

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/044365

発行日 平成24年3月15日 (2012.3.15)

(43) 国際公開日 平成22年4月22日 (2010.4.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42	2 G 0 5 4
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	4 B 0 6 3
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号 特願2010-533879 (P2010-533879)	(71) 出願人 504196300 国立大学法人東京海洋大学 東京都港区港南4丁目5番7号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/067502	
(22) 国際出願日 平成21年10月7日 (2009.10.7)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-268871 (P2008-268871)	(74) 代理人 100090402 弁理士 窪田 法明
(32) 優先日 平成20年10月17日 (2008.10.17)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 鈴木 徹 東京都港区港南4-5-7 国立大学法人 東京海洋大学内
	(72) 発明者 濱田 奈保子 東京都港区港南4-5-7 国立大学法人 東京海洋大学内
	(72) 発明者 シリランサアン パウイナー 東京都港区港南4-5-7 国立大学法人 東京海洋大学内

最終頁に続く

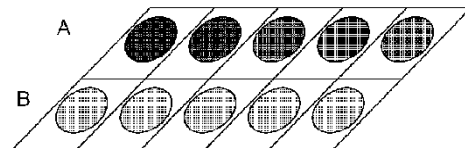
(54) 【発明の名称】 鮮度測定用試薬キット

(57) 【要約】

複数種類の酵素と酵素保護剤を含有する試薬溶液を凍結乾燥して比較的高い温度における保存安定性の良い鮮度測定用試薬キットを得る。

第一試薬及び第二試薬からなり、該第一試薬は、X O DとN Pと酵素保護剤と発色剤とを含む第一試薬溶液の凍結物をガラス転移点温度 (T g) 以下の温度で減圧乾燥させたものからなり、該第二試薬は、X O DとN PとA Pと酵素保護剤と発色剤とを含む第二試薬溶液の凍結物をガラス転移点温度 (T g) 以下の温度で減圧乾燥させたものからなり、該酵素保護剤はスクロース及び/又はゼラチンからなり、該発色剤はH xがX O Dによってキサンチンと尿酸に分解する反応に共役して発色するものからなる。

【図5】



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第一試薬及び第二試薬からなり、該第一試薬は、キサンチンオキシダーゼ (Xanthine oxidase: XOD) とヌクレオシドフォスホリラーゼ (Nucleoside phosphorylase: NP) と酵素保護剤と発色剤とを含む第一試薬溶液の凍結物をガラス転移点温度 (T_g) 以下の温度で減圧乾燥させたものからなり、該第二試薬は、キサンチンオキシダーゼ (XOD) とヌクレオシドフォスホリラーゼ (NP) とアルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase: AP) と酵素保護剤と発色剤とを含む第二試薬溶液の凍結物をガラス転移点温度 (T_g) 以下の温度で減圧乾燥させたものからなり、該酵素保護剤はスクロース及び / 又はゼラチンからなり、該発色剤はヒポキサンチン (Hx) がキサンチンオキシダーゼ (XOD) によってキサンチンと尿酸に分解する反応に共役して発色するものからなることを特徴とする鮮度測定用試薬キット。

10

【請求項 2】

前記第一試薬溶液の凍結物を減圧乾燥させる際の温度を時間の経過とともに上昇させ、前記第二試薬溶液の凍結物を減圧乾燥させる際の温度を時間の経過とともに上昇させていることを特徴とする請求項 1 に記載の鮮度測定用試薬キット。

【請求項 3】

前記第一試薬溶液中、キサンチンオキシダーゼ (XOD) が 0.1 U/ml ~ 10 U/ml の濃度範囲に、ヌクレオシドフォスホリラーゼ (NP) が 0.05 U/ml ~ 20 U/ml の濃度範囲に、前記第二試薬溶液中、キサンチンオキシダーゼ (XOD) が 0.1 U/ml ~ 10 U/ml の濃度範囲に、ヌクレオシドフォスホリラーゼ (NP) が 0.05 U/ml ~ 20 U/ml の濃度範囲に、アルカリフォスファターゼ (AP) が 5 U/ml ~ 200 U/ml の濃度範囲にあることを特徴とする請求項 1 に記載の鮮度測定用試薬キット。

20

【請求項 4】

前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液中、スクロースが 50 mM ~ 400 mM の濃度範囲にあることを特徴とする請求項 3 に記載の鮮度測定用試薬キット。

【請求項 5】

前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液中、ゼラチンが 0.1 ~ 2.0 (ゼラチン g / 試薬溶液 100 ml) の濃度範囲にあることを特徴とする請求項 3 に記載の鮮度測定用試薬キット。

30

【請求項 6】

前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液中、発色剤が 0.1 mM ~ 0.6 mM の濃度範囲にあることを特徴とする請求項 3 に記載の鮮度測定用試薬キット。

【請求項 7】

前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液の pH が 6.8 ~ 8.5 であることを特徴とする請求項 3 に記載の鮮度測定用試薬キット。

【請求項 8】

前記発色剤が WST-8 であることを特徴とする請求項 3 に記載の鮮度測定用試薬キット。

40

【請求項 9】

前記第一試薬溶液の凍結物が前記第一試薬溶液を液体窒素で急速冷凍させて得られたものであり、前記第二試薬溶液の凍結物が前記第二試薬溶液を液体窒素で急速冷凍させて得られたものであることを特徴とする請求項 1 に記載の鮮度測定用試薬キット。

【請求項 10】

前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液が血清アルブミン (BSA) を含有していることを特徴とする請求項 1 に記載の鮮度測定用試薬キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

50

本発明は、魚肉等の鮮度を容易に短時間で測定することができ、しかも保存安定性の高い鮮度測定用試薬キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、畜肉、魚肉又は鶏肉等の鮮度はK値が指標として使用されている。K値とはこれらの肉中におけるアデノシン三リン酸（ATP）及びATP分解生成物（ADP、AMP、IMP、HxR、Hx）の含有量に対するイノシン（HxR）及びヒポキサンチン（Hx）の含有量の割合（%）、すなわち $(HxR + Hx) \times 100 / (ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)$ で表される数値（%）である。ここで、ADPはアデノシン二リン酸、AMPはアデノシン一リン酸、IMPはイノシン酸、HxRとはイノシン、Hxはヒポキサンチンである。

10

【0003】

このK値を求めるには畜肉、魚肉又は鶏肉中のATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hxの全ての含有量を測定する必要がある。しかし、これらATP及びATP分解生成物の全ての含有量を測定するのは非常に面倒であるし、魚肉の場合、ATP、ADP、AMPは、魚の死後、時間の経過とともにほとんどがIMP（イノシン酸）に分解しており、ATP、ADP、AMPは非常に少なくなっているため、 $(HxR + Hx) \times 100 / (IMP + HxR + Hx)$ で表される数値KiがKiとしてK値の代わりに鮮度の指標として便宜的に用いられている。

20

【0004】

ここで、HxRとHxの含有量は、例えば特公昭62-50120号公報に記載されているように、ヌクレオシドフォスホリラーゼ（Nucleoside phosphorylase：NP）、キサンチンオキシダーゼ（Xanthine oxidase：XOD）及び発色剤を含む組成液を肉汁に混合し、肉汁中のHxRをヌクレオシドフォスホリラーゼ（NP）でHxに分解させ、Hxをキサンチンオキシダーゼ（XOD）でキサンチンと尿酸に分解させ、発色剤をHxの分解に共役して発色させ、この発色の強度から求める方法が知られている。

【0005】

IMPとHxRとHxの含有量は、例えば特開平9-262098号公報に記載されているように、アルカリフォスファターゼ（Alkaline phosphatase：AP）、ヌクレオシドフォスホリラーゼ（NP）、キサンチンオキシダーゼ（XOD）を固定したリアクタに肉汁を含んだ試料液を通し、試料液中のイノシン酸（IMP）をアルカリフォスファターゼ（AP）でイノシン（HxR）に分解し、イノシン（HxR）をヌクレオシドフォスホリラーゼ（NP）でヒポキサンチン（Hx）に分解し、ヒポキサンチン（Hx）をキサンチンオキシダーゼ（XOD）でキサンチンと尿酸に分解させ、ヒポキサンチン（Hx）の濃度を発光試薬で測定することにより求める方法が知られている。

30

【0006】

しかし、上述した方法で使用されている各酵素（AP、NP、XOD）は非常に不安定なものであり、時間とともにその活性が容易に低下し、また温度が高いとその活性が更に低下してしまうので、これらの酵素を含む組成物を試薬として商品化することは非常に困難であった。

40

【0007】

これらの酵素の不安定さに対しては、例えば特開平8-131196号公報、特表2000-513940号公報、特再W002/004633号公報、特開2008-206491号公報に記載されているように、酵素の水溶液中に糖（トレハロース、スクロース等）や血清アルブミン（BSA）を添加し、これらを凍結乾燥させることにより、酵素を安定化させる技術がいくつか提案されている。

【0008】

しかし、糖の種類と酵素の種類との間には酵素の安定化について相性があり、糖と酵素の組合せの仕方によって酵素の安定化の程度が異なり、ある特定の酵素を安定化させる糖の種類や濃度は簡単にはわからない。そして、その酵素が複数種の混合物の場合、それら

50

の酵素を安定化させる糖の種類や濃度は更にわからない。

【0009】

また、酵素を含む水溶液を凍結後、乾燥させて安定化させる場合、その条件、特に凍結後に温度を上昇させて凍結物を乾燥させる過程における条件も酵素の安定性に大きな影響があるが、その最適条件はわかっていない。そして、酵素が複数種の混合物になった場合、この最適条件は更にわからない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開昭62-50120号公報

10

【特許文献2】特開平9-262098号公報

【特許文献3】特開平8-131196号公報

【特許文献4】特表2000-513940号公報

【特許文献6】特再W002/004633号公報

【特許文献7】特開2008-206491号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

解決しようとする課題は、魚肉等の鮮度を測定するためのものとして、高い温度で長時間保存しても酵素活性の低下が極めて少ない、魚肉等の鮮度を適切に測定するために必要な酵素活性を備えている保存安定性の高い鮮度測定用試薬キットが提供されていない点である。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明に係る鮮度測定用試薬キットは、鮮度測定用試薬キットに含まれる酵素の保存安定性を高めるために、酵素保護剤（糖及び/又はゼラチン）を含む酵素水溶液を急速冷凍させ、得られた凍結物を減圧下で該凍結物のガラス転移点温度（T_g）以下の温度で乾燥させたことを最も主要な特徴とする。

【0013】

すなわち、本発明に係る鮮度測定用試薬キットは第一試薬及び第二試薬からなり、該第一試薬は、キサンチンオキシダーゼ（Xanthine oxidase：XOD）とヌクレオシドフォスフォリラーゼ（Nucleoside phosphorylase：NP）と酵素保護剤と発色剤とを含む第一試薬溶液を凍結乾燥させたものからなり、該第二試薬は、キサンチンオキシダーゼ（XOD）とヌクレオシドフォスフォリラーゼ（NP）とアルカリフォスファターゼ（Alkaline phosphatase：AP）と酵素保護剤と発色剤とを含む第二試薬溶液を凍結乾燥させたものからなる。

30

【0014】

ここで、前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液は例えば液体窒素等で急速冷凍させ、その後、減圧しながら乾燥させる。この場合、試料温度（凍結乾燥機棚温度）を時間の経過とともに上昇させながら乾燥させると乾燥時間を短くすることができるので、試料温度を時間の経過とともに上昇させながら乾燥させるのが好ましい。しかし、試料温度を乾燥によって得られたもののガラス転移点温度（T_g）以上にすると酵素活性が低下するので、試料温度は乾燥によって得られるもののガラス転移点温度（T_g）以下で上昇させる必要がある。

40

【0015】

また、前記酵素保護剤としてはスクロース及び/又はゼラチンを使用することができる。スクロースの濃度は50mM～400mMの範囲が好ましい。スクロースの濃度がこの範囲にある場合、保存安定性の良い試薬が得られるからである。また、ゼラチンの濃度は0.1～2.0（ゼラチンg/試薬溶液100ml）の範囲が好ましい。ゼラチンの濃度がこの範囲にある場合、保存安定性の良い試薬が得られるからである。

50

【0016】

また、前記発色剤としてはヒポキサンチン(Hx)がキサンチンオキシダーゼ(XOD)によってキサンチンと尿酸に分解する反応に共役して発色するもの、例えば、テトラゾリウムブルー〔TB〕、ニトロテトラゾリウムブルー〔ニトロ-TB〕、テトラゾリウムバイオレット〔TV〕、ニトロブルーテトラゾリウム〔NBT〕、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2Hテトラゾリウム〔MTT〕、2-(4-ヨ-ドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフェニル)-2H-テトラゾリウム塩〔WST-1〕、2-(4-ヨ-ドフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフェニル)-2H-テトラゾリウム塩〔WST-3〕、2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフェニル)-2H-テトラゾリウム塩〔WST-8〕、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム、3-(4,5-ジメチルチアゾ-ル-2-フェニル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム塩〔MTS〕等の公知のホルマザン試薬を使用することができる。

10

【0017】

発色剤の濃度は、発色剤がWST-8の場合、0.1mM~0.6mMの範囲が好ましい。発色剤の濃度がこの範囲にある場合、安定した発色が得られるからである。なお、発色剤の濃度が0.6mMを超えた場合、発色の強度が頭打ちになり、経済的に無駄なので、0.6mMを上限としたが、0.6mMを超える場合を排除するものではない。

20

【0018】

また、第一試薬溶液中及び第二試薬溶液中、キサンチンオキシダーゼ(XOD)は0.1U/ml~10U/mlの濃度範囲が好ましく、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)は0.05U/ml~20U/mlの濃度範囲が好ましく、第二試薬溶液中、アルカリフォスファターゼ(AP)は5U/ml~200U/mlの濃度範囲が好ましい。

【0019】

キサンチンオキシダーゼ(XOD)の濃度の下限を0.1U/ml、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)の下限を0.05U/ml、アルカリフォスファターゼ(AP)の下限を5U/mlとしたのは、これらの値未満になると酵素の安定性が落ちるからである。また、キサンチンオキシダーゼ(XOD)の上限を10U/ml、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)の上限を20U/ml、アルカリフォスファターゼ(AP)の上限を200U/mlとしたのは、これらの値を超えると試薬の保存安定性が低くなってしま

30

【0020】

前記第一試薬溶液及び前記第二試薬溶液は血清アルブミン(BSA)を含有していてもよいし、含有していなくてもよい。

【0021】

第一試薬溶液と第二試薬溶液のpHはいずれも6.8~8.5が好ましい。pHを6.8~8.5としたのは、上述した酵素が機能するpHの範囲は6.8~8.5だからである。なお、第一試薬溶液と第二試薬溶液のpHはリン酸カリウム等の緩衝液を用いて6.8~8.5の範囲とするのが好ましい。

40

【0022】

前記第一試薬及び前記第二試薬は各々紙に含浸させ、凍結乾燥させて2種類の試験紙とし、これらの試験紙を使用して魚肉等の鮮度を測定できるようにしてもよい。

【発明の効果】

【0023】

本発明は、上述した2種及び3種の酵素を酵素保護剤とともに溶解させた試薬溶液を凍結させ、得られた凍結物をガラス転移点温度(Tg)以下の温度範囲で減圧乾燥させて各試薬を得たので、各試薬の保存安定性(残存活性)が高まり、各試薬を比較的高い温度で長期間にわたって保存することができるという利点がある。

【0024】

50

そして、各試薬を比較的高い温度（例えば、55℃）で長期間にわたって保存することができるので、例えば水産加工工場や水産物を使う食品工場の原料品質検査に使用することができ、魚の鮮度をその場で個別に客観的に判断することができるという利点がある。

【0025】

また、各試薬を比較的高い温度（例えば、55℃）で長期間にわたって保存することができるので、発展途上国等で冷蔵設備のない地域において魚の鮮度の判定に簡便に使用することができるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】[HxR + Hx]濃度(μM)と吸光度(454nm)との関係を示すグラフである。 10

【図2】[IMP + HxR + Hx]濃度(μM)と吸光度(454nm)との関係を示すグラフである。

【図3】本発明試薬キットで求めたKi値とHPLCで求めたKi値との相関を示すグラフである。

【図4】本発明試薬キットの保存期間とKi値との関係を示すグラフである。

【図5】本発明試薬キットの仕様イメージを示す説明図である。

【図6】温度25℃で貯蔵した第一試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を示すグラフである。

【図7】温度25℃で貯蔵した第二試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を示すグラフである。 20

【図8】温度40℃で貯蔵した第一試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を示すグラフである。

【図9】温度40℃で貯蔵した第二試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を示すグラフである。

【図10】温度55℃で貯蔵した第二試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を示すグラフである。

【図11】温度55℃で貯蔵した第二試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を示すグラフである。

【図12】第一試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を各湿度毎に示すグラフである。 30

【図13】第二試薬の貯蔵日数と残存活性との関係を各湿度毎に示すグラフである。

【図14】酵素保護剤無しの酵素複合体(試薬キット)の貯蔵日数と各貯蔵日数における試薬キットを用いて求めた同一魚肉のKi値との関係を示すグラフである。

【図15】スクロース入りの酵素複合体(試薬キット)の貯蔵日数と各貯蔵日数における試薬キットを用いて求めた同一魚肉のKi値との関係を示すグラフである。

【図16】スクロース+ゼラチン入りの酵素複合体(試薬キット)の貯蔵日数と各貯蔵日数における試薬キットを用いて求めた同一魚肉のKi値との関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0027】

保存安定性の高い鮮度測定用試薬キットを提供するという目的を、簡易な方法で、酵素の基本的な活性を低下させることなく実現した。 40

【実施例1】

【0028】

ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)を20mMのリン酸カリウム緩衝液(potassium phosphate buffer)(pH=7.8)に溶解してNP液を調製した。また、キサンチンオキシダーゼ(XOD)を20mMのリン酸カリウム緩衝液(pH=7.8)に溶解してXOD液を調製した。そして、NP液及びXOD液は含まれている安定剤を透析して除去した。また、スクロース(Sucrose)を20mMのリン酸カリウム緩衝液(pH=7.8)に溶解してスクロース液を調製した。また、WST-8(発色剤)を20mMのリン酸カリウム緩衝液(pH=7.8)に溶解してWST-8(発色剤)液を調製した。 50

【0029】

次に、これらNP液、XOD液、スクロース液、WST-8（発色剤）液を全て混合して第一試薬溶液を調製し、この第一試薬溶液を2mlのポリプロピレン製チューブに入れ、液体窒素に1分間浸漬し、急速冷凍させた。次に、このポリプロピレン製チューブを、上部のふたを開放した状態で、凍結乾燥機に入れ、乾燥させた。乾燥は、 3.0×10^{-2} Torrの減圧下で行った。このときの温度は、-40 から3時間ごとに5 ずつ5 まで温度を上昇させ、5 から3時間ごとに10 ずつ25 まで温度を上昇させた。次に、凍結乾燥機から乾燥物を取り出し、これをP₂O₅を入れたデシケーターに移し、7日間保存し、完全脱水して第一試薬を得た。

【0030】

また、ヌクレオシドフォスホリラーゼ（NP）を20mMのリン酸カリウム緩衝液（pH = 7.8）に溶解してNP液を調製した。また、キサンチンオキシダーゼ（XOD）を20mMのリン酸カリウム緩衝液（pH = 7.8）に溶解してXOD液を調製した。また、アルカリフォスファターゼ（AP）液を準備した。そして、NP液、XOD液及びAP液は透析して含まれている安定剤を除去した。また、スクロースを20mMのリン酸カリウム緩衝液（pH = 7.8）に溶解してスクロース液を調製した。また、WST-8（発色剤）20mMのリン酸カリウム緩衝液（pH = 7.8）に溶解してWST-8（発色剤）液を調製した。

【0031】

次に、NP液、XOD液、AP液、スクロース液、WST-8（発色剤）液を全て混合して第二試薬溶液を調製し、この第二試薬溶液を2mlのポリプロピレン製チューブに入れ、液体窒素に1分間浸漬し、急速冷凍させた。次に、このポリプロピレン製チューブを、上部のふたを開放した状態で、凍結乾燥機に入れ、乾燥させた。乾燥は、 3.0×10^{-2} Torrの減圧下で行った。このときの温度は、-40 から3時間ごとに5 ずつ5 まで温度を上昇させ、5 から3時間ごとに10 ずつ25 まで温度を上昇させた。次に、凍結乾燥機から乾燥物を取り出し、これをP₂O₅を入れたデシケーターに移し、7日間保存し、完全脱水して第二試薬を得た。

【0032】

次に、60mgの第一試薬を1mlの蒸留水に溶解し、そのうちの150μlを分取し、これを魚肉絞り汁150μlと混合し、混合液を分光光度計でAbs. = 454nmで測定してその吸光度Aを求めた。そして、図1に示すように、予め作成しておいた吸光度（Abs. at 454nm）と[HxR + Hx]濃度（μM）との関係から魚肉絞り汁中の[HxR + Hx]濃度A（μM）を求めた。

【0033】

また、60mgの第二試薬を1mlの蒸留水に溶解し、そのうちの150μlを分取し、これを魚肉絞り汁150μlと混合し、混合液を分光光度計でAbs. = 454nmで測定してその吸光度Aを求めた。そして、図2に示すように、予め作成しておいた吸光度（Abs. at 454nm）と[IMP + HxR + Hx]濃度（μM）との関係から魚肉絞り汁中の[IMP + HxR + Hx]濃度B（μM）を求めた。

【0034】

次に、 $(HxR + Hx) \times 100 / (IMP + HxR + Hx) = Ki (\%)$ であり、(HxR + Hx)は濃度Aであり、(IMP + HxR + Hx)は濃度Bであることから、Ki値(=A/B)を求めた。

【0035】

また、同じ魚肉のKi値を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で別に求め、本発明試薬キットで求めたKi値とHPLCで求めたKi値との相関を求めたところ、図3のグラフに示す通りであった。この図3のグラフに示された結果から、本発明の測定方法で求めたKi値とHPLCで求めたKi値とは $R^2 = 0.996$ という高い相関関係が有ることがわかる。

【実施例2】

10

20

30

40

50

【0036】

本発明試薬キットを5、25、40で50日間保存し、この試薬キットを使って同じ魚肉(マアジ)の K_i 値を求めたところ、図4に示す通りであった。この結果から、本発明試薬キットは40で50日まではかなり酵素活性の高い状態で保存できることがわかる。

【実施例3】

【0037】

実施例1と同様の実験において、アルカリフォスファターゼ(AP)を5U/ml未満としたところ、アルカリフォスファターゼ(AP)によるIMPの分解が不完全になるためか、得られる K_i 値が不安定になり、アルカリフォスファターゼ(AP)が200U/mlを超えると試薬の保存安定性が悪くなった。これに対し、アルカリフォスファターゼ(AP)を5U/ml~200U/mlとした場合はかかる不都合を生ずることなく、安定した K_i 値が得られた。従って、アルカリフォスファターゼ(AP)は5U/ml~200U/mlの範囲が最適範囲と考えられる。

10

【実施例4】

【0038】

実施例1と同様の実験において、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)を0.05U/ml未満としたところ、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)によるHxRの分解が不完全になるためか、得られる K_i 値が不安定になり、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)が20U/mlを超えると試薬の保存安定性が悪くなった。これに対し、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)を0.05U/ml~20U/mlとした場合はかかる不都合を生ずることなく、安定した K_i 値が得られた。従って、ヌクレオシドフォスホリラーゼ(NP)は0.05U/ml~20U/mlの範囲が最適範囲と考えられる。

20

【実施例5】

【0039】

実施例1と同様の実験において、キサンチンオキシダーゼ(XOD)を0.1U/ml未満としたところ、キサンチンオキシダーゼ(XOD)によるHxの分解が不完全になるためか、得られる K_i 値が不安定になり、キサンチンオキシダーゼ(XOD)が10U/mlを超えると試薬の保存安定性が悪くなった。これに対し、キサンチンオキシダーゼ(XOD)を0.1U/ml~10U/mlとした場合はかかる不都合を生ずることなく、安定した K_i 値が得られた。従って、キサンチンオキシダーゼ(XOD)は0.1U/ml~10U/mlの範囲が最適範囲と考えられる。

30

【実施例6】

【0040】

実施例1と同様の実験において、スクロースを50mM未満としたところ、得られる K_i 値が不安定になり、スクロースが400mMを超えると酵素液が結晶化してしまう。これに対し、スクロースを50mM~400mMとした場合はかかる不都合を生ずることなく、安定した K_i 値が得られた。従って、スクロースは50mM~400mMの範囲が最適範囲と考えられる。

40

【実施例7】

【0041】

実施例1と同様の実験において、WST-8(発色剤)を0.1mM未満としたところ、発色が不安定になり、WST-8(発色剤)が0.6mMを超えた場合は濃度の増加にもかかわらず発色の度合いが頭打ちになってしまう。これに対し、WST-8(発色剤)を0.1mM~0.6mMとした場合はかかる不都合を生ずることなく、安定した K_i 値が得られた。従って、WST-8(発色剤)は0.1mM~0.6mMの範囲が最適範囲と考えられる。

【実施例8】

【0042】

50

実施例 1 と同様の実験において、pH を 6.8 未満としたり、8.5 を超えるようにした場合は酵素が機能しなくなるが、pH を 6.8 ~ 8.5 とした場合はかかる不都合を生ずることなく、安定した K_i 値が得られた。従って、pH は 6.8 ~ 8.5 の範囲が最適範囲と考えられる。

【実施例 9】

【0043】

上記実施例では、試薬の発色強度は吸光光度計を用いて測定したが、図 5 に示すように、プレートリーダーの各セルに凍結乾燥させた各試薬粉末を分注し、ここに魚肉抽出物を適量添加して発色させ、この発色強度を色サンプルと比較して [IMP + HxR + Hx] の濃度又は [HxR + Hx] の濃度を求めてもよい。また、プレートリーダーのセルに酵素液を分注し、この状態で酵素液を凍結乾燥させたものを試薬キットとして用いてもよい。

10

【実施例 10】

【0044】

200 mM のスクロース溶液 1 ml 中に、又は、200 mM の sucrose + 0.5 % ゼラチン溶液 1 ml 中に、0.02 mg のヌクレオシドホスホリラーゼ (NP) と 2 mg のキサンチンオキシダーゼ (XOD) を溶解させて、0.3 Unit/ml の NP + 0.6 Unit/ml の XOD を含む第一試薬溶液を調製した。

【0045】

200 mM のスクロース溶液 1 ml 中に、又は、200 mM の sucrose + 0.5 % ゼラチン溶液 1 ml 中に、1.5 μ l のアルカリホスファターゼ (AP)、0.02 mg のヌクレオシドホスホリラーゼ (NP) 及び 2 mg のキサンチンオキシダーゼ (XOD) を溶解させて、4.5 Unit/ml の AP + 0.3 Unit/ml の NP + 0.6 Unit/ml の XOD を含む第二試薬溶液を調製した。

20

【0046】

第一試薬溶液を 2 ml のポリプロピレンチューブに 1 ml 入れ、また、第二試薬溶液を 2 ml の別のポリプロピレンチューブに 1 ml 入れ、これらのポリプロピレンチューブを液体窒素に少なくとも 1 分間浸漬して急速冷凍し、得られた凍結物を -90 で保存した。

【0047】

次に、この凍結物を予め -40 に冷却された凍結乾燥機に移し、-40 から 5 まで 5 ずつ温度を上げて、5 から 25 まで 10 ずつ温度を上げて、乾燥させた。各温度ステップにおいて、その温度は 3 時間保持した。また、乾燥機内の圧力は、乾燥プロセスの全体にわたって 3.0×10^{-2} Torr に維持した。凍結物は、凍結乾燥によって、水分を失い、乾燥固形物になった。

30

【0048】

乾燥固形物中の残余の水分は、室温で 7 日間減圧デシケーター中の P_2O_5 で更に除去させた。第一試薬溶液の凍結物から得られた乾燥固形物は第一試薬、第二試薬溶液の凍結物から得られた乾燥固形物は第二試薬として、乾いた窒素で置換したグローブボックス内に入れ、25、40、55 で、45 日間保存した。

40

【0049】

第一試薬 60 mg を蒸留水 1 ml で戻し、それから 75 μ l を分取し、それに 4 mM の HxR を 75 μ l 加え、さらに 20 mM のリン酸カリウム緩衝液 150 μ l を加えて第一試薬溶液を調製した。UV-VIS 分光光度計を用いて、第一試薬溶液の 292 nm における吸光度を、20 で測定し、酵素の活性を初期の活性から評価した。

【0050】

また、第二試薬 60 mg を蒸留水 1 ml で戻し、それから 75 μ l を分取し、それに 4 mM の IMP + 1 mM $MgCl_2$ を 75 μ l 加え、20 mM のリン酸カリウム緩衝液 150 μ l を加えて第二試薬溶液を調製した。UV-VIS 分光光度計を用いて、第二試薬溶液の 292 nm における吸光度を、20 で測定し、酵素の活性を初期の活性から評価した。残存活性は、

50

凍結乾燥する前の活性のパーセンテージとして表わした。

【 0 0 5 1 】

貯蔵温度 25 における第一試薬の 0 日 ~ 4 5 日間の酵素としての残存活性は図 6 に示す通り、貯蔵温度 25 における第二試薬の 0 日 ~ 4 5 日間の酵素としての残存活性は図 7 に示す通り、貯蔵温度 40 における第一試薬の 0 日 ~ 4 5 日間の酵素としての残存活性は図 8 に示す通り、貯蔵温度 40 における第二試薬の 0 日 ~ 4 5 日間の酵素としての残存活性は図 9 に示す通り、貯蔵温度 55 における第一試薬の 0 日 ~ 4 5 日間の酵素としての残存活性は図 10 に示す通り、貯蔵温度 55 における第二試薬の 0 日 ~ 4 5 日間の酵素としての残存活性は図 11 に示す通りであった。

【 0 0 5 2 】

図 6 ~ 図 11 に示す結果から、第一試薬及び第二試薬は、スクロースを添加すると、無添加のもの比べて、いずれも残存活性が高まることがわかり、スクロース及びゼラチンを添加すると、スクロースのみを添加した試薬と比べて、いずれも残存活性が更に高まることわかる。なお、第一試薬及び第二試薬の含水量は、カールフィッシャー水分計 (73 7のKF、Herisau、スイス) を用いて計測した。また、第一試薬及び第二試薬の熱特性は、示差走査熱量測定装置 (DSC-50 : 島津、社、日本) を用いて調べた。

【 実施例 1 1 】

【 0 0 5 3 】

スクロースとゼラチンを含む第一試薬、及びスクロースとゼラチンを含む第二試薬を作成し、これらを 55 で 0 日 ~ 4 5 日間、相対湿度 0 %、33 % 及び 53 % の各湿度環境下でそれぞれ貯蔵し、各湿度環境下における各試薬の残存活性を、貯蔵日数の経過に従って調べた。ここで、各試薬は実施例 10 と同様の方法で作成し、各試薬の残存活性は実施例 10 と同様の方法で調べた。

【 0 0 5 4 】

第一試薬の各湿度環境下における残存活性は図 12 に示す通り、第二試薬の各湿度環境下における残存活性は図 13 に示す通りであった。図 12 及び図 13 に示す結果から、相対湿度 0 % の場合は相対湿度 33 %、53 % の場合と比較して、残存活性が大幅に高いことがわかる。本試薬の残存活性を低下させないためには、相対湿度をできる限り 0 % に近づけた雰囲気中で保存する必要があることがわかる。

【 実施例 1 2 】

【 0 0 5 5 】

スクロースとゼラチンのいずれも含まない第一試薬、スクロースを含みゼラチンを含まない第一試薬 (Tg : 65、MT : 0.81%) 及びスクロースとゼラチンの両方を含む第一試薬 (Tg : 77、MT : 0.5%) を各作成し、5、25、40 で 0 日 ~ 112 日間それぞれ貯蔵した。

【 0 0 5 6 】

また、スクロースとゼラチンのいずれも含まない第二試薬、スクロースを含みゼラチンを含まない第二試薬 (Tg : 65、MT : 0.78%) 及びスクロースとゼラチンの両方を含む第二試薬 (Tg : 76、MT : 0.99%) を各作成し、5、25、40 で 0 日 ~ 112 日間それぞれ貯蔵した。ここで、第一試薬及び第二試薬の基本的な組成及び作成条件は実施例 10 と同様とし、発色剤 WST-8 を添加したものである。

【 0 0 5 7 】

0、5、10、20、30 および 50 μ M のイノシン (HxR) を、20 mM 磷酸カリウム緩衝液の中に加えて HxR の標準溶液を調製した。また、0、5、10、20、30 および 50 μ M のイノシン酸 (IMP) を、1 mM の MgCl₂ とともに、20 mM 磷酸カリウム緩衝液の中に加えて IMP の標準溶液を調製した。HxR の標準溶液の実際の HxR 濃度と IMP の標準溶液の実際の IMP 濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて調べた。

【 0 0 5 8 】

第一試薬溶液 150 μ l を 150 μ l の HxR (0、5、10、20、30 および 50 μ M

10

20

30

40

50

)標準溶液に加え、UV-VIS分光測光器で454nmの吸光度を25で測定し、H×Rの濃度と吸光度との関係を求め、これから標準曲線を作成した。また、第二試薬溶液150μlを150μlのIMP(0, 5, 10, 20, 30および50μM)標準溶液に加え、UV-VIS分光測光器で酵素混合液の454nmの吸光度を25で測定し、IMPの濃度と吸光度との関係を求め、これから標準曲線を作成した。

【0059】

1gの魚肉と10%の過塩素酸4mlをミンチ混合し、さらに、5%の過塩素酸4mlを追加混合し、5、回転数2000rpmで10分間遠心分離した。上澄みを取り、8M又は1MのKOHで、pHを6.8~7.0に調整した。上澄み液を再び5、回転数2000rpmで10分間遠心分離した。試料溶液は、No.1のワットマン紙で濾過し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって等級付けされた蒸留水によって希釈し、20mlの魚エキスとした。希釈された試料溶液を0.65μm-poreサイズのmilipore紙で再び濾過し、鮮度測定の前に-90で保持した。

10

【0060】

次に、各貯蔵日数、各貯蔵温度における第一試薬及び第二試薬を用いて、同じ魚肉サンプルのKi値を調べた。ここで、魚肉サンプルのKi値は次のようにして求めた。まず、第一試薬及び第二試薬、各60mgを蒸留水1mlで別々に戻し、それら150μlに魚エキス20μlと、20mMのリン酸カリウム緩衝液130μlを加えて第一試薬溶液、第二試薬溶液をそれぞれ調製した。

20

【0061】

UV-VIS分光光度計を使用し、第一試薬溶液、第二試薬溶液の454nmの吸光度を25で測定し、第一試薬溶液から得られた結果と第二試薬溶液から得られた結果を用いて、標準曲線からH×R+H×の濃度を、IMP+H×R+H×の濃度をそれぞれ求めた。そして、下記数1で示す方程式にH×R+H×の濃度及びIMP+H×R+H×の濃度を入れ、Ki値を求めた。

【0062】

【数1】

$$Ki(\%) = (H \times R + H \times) \times 100 / (IMP + H \times R + H \times)$$

30

【0063】

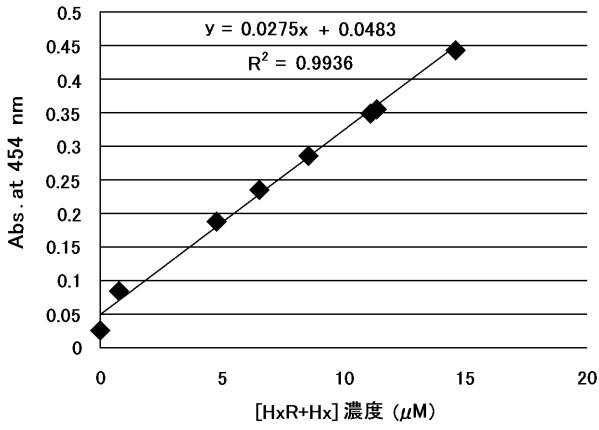
無添加の酵素複合体(第一試薬及び第二試薬)を用いて求めたKi値は図14に示す通り、スクロースを添加した酵素複合体(第一試薬及び第二試薬)を用いて求めたKi値は図15に示す通り、スクロースとゼラチンを添加した酵素複合体(第一試薬及び第二試薬)を用いて求めたKi値は図16に示す通りであった。

【0064】

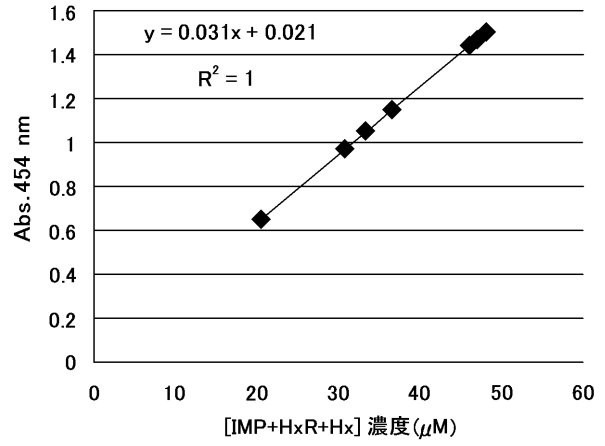
図14~図16に示す結果から、スクロースを添加した酵素複合体(第一試薬及び第二試薬)を用いて求めたKi値は、無添加の酵素複合体(第一試薬及び第二試薬)を用いて求めたKi値と比べ、バラツキが小さくなることがわかり、スクロースとゼラチンを添加した酵素複合体(第一試薬及び第二試薬)を用いて求めたKi値のバラツキは更に小さくなることわかる。

40

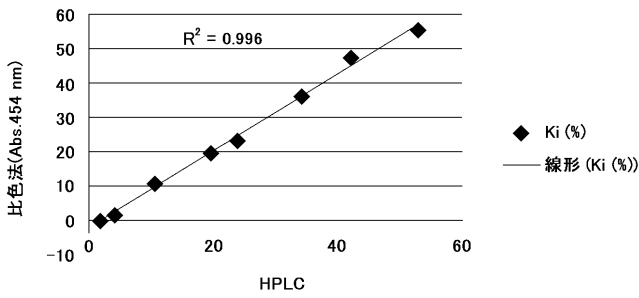
【 図 1 】



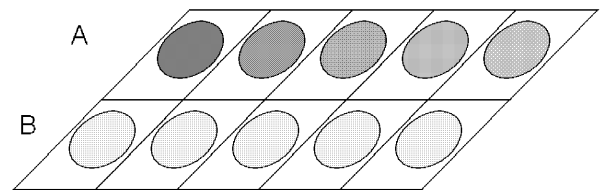
【 図 2 】



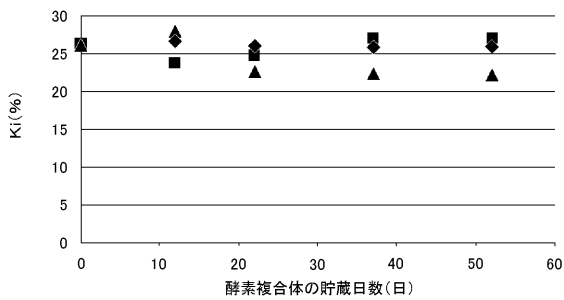
【 図 3 】



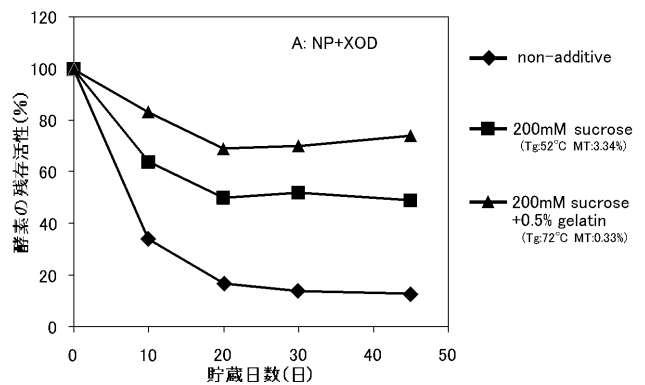
【 図 5 】



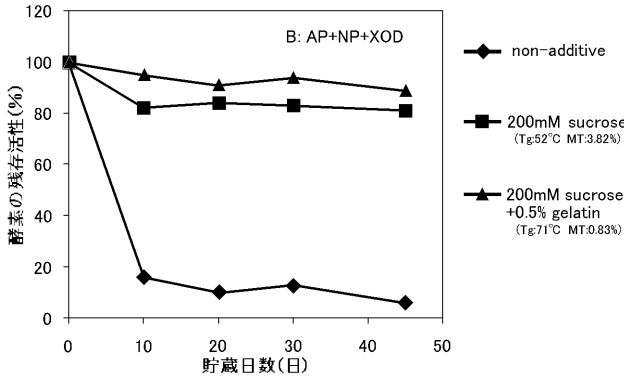
【 図 4 】



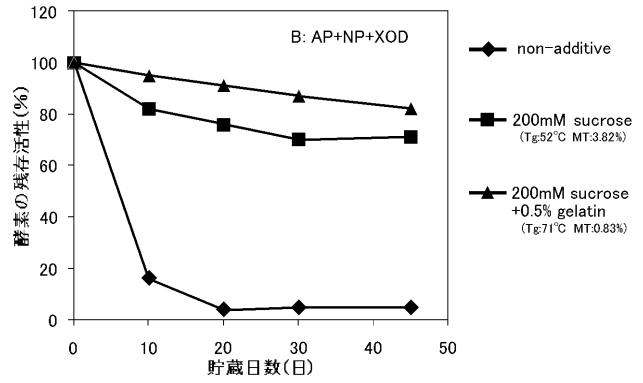
【 図 6 】



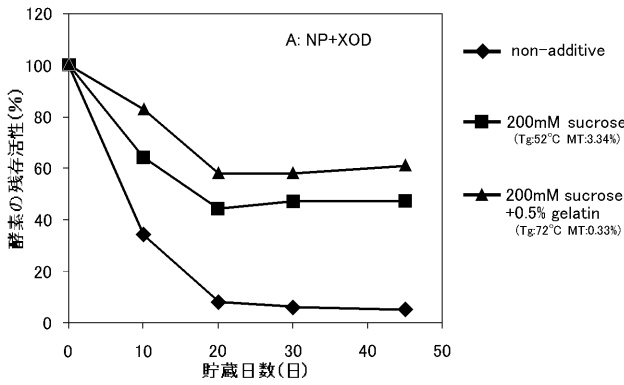
【 図 7 】



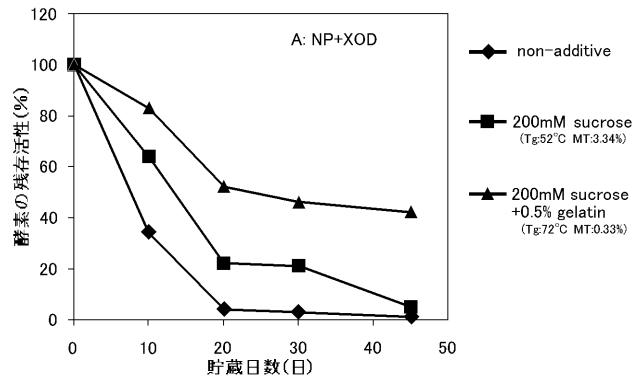
【 図 9 】



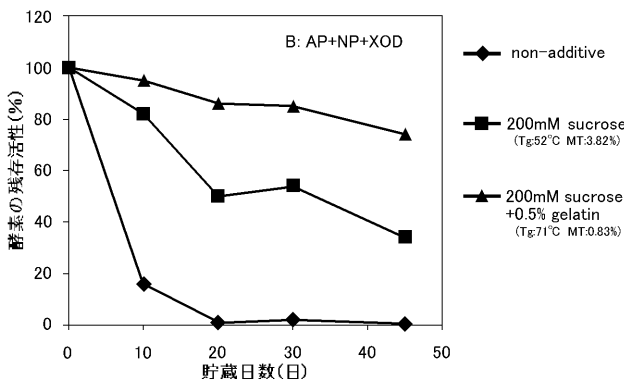
【 図 8 】



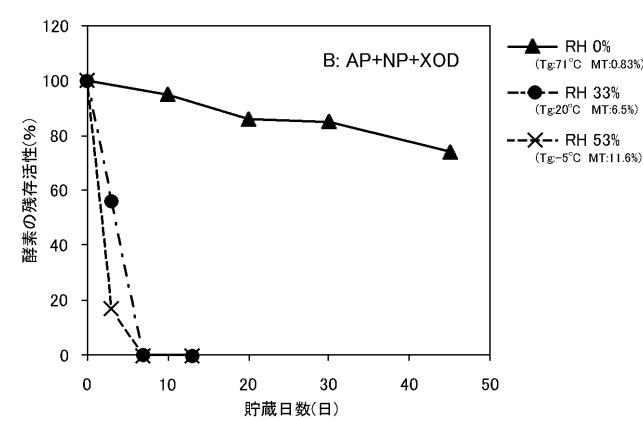
【 図 10 】



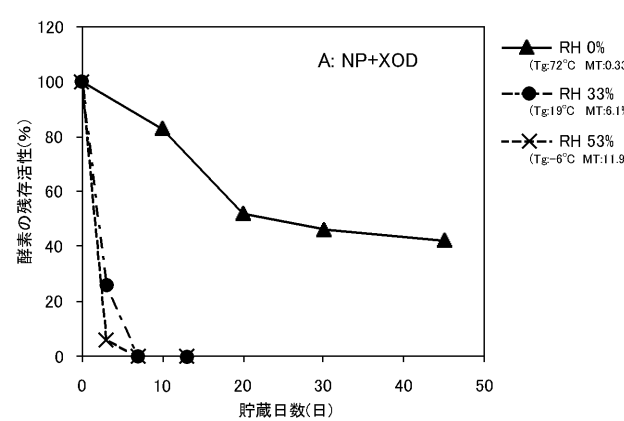
【 図 11 】



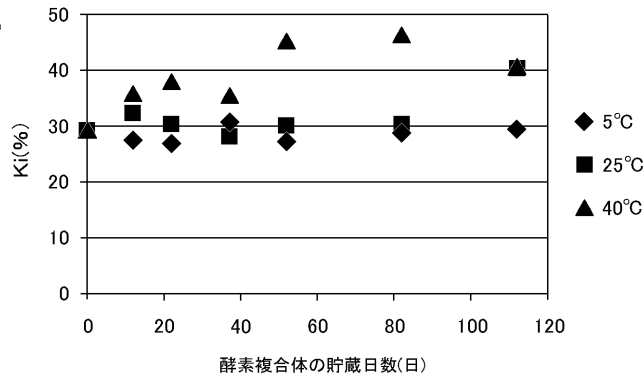
【 図 13 】



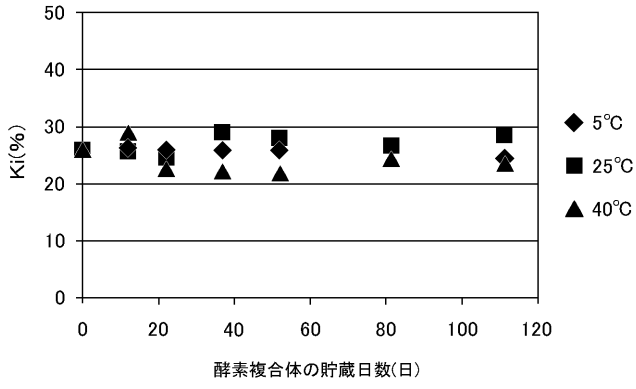
【 図 12 】



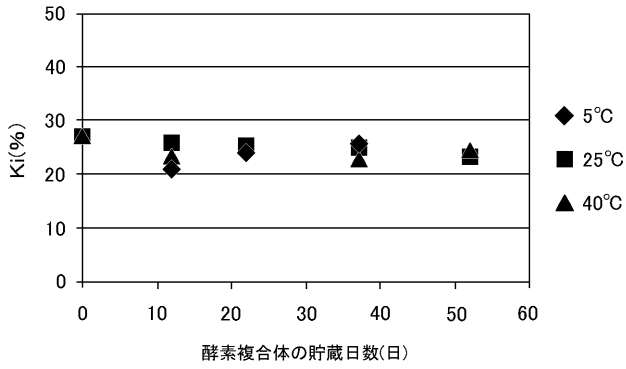
【 図 14 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/067502
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/42(2006.01) i, C12Q1/26(2006.01) i, G01N21/78(2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/42, C12Q1/26, G01N21/78 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CApus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 1-289500 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 21 November 1989 (21.11.1989), page 4, upper right column, line 19 to lower left column, line 21; page 6, lower left column, line 16 to page 6, lower right column, line 19 & EP 383922 A1 & WO 1989/007655 A1	1-2, 9-10/3-8
Y/A	JP 2-265984 A (Pafra Ltd.), 30 October 1990 (30.10.1990), page 2, lower left column, line 19 to lower right column, line 8 & US 5098893 A & US 37872 E & US 38385 E & US 39497 E & EP 383569 A2	1-2, 9-10/3-8
<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: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October, 2009 (29.10.09)		Date of mailing of the international search report 10 November, 2009 (10.11.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 11-504802 A (Kairon Corp.), 11 May 1999 (11.05.1999), page 87, lines 19 to 27 & US 5789245 A & US 5814482 A & US 5843723 A & US 6015686 A & US 6015694 A & US 6342372 B1 & US 6376236 B1 & US 2003/0232035 A1 & US 2004/0029278 A1 & EP 797679 A2 & WO 1996/017072 A2	1-2, 9-10/3-8
Y/A	JP 2000-513940 A (Molecular Biology Resources, Inc.), 24 October 2000 (24.10.2000), page 13, line 7 to page 14, line 12 & US 5876992 A & US 6294365 B1 & EP 910630 A1 & WO 1998/000530 A1	1-2, 9-10/3-8
A	JP 3-219900 A (Otsuka Foods Co., Ltd.), 27 September 1991 (27.09.1991), page 3, upper left column, line 12 to upper right column, line 8 (Family: none)	1-10
A	JP 9-262098 A (Nichirei Corp.), 07 October 1997 (07.10.1997), paragraphs [0002] to [0006] (Family: none)	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 7 5 0 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/42(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/42, C12Q1/26, G01N21/78											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009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) CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
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 請求項の番号									
Y/A	JP 1-289500 A (第一化学薬品株式会社) 1989.11.21, 第4頁右上欄19行-左下欄21行, 第6頁左下欄第16行-第6頁右下欄第19行 & EP 383922 A1 & WO 1989/007655 A1	1-2, 9-10 /3-8									
Y/A	JP 2-265984 A (パフラ・リミテッド) 1990.10.30, 第2頁左下欄19行-右下欄8行 & US 5098893 A & US 37872 E & US 38385 E & US 39497 E & EP 383569 A2	1-2, 9-10 /3-8									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 29.10.2009		国際調査報告の発送日 10.11.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高山 敏充	4 B 4 1 5 3								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/067502
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	JP 11-504802 A (カイロン コーポレイション) 1999.05.11, 第 87 頁第 19-27 行 & US 5789245 A & US 5814482 A & US 5843723 A & US 6015686 A & US 6015694 A & US 6342372 B1 & US 6376236 B1 & US 2003/0232035 A1 & US 2004/0029278 A1 & EP 797679 A2 & WO 1996/017072 A2	1-2, 9-10 /3-8
Y/A	JP 2000-513940 A (モレキュラー バイオロジー リソーシス, イン コーポレイテッド) 2000.10.24, 第 13 頁第 7 行-第 14 頁第 12 行 & US 5876992 A & US 6294365 B1 & EP 910630 A1 & WO 1998/000530 A1	1-2, 9-10 /3-8
A	JP 3-219900 A (大塚食品株式会社) 1991.09.27, 第 3 頁左上欄 12 行-右上欄 8 行 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 9-262098 A (株式会社ニチレイ) 1997.10.07, 段落【0002】 - 【0006】 (ファミリーなし)	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 川井 清司

広島県東広島市西条町寺家7975-1

Fターム(参考) 2G054 AA10 AB10 CE02 EA06 FA06 GB01 GE03

4B063 QA05 QA18 QQ16 QQ62 QQ65 QR03 QR06 QR13 QR41 QR66

QR85 QS36 QX02

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。