

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-226689

(P2006-226689A)

(43) 公開日 平成18年8月31日(2006.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2005-37208 (P2005-37208)	(71) 出願人	000004178
(22) 出願日	平成17年2月15日 (2005. 2. 15)		J S R株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2004-47846 (P2004-47846)		東京都中央区築地五丁目6番10号
(32) 優先日	平成16年2月24日 (2004. 2. 24)	(72) 発明者	村田 充弘
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2005-10104 (P2005-10104)	(72) 発明者	尾崎 一郎
(32) 優先日	平成17年1月18日 (2005. 1. 18)		東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	上野 勝
			東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫検査用磁性粒子

(57) 【要約】

【課題】 疾病の早期発見などの目的のために検査の高感度化が求められ診断薬の感度向上が大きな課題となっているなか、さらに多くの一次プローブを結合できる磁性粒子を得る。

【解決手段】 免疫検査用の磁性粒子であって、検査対象物質と結合する一次プローブと磁性粒子との結合に用いる粒子表面の官能基量がパーキングエリアとして15平方 / 官能基未満の値をしめすことを特徴とする免疫検査用磁性粒子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫検査用の磁性粒子であって、検査対象物質と結合する一次プローブと磁性粒子との結合に用いる粒子表面の官能基量がパーキングエリアとして 15 平方 / 官能基未満の値をしめすことを特徴とする免疫検査用磁性粒子。

【請求項 2】

一次プローブとの結合に用いる粒子表面の官能基がカルボキシル基であることを特徴とする請求項 1 に記載の免疫検査用磁性粒子。

【請求項 3】

一次プローブと磁性粒子の結合が、アビジン - ビオチンまたはプロテイン A またはプロテイン G または一次プローブと反応する抗体を介したものであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の免疫検査用磁性粒子。 10

【請求項 4】

磁性粒子が核粒子の表面に Fe_2O_3 および Fe_3O_4 の少なくとも一方を含む磁性体層が形成された母粒子に重合により該磁性体層上にポリマー層を形成する磁性粒子である請求項 1 または 2 または 3 に記載の免疫検査用磁性粒子。

【発明の詳細な説明】 20

【技術分野】

【0001】

本発明は、生化学・医薬品分野での免疫検査用磁性粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

磁性粒子は感染症・癌マーカー・ホルモンなどの検査のため、抗原抗体反応を利用した診断薬の反応固相として用いられている。このような診断薬の通常の形態としては、抗体または抗原等の検査用プローブ（一次プローブ）が磁性粒子上の官能基に共有結合的に固定化される。この際、一次プローブをビオチン標識し、磁性粒子にアビジンを結合し、アビジン - ビオチンの親和性を利用して磁性粒子に一次プローブを結合する方法や、一次プローブが抗体の場合には、プロテイン A やプロテイン G を結合した磁性粒子に抗体を結合する方法も利用されることがある。このように一次プローブ結合した磁性粒子上にサンプル中の検査対象物質が捕捉された後、第二の検査プローブと反応される。第二の検査プローブ（二次プローブ）は蛍光物質や酵素で標識されており、蛍光や酵素反応によって検出が行われる。 30

一次プローブの結合に用いられる磁性粒子上の官能基量は、官能基一個当たりが占める面積（パーキングエリア）で示される。一般的に、一次プローブの結合量はパーキングエリアの数値に反比例する。すなわち、パーキングエリアが大きいほど一次プローブ量は少なく、パーキングエリアが小さいほど一次プローブ量は多く結合できる。しかしながら、パーキングエリアが大きく一次プローブの量が少ないと検査に必用な十分な感度が得られない場合が多い。一方、パーキングエリアが小さく一次プローブが多く結合する場合は、粒子表面官能基が多すぎ、多数の粒子表面官能基と一次プローブ分子の多数箇所とが結合するため、一次プローブは多く結合できるが活性が失われ、結果的に感度が低下する場合がある。したがって、適度なパーキングエリアを持ち、一次プローブを高活性に保ったまま粒子表面に結合できる磁性粒子が要望されていた。 40

【特許文献 1】特開平 7 - 136547

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、このような従来の問題点を解決するために、従来に比較して一次プローブの 50

活性を保って粒子表面に結合できる磁性粒子の提供を目的とするものである。

【発明の効果】

【0004】

本発明の磁性粒子は、抗体やアビジンの結合量が中程度であるにもかかわらず、免疫測定において高いシグナル強度が得られ免疫検査用磁性粒子として優れている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

すなわち本発明は、免疫検査用の磁性粒子であって、検査対象物質と結合する一次プローブと磁性粒子との結合に用いる粒子表面の官能基量がパーキングエリアとして15～50平方 / 官能基の値をしめすことを特徴とする免疫検査用磁性粒子である。

10

官能基のパーキングエリアPA(平方 / 官能基)は、平滑な表面を持つ粒子の場合は、表面の官能基密度(Q mmol / g 粒子)、粒子径(D μ m)、粒子比重(ρ g / cm^3)を用いて、式(1)であらわすことができる。

【0006】

$$PA = 1 / (Q * D * \rho) \quad \dots \dots \dots (1)$$

【0007】

また、凹凸のある表面を持つ粒子の場合は、気体吸着法など公知の方法で測定した単位重量あたりの表面積 S (cm^2 / g 粒子)を用いて、式(2)で表すことができる。

【0008】

$$PA = S / (60 * Q) \quad \dots \dots \dots (2)$$

20

【0009】

本発明の磁性粒子はパーキングエリアが15～50平方 / 官能基の値を示し、従来に比較して一次プローブの活性を保って粒子表面に結合できる。したがって、検査対象物質の捕捉効率が向上し、高感度な検出が可能である。

一次プローブと磁性粒子との結合に用いる官能基(以下、特定官能基という)としては、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基、チオール基、水酸基、トシル基などをあげることができるが、特にカルボキシル基が好ましく用いることができる。

磁性粒子の表面に特定官能基を導入する方法としては、(1)磁性粒子の存在下で、特定官能基を有する(共)重合性モノマー、必要に応じてその他の共重合性モノマーを液体中で重合を行う方法、(2)磁性粒子表面に特定官能基を有する分子を結合させる方法等をあげることができる。

30

【0010】

(1)の例としては、磁性粒子の存在下で、主原料としての特定官能基を有する(共)重合性モノマーや他の共重合性モノマー、副原料である重合開始剤、乳化剤、分散剤、界面活性剤、電解質、架橋剤、分子量調節剤などが必要に応じて添加し、液体中で重合を行う方法をあげることができる。特定官能基を有する(共)重合性モノマーとしては、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、無類マレイン酸、クロトン酸などのモノまたはジカルボン酸化合物、ヒドロキシエチルメタクリレートなどの水酸基含有モノマー；グリシジル(メタ)アクリレート、アリルグリシジルエーテルなどのエポキシ基含有モノマー、をあげることができる。これらのモノマーは一種単独でも、また二種以上を混合して用いることも可能である。他の共重合性モノマーとしては、スチレン、ジビニルベンゼンなどの芳香族ビニル単量体、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレートなどのエチレン性不飽和カルボン酸アルキルエステルをあげることができる。これらのモノマーも、一種または二種以上を混合して用いることが可能である。

40

【0011】

(2)の例としては、磁性粒子表面に導入されたカルボキシル基または水酸基などに対し特定官能基を持つ分子を公知の方法により結合させる方法や、特定官能基を持つ分子と磁性粒子を乳化剤を含む水中に分散させ重合開始剤等のラジカル発生剤を作用させることにより特定官能基を持つ分子を粒子表面に導入する方法などあげることができる。特定官能基

50

を持つ分子としては、エチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、ビス-(3-アミノプロピル)アミンなどの多官能アミン、トシルクロリド、ポリ(メタ)アクリル酸、(メタ)アクリル酸-アルキル(メタ)アクリレート共重合体などのカルボン酸含有ポリマー、ポリエチレンジイミン、ポリアリルアミンなどのアミノ基含有ポリマー、ポリビニルアルコール、などを上げることができる。

本発明の免疫検査用磁性粒子の粒径は、 $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲が好ましく用いることができる。粒径が $0.5 \mu\text{m}$ 以下では、磁気分離に時間がかかりすぎ、また $10 \mu\text{m}$ 以上では自然沈降の速度が速すぎるため免疫検査用としては好ましくない。

【0012】

本発明の免疫検査用磁性粒子の実際の使用に当たって一次プローブを結合させる方法としては、特定官能基によって公知の方法を適宜選択して用いることができる。この際、一次プローブと特定官能基は直接結合されていてもかまわないし、アビジン-ビオチンの親和性を利用した結合法や、抗体とプロテインAやプロテインGの親和性を利用した結合法、一次プローブに対する抗体を利用した結合法を用いることも可能である。

【実施例】

【0013】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

実施例 1

1. 核粒子の作製

特公昭57-24369号公報記載の膨潤重合法、ジャーナル オブポリマーサイエンス ポリマーレター エディション(J. Polym. Sci., Polymer Letter Ed.)記載の重合方法、あるいは本発明者らが先に提案した重合方法(特開昭61-215602、同61-215603、同61-215604)を参考に下記核粒子を作製した。下記核粒子は、重合後遠心分離により粒子のみ取り出したものをさらに水洗し、乾燥、粉碎した。

核粒子1; メチルメタクリレート/ジビニルベンゼン = 80 / 20 共重合体
(平均粒子径 $1.5 \mu\text{m}$ CV値 2.2%)

核粒子2; スチレン/ジビニルベンゼン = 80 / 20 共重合体
(平均粒子径 $0.8 \mu\text{m}$ CV値 3%)

2. 核粒子への磁性体の被覆(磁性体層の形成)

油性磁性流体「FV55」[松本油脂(株)製]にアセトンを加えて粒子を析出沈殿させた後、これを乾燥することにより、疎水化処理された表面を有するフェライト系の超常磁性体(平均粒子径: $0.02 \mu\text{m}$)を得た。なおこの磁性体は界面活性剤により疎水化処理された表面を有するものである。得られた磁性体をトルエン/水(重量比1:1)に添加し、十分に攪拌した後静置したところ、磁性体はトルエンのみに分散されており、表面が疎水化されたことを確認した。ついで、核粒子に、疎水化された磁性体を混合し、この混合物をハイブリダイゼーションシステムNHS-0型(奈良機械製作所(株)製)を使用して、羽根(攪拌翼)の周速度100m/秒(16200rpm)で3分間処理した。

3. 母粒子の表面のコーティング重合(コーティングポリマー層の形成)

実施例1 核粒子1の50gに磁性体50gを複合化した磁性体被覆粒子30gと、分散剤としてノニオン性乳化剤「エマルゲン150」(花王製)の0.5重量%水溶液375gと、アニオン性乳化剤ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)の0.5重量%水溶液375gとを1Lセパラブルフラスコに投入し十分に分散させた。ついで、イカリ型攪拌羽200rpm攪拌、 N_2 ガス気流下60℃とした。これに、モノマーとしてシクロヘキシルメタクリレート15g、メタクリル酸3.75g、重合開始剤としてターシャリーブチルペルオキシ2-エチルヘキサネート(日本油脂社製; パープチルO)0.7g、分散剤としてノニオン性乳化剤「エマルゲン150」(花王製)の0.5重量%水溶液75gおよびアニオン性乳化剤ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)の0.5%水溶液75gの混合物を10℃以下において超音波微分散により乳化させて、2時間にわたり連続添加して反応さ

10

20

30

40

50

せた。その後、さらに温度を80とし3時間継続し反応を完結させた。その後、室温に冷却し500メッシュステンレス製網で粗大物を除去し、さらに磁気精製において非磁性成分を除去した。粒径は2.1 μm 、比重1.6 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

【0014】

実施例2

核粒子1の50gに磁性体50gを複合化した磁性体被覆粒子30gと、分散剤としてノニオン性乳化剤「エマルゲン150」（花王製）の0.5重量%水溶液375gを1Lセパラブルフラスコに投入し十分に分散させた。ついで、イカリ型攪拌羽200rpm攪拌、 N_2 ガス気流下60とした。これに、モノマーとしてシクロヘキシルメタクリレート30g、メタクリル酸1.5g、重合開始剤としてターシャリーブチルペルオキシ2-エチルヘキサネート（日本油脂社製；パーブチルO）1.5gの混合物を、2時間にわたり連続添加して反応させた。その後、さらに温度を80とし3時間継続し反応を完結させた。その後、室温に冷却し500メッシュステンレス製網で粗大物を除去し、さらに磁気精製において非磁性成分を除去した。粒径は2.1 μm 、比重1.6 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

10

【0015】

実施例3

核粒子2の50gに磁性体100gを複合化した磁性体被覆粒子30gと、モノマーとしてシクロヘキシルメタクリレート6g、メタクリル酸0.3g、重合開始剤としてターシャリーブチルペルオキシ2-エチルヘキサネート（日本油脂社製；パーブチルO）0.6gの混合物を、分散剤としてノニオン性乳化剤「エマルゲン150」（花王製）の0.5%水溶液375gを1Lセパラブルフラスコに投入し十分に分散させた後、イカリ型攪拌羽200rpm攪拌、 N_2 ガス気流下、25で1時間攪拌した。ついで、温度を60とし2時間反応させた。その後、さらに温度を80とし3時間継続し反応を完結させた。その後、室温に冷却し500メッシュステンレス製網で粗大物を除去し、さらに磁気精製において非磁性成分を除去した。粒径は1.1 μm 、比重1.9 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

20

【0016】

実施例4

核粒子1の50gに磁性体100gを複合化した磁性体被覆粒子30gと、分散剤としてノニオン性乳化剤「エマルゲン150」（花王製）の0.5重量%水溶液375gと、アニオン性乳化剤ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）の0.5重量%水溶液375gとを1Lセパラブルフラスコに投入し十分に分散させた。ついで、イカリ型攪拌羽200rpm攪拌、 N_2 ガス気流下60とした。これに、モノマーとしてスチレン14g、ジビニルベンゼン1g、メタクリル酸2.0g、重合開始剤としてターシャリーブチルペルオキシ2-エチルヘキサネート（日本油脂社製；パーブチルO）0.6g、分散剤としてノニオン性乳化剤「エマルゲン150」（花王製）の0.5重量%水溶液75gおよびアニオン性乳化剤ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）の0.5重量%水溶液75gの混合物を10以下において超音波微分散により乳化させて、2時間にわたり連続添加して反応させた。その後、さらに温度を80とし3時間継続し反応を完結させた。その後、室温に冷却し500メッシュステンレス製網で粗大物を除去し、さらに磁気精製において非磁性成分を除去した。粒径は1.1 μm 、比重1.9 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

30

40

【0017】

比較例1

実施例1においてメタクリル酸を7gとした以外は全て実施例1の方法に基づいて実施した。粒径は2.1 μm 、比重1.6 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

比較例2

50

実施例 1 においてメタクリル酸を 0.9 g とした以外は全て実施例 1 の方法に基づいて実施した。粒径は 2.1 μm 、比重 1.6 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

比較例 3

実施例 3 においてメタクリル酸を 2 g とした以外は全て実施例 5 の方法に基づいて実施した。粒径は 1.1 μm 、比重 1.9 g/cm^3 であった。得られた粒子は気体収着法により平滑な表面を持っていた。

【0018】

実施例 1 ~ 5 および比較例 1 ~ 3 の粒子径、粒子比重、表面カルボン酸濃度、パーキングエリアを表 1 に示す。

抗体直接結合法による免疫測定評価

実施例 1 ~ 4 および比較例 1 ~ 3 で得られた診断薬用粒子の 100 mg を 10 mM MES - NaOH (pH 6) 10 mL に分散させ、水溶性カルボジイミド 20 mg を加え、室温で回転攪拌機にて 30 分間攪拌した。磁性粒子を磁気分離にて 2 回洗浄後、10 mM MES - NaOH (pH 6) 10 mL に分散させ、これに抗 AFP マウス IgG 抗体溶液 (1 mg/mL、10 mM MES - NaOH (pH 6)) を 5 mL 加え、室温で回転攪拌機にて 2 時間間攪拌した。上清を除去し、上清中の残存抗体量から抗体結合量を求めた。次に、粒子に 0.1% BSA 含有リン酸緩衝塩溶液 (pH 7.4) を 10 mL 加え室温で回転攪拌機にて 2 時間攪拌した。2 時間後、実施例、比較例ともにリン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 回洗浄後、粒子濃度が 0.5 重量% となるように 0.1 重量% BSA 含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) に再分散し、抗 AFP IgG 結合磁性粒子 (免疫測定用粒子) とした。

この免疫測定用粒子 10 μL に 100 ng/mL の AFP を含むサンプル 50 μL を加えて攪拌し、室温で 5 分放置した。磁気分離法により免疫測定用粒子をリン酸緩衝塩溶液 (PBS) で 2 回洗浄を行った。

次に、アルカリフォスファターゼコンジュゲート抗 AFP 抗体 (抗体濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1% BSA/PBS) を 100 μL 加えて攪拌し、室温で 10 分放置した。これを前述の磁気分離法により洗浄を行った。この粒子に AMP-PD 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む基質液 100 μL を加え攪拌の後、10 分間放置後、ルミノメータ (ベルトールド社製) で測定した。図 1 に抗体結合量と化学発光強度を示す。

【0019】

アビジン-ビオチン法による免疫測定評価

実施例 1 ~ 3 および比較例 1 で得られた診断薬用粒子の 100 mg を 10 mM MES - NaOH (pH 6) 10 mL に分散させ、水溶性カルボジイミド 20 mg を加え、室温で回転攪拌機にて 30 分間攪拌した。磁性粒子を磁気分離にて 2 回洗浄後、10 mM MES - NaOH (pH 6) 10 mL に分散させ、これにアビジン溶液 (1 mg/mL、10 mM MES - NaOH (pH 6)) を 5 mL 加え、室温で回転攪拌機にて 2 時間間攪拌した。2 時間後、上清を除去し、粒子に 0.1% BSA 含有リン酸緩衝塩溶液 (pH 7.4) を 10 mL 加え室温で回転攪拌機にて 2 時間攪拌した。その後、実施例、比較例ともにリン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 回洗浄後、粒子濃度が 5 重量% となるように 0.1% BSA 含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) に再分散し、アビジン結合磁性粒子とした。

このアビジン結合磁性粒子 1 mg (0.2 mL) に FAM 標識したビオチン溶液 (1000 pmol/mL) 0.5 mL を加え、室温で回転攪拌機にて 1 時間攪拌した。上清に残った FAM の蛍光量からアビジン結合磁性粒子のビオチン結合量を求めた。

次に、上で得られたアビジン結合粒子を用いて免疫測定用粒子を調製した。アビジン結合粒子 10 mg (2 mL) に、ビオチン標識抗 AFP マウス IgG 抗体溶液 (1 mg/mL、10 mM MES - NaOH (pH 6)) を 0.5 mL 加え、室温で回転攪拌機にて 2 時間間攪拌した。2 時間後、0.1% BSA 含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 回洗浄後、粒子濃度が 5 重量% となるように 0.1% BSA 含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) に再分散し、抗 AFP IgG 結合磁性粒子 (免疫測定用粒子) とした。

この免疫測定用粒子 10 μL に 100 ng/mL の AFP を含むサンプル 50 μL を加えて

10

20

30

40

50

攪拌し、室温で5分放置した。磁気分離法により免疫測定用粒子をリン酸緩衝塩溶液（PBS）で2回洗浄を行った。

次に、アルカリフォスファターゼコンジュゲート抗AFP抗体（抗体濃度2.5 µg/mL、0.1重量%BSA/PBS）を100 µL加えて攪拌し、室温で5分放置した。これを前述の磁気分離法により洗浄を行った。この粒子にAMP-PD 200 µg/mLを含む基質液100 µLを加え攪拌の後、10分間放置後、ルミノメータ（ベルトールド社製）で測定した。図2にFAM標識ビオチン結合量と化学発光強度を示す。

【0020】

【表1】

	粒子径 (µm)	粒子比重 (g/cm ³)	表面カルボン酸 濃度 (µmol/g)	パーキングエリア (平方Å)
実施例1	2.1	1.6	13	23
実施例2	2.1	1.6	11	27
実施例3	1.1	1.9	16	30
実施例4	1.1	1.9	12	40
比較例1	2.1	1.6	31	9.6
比較例2	2.1	1.6	4	74
比較例3	1.1	1.9	38	13

10

20

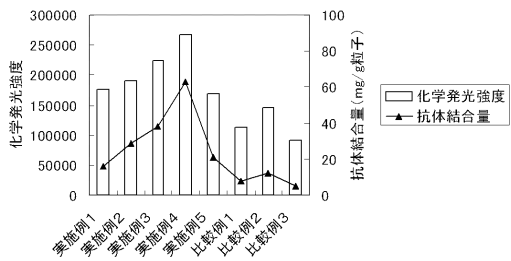
【図面の簡単な説明】

【0021】

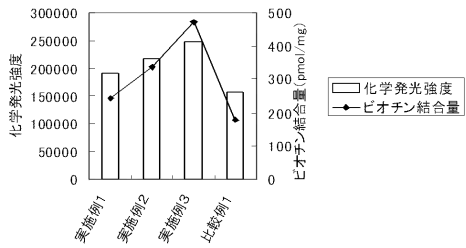
【図1】実施例および比較例の化学発光強度と抗体結合量との関係を示すグラフ

【図2】実施例および比較例の化学発光強度とビオチン結合量との関係を示すグラフ

【 図 1 】



【 図 2 】



专利名称(译)	用于免疫测定的磁性颗粒		
公开(公告)号	JP2006226689A	公开(公告)日	2006-08-31
申请号	JP2005037208	申请日	2005-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	杰瑟股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	JSR株式会社		
[标]发明人	村田 充弘 尾崎 一郎 上野 勝		
发明人	村田 充弘 尾崎 一郎 上野 勝		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/553		
FI分类号	G01N33/543.541.A G01N33/543.525.U G01N33/53.U G01N33/553		
优先权	2004047846 2004-02-24 JP 2005010104 2005-01-18 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得用于免疫学检查的磁性颗粒，其能够连接大量的初级探针，以符合提高检查灵敏度的要求和提高诊断药物灵敏度的要求为了在早期阶段发现疾病。ŽSOLUTION：用于免疫学检查的磁性颗粒的特征在于，用于连接到待检查物质的初级探针和磁性颗粒连接的磁性颗粒表面上的官能团的量显示出值小于15平方Å/功能组作为停车区。Ž

【表1】

	粒子径 (μm)	粒子比重 (g/cm^3)	表面カルボン酸 濃度 ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	パーキングエリ ア (平方Å)
実施例1	2.1	1.6	13	23
実施例2	2.1	1.6	11	27
実施例3	1.1	1.9	16	30
実施例4	1.1	1.9	12	40
比較例1	2.1	1.6	31	9.6
比較例2	2.1	1.6	4	74
比較例3	1.1	1.9	38	13