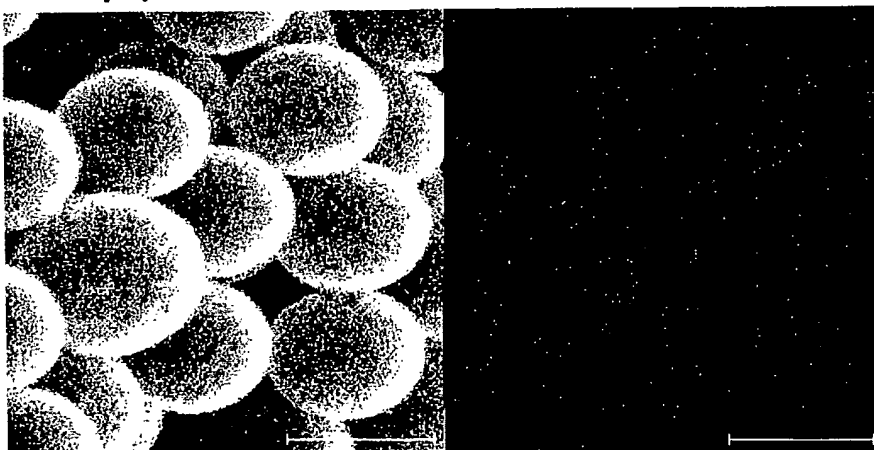


図 4

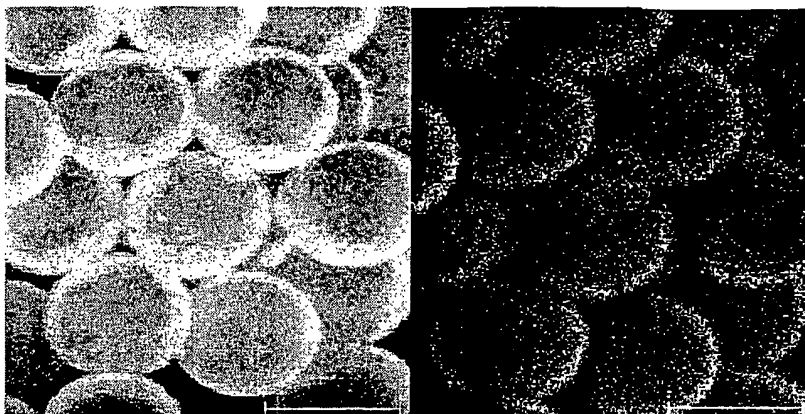


図 5

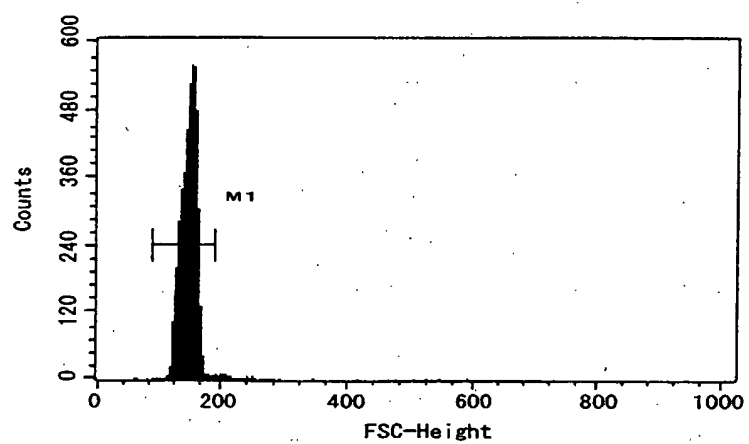


図 6

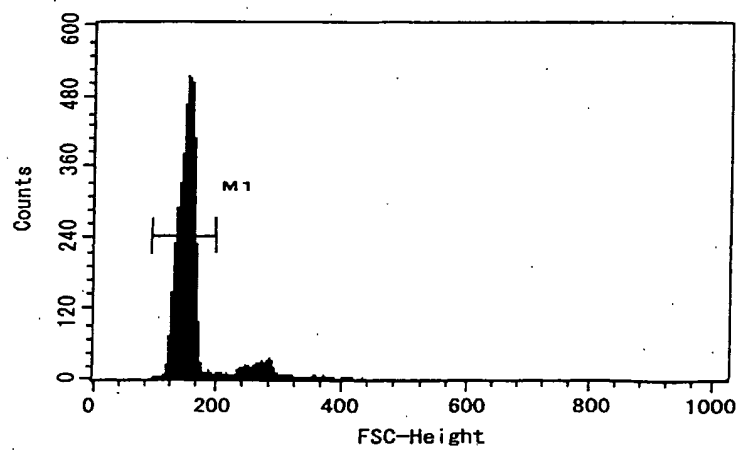


図 7

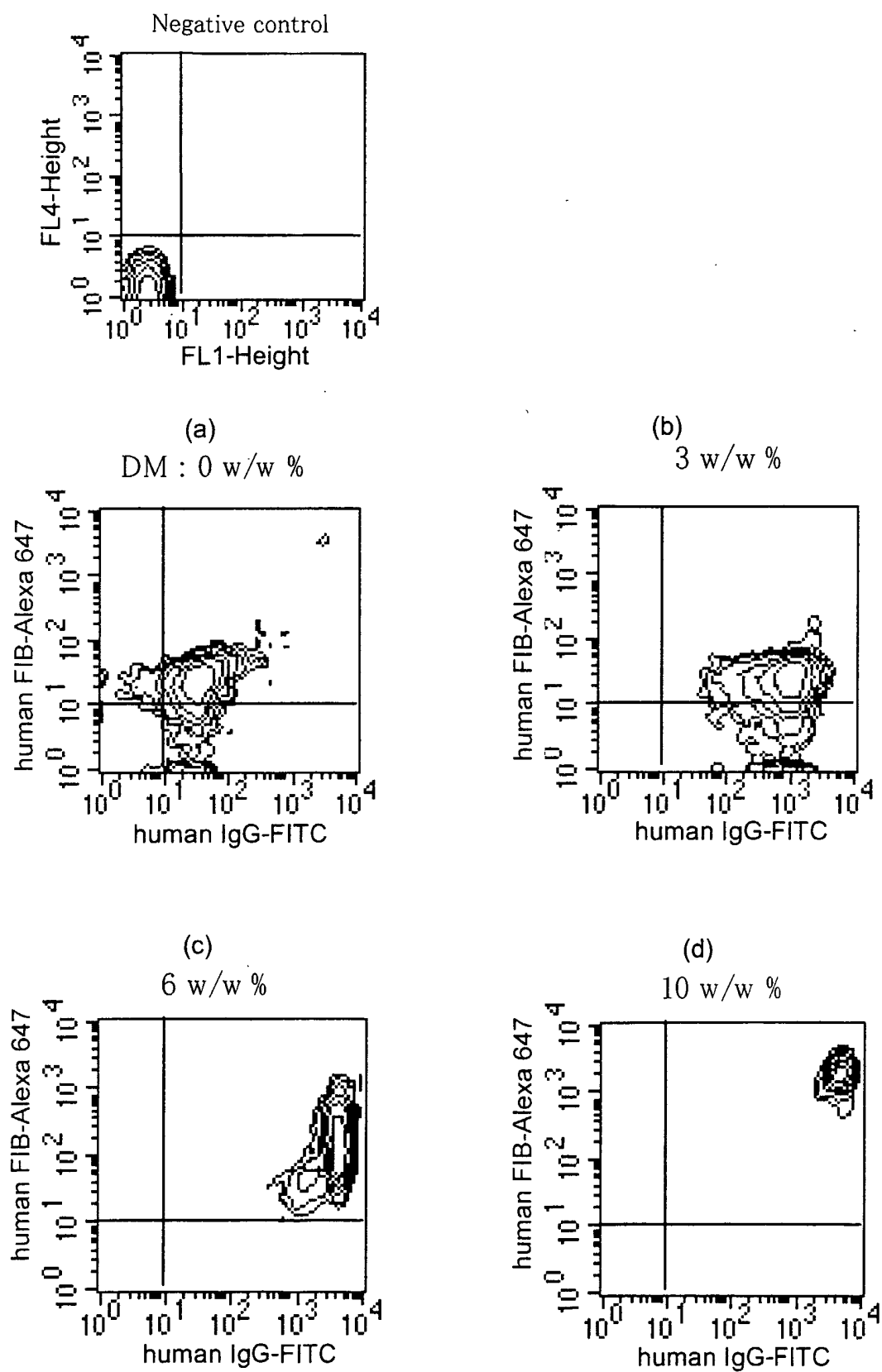


図 8

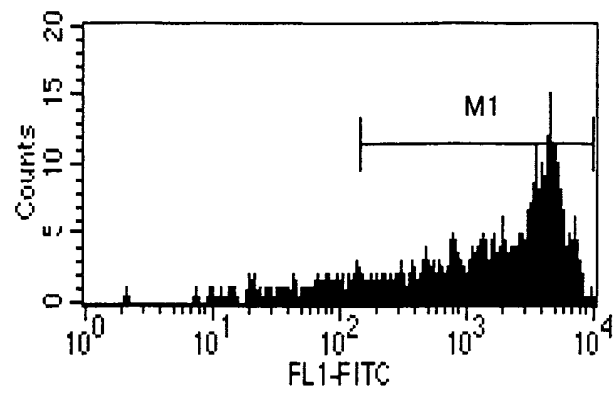


図 9

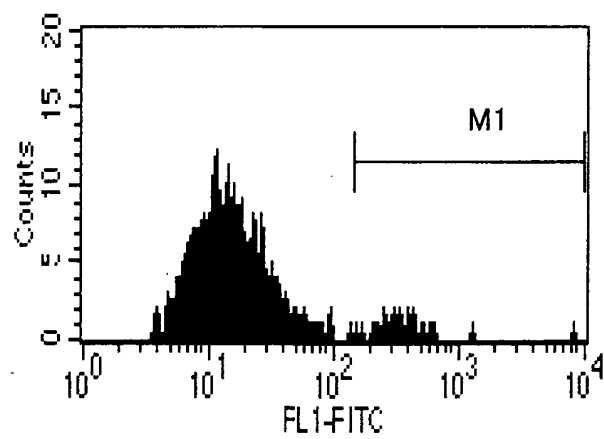


図 10

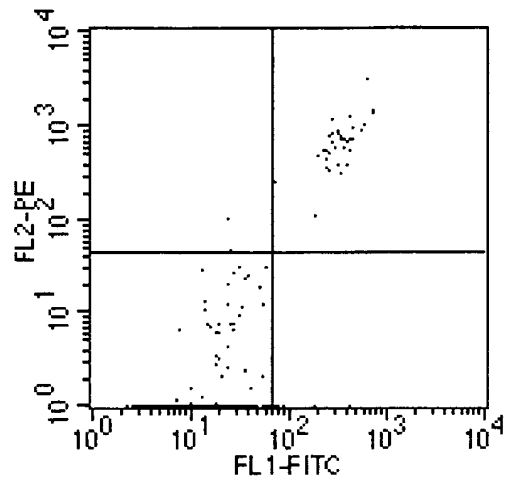


図 11

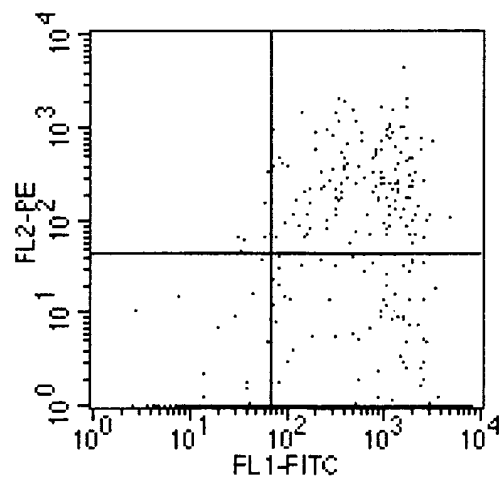
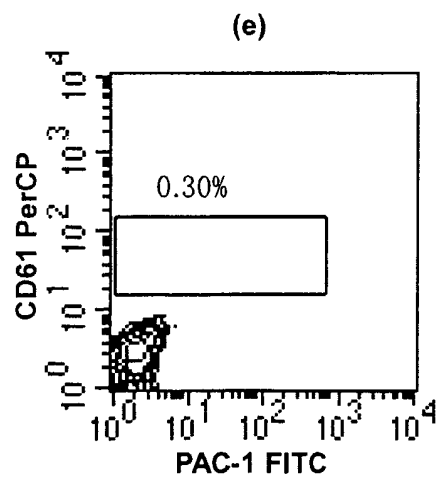
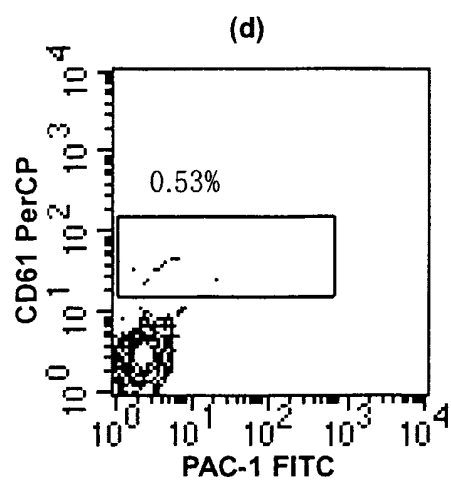
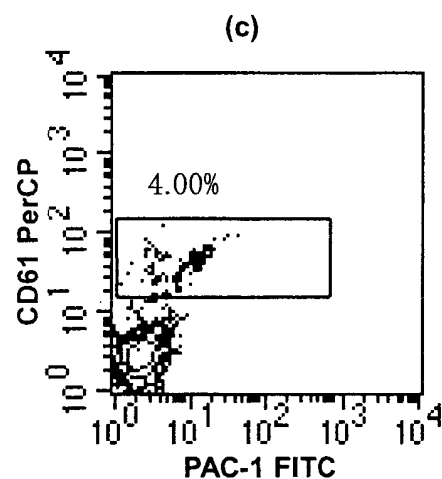
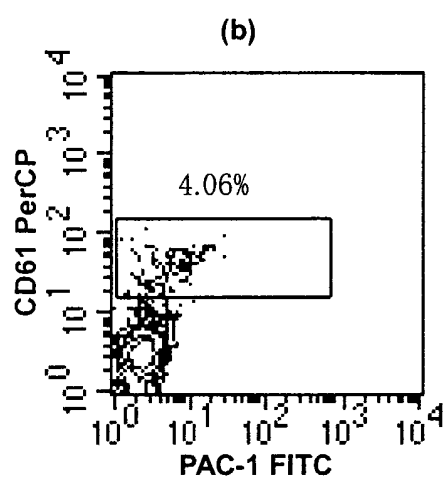
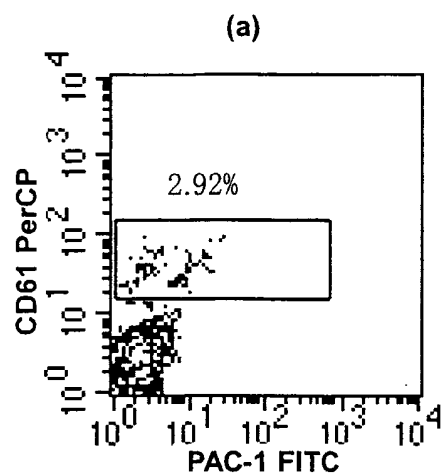
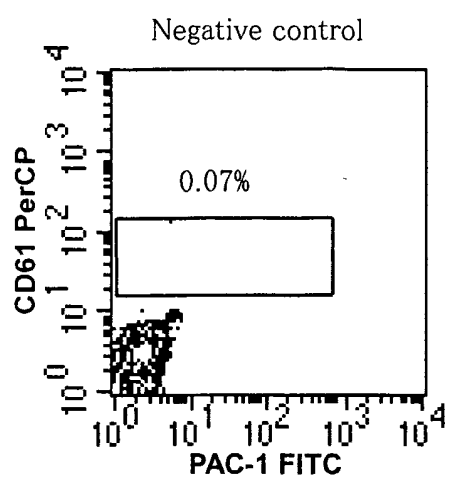
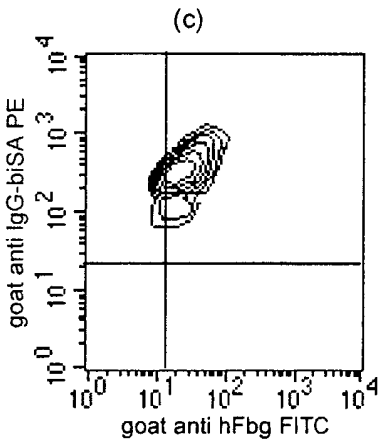
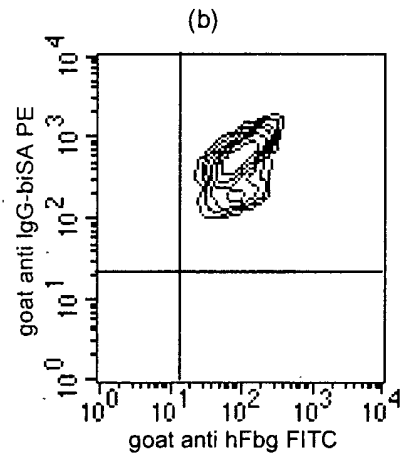
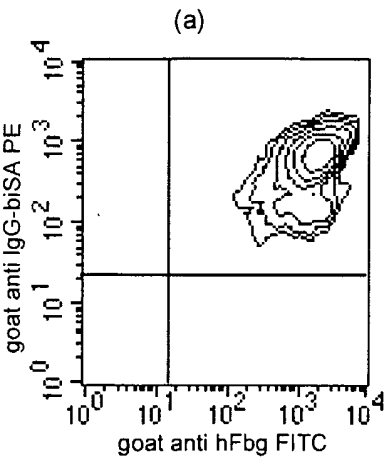
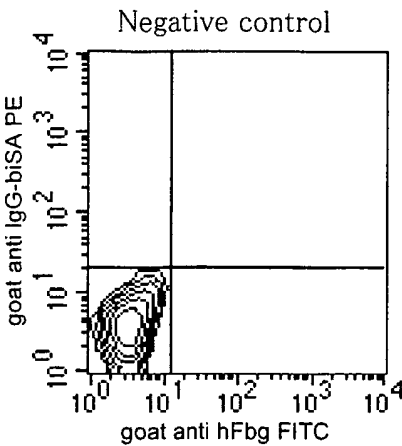


図 1 2



1 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N15/14, G01N33/48

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.Cl⁷ G01N15/14, G01N33/48

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

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.
X	JP 10-054831 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 24 February, 1998 (24.02.98), Par. Nos. [0011] to [0014]	1-3
Y	Par. Nos. [0011] to [0014] (Family: none)	7-16
Y	JP 05-172817 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 13 July, 1993 (13.07.93), Abstract (Family: none)	7-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
27 September, 2002 (27.09.02)

Date of mailing of the international search report
15 October, 2002 (15.10.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08614

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 4-6
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (continuation of item 1 of first sheet). Described in extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08614

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

Box I Observations where certain claims were found unsearchable
(continuation of item 1 of first sheet)

The inventions as set forth in claims 4 to 6 relate to a product "medical material".

On the other hand, an invention of a product cannot be specified unless the "product" is specified on the basis of the factors of the "product", i.e., shape, structure, properties, characteristics, etc.

Although claims 4 to 6 have been examined, the criteria for the selection, on which the product specified by the selection methods as set forth in claims 4 to 6 are selected, are unknown. Namely, the shape, structure, properties, characteristics, etc. of the "product" are completely unknown and thus the "product" per se is unknown.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 4 to 6 cannot be specified and are highly unclear.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N15/14 G01N33/48

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.⁷ G01N15/14 G01N33/48

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 1971-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002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
X	JP 10-054831 A (オリンパス光学株式会社) 1998.02.24 【0011】 - 【0014】	1-3
Y	【0011】 - 【0014】 (ファミリー無し)	7-16
Y	JP 05-172817 A (積水化学株式会社) 1993.07.13 【要約】 (ファミリー無し)	7-16

☐ 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

27.09.02

国際調査報告の発送日

15.10.02

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)

郡山 順

2J

8502

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 4-6 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）第2頁に記載してある。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第 1 ページの 2 の続き）第 2 頁

請求の範囲 4－6 にかかる発明は、「医療用材料」という物に関する発明である。

他方、「物」の発明においては「物」がどのような形状、構造、性質、特性等をしているのかという「物」として特定する要件でなくては発明が特定され得ない。

そこで、請求の範囲 4－6 を検討すると、請求の範囲 4－6 記載の選抜する方法によって特定される物とは、どのような基準で選抜されるか不明であって、「物」の構造、形状、性質、特性等がどのような「物」か全く不明である。

したがって、請求の範囲 4－6 にかかる発明を特定することが不可能で、きわめて不明瞭である。