

(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2004-108814  
(P2004-108814A)

(43) 公開日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/327	GO 1 N 27/30 3 5 7	2 GO 4 5
GO 1 N 27/12	GO 1 N 27/12 Z	2 GO 4 6
GO 1 N 27/416	GO 1 N 33/483 E	
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 27/46 G	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-268530 (P2002-268530)	(71) 出願人	000005821 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22) 出願日	平成14年9月13日 (2002.9.13)	(74) 代理人	100097445 弁理士 岩橋 文雄
		(74) 代理人	100103355 弁理士 坂口 智康
		(74) 代理人	100109667 弁理士 内藤 浩樹
		(72) 発明者	貫名 康之 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
		(72) 発明者	野村 幸生 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

最終頁に続く

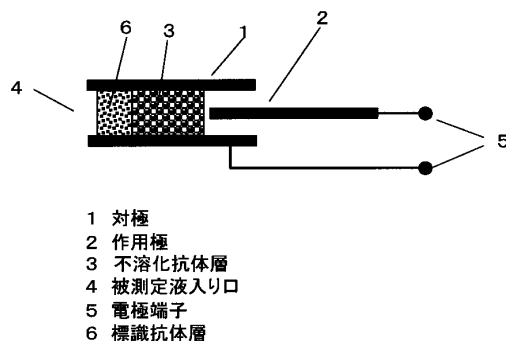
(54) 【発明の名称】 免疫電極センサー

(57) 【要約】

【課題】本発明は、免疫法の汎用性と、生体のレセプターのセンシングに見られる、感度、精度、簡便性、迅速性を併せ持ち、免疫反応を電気応答として取り出す免疫電極センサーを提供することを目的とする。

【解決手段】本発明では、イオンチャンネルマーカを標識にし、抵抗検出を標識検出の検出法として併用し、これに、抗原抗体反応の結果イオンチャンネルを遊離する手段を組み合わせ、被測定物である抗体を測定する。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被検物である抗体とは同一抗原に対応する認識部位の異なる脂溶性イオン伝導性物質で標識した可溶性の標識抗体と、前記標識抗体とは同一抗原に対応する認識部位の異なる不溶化抗体と、作用極と対極の一对の電極と、前記作用極表面に形成した脂質薄膜とを有し、前記標識抗原と被測定液中の抗体との接触により抗体と標識抗原との複合体を生成させ、未反応の前記標識抗原を不溶化抗体に結合させて除去し、抗体と標識抗原との複合体を脂質薄膜に吸着させ、脂質薄膜の電気伝導度の変化量をもって脂溶性イオン伝導性標識を検出し、被測定液中の抗体を検出する免疫電極センサー。

**【請求項 2】**

水溶性イオンと抱接化合物を生成する脂溶性物質、その抱接化合物、脂溶性キレート剤、そのキレート化合物、脂溶性イオン、内向けに極性基が配向し外向けに疎水基が配向する構造をもつポリマーまたはオリゴマー、の内の少なくとも1つを脂溶性イオン伝導性物質である請求項1記載の免疫電極センサー。

**【請求項 3】**

脂質薄膜が、単分子膜または重層膜である請求項1記載の免疫電極センサー。

**【請求項 4】**

脂質薄膜がイオウ原子を介して電極の金属材料と結合する請求項1記載の免疫電極センサー。

**【請求項 5】**

脂質薄膜表面が、疎水基、非イオン性親水基、陽イオン性解離基、陰イオン性解離基、両性イオン性解離基の内の少なくとも1つで覆われた請求項1記載の免疫電極センサー。

**【請求項 6】**

脂溶性イオン伝導性物質で標識した可溶性の標識抗体がモノクローナル抗体である請求項1記載の免疫電極センサー。

**【請求項 7】**

電気伝導度の変化量測定が交流加印あるいは直流バイアスを加えた交流加印である請求項1記載の免疫電極センサー。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、化学物質の電気化学的分析・測定に関するものである。

**【0002】****【従来の技術】**

特定物質を選択的に検出する方法には抗体を利用した方法が多く用いられる。

**【0003】**

抗体は特異的認識・結合を行う生体物質である。実験動物に抗原を感作させることにより多数の物質に対応する抗体を得ることが可能であり、汎用的に多種類の物質に対しセンシング法を構築することが可能である。抗体が特異的に抗原を認識して結合し複合体を形成する反応は、抗原抗体反応あるいは免疫反応と呼ばれる。この抗原抗体反応を利用して多くのセンシング法が開発されてきた。

**【0004】**

その内の一つは、特に標識物質を用いず、抗原抗体反応の結果生じる複合体を検出するので、目視で検出を行うABO血液型判定は古くから知られる例である。他にも、複合体をゲル濾過法で分子量分画して分析する液体クロマトグラフィーなどの検出法がある。

**【0005】**

しかしながら、この分野の多くのセンシング法は、抗体あるいは抗原に標識(マーカー)を結合させて用い、標識の検出手段との併用で利用され発展してきた。

**【0006】**

ラジオイムノアッセイは、ラジオアイソトープを標識とし、放射線をシンチレーションカ

10

20

30

40

50

ウンターあるいはラジオオートグラフィーなどで検出する。

【0007】

蛍光抗体法は、蛍光物質を標識とし、蛍光光度法、蛍光顕微鏡観察などの光学的検出を行う。

【0008】

酵素免疫法は、カラシ大根のパーオキシダーゼを標識とし、パーオキシダーゼ反応を利用した発光分析で検出するのが一般的である。また、この方法のバリエーションとして、酸化還元酵素を標識とし、酵素反応の結果である酸化性物質あるいは還元性物質の濃度変化を、電極電位あるいは電流滴定（電気分解）の電流として検出することは可能である。

【0009】

色素・顔料などの有色物質を標識とするものは、光度法または目視判定などで検出される。金コロイドやブルーラテックス粒子などが標識として用いられることが多い。これらは、濾紙などの基板上に標識抗体などを内蔵し、その上での検の移動を伴って抗原抗体反応の結果生ずる複合体を分離し、同じくその上で比色検出を行う簡易法である免疫クロマト法に利用されることが多い。

【0010】

他にも、マグネタイト粒子を標識とし、磁性を検出するなど、標識と標識の検出法の併用にはその組み合わせが多い。

【0011】

しかしながら、これらの免疫法には、課題も多い。

【0012】

ラジオイムノアッセイは、放射性物質の管理が大きな負担で、簡便な測定法にはなり得ない。

【0013】

各種の光学的検出法を用いる方法は、感度が悪い。あるいは、感度を上げるために増感を行うと、ノイズを拾い精度が悪くなる。

【0014】

また、免疫クロマト法などの簡易法は、測定に際し煩雑な操作は必要としないが、精度と感度の問題から、しきい値を設けた2値あるいは3値判定にならざるを得ない。

【0015】

一方、生体内において、選択的な特定物質の検出方法の典型的な例として、神経シナプスにおける、アセチルコリンレセプターによる、神経伝達物質アセチルコリンの認識・応答が知られている。

【0016】

アセチルコリンレセプターは、脂質二重層を貫通し、アセチルコリン認識部位を外側に向けて存在する。アセチルコリンレセプターのアセチルコリンの認識・結合は特異的で精度・感度が高い。アセチルコリンを認識・結合したアセチルコリンレセプターは、コンフォメーション変化により脂質二重層を貫通した、イオンチャネルを形成する。通常、脂質二重層の内外は、イオンの偏りによって電氣的に分極した状態にあるが、イオンチャネルを介してのイオンの移動・混合により脱分極がおこる。この脱分極状態がパルスとして神経細胞中を移動して、生体内の離れた部位に情報を伝達する（神経伝達）。

【0017】

この例のように、生体の検出は、精度・感度が高く、かつ、1ステップの簡便迅速なプロセスで認識情報が電気信号に変換されて以降の情報処理がなされるという点で、極めて合理性の高い検出法であると言い得る。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、この生体検出の生体外での検出技術は、生体からレセプターを抽出し、これを脂質二重層上に再構築するに止まり、生体がもつレセプターの種類に制約されて汎用的に多種類の物質に対して同等のセンシングを行うことができない。

10

20

30

40

50

## 【0019】

本発明は、免疫法の汎用性と、生体のレセプターのセンシングに見られる、感度、精度、簡便性、迅速性を併せ持ち、免疫反応を電気応答として取り出す免疫電極センサーを提供することを目的とする。

## 【0020】

## 【課題を解決するための手段】

本発明では、イオンチャンネルマーカを標識にし、抵抗検出を標識検出の検出法として併用し、これに、抗原抗体反応の結果イオンチャンネルを遊離する手段を組み合わせ、被測定物である抗体を測定する。

## 【0021】

すなわち、本発明の免疫電極センサーは、被検物である抗体とは同一抗原に対応する認識部位の異なる脂溶性イオン伝導性物質で標識した可溶性の標識抗体と、前記標識抗体とは同一抗原に対応する認識部位の異なる不溶化抗体と、作用極と対極の一对の電極と、前記作用極表面に形成した脂質薄膜とを有し、前記標識抗原と被測定液中の抗体との接触により抗体と標識抗原との複合体を生成させ、未反応の前記標識抗原を不溶化抗体に結合させて除去し、抗体と標識抗原との複合体を脂質薄膜に吸着させ、脂質薄膜の電気伝導度の変化量をもって脂溶性イオン伝導性標識を検出する。

10

## 【0022】

このような標識と標識検出を併用することにより、免疫法の汎用性と、生体のレセプターのセンシングに見られる、感度、精度、簡便性、迅速性を併せ持ち、免疫反応を電気応答として取り出す免疫電極センサーが可能となる。

20

## 【0023】

## 【発明の実施の形態】

請求項1に記載の本発明は、被検物である抗体とは同一抗原に対応する認識部位の異なる脂溶性イオン伝導性物質で標識した可溶性の標識抗体と、前記標識抗体とは同一抗原に対応する認識部位の異なる不溶化抗体と、作用極と対極の一对の電極と、前記作用極表面に形成した脂質薄膜とを有し、前記標識抗原と被測定液中の抗体との接触により抗体と標識抗原との複合体を生成させ、未反応の前記標識抗原を不溶化抗体に結合させて除去し、抗体と標識抗原との複合体を脂質薄膜に吸着させ、脂質薄膜の電気伝導度の変化量をもって脂溶性イオン伝導性標識を検出し、免疫反応を電気応答として取り出す。

30

## 【0024】

免疫法の汎用性と、生体のレセプターのセンシングに見られる、感度、精度、簡便性、迅速性を併せ持ち、免疫反応を電気応答として取り出す免疫電極センサーを与える。

## 【0025】

請求項2に記載の本発明は、請求項1に記載の発明の、脂溶性イオン伝導性物質が、水溶性イオンと抱接化合物を生成する脂溶性物質、その抱接化合物、脂溶性キレート剤、そのキレート化合物、脂溶性イオン、内向きに極性基が配向し外向きに疎水基が配向する構造をもつポリマーまたはオリゴマー、の内の少なくとも1つである免疫電極センサーであり、標識の種類が増える。

## 【0026】

請求項3に記載の本発明は、請求項1に記載の発明の脂質薄膜が、単分子膜あるいは重層膜である測定法であり、高感度を安定して保持できる。

40

## 【0027】

請求項4に記載の本発明は、請求項1に記載の発明の脂質薄膜がイオウ原子を介して電極の金属材料と結合する免疫電極センサーであり、脂質薄膜を容易に作成することができる。

## 【0028】

請求項5に記載の本発明は、請求項1に記載の発明の脂質薄膜表面が疎水基、非イオン性親水基、陽イオン性解離基、陰イオン性解離基、両性イオン性解離基の内の少なくとも1つで覆われた免疫電極センサーであり、測定の感度、測定範囲、応答速度を制御すること

50

ができ、さらに、絶縁耐性を高めることができる。

【0029】

請求項6に記載の本発明は、請求項1に記載の発明の脂溶性イオン伝導性物質で標識した可溶性の標識抗体にモノクローナル抗体を使用する免疫電極センサーであり、一般のポリクローナル抗体使用時の抵抗測定の応答性の低下を回避することができる。

【0030】

請求項7に記載の本発明は、請求項1に記載の発明の電気伝導度測定が交流加印あるいは直流バイアスを加えた交流加印である免疫電極センサーであり、電気応答を外部に取り出すことができる。

【0031】

【実施例】

(実施例1)

本発明第1の実施例を図1図2をもとに説明する。図1は本発明のセンサーの全体構成例を示す図で、図中1は筒状の対極、2は対極1内に先端を挿入した作用極である。6は標識抗体層でありセルロースパウダーに標識抗体を塗布して充填したものである。3は筒状の対極1の内部に粒状の不溶化抗体を充填した不溶化抗体層である。4は被測定液入り口であって、抗体を含む電解質水溶液である被測定液は、ここより標識抗体層に入り、不溶化抗体層3を毛細管現象により通過して作用極2の先端に達し、作用極と接触する。

【0032】

図2は、図1の内部構成を被測定液の移動とともに説明した図で、11は被測定液12中の抗体で本例の被測定物にあたる。被測定液12は毛細管現象により標識抗体層6に入る。ここには、被測定物である抗体12とは異なる抗原の認識部位を持った抗体13、にマーカ-15を結合させた標識抗体16に、さらに被測定物である抗体11に対応する抗原14を抗原抗体反応により結合させた1次複合体が塗布されている。このマーカ-15は脂溶性イオン伝導性物質である。この1次複合体16は被測定液12に溶けて遊離状態となる。被測定液に含まれる抗体11は、1次複合体16と抗原抗体反応で結合して2次複合体18となる。

【0033】

このようにしてできた、2次複合体18と未反応の遊離の1次複合体17は、次の不溶化抗体層に入る。ここには、不溶化基材20の表面に、抗体11と同じ抗体19があらかじめ結合して、合わせて不溶化抗体24を形成している。この不溶化抗体24に対して未反応の1次複合体17が抗原抗体反応により結合する。一方の2次複合体18の抗原部は、既に抗体と結合しており、不溶化抗体24と結合することができない。このために、被測定液から1次複合体17だけが選択的に除去される。

【0034】

このようにして残った2次複合体18が、被測定液の移動にともない作用極1に達し、作用極1と対極2が被測定液を介して接続されることとなる。

【0035】

ここで21は1の作用極上に形成された脂質分子22からなる脂質単分子膜であり脂質薄膜である。12は、1、2の両電極の間を満たす電解質水溶液で、本構成例の中では、不溶化抗体層を通過した被測定液である。その電解質濃度は、体液あるいは尿程度の塩濃度を想定している。

【0036】

本例の脂質薄膜である脂質単分子膜は、面積1平方センチメートルのもとで10の8乗オーム程度の高い抵抗を有する。これは電解質のイオン伝導の抵抗(通常は導電率で表される)や、電極表面の抵抗に比べて著しく高く、測定系全体の抵抗は近似的に脂質単分子膜の抵抗となっている。電解質水溶液中の2次複合体18は電解質溶液中を拡散して脂質単分子膜に至る。この時、図2中の23のようにマーカ-部は脂質単分子膜に吸着し取り込まれて、脂質単分子膜に導電性を付与し膜抵抗が下がる(電気伝導度が上がる)。前述のように測定系全体の抵抗は膜抵抗であるので、抵抗の減少分、あるいは電気伝導度の上昇

10

20

30

40

50

分が吸着による寄与分である。

【0037】

ところで、脂質単分子膜を作用極と対極との間に置かれた電気回路と見た場合、脂質単分子膜に取り込まれたマーカーとマーカー、マーカーとベースの脂質単分子膜の関係は、抵抗の並列接続回路となる。この場合の計算処理は、電気伝導度を用いると、各部分の電気伝導度の総和が、全膜の電気伝導度となるので計算処理が容易である。すなわち、マーカーの取り込まれていない脂質単分子膜部分を近似的に電気伝導度ゼロとして、取り込まれたマーカー数と電気伝導度が比例関係を持つ。

【0038】

一方、マーカーの取り込み現象は、一般的吸着現象であり、時間に対するマーカーの吸着量の関係は、飽和曲線を描く。このとき、平衡吸着量と吸着の初速度が電解質溶液中のマーカー濃度（これは、複合体濃度でもある）に比例する。従って、測定の平衡時の電気伝導度、または、電気伝導度の接液初期の立ち上がり傾きがマーカー濃度に比例するのでこの関係から標識抗原と抗原の複合体濃度を算出することができる。

10

【0039】

また、作用極に至る2次複合体18の濃度は、そのまま初期に被測定液にあった抗体濃度であるので、前述の通り、測定の平衡時の電気伝導度、または、電気伝導度の接液初期の立ち上がり傾きがそのまま被測定液中の抗原濃度に比例するのでこの関係から被測定物である抗原の濃度を算出することができる。

【0040】

以上は、比例領域を用いた測定であり、比例領域を用いるのが簡単である。しかし、比例領域でなくとも、抗体濃度と応答の間に1対1の関係が成り立てば抗体濃度の測定は可能である。比例領域以外は、別途検量線を作成し、検量線上の応答と抗体濃度の対応として求めることができる。

20

【0041】

また、脂質単分子層に対する、マーカー1個の吸着による電気伝導度の上昇は、10のマイナス8乗ジーマンス程度あり、これは、高精度の抵抗測定で一分子の被測定物の検出が可能であり、マーカーの検出感度は極めて高いものであり、測定の感度は極めて高い。

【0042】

以上述べたように、本発明の測定法は本質的に抵抗（電気伝導度）変化を観測して被測定物質濃度を求めるものであり、電気分解の電流を測定する他の測定法や電極電位を測定する他の測定法との区別は明確である。しかしながら、外部電源（図1に図示せず）に対する応答と考えるならば、一定電圧印加状態での電流値は、電気伝導度と同義であるので、電流を観測しても良いことになる。従って、本発明で言う電気伝導度あるいは抵抗は、膜の抵抗変化を観測するものであればその測定手法あるいは表示の単位系は何であっても良い。

30

【0043】

（実施例2）

本発明第2のマーカーの実施例を、標識抗体の構造例を示す図3の化学構造式を用いて説明する。

40

【0044】

図3中31は抗体であり、32はそのチオール残基である。35は抗体タンパク鎖のカルボキシル末端である。33はアミノベンゾ-15-クラウン-5残基であり脂溶性イオン伝導性の標識（マーカー）の一例である。34は抗体とマーカーとをつなぐ二価架橋試薬であるN-(4-マレイミドブチロキシ)スクシニミドの残基である。33のマーカー部は、クラウン化合物の1種であり、電気陰性度の高い酸素を分子を内側に向け、その内部に大きさの定まった空間を持つ。このため、この空間には、空間の大きさに適合し電氣的に陽性の化学種を取り込み易い。本例の15-クラウン-5構造では、ナトリウムイオン、カリウムイオンを主に包接する。一方では、クラウン化合物は外側を囲うようにハイドロカーボンを向けており、この部分は疎水性であって油に溶解しやすい。このような性質

50

のためにクラウン化合物は、水溶液から移動して脂質薄膜に溶解（吸着）して取り込まれ、脂質薄膜内にイオンを持ち込む。このイオン伝導でのイオンの移動は、脂質薄膜が薄く、クラウン化合物の分子サイズ程度である場合には、クラウン化合物内部の空間が、脂質薄膜の貫通孔となって、イオンの直接通過により行われる。脂質薄膜が厚くなれば、イオンを抱接した抱接化合物イオンが脂質薄膜内を電気泳動することにより行われる。これは、脂溶性イオンによるイオン伝導である。従って、吸着マーカー当たりの導電性の増加は、脂質薄膜が薄い方が大きく、感度が高い。

#### 【0045】

クラウン化合物と同様にイオンを抱接する、脂溶性イオン伝導性物質に、天然物で抗生物質であるバリノマイシンなど多種類の化合物が知られている。これらはニュートラルイオンキャリアーあるいはイオノフォアなどと呼ばれ、実用上はイオン電極などに応用されている。これらの化合物は、アミノベンゾイル - 15 - クラウン - 5 のアミノ基のように架橋に利用できる修飾基を導入するならば、すべて脂溶性イオン伝導性のマーカーとして利用できる。

10

#### 【0046】

親水基の修飾を受けていないポルフィリン化合物は脂溶性物質である。クラウン化合物と同様に内部に空間を有する化合物であるが、内向けにアミンが並ぶ点がクラウンと大きく異なる。ポルフィリン化合物はその内部に金属陽イオンを取り込みアミンとの間に配位結合を形成した金属キレート形成する。この金属キレートは脂質薄膜に取り込まれ、前述抱接化合物と同様に脂質薄膜にイオン伝導性を与える。また、ポルフィリン化合物の内部に向かつて並ぶアミンは、陽イオン性の解離基であって、ポルフィリン化合物自身は脂溶性のイオン性物質である。このため、前述の抱接イオンと同様に、脂溶性イオンによるイオン伝導性を脂質薄膜にあたえる。ポルフィリン化合物は架橋に利用できる修飾基を導入するならば、脂溶性イオン伝導性のマーカーとして利用できる。

20

#### 【0047】

ポルフィリンと類似の構造を持ち、ポルフィリンと同様のイオン伝導性を与える物質にフタロシアンがある。また、脂溶性イオンとして脂質薄膜にイオン伝導性を与える物質として、長鎖のアルキル基を有するアミン類がある。また、金属キレートを作り、これが脂質薄膜に吸着してイオン伝導性を示す物質には、多くの疎水性のキレート剤が市販されている。これらはいずれも架橋に利用できる修飾基を導入するならば、すべて脂溶性イオン伝導性のマーカーとして利用できる。

30

#### 【0048】

また、アミノ酸である L - アラニンがペプチド結合（アミド結合）したポリマーあるいはオリゴマーはペプチド主鎖の極性基間の水素結合のために、ヘリックス構造をとり、螺旋状の主鎖の極性基を内に配向し、これを疎水基であるハイドロカーボン側鎖が取り囲む立体構造をとる。結果、親水部を中心に周囲を疎水基が取り囲んだ筒状構造ができる。この筒状物質は外側を覆う疎水基のために脂溶性で、脂質薄膜に取り込まれ、親水部がイオンの貫通孔として働き、脂質薄膜にイオン伝導性を与える。この時、イオン伝導に参与するイオン種はサイズが小さく移動の容易な水素イオンが中心である。このポリマーまたはオリゴマーを用いて標識抗原を作るための架橋反応は、N末端のアミノ基に対して行うことができる。

40

#### 【0049】

##### （実施例3）

本発明第3の脂質薄膜の実施例を、脂質薄膜の構造を示す図4をもとに説明する。図4中の51は金属銅の電極である。52は脂質分子であって、これが銅表面を覆って単分子膜をなしており、51の金属銅の電極と合わせて作用極をなしている。本例の脂質分子原料は6 - アミノ - メルカプトヘキサンである。脂質分子と銅とは、イオウ原子53を介して結合する。55は末端の修飾基であるアミノ基である。54はハイドロカーボン鎖であって、この層は疎水性で脂質薄膜の高抵抗の主体である。本例の単分子膜は、脂質薄膜としては究極の薄さを持ち、かつ均一な厚みをもつ。前述したごとく、脂質薄膜は薄い方が高

50

感度である。しかも、均一であってどの部位でも等しい感度を出し得るので、安定した高感度が得られる。ハイドロカーボン鎖長の影響は、鎖長が長くなるほど、感度が下がるが、C18程度までは影響は小さい。一方、測定時に電圧を印加した場合、過剰な印加にたいしマーカがないハイドロカーボン層をイオンが貫通して絶縁破壊が起こるが、絶縁耐性はハイドロカーボン鎖長が長い方が高く有利である。

【0050】

末端修飾基は修飾基の種類により、特徴ある挙動を示す。これについては後述する。

【0051】

また、末端修飾基がメチル基である単分子膜に、長鎖のハイドロカーボンをもつカルボン酸（これは高級脂肪酸とよばれる）あるいは長鎖のハイドロカーボンを持つ1から4級アミンを水中で作用させると、長鎖のハイドロカーボンが単分子層に向けて配向し、カルボキシル基あるいはアミン基が水に向けて配向し、容易に2重層の脂質膜が得られる。この2分子膜の脂質薄膜は、単分子膜と同様に均一であり、単分子膜に次いで感度が高く、単分子膜以上に絶縁耐性が高い、好ましいものである。

10

【0052】

また、2分子膜などの重層膜はLB膜（ラングミュア・プロジェット膜）を電極上に作成することによってもできる。

【0053】

以上のように、本実施例によれば、脂質薄膜を、単分子膜あるいは重層膜にすることにより、高感度を安定して保持することができる。

20

【0054】

（実施例4）

本発明第4の脂質薄膜の実施例を、前出図4をもとに説明する。図4中の53はイオウ原子であり、その原料であった6-アミノ-メルカプトヘキサンではチオヒドリル基として存在していたものである。チオヒドリル基は銀、銅、鉄、タングステンなどの多くの金属に作用して容易に結合する。その結合が、図4中の53に示すイオウ原子を介しての電極金属との結合である。このように、チオヒドリル基を有するハイドロカーボンは金属電極上に容易に脂質単分子膜を形成することができる。そのようにしてできた単分子膜は自己組織化単分子膜と呼ばれる。本発明は、これを応用したものであって、容易に均質高感度な作用極を作成することができる。

30

【0055】

同様の自己組織化単分子膜を生成するものに、トリアジン環に2つのチオヒドリル基を導入したトリアジチオール基を有する長鎖のハイドロカーボンが知られる。この場合も、トリアジチオールのチオヒドリル基が金属との結合を行い、単純なチオヒドリル基のみの結合と同様な、均一で高感度の脂質薄膜を有する作用極ができる。

【0056】

（実施例5）

本発明第5の脂質薄膜の実施例を、前出図4と図3を用いて説明する。図4中の55は、脂質単分子膜の末端修飾基であるアミノ基である。アミノ基は陽イオン性の解離基であり、電解質溶液（被測定液）中の陰イオンを吸着してイオン対を作る。一方、既に図3に示した標識抗体は、さらに、抗原と抗体とを結合した2次複合体となつて、作用極の脂質単分子膜に到達する。抗体は図3の35のカルボキシル基を持つ。このカルボキシル基は陰イオン性の解離基である。そのために、2次複合体は、図4の脂質薄膜表面のアミノ基との間にイオン対を作つて吸着し、脂質薄膜表面に複合体が濃縮されることとなる。この濃縮状態から脂溶性イオン導電性物質であるマーカ部33が、さらに54のハイドロカーボン層に取り込まれる。このためにマーカ部の平衡吸着量が大きく、かつ吸着速度が大きくなる。平衡吸着量の増大に伴い、測定できるマーカの測定範囲が大きくなる。また、吸着速度の増加にともない、測定の応答速度が大きくなる。

40

【0057】

同じことが、標識抗体に1から4級アミンなどの陽イオン性の解離基を導入し、脂質薄膜

50

の表面をカルボキシル基などの陰イオン性の解離基で覆った時にも起こる。すなわち、標識抗原と脂質薄膜表面の解離基が逆符号である場合は、平衡吸着量の増大と吸着速度の増大が起こる。

【0058】

また、標識抗原と脂質薄膜表面の解離基が同符号である場合には、標識抗原は脂質薄膜表面に近づきにくくなり、そのためにマーカー部の平衡吸着量は小さくなり、吸着速度も小さくなる。

【0059】

また、脂質薄膜表面が、水酸基、フォルムアミド基などの非イオン性の極性の大きな親水基で覆われた場合と、疎水基のメチル基であった場合とでは、平衡吸着量に大きな差は無いが、吸着速度は親水基を用いた方が速い。脂質表面が親水基で覆われた場合、被測定液中の水分子との間に水素結合ができ、その分脂質薄膜界面での水分子間の水素結合が減少する。このため水分子との間に水素結合を作らない疎水基の場合に比べ、界面張力が小さくなり、小さな力で界面を破ってマーカーが脂質薄膜のハイドロカーボンの疎水層に侵入できるからである。

10

【0060】

また、脂質薄膜表面が前述のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質のように、アミンの陽イオン性解離基とリン酸エステルなどの陰イオン性解離基の両者をもつ両性イオン性電解質で覆われた場合、脂質薄膜表面にリン酸エステルなどの陰イオン層とアミンの陽イオン層が重層された脂質薄膜の表面構造ができる。この陽イオン層は陽イオンを排斥し、陰イオン層は陰イオンを排斥する。このため、この重層構造を通して陽イオンが通過することも、陰イオンが通過することも阻止するので、脂質薄膜の抵抗が上昇し、さらにイオンが脂質薄膜を貫通して移動するために起こる、絶縁破壊に対しても強くなる。

20

【0061】

以上のように、脂質薄膜の表面基は、平衡吸着量、吸着速度をに關係し、抗体の測定範囲、応答速度を制御でき、また脂質薄膜の抵抗に關与し、絶縁耐性を高めることができる。

【0062】

(実施例6)

本発明第6の抗体の実施例を図5の不溶化抗体の構成例および図6の1価抗体の作成例をもとに説明する。

30

【0063】

図5中の53は被測定物である抗体と同じ抗体である。51は本例で不溶化基材として選んだポリスチレンビーズである。ポリスチレンはハイドロカーボンの主鎖にフェニル基の側鎖が結合した分子構造を有する。このポリスチレンに臭素分子を作用させると、フェニル基の水素が臭素原子と置換した臭素化ポリスチレンが得られる。この臭素化ポリスチレンは活性であって、抗体などのタンパクと反応してフェニル基を介した架橋結合ができる。図1の3に示す不溶化抗体層はこのようにして得た不溶化抗体を筒状の対極に充填したものである。また、例示の方法以外にも、不溶化の方法は多種類あり、また、その形状もビーズ以外に多種類のものが知られる。本発明は、これらを限定しない。

40

【0064】

モノクロナール抗体の実施例を説明する。ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウシなどの実験動物に抗原を感作させることにより、抗原に対応する多種類の抗体が血漿中に生産される。実験動物の体内では、抗体を生産する免疫細胞は、1細胞1抗体であって、多数の免疫細胞が同一の抗原に対する、別の抗体を生産することにより抗体の多様性ができる。このような抗体はポリクロナール抗体と呼ばれる。これに対し、一つの免疫細胞のみを取り出し、骨髄腫細胞との細胞融合などで不死化(あるいは幼若化)した細胞は、ただ1種の抗体を作る。この抗体は、モノクロナール抗体と呼ばれる。

【0065】

ポリクロナール抗体は、同一抗原内の、別個の認識位置を認識して結合する多数の抗体の

50

混合物である。多数の抗体の中には、すでに抗原抗体反応で結合した2次複合体の抗原部に別の認識部をもち結合能力を有するものが存在する。そのため、2次複合体がポリクローナル抗体でできた不溶化抗体で除去され作用極に達することができない。

【0066】

これに対し、モノクローナル抗体では、同一の認識位置をもつ抗体は除去されないで、必ず作用極に到達し、電気伝導度測にかかるといえる。

【0067】

(実施例7)

本発明第7の電気伝導度測定の実施例について図2をもとに説明する。図2中の1、2は脂質薄膜を挟むように設置された一对の電極である。抵抗を測定するには、脂質薄膜の両側に電位差を付ける。これは、外部電源(図示せず)より一对の電極を介して行う。

10

【0068】

外部電源を用いる場合には、電圧にたいする電流の応答から抵抗を求める。また、ホイストンブリッジ回路の抵抗の一つに替えて、電極・電解質水溶液・脂質薄膜からなる図2の構成の回路を用い、ブリッジ回路の平衡条件から既知抵抗との比として求めることもできる。

【0069】

しかしながら、外部電源が直流電圧の印加である場合には、イオンの移動に従って、化学ポテンシャルが変化して逆電位が発生し、外部電源の電位が短時間の内に経時的に相殺されて、脂質薄膜の抵抗変化を計りにくい。

20

【0070】

その対策として、外部電源から、脂質薄膜を挟む1対の電極に対し、交流電圧を加印して抵抗を求める。なぜなら、交流では、化学ポテンシャルの変化を伴わずに抵抗測定を行うことができるからである。この場合の用語は、交流によるものであるから、抵抗は、インピーダンスであり、電気伝導度はアドミタンスと読み替える。

【0071】

一方、このようなインピーダンス測定では、外部電源の交流に、電気分解が起こらない程度の直流バイアス電圧を加えると、2次複合体の解離基に対し一定方向への電気泳動の駆動力がかかる。その結果、等電点が電解質のpHより酸性側にある2次複合体は陽極側へ移動する。陽極が作用極である場合は、マーカーが脂質薄膜に取り込まれるため、マーカーの脂質薄膜にたいする吸着が加速されて応答が速くなり、また、マーカーの脂質薄膜に対する平衡吸着量が増して、感度が上がる。なお、電気分解が起こらない程度の直流バイアス電圧は、特に酸化性物質や還元性物質が存在しない場合、交流の最大電圧を加えた合計で、水の水酸イオン、水素イオンへの解離の理論電位である0.83ボルト未満である。また、電気分解を起こさない限り、このバイアス電圧では、持続的電気泳動はできず、そのため、微量の標識抗原に対してのみ感度を増す方法となる。

30

【0072】

また、等電点が電解質のpHよりアルカリ側にある2次複合体は、作用極が陰極である場合に、マーカーが脂質薄膜に取り込まれるため、マーカーの脂質薄膜にたいする吸着が加速されて応答が速くなり、また、マーカーの脂質薄膜に対する平衡吸着量が増して、感度が上がり同様の効果が得られる

40

【0073】

【発明の効果】

以上のように、本発明は、高い抵抗を有する脂質に可溶性で、かつ脂質にイオン伝導性を付与する物質を標識として抗体に結合させ、さらに被測定物である抗体との間に抗原を介して2次複合体を生成させ、この標識が脂質薄膜に吸着(薄膜に対する溶解)して、脂質薄膜にイオン伝導性を付与するために生じる抵抗の低下(電気伝導度の上昇)を検出し、被測定物質である抗体を測定するものであり、このような標識と標識検出のを併用することにより、免疫法の汎用性と、生体のレセプターのセンシングに見られる、感度、精度、簡便性、迅速性を併せ持ち、免疫反応を電気応答として取り出す免疫電極センサーが可能

50

となる。

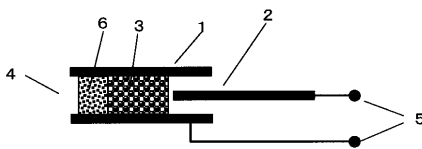
【図面の簡単な説明】

- 【図1】本発明の実施例1における全体構成を示す図
- 【図2】本発明の実施例1における内部構成を示す図
- 【図3】本発明の実施例2における標識抗原の構造を示す図
- 【図4】本発明の実施例3、4、5における脂質薄膜の構成を示す図
- 【図5】本発明の実施例6に不溶化抗体の構成図
- 【図6】本発明の実施例6における一価抗体の作成行程を示す図

【符号の説明】

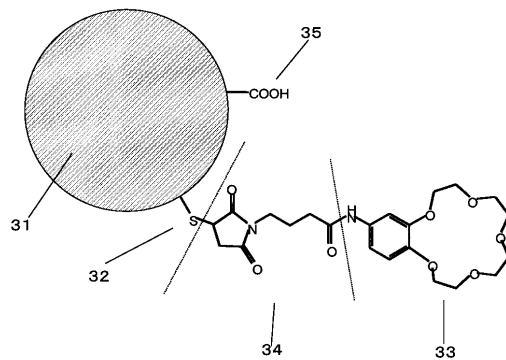
- 1 作用極
- 1 1 抗体
- 1 3 抗体
- 1 4 抗原
- 1 5 マーカー
- 1 6 標識抗体
- 1 7 1次複合体
- 1 8 2次複合体
- 1 9 抗体
- 2 1 脂質薄膜

【図1】



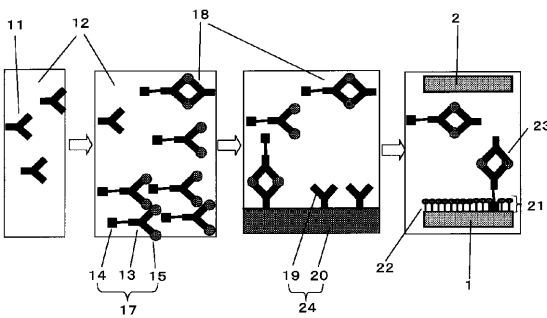
- 1 対極
- 2 作用極
- 3 不溶化抗体層
- 4 被測定液入り口
- 5 電極端子
- 6 標識抗体層

【図3】



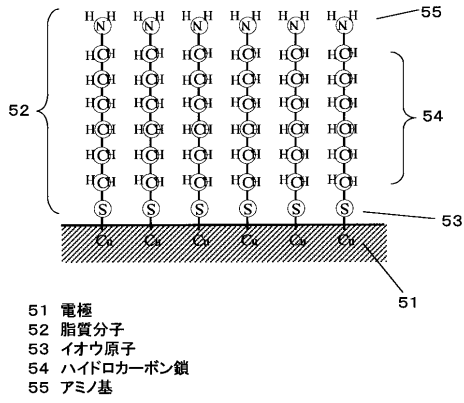
- 31 抗体残基
- 32 チオール残基
- 33 アミノベンゾ-15-クラウン-5残基
- 34 架橋剤残基
- 35 カルボキシル基

【図2】

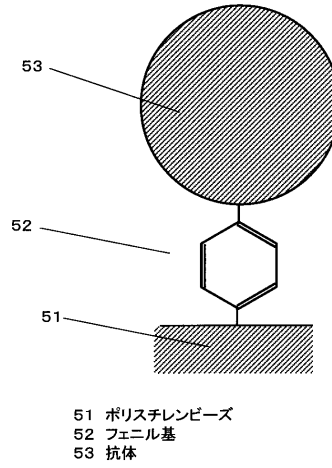


- 1 作用極
- 2 対極
- 11 抗体
- 12 被測定液
- 13 抗体
- 14 抗原
- 15 マーカー
- 16 標識抗体
- 17 1次複合体
- 18 2次複合体
- 19 抗体
- 20 不溶化基材
- 21 脂質薄膜
- 22 脂質分子
- 23 吸着2次複合体
- 24 不溶化抗体

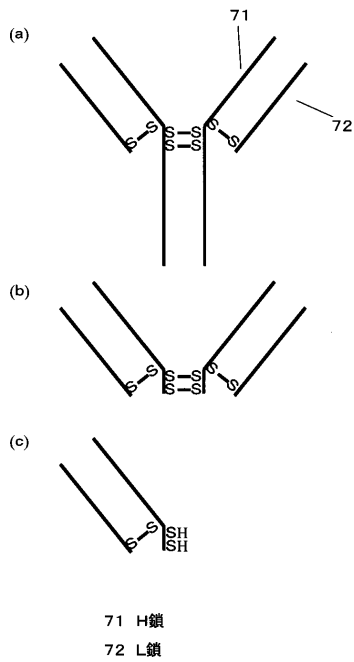
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/46 3 3 6 G

G 0 1 N 27/46 3 3 6 B

(72)発明者 志賀 あづさ

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA01 AA25 BA11 CA26 FB03 FB05

2G046 AA34 BF01 BG01 DD01 DD02 EB09 FA03 FA04 FA09 FE02

FE11 FE12 FE46

专利名称(译)	免疫电极传感器		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004108814A</a>	公开(公告)日	2004-04-08
申请号	JP2002268530	申请日	2002-09-13
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	貫名康之 野村幸生 志賀あづさ		
发明人	貫名 康之 野村 幸生 志賀 あづさ		
IPC分类号	G01N33/483 G01N27/12 G01N27/327 G01N27/416 G01N33/53		
FI分类号	G01N27/30.357 G01N27/12.Z G01N33/483.E G01N33/53.D G01N27/46.G G01N27/46.336.G G01N27/46.336.B G01N27/327.357 G01N27/416.300.G G01N27/416.336.B G01N27/416.336.G		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA25 2G045/BA11 2G045/CA26 2G045/FB03 2G045/FB05 2G046/AA34 2G046/BF01 2G046/BG01 2G046/DD01 2G046/DD02 2G046/EB09 2G046/FA03 2G046/FA04 2G046/FA09 2G046/FE02 2G046/FE11 2G046/FE12 2G046/FE46		
代理人(译)	内藤裕树		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫电极传感器，它结合了免疫测定的多功能性和灵敏度，精确性，方便性，快速性，可用于感知活体受体，并提取免疫反应作为电响应它旨在。解决方案：在本发明中，组合作为标记的离子通道标记物，作为标记物检测的检测方法的抗性检测，和作为抗原-抗体反应的结果释放离子通道的装置，并且将抗体作为待测对象。被衡量。点域1

