

(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2017-198706

(P2017-198706A)

(43) 公開日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(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 9 5	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 J	2 G O 5 4
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	2 G O 5 9
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	
GO 1 N 21/41 (2006.01)	GO 1 N 21/64 G	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-134577 (P2017-134577)	(71) 出願人	000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(22) 出願日	平成29年7月10日 (2017.7.10)	(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(62) 分割の表示	特願2014-551007 (P2014-551007) の分割	(72) 発明者	金子 智典 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
原出願日	平成25年11月8日 (2013.11.8)	(72) 発明者	磯田 武寿 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2012-266061 (P2012-266061)	Fターム(参考)	2G043 AA01 BA14 BA16 CA04 DA01 EA01 GA07 GB02 HA01 HA07 JA03 KA02 KA07 KA09 LA02 MA01
(32) 優先日	平成24年12月5日 (2012.12.5)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン励起増強蛍光分光法 (S P F S) を用いた免疫測定法における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 表面プラズモン励起増強蛍光分光法 (S P F S) を用いた免疫測定法において、検体中の夾雑物が S P F S のセンサ部 (一次抗体、固相化層、金属薄膜等) に非特異的に吸着することによって生じる非特異的シグナルの抑制方法を提供する。

【解決手段】 表面プラズモン励起増強蛍光分析法 (S P F S) を用いた免疫測定法 (一次抗体に替えて測定対象化合物に対するレセプターを用いる場合を含む) における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法であって、(1) 検体に酸又はアルカリを添加する前処理、(2) 検体に金属イオンを添加する前処理、及び(3) 検体を加熱する前処理、の少なくとも一つの前処理を行う非特異的シグナルの抑制方法である。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

表面プラズモン励起増強蛍光分析法 (SPFS) を用いた免疫測定法 (一次抗体に替えて測定対象化合物に対するレセプターを用いる場合を含む) における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法であって、

検体を加熱する前処理を行う非特異的シグナルの抑制方法。

**【請求項 2】**

前処理を行った検体についてのバックグラウンドに対するシグナルの比 (S/B) が前処理を行わない検体についての S/B より大きい請求項 1 に記載の非特異的シグナルの抑制方法。

**【請求項 3】**

前処理が、検体を 95 ~ 100 で 5 ~ 10 分間加熱する前処理である請求項 1 又は 2 に記載の非特異的シグナルの抑制方法。

**【請求項 4】**

検体が血漿又は血清である請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の非特異的シグナルの抑制方法。

**【請求項 5】**

測定対象化合物が糖タンパク質又は糖脂質である請求項 1 ~ 4 いずれかに記載の非特異的シグナルの抑制方法。

**【請求項 6】**

測定対象化合物がシアル酸を含む糖鎖を有する糖タンパク質又は糖脂質である請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の非特異的シグナルの抑制方法。

**【請求項 7】**

測定対象化合物が前立腺特異抗原 (prostate specific antigen、PSA) である請求項 6 に記載の非特異的シグナルの抑制方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、表面プラズモン励起増強蛍光分光法 (SPFS) を用いた免疫測定法における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法に関する。更に詳しくは、上記測定法において、検体中の夾雑物が SPFS のセンサ部に非特異的に吸着することによって生じる非特異的シグナルの抑制方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

ヒトや動物の血液、尿、その他の生体試料中に含まれる腫瘍マーカー、特定のタンパク質、その他の抗原を検出、定量することは、今日の医療分野における診断や生物、生化学の分野における研究において広く行われている。そして、微量の測定対象化合物 (抗原) を特異的に検出する方法として免疫測定法が用いられている。免疫測定法の一つに、一次抗体で捕捉した抗原を二次抗体を用いて標識するサンドイッチ法があり、二次抗体に蛍光標識抗体等を用いる方法が広く実施されている。二次抗体の代わりに、測定対象化合物が有する糖鎖と結合するレクチンを標識して用いる方法も知られている。

**【0003】**

また、免疫測定法において、抗原抗体反応により捕捉された標識蛍光分子を極めて効率的に励起し、高感度に検出する方法として、表面プラズモン励起増強蛍光分光法 (SPFS; Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy) が知られている。SPFS では、抗原より照射したレーザー光等の励起光が、金属薄膜表面で全反射減衰 (ATR; attenuated total reflectance) する条件において、金属薄膜表面に表面プラズモン (粗密波) を発生させることによって、光源より照射した励起光が有するフォトン量を数十倍 ~ 数百倍に増やして、表面プラズモン光の電場増強効果を得ることができる。そして、SPFS を用いた免疫測定法では、この電場増強効果により、金属薄膜の表面近傍に

10

20

30

40

50

捕捉した測定対象化合物と結合した蛍光物質を効率良く励起させ、増強された蛍光発光を観察することによって、極めて微量の測定対象化合物も測定可能となる。

【0004】

一方、血液（血清、血漿）のような生体試料中には、測定対象化合物以外に種々のタンパク質、脂質、その他の夾雑物が含まれており、免疫測定法において、これらの夾雑物が一次抗体や二次抗体あるいは抗体を固定化するための支持体等に非特異的に吸着し、この夾雑物に蛍光標識体が結合することにより、夾雑物由来の非特異的シグナルが発生し、バックグラウンドノイズの原因となる。特に、SPFSを用いた免疫測定法の場合は、化学発光法を用いた場合に比べ100倍以上の高感度を実現しており、そのため化学発光法では検出されなかった非特異的シグナルも検出され、測定感度の低下が起こる。また、SPFSの場合、夾雑物を介して蛍光標識体がセンサ部（一次抗体、固相化層、金属薄膜等）に僅かでも付着してしまうと、屈折率が変化して電場増強効果に影響を及ぼすことになり、その結果、蛍光測定のバックグラウンドノイズが不安定になり、高感度測定の障害となることもある。SPFSにおけるこの問題は、特に血清のようなクルードな検体の測定時に大きな問題となる。

10

【0005】

この問題に関して、SPFSにおけるセンサエリア上の非特異的吸着を防止する対策として、SPFS測定用流路において、フロー方向に対して上流に精製エリアを配置し、その下流にセンサエリアを配置するSPFS用センサチップが提案されている（特許文献1）。このように、SPFSにおける非特異的シグナルの抑制及びバックグラウンドノイズの低減については既に提案されているが、検体、測定対象化合物、測定目的、操作性、費用等に応じて、最も効果的な方法を選ぶことは重要であり、更なる提案が望まれている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開WO2012/023391号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS）を用いた免疫測定法において、検体中の夾雑物がSPFSのセンサ部（一次抗体、固相化層、金属薄膜等）に非特異的に吸着することによって生じる非特異的シグナルの抑制方法を提供することを課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、SPFSを用いた免疫測定法で生じる非特異的シグナルの原因は血漿、血清等の検体中の夾雑物がセンサ部に非特異的に吸着することであり、この夾雑物が測定対象化合物以外のタンパク質、脂質、等であるということに着目して検討した。その結果、この夾雑物の構造を特定の処理方法により変化（変性）させることで、夾雑物のセンサ部への非特異的吸着を抑制でき、夾雑物由来の非特異的シグナル（バックグラウンド）を大幅に低下させることができること、更に、測定対象化合物への影響を最小限に抑え、測定対象化合物由来のシグナルの低下を相対的に小さなものに留めることにより、測定において重視される前記バックグラウンドの値に対する当該シグナルの値の比率（S/B比）を向上させることができることを見出し、本発明を完成させた。

40

【0009】

すなわち、本発明の一側面では、本発明の非特異的シグナルの抑制方法は次の通りである。

表面プラズモン励起増強蛍光分析法（SPFS）を用いた免疫測定法（一次抗体に替えて測定対象化合物に対するレセプターを用いる場合を含む）における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法であって、

50

- (1) 検体に酸又はアルカリを添加する前処理、
- (2) 検体に金属イオンを添加する前処理、及び
- (3) 検体を加熱する前処理

の少なくとも一つの前処理を行うことを特徴とする非特異的シグナルの抑制方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、SPFSを用いた免疫測定法において、検体中の夾雑物がSPFSのセンサ部に非特異的に吸着することによって生じる非特異的シグナル(バックグラウンド)を大幅に低下させることができる。更に、本発明によれば、測定対象化合物への影響を最小限に抑えた上で、すなわち、測定対象化合物由来のシグナルの低下を相対的に小さなものに留めた上で、夾雑物由来の非特異的シグナルを抑制できる。

10

【0011】

その結果、本発明によれば、SPFSを用いた免疫測定法において、血漿や血清のような夾雑物を含む検体であっても、バックグラウンドノイズの低減及びバックグラウンドの値に対する測定対象化合物由来のシグナルの値の比率(S/B比)の向上を図ることができ、極めて微量な測定対象化合物のより正確な測定が可能となる。

【0012】

また、本発明で用いる前処理は複雑な工程を必要とせず、SPFS用のセンサチップに特殊な領域を配置する必要もないので、操作性やコストを犠牲にすることなく高い効果を得ることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本発明で使用する上で好適なSPFS用測定装置の全体構成を模式的に示す概略図である。

【図2】図2は、図1の測定装置のセンサチップ周辺の部分拡大図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、表面プラズモン励起増強蛍光分光法(SPFS)を用いた免疫測定法における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法である。以下に、本発明の非特異的シグナルの抑制方法について説明する。

30

【0015】

#### 1. 測定対象化合物

(1) 検体

本発明は、用いる検体は特に制限はなく、例えば、ヒトや動物の血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、細胞、組織及び器官及びこれらの調整物(例えば、生検標本)が挙げられる。特に、癌抗原、腫瘍マーカーを含む可能性のある血液、血清及び血漿は測定する生体試料として好適である。

【0016】

血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液等の液性の試料は、必要に応じて、適当な緩衝液により希釈して使用することができる。また、細胞、組織、器官等の固形の試料は、適当な緩衝液を加えてホモジェナイズして、懸濁液又はその上清を、そのまま、又は更に希釈して使用することができる。

40

【0017】

(2) 測定対象化合物

測定対象化合物は、免疫測定法でリガンド(抗体)によって捕捉可能な物質であればよい。また、サンドイッチ法の蛍光標識体としてレクチンを用いる場合は、糖鎖を有する物質を測定対象化合物とする。

【0018】

このような測定対象化合物としては、例えば、タンパク質(糖タンパク質を含む)、脂質(糖脂質を含む)、これらの修飾分子、複合体等を挙げることができ、好ましい測定対

50

象化合物としては、前立腺特異抗原 (prostate specific antigen、P S A ) その他の腫瘍マーカーが挙げられる。なお、前立腺癌患者の P S A の糖鎖が 2 , 3 - 結合または 2 , 6 - 結合したシアル酸を有することが知られている。

#### 【 0 0 1 9 】

##### 2 . 前処理

本発明では、( i ) 検体に酸又はアルカリを添加する前処理、( ii ) 検体に金属イオンを添加する前処理、及び、( iii ) 検体を加熱する前処理の少なくとも一つの前処理を実施する。これらの前処理を単独で行っても、組み合わせて行ってもよい。前処理は、検体中の夾雑物が S P F S のセンサ部に非特異的に吸着することを抑制するために行うため、検体を後述する S P F S 用測定装置の測定領域へ供給する ( センサチップの金属薄膜上の反応層に接触させる ) 前に行う。以下、それぞれの前処理について説明する。

10

#### 【 0 0 2 0 】

##### ( 1 ) 検体に酸又はアルカリを添加する前処理

添加する酸、アルカリに特に制限はなく、有機酸、無機酸いずれも使用可能である。

酸、アルカリは、検体中で所定の pH を維持するために、通常は緩衝液の形で検体に添加する。緩衝液は、目的とする pH に応じて適宜選択すればよく、例えば、pH 1 . 0 ~ 2 . 2 では塩酸 - 塩化カリウム緩衝液、pH 2 . 2 ~ 3 . 6 ではグリシン - 塩酸緩衝液、pH 3 . 0 ~ 6 . 2 ではクエン酸緩衝液、pH 3 . 0 ~ 5 . 6 では酢酸緩衝液、pH 2 . 6 ~ 7 . 0 ではクエン酸 - リン酸緩衝液、pH 5 . 8 ~ 8 . 0 ではリン酸緩衝液、pH 7 . 2 ~ 9 . 0 ではトリス - 塩酸緩衝液、pH 8 . 6 ~ 1 0 . 6 ではグリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液、pH 9 . 2 ~ 1 0 . 6 では炭酸 - 重炭酸緩衝液、pH 1 1 . 0 ~ 1 2 . 0 ではリン酸水素 2 ナトリウム - 水酸化ナトリウム緩衝液、等がある。

20

#### 【 0 0 2 1 】

添加後の検体の pH は、検体と測定対象化合物に応じて、その測定の目的から、検体中の夾雑物由来の非特異的シグナルが必要な程度に抑制され、測定対象化合物のシグナルの低下が許容できる範囲で選べばよい。特に、シアル酸を含む糖鎖は酸、アルカリ等の前処理で切断その他の変性が起こりやすく ( 特に糖鎖の末端に結合したシアル酸は切断されやすい )、測定対象化合物がシアル酸を含む糖鎖を有する糖タンパク質又は糖脂質である場合、特に、このような測定対象化合物を標識したレクチンを用いて測定する場合には、測定化合物のシグナル低下の許容範囲を考慮して合目的な範囲で前処理条件 ( 添加後の検体の pH ) を選ぶ必要がある。そのような前処理条件の範囲は ( 4 ) で後述する方法で評価し、適宜調整することができるが、一般的には、検体に酸を添加して検体の pH を 1 ~ 4 にする前処理又は検体にアルカリを添加して検体の pH を 8 ~ 1 1 にする前処理が好ましい ( 実施例 1 及び 3 の処理方法 1 ~ 5 を参照 ) 。

30

#### 【 0 0 2 2 】

処理時間は効果が得られる範囲で適宜選べばよく、例えば、所定の pH で室温にて 3 0 分放置すればよい。その後、必要に応じ、生理食塩水へのバッファー交換等により、検体の当初の pH 等へ戻せば良い。

#### 【 0 0 2 3 】

##### ( 2 ) 検体に金属イオンを添加する前処理

添加する金属イオンは、検体中の夾雑物であるタンパク質、脂質、等の変性を起こさせる金属イオンであればよく、特に、重金属イオンが好ましい。重金属イオンとしては、例えば、P b <sup>2+</sup>、C r <sup>3+</sup>、F e <sup>3+</sup>、F e <sup>2+</sup>、C d <sup>2+</sup>、N i <sup>2+</sup>、H g <sup>2+</sup>、C o <sup>2+</sup>、S n <sup>2+</sup>、S n <sup>4+</sup>、M n <sup>2+</sup>、M o <sup>3+</sup>、W <sup>3+</sup>、Z n <sup>2+</sup>、C u <sup>2+</sup>、A g <sup>2+</sup>等を挙げることができる。使用にあたっては、廃液等の環境汚染を考慮することが好ましく、この点からは、例えば、F e <sup>3+</sup>、Z n <sup>2+</sup>が好ましい。

40

#### 【 0 0 2 4 】

測定対象化合物が糖タンパク質や糖脂質等の糖複合体、特に、シアル酸を含む糖鎖を有する糖タンパク質又は糖脂質である場合には、「検体に金属イオンを添加する前処理」が好ましい。シアル酸を含む糖鎖は酸、アルカリ、加熱等の前処理で切断その他の変性が起

50

こりやすい（特に糖鎖の末端に結合したシアル酸は切断されやすい）が、この点、金属イオンは糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分へは影響がなく、タンパク質部分や脂質部分のみに作用する。従って、測定対象化合物が糖鎖を有する場合（特に、測定対象化合物がシアル酸を含む糖鎖を有する糖タンパク質又は糖脂質である場合）、「検体に金属イオンを添加する前処理」は測定対象化合物の糖鎖構造の変化を防ぎ、かつ、夾雑物の非特異的吸着を抑制する上で好ましく、サンドイッチ法の二次抗体に替えて標識したレクチンを用いて糖鎖を有する測定対象化合物を測定する場合には特に好ましい。

#### 【0025】

また、「検体に金属イオンを添加する前処理」は、検体を中性条件下で前処理することが可能であり、その後の抗原抗体反応へも特に影響がなく測定可能である。従って、前処理後は、金属イオンを除去することなく、そのままSPFSを用いた免疫測定法を行うことができ、また、必要に応じて、生理食塩水へのバッファー交換等により、添加した金属イオンを検体から除去した後、測定を行ってもよい。

10

#### 【0026】

金属イオンの添加方法は、特に制限はないが、通常は金属塩として添加する。金属塩としては、無機酸の塩や有機酸の塩として添加することができ、好ましくは、水溶性の塩として添加する。このような水溶性の塩は、例えば強酸の塩であり、一例として、 $Fe^{3+}$ の場合は $FeCl_3$ 、 $Fe_2(SO_4)_3$ 、 $Zn^{2+}$ の場合は $ZnCl_2$ 、 $ZnSO_4$ として添加すればよい。

#### 【0027】

添加する金属イオンの濃度は、夾雑物の吸着防止効果と測定対象化合物への影響の点から適宜選択すればよいが、通常は、 $10\ \mu M \sim 5\ M$ 、好ましくは、 $50\ \mu M \sim 100\ mM$ 、を添加する（実施例1及び3の処理方法6及び7を参照）。

20

#### 【0028】

##### (3) 検体を加熱する前処理

検体を加熱する前処理は、検体と測定対象化合物に応じて、その測定の目的から、検体中の夾雑物由来の非特異的シグナルが必要な程度に抑制され、測定対象化合物のシグナルの低下が許容できる範囲で選べばよい。特に、シアル酸を含む糖鎖は加熱等の前処理で切断その他の変性が起こりやすく（特に糖鎖の末端に結合したシアル酸は切断されやすい）、測定対象化合物がシアル酸を含む糖鎖を有する糖タンパク質又は糖脂質である場合、特に、このような測定対象化合物を標識したレクチンを用いて測定する場合には、測定化合物のシグナル低下の許容範囲を考慮して合目的な範囲で前処理条件（加熱温度及び時間）を選ぶ必要がある。そのような前処理条件の範囲は後述する方法で評価し、適宜調整できるが、一般的には、検体を $95 \sim 100$  で $5 \sim 10$ 分間加熱する前処理が好ましい（実施例2及び3の処理方法8を参照）。

30

#### 【0029】

加熱処理の方法は、特に制限はないが、例えば、市販のヒートブロックを用いて、所定の温度に設定して所定の時間、検体を加熱すればよい。

#### 【0030】

##### (4) 前処理条件の効果の評価方法

前処理条件の効果は、前処理を行った検体についてのバックグラウンドに対するシグナルの比（ $S/B$ ）と前処理を行わない検体についての $S/B$ とを比較することで評価することができる（実施例及び比較例を参照）。

40

#### 【0031】

ここで、検体のバックグラウンド（ $B$ ）とは、測定対象化合物を含まない検体について、SPFSを用いた免疫測定法で測定した場合のシグナルの値である。検体のシグナル（ $S$ ）とは、測定対象化合物を含む検体について、SPFSを用いた免疫測定法で測定した場合のシグナルの値である。両シグナルの値から $S/B$ を算出する（この場合の $S$ は、正確には $B$ の上乗せとして観察されるシグナル（ $S+B$ ）であるが、 $S$ に比べて $B$ が小さいことから、 $S/B$ の値をバックグラウンドに対するシグナルの比として用いる）。

50

## 【0032】

前処理を行った検体のS/B（後述の実施例1の処理方法1～7及び実施例2の処理方法8）と前処理を行わない検体のS/B（後述の比較例1の処理方法9）を比較し、前処理を行ったS/Bの値が前処理を行わない検体のS/Bに比べ、大きければ本発明の前処理の条件として使用できる。その大きさは、その測定の目的を考慮して決めればよく、前処理方法、検体、測定対象化合物などによっても変わってくるが、例えば、検体が血清であり、測定対象化合物が糖タンパク質又は糖脂質である場合には、サンドイッチ法の二次抗体として標識された抗体を用いる場合は、両S/Bの比、すなわち、（前処理を行った検体についてのS/B）/（前処理を行わない検体についてのS/B）は、好ましくは1.5以上、更に好ましくは2以上である。同様の検体と測定対象化合物の場合で、サンドイッチ法の二次抗体に替えて標識したレクチンを用いる場合は、両S/Bの比（前処理を行った検体についてのS/B）/（前処理を行わない検体についてのS/B）は、好ましくは5.0以上、更に好ましくは、6.0以上である。

10

## 【0033】

なお、上記のS/Bの測定において、測定対象化合物を含まない検体は、例えば、血清の場合は市販されているもの（正常ヒトプール血清）を用いることができる。測定対象化合物を含む検体は、この市販の血清に測定対象化合物の標準品（PSAの場合は、PSA産生細胞の培養上清から調製）を一定量加えて作製することができる。前処理を行った場合と前処理を行わない場合の検体は、使用する市販の検体、測定対象化合物添加量等は同条件で測定することは言うまでもない。

20

## 【0034】

## 3. 表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS）を用いた免疫測定法

本発明では免疫測定法（イムノアッセイ法）を用いており、抗原抗体反応でセンサ部に捕捉された標識蛍光分子をSPFSによって励起させ、増強させた蛍光発光を測定する。従って、本発明で用いる免疫測定法は、蛍光免疫測定法（蛍光イムノアッセイ法）であればいずれも使用可能であり、通常はサンドイッチ法が用いられる。以下に、サンドイッチ法を用いた本発明について説明する。

## 【0035】

## (1) 免疫測定法

## (a) リガンド

本発明で使用するリガンド（サンドイッチ法の一次抗体）は、測定対象化合物を特異的に認識して結合する抗体である。特に、測定対象化合物に対するモノクローナル抗体が好適である。なお、本発明では、測定対象化合物に応じて、そのレセプターもリガンドとして用いることができ、本発明の範囲には、サンドイッチ法の一次抗体に替えて測定対象化合物に対するレセプターを用いる場合も含んでいる。

30

## 【0036】

癌抗原、腫瘍マーカー等を測定対象化合物とする場合は、その抗原に特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体等）をリガンドとして用いることが適切である。例えば、ヒトPSA（前立腺特異抗原）を測定対象化合物とする場合は、抗ヒトPSA抗体を用いればよい。

40

## 【0037】

なお、上記のリガンド（サンドイッチ法の一次抗体）は測定対象化合物を特異的に捕捉する物質を意味し、完全抗体のみならず任意の抗体断片または誘導体を含み、完全抗体に加え、Fab、Fab'<sub>2</sub>、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体（ScFv）等の各種抗体も包含される。

## 【0038】

## (b) リガンドの固相化

本発明では、上記(a)のリガンドを通して測定対象化合物を捕捉し、捕捉した測定対象化合物に結合した蛍光標識分子をSPFSによって励起する必要がある。従って、リガンドはSPFSのセンサ部の金属薄膜上に固相化（固定化）する。金属薄膜上への固相化

50

の方法は通常の方法を用いればよく、詳細は後述のSPFSにおいて説明する。

【0039】

(c) 蛍光標識体

本発明では、上記(b)でリガンドを通してSPFSのセンサ部の金属薄膜上に捕捉された測定対象化合物を蛍光標識するために、二次抗体、レクチン、その他、通常のサンドイッチ法で使用可能な蛍光標識体が用いられる。

【0040】

二次抗体としては、例えば、測定対象化合物上のリガンド(一次抗体)とは別のエピトープを認識するモノクローナル抗体を使用し、蛍光標識抗体を作製することができる。

また、測定対象化合物が糖鎖を有する場合、その糖鎖と高い結合能で結合するレクチンもサンドイッチ法の蛍光標識体として用いることができる。レクチンとしては、リシンB鎖関連の「R型レクチン」、「カルネキシン・カルレティキュリン」、「C型レクチン」、「ガレクチン」、「豆科レクチン」、「L型レクチン」、「P型レクチン」、「アネキシン」、「I型レクチン」等、種々のものがあるが、目的にあったものを用いればよく、例えば、測定対象化合物が前立腺特異抗原(PSA)の場合はWFA(ノダフジレクチン)、SBA(ダイズレクチン)、TJA-III(キカラスウリレクチン)、測定対象化合物が $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)の場合はLCA(レンズマメレクチン)、AAL(ヒヨクチャワンダケレクチン)、AOL(アスペルギルス・オリゼレクチン)、測定対象が癌胎児性抗原(CEA)の場合はTJA-I(キカラスウリレクチン)等が挙げられる。

【0041】

蛍光標識体の作製方法は、例えば、蛍光物質にカルボキシル基を付与し、該カルボキシル基を水溶性カルボジイミド(WSC)とN-ヒドロキシコハク酸(NHS)とにより活性エステル化し、次いで活性エステル化したカルボキシル基と抗体又はレクチンが有するアミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて脱水反応させ固定化させる方法、その他を用いることができる。

【0042】

蛍光色素は特に限定されるものではないが、SPFSを用いる本発明においては、後述する蛍光測定を行う際に、金属薄膜に含まれる金属による吸光の少ない波長領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることが望ましい。例えば、金属薄膜として金を用いる場合には、金薄膜による吸光による影響を最小限に抑えるため、最大蛍光波長が600nm以上である蛍光色素を使用することが望ましい。したがって、この場合には、Cy5, Alexa Fluor(登録商標)647等近赤外領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることが特に望ましい。このような近赤外領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることは、血液中の血球成分由来の鉄による吸光の影響を最小限に抑えることができる点で、検体として血液を用いる場合においても有用である。一方、金属薄膜として銀を用いる場合には、最大蛍光波長が400nm以上である蛍光色素を使用することが望ましい。

【0043】

(2) 表面プラズモン励起増強蛍光分光法(SPFS)

表面プラズモン励起増強蛍光分光(Surface Plasmon-field enhanced fluorescence spectroscopy:SPFS)法(SPFS)は、誘電体部材上に形成された金属薄膜に全反射減衰(ATR)が生じる角度で励起光を照射したときに、金属薄膜を透過したエバネッセント波が表面プラズモンとの共鳴により数十倍~数百倍に増強されることを利用して、金属薄膜近傍に捕捉された測定対象化合物を標識する蛍光体を効率的に励起させ、その蛍光シグナルを測定する方法である。このようなSPFSは、一般的な蛍光標識法などに比べて極めて感度が高いため、サンプル中に測定対象化合物がごく微量しか存在しない場合であってもそれを定量することができる。SPFS法を用いる場合の測定部材は流路、ウエルのいずれの構成もとることができ、センサチップ、反応層、SPFSシステム、SPFS測定装置等は通常用いられているものを用いることができる。

【0044】

10

20

30

40

50

以下に、本発明で用いる表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS）について図1及び図2を用いて説明するが、本発明はこれに限定されるものではなく、SPFSの原理を用いた方法であればいずれも使用可能である。

【0045】

(a) SPFS用測定装置

SPFS用測定装置は、基本的に、SPFS用測定部材が着脱可能となっており、使用する蛍光体に応じた適切な波長の励起光（好適にはレーザー光）を照射するための光源、励起光をセンサチップの金属薄膜の裏面に所定の角度で入射させるためのプリズム（透明支持体が平面基板状のセンサチップを使用する場合）、金属薄膜で反射した光を受光しその強度を測定する受光器、蛍光体から発せられる蛍光を集光するためのレンズおよびその蛍光の強度を測定するための検出器、励起光および蛍光から所定の波長を有する光のみを透過させそれ以外の光をカットするための各種のフィルタなどを備える。

10

【0046】

免疫測定法に使用するSPFS用測定装置の例として、図1及び図2を示す。

図1は、本発明で使用する上で好適なSPFS用測定装置の全体構成を模式的に示す概略図である。図2は、図1の測定装置のセンサチップ周辺の部分拡大図である。

【0047】

図1及び図2に示すように、定量測定装置10は、鉛直断面形状が略台形であるプリズム形状の誘電体部材12と、この誘電体部材12の水平な上面12aに形成された金属薄膜14とを有するセンサチップ16を備えており、このセンサチップ16は、定量測定装置10のセンサチップ装填部18に装填されている。

20

【0048】

また、誘電体部材12の下方の一方の側面12bの側には、図に示すように、光源20が配置されており、この光源20からの入射光22が、誘電体部材12の外側下方から、誘電体部材12の側面12bに入射して、誘電体部材12を介して、誘電体部材12の上面12aに形成された金属薄膜14に向かって照射されるようになっている。

【0049】

また、光源20と誘電体部材12の間には、光源20から照射されるレーザー光を、金属薄膜14上で表面プラズモンを効率よく発生させるP偏光とするための偏光フィルタを設けることもできる。

30

【0050】

また、誘電体部材12の下方の他方の側面12cの側には、図5に示すように、入射光22が金属薄膜14によって反射された金属薄膜反射光24を受光する受光手段26が備えられている。

【0051】

なお、光源20には、光源20から照射される入射光22の、金属薄膜14に対する入射角 $\theta_1$ を適宜変更可能とする入射角調整手段（図示せず）が備えられている。一方で、受光手段26にも、図示しない可動手段が備えられており、金属薄膜反射光24の反射角が変わった場合にも、光源20と同期して、確実に金属薄膜反射光24を受光するように構成されている。

40

【0052】

なお、センサチップ16、光源20、受光手段26によって、定量測定装置10のSPR測定を行うSPR測定部28が構成されている。

また、センサチップ16の上方には、後述するような蛍光物質が励起されて発光した蛍光30を受光するための光検出手段32が備えられている。

【0053】

なお、センサチップ16と、光検出手段32の間には、例えば、カットフィルタや集光レンズなどを設けることもできる。

なお、センサチップ16、光源20、光検出手段32によって、定量測定装置10のSPFS測定を行うSPFS測定部34が構成されている。

50

## 【0054】

また、受光手段26および光検出手段32は、それぞれ、定量演算手段40に接続されており、受光手段26によって受光した金属薄膜反射光24の光量と、光検出手段32によって受光した蛍光30の光量とが、定量演算手段40に送信されるように構成されている。

## 【0055】

また、後述する実施例のセンサチップ16では、金属薄膜14の上面14aに流路36が形成されている。この流路36の一部には、測定対象化合物（アナライト）と特異的に結合する分子（リガンド）が固相化されたセンサ部38が設けられている。

## 【0056】

## (b) SPFS用測定部材

上記のSPFS用測定装置の内、SPFS用測定部材は、一般的に、サンドイッチ型免疫複合体を形成してSPFSによる蛍光測定を行うための場（測定領域）が形成されているセンサチップと、サンドイッチ型免疫複合体の形成などに用いられる各種の溶液（測定対象化合物を含む検体、蛍光標識体の溶液、その他の反応試薬等）を測定領域上に保持することができる流路またはウェルを構築するための部材とを積層化した構成をとる。

## 【0057】

センサチップは、基本的に、金属薄膜の裏面に励起光を導入するための透明支持体と、当該透明支持体上に形成された表面プラズモン共鳴を発生させるための金属薄膜と、当該金属薄膜上に形成された測定対象化合物をセンサ表面に捕捉するための反応層とを含み、更に必要に応じて、金属薄膜と反応層の間に形成された蛍光体が金属薄膜に近接しすぎることにより起こる蛍光の金属消光を防止するためのスペーサ層を含んでいてもよい。

## 【0058】

反応層が形成されている部位が測定領域に相当する。流路またはウェルの底面全域に反応層を形成して測定領域としてもよいし、底面の一部のみに（必要であれば所望のパターニングで）反応層を形成して測定領域としてもよい。測定領域の面積は、一般的にレーザー光として照射される励起光の照射面積を考慮しながら調整することができる。例えば、励起光のスポット径が1mm程度であれば、上記アッセイエリアは通常、少なくとも数mm四方の面積を有するものとなるよう設計される。

## 【0059】

SPFSのシステムを、密閉流路を通じて各種の溶液を送液する「流路型」とする場合、センサチップの上に、流路を形成するための穴のあいた「フローセル」を積載し、必要に応じてさらにその上に、上記フローセルの穴に対応する位置に送液導入口および送液排出口のあいた「天板」を積載し、これらを密着させて固定するようにして、測定部材を構築する。上記フローセルの穴に対応する位置のセンサチップ表面が、流路の底面をなし、そこに測定領域が形成される。流路型の場合、たとえばポンプやチューブを含む送液手段を用いて、各種の液体を送液導入口から流路内に送液して送液排出口から排出することができ、必要に応じて往復型、循環型の送液を行うこともできる。送液速度や送液（循環）時間などの条件は、試料の量や試料中のアナライトの濃度、流路ないしウェルのサイズや反応層の態様（固相化リガンドの密度等）、ポンプの性能等を考慮しながら、適宜調整することができる。

## 【0060】

一方、SPFSのシステムを、上記流路よりも広い空間に各種の溶液を貯留させる「ウェル型」とする場合、センサチップの上に、ウェルを形成するための貫通孔を有する「ウェル部材」を積載して固定することにより測定部材を構築する。ウェル型の場合、たとえばピペット状の部材を用いて、各種の液体をウェルに添加し、除去することができる。

## 【0061】

上記フローセルは、たとえばシート状のポリジメチルシロキサン（PDMS）製とすることができる。上記天板は、測定領域から発せられる蛍光を測定できるよう透明性を有する材料で作製され、たとえばプレート状のポリメタクリル酸メチル（PMMA）製とする

10

20

30

40

50

ことができる。あるいは、フローセルおよび天板を、成形加工やフォトリソグラフィにより所望の形状にしたプラスチック製とすることも可能である。

【0062】

センサチップ上にフローセルまたはウェル部材を密着させて固定する手段は特に限定されるものではなく、一般的には物理的に上下から圧力をかけるようにすればよく、必要であれば、透明支持体と同じ光屈折率を有する接着剤、マッチングオイル、透明粘着シートなどを用いてもよい。

【0063】

(c) リガンドの金属薄膜上への固相化

金属薄膜上へのリガンドの固相化(固定化)方法の例として、SAM (Self-Assembled Monolayer: 自己組織化単分子膜)を形成する方法を示す。

【0064】

SAMは、リガンド、好ましくは固相化層を固定化する足場として、またプラズモンセンサをサンドイッチアッセイに用いた際に蛍光分子の金属消光を防止する目的で、上記金属薄膜の、上記反応層側(透明支持体(図1及び図2では誘電体部材)とは接していないもう一方の表面)に形成される。

【0065】

SAMが含む単分子としては、通常、炭素原子数4~20程度のカルボキシアルカンチオール(例えば、(株)同仁化学研究所、シグマ アルドリッチ ジャパン(株)などから入手可能)、特に好ましくは10-カルボキシ-1-デカンチオールが用いられる。炭素原子数4~20のカルボキシアルカンチオールは、それを用いて形成されたSAMの光学的な影響が少なく、すなわち透明性が高く、屈折率が低く、膜厚が薄いなどの性質を有していることから好適である。

【0066】

このようなSAMの形成方法としては、特に限定されず、従来公知の方法を用いることができる。具体例として、金属薄膜がその表面に形成された透明支持体の該薄膜表面にマスク材からなる層が形成されたものを、10-カルボキシ-1-デカンチオール((株)同仁化学研究所製)を含むエタノール溶液に浸漬する方法などが挙げられる。このように、10-カルボキシ-1-デカンチオールが有するチオール基が、金属と結合し固定化され、金薄膜の表面上で自己組織化し、SAMを形成する。

【0067】

また、SAMを形成する前に「誘電体からなるスペーサ層」を形成してもよく、この場合、SAMが含む単分子としては、加水分解でシラノール基(Si-OH)を与えるエトキシ基(またはメトキシ基)を有し、他端にアミノ基やグリシジル基、カルボキシル基などの反応基を有するシランカップリング剤であれば特に限定されず、従来公知のシランカップリング剤を用いることができる。

【0068】

このようなSAMの形成方法としては、特に限定されず、従来公知の方法を用いることができる。

このような「誘電体からなるスペーサ層」の形成に用いられる誘電体としては、光学的に透明な各種無機物、天然または合成ポリマーを用いることもできる。その中で、化学的安定性、製造安定性および光学的透明性に優れていることから、二酸化ケイ素(SiO<sub>2</sub>)、二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)または酸化アルミニウム(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)を含むことが好ましい。

【0069】

誘電体からなるスペーサ層の厚さは、通常10nm~1mmであり、共鳴角安定性の観点からは、好ましくは30nm以下、より好ましくは10~20nmである。一方、電場増強の観点から、好ましくは200nm~1mmであり、さらに電場増強の効果の安定性から、400nm~1,600nmがより好ましい。

【0070】

10

20

30

40

50

誘電体からなるスペーサ層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法，電子線蒸着法，熱蒸着法，ポリシラザン等の材料を用いた化学反応による形成方法，またはスピニングによる塗布などが挙げられる。

#### 【0071】

固相化層は、上記SAMの、上記金属薄膜とは接していないもう一方の表面に形成され、3次元構造を有するものである。

この「3次元構造」とは、後述するリガンドの固定化を、「センサ基板」表面（及びその近傍）の2次元に限定することなく、該基板表面から遊離した3次元空間にまで広げられる固相化層の構造をいう。

#### 【0072】

このような固相化層は、グルコース，カルボキシメチル化グルコース，ならびにビニルエステル類，アクリル酸エステル類，メタクリル酸エステル類，オレフィン類，スチレン類，クロトン酸エステル類，イタコン酸ジエステル類，マレイン酸ジエステル類，フマル酸ジエステル類，アリル化合物類，ビニルエーテル類およびビニルケトン類それぞれに包含される単量体からなる群より選択される少なくとも1種の単量体から構成される高分子を含むことが好ましく、デキストランおよびデキストラン誘導体などの親水性高分子ならびにビニルエステル類，アクリル酸エステル類，メタクリル酸エステル類，オレフィン類，スチレン類，クロトン酸エステル類，イタコン酸ジエステル類，マレイン酸ジエステル類，フマル酸ジエステル類，アリル化合物類，ビニルエーテル類およびビニルケトン類それぞれに包含される疎水性単量体から構成される疎水性高分子を含むことがより好ましく、カルボキシメチルデキストラン（CMD）などのデキストランが生体親和性、非特異的な吸着反応の抑制性、高い親水性の観点から特に好適である。

#### 【0073】

CMDの分子量は、1kDa以上5,000kDa以下が好ましく、4kDa以上1,000kDaがより好ましい。

固相化層（例えば、デキストランまたはデキストラン誘導体からなるもの）は、その密度として $2\text{ ng/mm}^2$ 未満を有することが好ましい。固相化層の密度は、用いる高分子の種類に応じて適宜調整することができる。上記高分子が上記SAMに、このような密度の範囲内で固相化されていると、プラズモンセンサをアッセイ法に用いた場合に、アッセイのシグナルが安定化し、かつ増加するため好適である。なお、Biacoreライフサイエンス社製「Sensor Chip CM5」の密度は $2\text{ ng/mm}^2$ であった。この密度は、このCM5基板および金膜のみの基板を用いて、Biacoreライフサイエンス社製のSPR測定機器により得られた測定シグナルにおいて、平均2000RUを測定した結果、 $2\text{ ng/mm}^2$ と見積もられたものである。

#### 【0074】

固相化層の平均膜厚は、3nm以上80nm以下であることが好ましい。この膜厚は原子間力顕微鏡（AFM）などを用いて測定することができる。固相化層の平均膜厚がこのような範囲内であると、プラズモンセンサをアッセイ法に用いた場合に、アッセイのシグナルが安定化し、かつ増加するため好適である。

#### 【0075】

固相化層に含まれる高分子として、カルボキシメチルデキストラン（CMD）を用いた場合の、SAM表面に固定化する方法を具体的に説明する。

すなわち、好ましくは分子量1kDa以上5,000kDa以下であり、上述したようなカルボキシメチルデキストランを $0.01\text{ mg/mL}$ 以上 $100\text{ mg/mL}$ 以下と、N-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）を $0.01\text{ mM}$ 以上 $300\text{ mM}$ 以下と、水溶性カルボジイミド（WSC）を $0.01\text{ mM}$ 以上 $500\text{ mM}$ 以下とを含むMES緩衝生理食塩水〔MES〕に、透明支持体と金属薄膜とSAMとがこの順序で積層された基板を0.2時間以上3.0時間以下浸漬し、SAMにカルボキシメチルデキストランを固定化することができる。

#### 【0076】

得られた固相化層の密度は、反応点数（SAMの官能基数），反応溶液のイオン強度お

10

20

30

40

50

よび pH , ならびにカルボキシメチルデキストラン分子のカルボキシル基数に対する W S C 濃度によって調整することができる。また固相化層の平均膜厚は、カルボキシメチルデキストランの分子量および反応時間によって調整することができる。

【 0 0 7 7 】

#### 4 . 検体中の測定対象化合物の測定

検体中の測定対象化合物のシグナル測定は、通常の S P F S を用いた免疫測定法における手順に従って実施することができる。本発明の夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法は、測定対象化合物を定性的に検出する場合、定量的に測定する場合、いずれにも実施することができる。

【 0 0 7 8 】

測定対象化合物を定量的に測定する場合は、例えば、市販の生体試料（血清等）に測定対象化合物の標準品を添加して本発明の前処理を行った後、シグナルを測定して検量線を作成する。次いで、測定する生体試料に同様の前処理を行った後、シグナルを測定し、そのシグナル強度を検量線にあてはめて、測定対象化合物の濃度を知ることができる。

【実施例】

【 0 0 7 9 】

以下に実施例を示し本発明の詳細な説明を行うが、本発明はこれにより限定されるものではない。

（定量測定装置の構成）

以下の実施例においては、測定装置として、S P F S 測定装置を自作して使用した。当該 S P F S 測定装置は、上記 3 . ( 2 ) ( a ) 「 S P F S 用測定装置」の定量測定装置 1 0 と同様の構成である。以下の記載中の符号は、上記 3 . ( 2 ) ( a ) 、 図 1 及び 図 2 の符号と同じである。

【 0 0 8 0 】

なお、上記構成のうち、光源 2 0 として、波長 6 3 5 n m の光を照射することができるレーザーダイオード ( L D ) を用いており、光源 2 0 と誘電体部材 1 2 との間には、光学フィルタとして減光フィルタ ( 中性濃度フィルタ ) を設けてフォトン量を調整できるようにした。

【 0 0 8 1 】

また、誘電体部材 1 2 としては、シグマ光機 ( 株 ) 製の 6 0 度プリズムを用い、この誘電体部材 1 2 の上部に、後述する、プラズモン励起センサを固定することによって、センサチップ 1 6 を構成する。

また、センサチップ 1 6 の上部には、集光レンズとして対物レンズを備え、光検出手段 3 2 としては、光電子増倍管 ( P M T ) を用いた。

【 0 0 8 2 】

（プラズモン励起センサの作製）

屈折率 1 . 7 2 、厚さ 1 m m のガラス製の透明平面基板 ( ( 株 ) オハラ製の S - L A L 1 0 ) をプラズマ洗浄し、この基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法によって形成した。その後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法によって形成した。クロム薄膜の厚さは 1 ~ 3 n m 、金薄膜の厚さは 4 4 ~ 5 2 n m であった。

【 0 0 8 3 】

このようにして金薄膜が形成された基板を、1 0 - カルボキシ - 1 - デカンチオールを 1 m M 含むエタノール溶液に 2 4 時間以上浸漬し、金薄膜の表面に S A M 膜 ( S e l f - A s s e m b l e d M o n o l a y e r : 自己組織化単分子膜 ) を形成した。基板をこの溶液から取り出し、エタノールおよびイソプロパノールで洗浄した後、エアガンを用いて乾燥させた。

【 0 0 8 4 】

この基板に N - ヒドロキシコハク酸イミド ( N H S ) 0 . 5 m M と、水溶性カルボジイミド ( W S C ) 0 . 5 m M とカルボキシメチルデキストラン C M D - 5 0 0 - 0 6 I 4 ( 名糖産業製 : 平均分子量 5 0 万 , 置換度 0 . 5 1 ) 1 m g / m L とを含む 2 5 m M の M E S

10

20

30

40

50

緩衝生理食塩水および10 mMのNaCl溶液(pH 6.0)を0.8 mL滴下し20分間反応させSAM上にCMDを固相化した。

【0085】

高さ0.5 mmの流路となる溝を有し、溝の両端に貫通穴を有するポリジメチルシロキサン(PDMS)製シートを、CMD膜の表面が流路の内側となるように溝をCMD膜に対向させて基板の上に配置し、流路の外側のPDMS製シート上部から圧着して、ピスでPDMS製シート(流路36)とプラズモン励起センサとを固定した。

【0086】

(抗体の固相化)

[調製例1]

[抗PSA抗体固相化基板]

上記のとおりプラズモン励起センサを接続した外部流路に、超純水を10分間、その後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を20分間、ペリスタポンプによって、室温(25)、流速500 μL/分の条件で循環送液させ、プラズモン励起センサの表面を平衡化した。

【0087】

続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を50 mMと、水溶性カルボジイミド(WSC)を100 mMとを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を5 mL送液し、20分間循環させた後、抗PSAモノクローナル抗体(No.72、2.5 mg/mL、ミクリ免疫研究所製)溶液2.5 mLを30分間循環送液することで、SAM膜上に当該抗体を固相化し、抗PSA抗体固相化SAM膜を調製した。

その後、1重量%牛血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を30分間循環送液することによって、流路内の非特異吸着防止処理を行った。

【0088】

(標識抗体および標識レクチンの作製)

[作製例1]

[蛍光標識PSA抗体]

蛍光標識PSA抗体を、蛍光物質ラベリングキット「Alexa Fluor(商標名)647タンパク質ラベリングキット」(インビトロジェン社製)を利用して作製した。PSA抗体(2E2、ミクリ免疫研究所製)100 μg相当と、0.1 M重炭酸ナトリウムと、Alexa Fluor 647 reactive dyeとを混合し、室温で1時間反応させた後、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび限外濾過を行い、標識に利用されなかったAlexa Fluor 647 reactive dyeを取り除いて、蛍光標識PSA抗体を得た。その後、吸光度を測定し蛍光標識PSA抗体濃度を定量した。

【0089】

[作製例2]

[蛍光標識WFAレクチン]

蛍光標識WFAレクチンを、蛍光物質ラベリングキット「Alexa Fluor(商標名)647タンパク質ラベリングキット」(インビトロジェン社製)を利用して作製した。WFAレクチン(L-1350、Vector社)100 μg相当と、0.1 M重炭酸ナトリウムと、Alexa Fluor 647 reactive dyeとを混合し、室温で1時間反応させた後、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび限外濾過を行い、標識に利用されなかったAlexa Fluor 647 reactive dyeを取り除いて、蛍光標識WFAレクチンを得た。その後、吸光度を測定し標識レクチン濃度を定量した。

【0090】

<血清検体中のPSAの測定>

検体としてPSAフリープールヒト血清を用意した。また、陽性検体として、PSAフリープール血清に、LNCaP(ヒト前立腺癌細胞培養株)培養上清をPSA濃度1 ng

10

20

30

40

50

/mLとなるように添加した血清サンプルを調製し、実施例1～2における測定サンプルとした。なお、前記PSAフリープールヒト血清としては、コージンバイオ社から正常ヒトプール血清を購入し、ELISAにてPSA濃度が1pg/mL以下であることを確認した血清を用いた。

この実質的にPSAを含まない、非特異的反応を示す試料溶液50μLに対して各種検体前処理を施すことで観察されていた非特異的反応が抑制できるか検討を行った。

【0091】

[実施例1] 検体処理方法(酸処理(処理方法1, 2, 3)、アルカリ処理(処理方法4, 5)、重金属添加(処理方法6, 7))

試料溶液50μLに表1に示した緩衝液または金属塩溶液50μLを添加し、チューブ内で良く攪拌した。攪拌後室温にて30分間放置した。放置後、生理食塩水へバッファ交換を行いSPFS測定用サンプルとした。

【0092】

[実施例2] 加熱処理(処理方法8)

試料溶液50μLに生理食塩水を50μL添加し、100℃5分間加熱処理を行った。その後室温に放置し、SPFS測定用サンプルとした。

【0093】

[比較例1] 無処理(処理方法9)

試料溶液50μLに生理食塩水を50μL添加し、SPFS測定用サンプルとした。

【0094】

[実施例3] 陽性検体試料溶液の処理

上記実施例1、2および比較例1と同様の処理を陽性検体試料においても実施した。

【0095】

【表1】

表1

	緩衝液組成	緩衝液添加後のpH	最終的なpH
処理方法1	0.2 M 塩酸・塩化カリウム緩衝液 pH1.0	pH1.5	pH7.0
処理方法2	0.1 M グリシンHCL pH1.5	pH2.5	pH7.3
処理方法3	0.1 M グリシンHCL pH2.5	pH3.5	pH7.4
処理方法4	0.1 M トリスHCL pH9.0	pH8.6	pH7.4
処理方法5	0.1 M 炭酸・重炭酸緩衝液 pH10.6	pH10.2	pH7.6
処理方法6	100μM FeCl <sub>3</sub> , PBS(-) pH7.4	pH7.5	pH7.5
処理方法7	100μM ZnCl <sub>2</sub> , PBS(-) pH7.4	pH7.7	pH7.6
処理方法8	PBS(-) pH7.4 (加熱処理)	pH7.6	pH7.5
処理方法9	PBS(-) pH7.4	pH7.6	pH7.5

【0096】

<抗体 抗体測定系>

各測定サンプルを抗PSA抗体を固相化した基板(調製例1)と反応させ、その後、蛍光標識PSA抗体(作製例1)と接触させた。詳しくは以下の通りである。

【0097】

測定サンプルを流路に0.1mL添加し、流速200μL/分にて20分間循環送液させた。続いて、Tween20を0.05重量%含有するTBS(TBS-T)を送液して、5分間洗浄した。反応後、Alexa Fluor 647を標識したPSA抗体溶

液（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解したものを）を $0.1\text{mL}$ 添加し、流速 $200\mu\text{L}/\text{分}$ にて5分間送液した。再びTween 20を $0.05$ 重量%含有するTBS（TBS-T）を送液して、5分間洗浄した。その後、定量測定装置によって、SPFS測定を行った。

【0098】

SPFSの測定結果を表2に示す。表中のシグナル値は実測値であり、PSA添加血清のシグナル値はPSA由来のシグナル値+バックグラウンドのシグナル値として示されている。

【0099】

【表2】

表2

	バックグラウンド (B) (PSAが含まれない 血清測定時の値)	シグナル (S) (PSA添加血清測定 時の値)	S/B	S/B比 (注1)
処理方法1	15300	3200000	209	1.8
処理方法2	13200	3564000	270	2.4
処理方法3	14300	3770000	264	2.3
処理方法4	14200	3320000	234	2.1
処理方法5	16000	3270000	204	1.8
処理方法6	15000	3749000	250	2.2
処理方法7	17400	3658000	210	1.8
処理方法8	24000	2990000	125	1.1
処理方法9	34000	3892000	114	

（注1）（前処理を行った検体についてのS/B）/（前処理を行わない検体についてのS/B）

タンパク質を変性させる効果がある前処理を行うことで、生理食塩水にて希釈するのみの処理方法に比べて血清バックグラウンドが低下し、S/Bが大幅に向上することが確認できた。

【0100】

<抗体 レクチン測定系>

各測定サンプルを抗PSA抗体を固相化した基板（調製例1）と反応させ、その後、蛍光標識WFAレクチン（作製例2）と接触させた。詳しくは以下の通りである。

【0101】

測定サンプルを流路に $0.1\text{mL}$ 添加し、流速 $200\mu\text{L}/\text{分}$ にて20分間循環送液させた。続いて、Tween 20を $0.05$ 重量%含有するTBS（TBS-T）を送液して、5分間洗浄した。反応後、Alexa Fluor 647を標識したWFAレクチン溶液（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解したものを）を $0.1\text{mL}$ 添加し、流速 $200\mu\text{L}/\text{分}$ にて5分間送液した。再びTween 20を $0.05$ 重量%含有するTBS（TBS-T）を送液して、5分間洗浄した。その後、定量測定装置によって、SPFS測定を行った。

【0102】

SPFSの測定結果を表3に示す。表中のシグナル値は実測値であり、PSA添加血清のシグナル値はPSA由来のシグナル値+バックグラウンドのシグナル値として示されている。

【0103】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

	バックグラウンド (B) (P S A が含まれない 血清測定時の値)	シグナル (S) (P S A 添加血清測定 時の値)	S/B	S/B 比 (注 2)
処理方法 1	8000	200000	25	4.2
処理方法 2	7300	256700	35	5.8
処理方法 3	8800	278000	32	5.3
処理方法 4	9700	250000	26	4.3
処理方法 5	13000	254000	20	3.3
処理方法 6	9800	428000	44	7.3
処理方法 7	10800	410000	38	6.3
処理方法 8	32000	244000	8	1.3
処理方法 9	72600	432000	6	

10

(注 2) (前処理を行った検体についての S / B) / (前処理を行わない検体についての S / B)

20

タンパク質を変性させる効果がある前処理を行うことで、生理食塩水にて希釈するのみの処理方法に比べて血清バックグラウンドが低下し、S/Bが大幅に向上することが確認できた。また、酸、アルカリによる処理よりも重金属添加による処理ではシグナルにあまり影響することなく、バックグラウンドのみ低減させることに成功した。

【符号の説明】

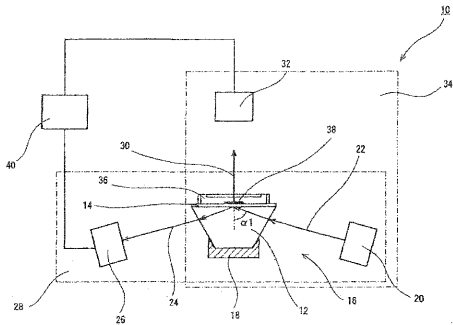
【 0 1 0 4 】

- 1 0 定量測定装置
- 1 2 誘電体部材
- 1 2 a 上面
- 1 2 b 側面
- 1 2 c 側面
- 1 4 金属薄膜
- 1 4 a 上面
- 1 6 センサチップ
- 1 8 センサチップ装填部
- 2 0 光源
- 2 2 入射光
- 2 4 金属薄膜反射光
- 2 6 受光手段
- 2 8 S P R 測定部
- 3 0 蛍光
- 3 2 光検出手段
- 3 4 S P F S 測定部
- 3 6 微細流路
- 3 8 センサ部
- 4 0 定量演算手段

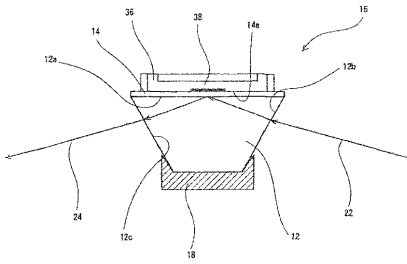
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 21/78 C  
G 0 1 N 21/41 1 0 1

Fターム(参考) 2G054 AA07 AA08 AB04 BA01 BB10 BB13 CA23 CA25 CE02 EA03  
FA06 FA10 FA12 FA17 FA19 FA32 GA03 GA04 GA05 GA06  
GB02 GE03 JA11  
2G059 EE07

专利名称(译)	使用表面等离子体激发增强荧光光谱法 ( SPFS ) 抑制免疫测定中来自杂质的非特异性信号的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017198706A</a>	公开(公告)日	2017-11-02
申请号	JP2017134577	申请日	2017-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	金子智典 磯田武寿		
发明人	金子 智典 磯田 武寿		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/64 G01N21/78 G01N21/41		
CPC分类号	G01N21/648 G01N33/5306 G01N33/54373 G01N2021/6439 G01N2333/42 G01N21/6428 G01N33/54393 G01N2440/38		
FI分类号	G01N33/543.595 G01N33/543.501.J G01N33/53.V G01N21/64.F G01N21/64.G G01N21/78.C G01N21/41.101		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA14 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB02 2G043/HA01 2G043/HA07 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/KA07 2G043/KA09 2G043/LA02 2G043/MA01 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BA01 2G054/BB10 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CA25 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/FA06 2G054/FA10 2G054/FA12 2G054/FA17 2G054/FA19 2G054/FA32 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GA06 2G054/GB02 2G054/GE03 2G054/JA11 2G059/EE07		
优先权	2012266061 2012-12-05 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 要解决的问题：提供使用表面等离子体激发增强荧光光谱 ( SPFS ) 的免疫测定方法，其中样品中的污染物非特异性地吸附到SPFS传感器部分（一抗，固定层，金属薄膜等）以及抑制由该方法产生的非特异性信号的方法。 解决方案：这是一种使用表面等离子体激发增强荧光分析（SPFS）（包括使用受体测量化合物代替一抗的情况），在免疫测定方法中抑制来自污染物的非特异性信号的方法（1）对试样中加入酸或碱的预处理至少一种预处理，（2）向试样中加入金属离子的预处理，和（3）加热试样的预处理是一种抑制特定信号的方法。【选择图】无

(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2017-198706 (P2017-198706A) (43) 公開日 平成29年11月2日 (2017.11.2)
(51) Int. Cl. G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01) G01N 21/41 (2006.01)	F I G O 1 N 33/543 5 9 5 G O 1 N 33/543 5 0 1 J G O 1 N 33/53 F G O 1 N 21/64 V G O 1 N 21/64 G	テームコード (参考) 2 G 0 4 3 2 G 0 5 4 2 G 0 5 9
(21) 出願番号 特願2017-134577 (P2017-134577) (22) 出願日 平成29年7月10日 (2017.7.10) (62) 分割の表示 特願2014-551007 (P2014-551007) の分割 原出願日 平成25年11月8日 (2013.11.8) (31) 優先権主張番号 特願2012-266061 (P2012-266061) (32) 優先日 平成24年12月5日 (2012.12.5) (33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(71) 出願人 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 110001070 (74) 代理人 特許業務法人 S S I N P A T (72) 発明者 金子 智典 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 磯田 武寿 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Fターム(参考) 2G043 AA01 BA14 BA16 CA04 DA01 EA01 GA07 GB02 HA01 HA07 JA03 KA02 KA07 KA09 LA02 MA01	審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 19 頁) 最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 表面プラズモン励起増強蛍光分光法 ( SPFS ) を用いた免疫測定法における夾雑物由来の非特異的シグナルの抑制方法	最終頁に続く	