

(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2013-145139

(P2013-145139A)

(43) 公開日 平成25年7月25日(2013.7.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 595	2GO43
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 33/543 501A GO1N 33/543 575 GO1N 21/64 F	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-4967 (P2012-4967)	(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24年1月13日 (2012.1.13)	(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
		(72) 発明者	磯田 武寿 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
		(72) 発明者	彼谷 高敏 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
		(72) 発明者	大谷 真紀子 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S P F S (表面プラズモン励起増強蛍光分光法) を用いたミオグロビンの免疫学的測定法

## (57) 【要約】

【課題】試料中のミオグロビンを高感度で定量ないし検出するための手段を提供する。

【解決手段】試料中のミオグロビンを対象とする免疫学的測定法であって、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体を形成する工程、および形成されたサンドイッチ型免疫複合体に含まれる蛍光体から発せられる蛍光強度を S P F S (表面プラズモン励起増強蛍光分光法) により測定する工程を含むことを特徴とする免疫学的測定法。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中のミオグロビンを対象とする免疫学的測定法であって、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体を形成する工程、および形成されたサンドイッチ型免疫複合体に含まれる蛍光体から発せられる蛍光強度を S P F S (表面プラズモン励起増強蛍光分光法)により測定する工程を含むことを特徴とする免疫学的測定法。

**【請求項 2】**

前記サンドイッチ型免疫複合体を形成する工程が、前記固相化された抗ミオグロビン抗体と試料中のミオグロビンとを反応させて免疫複合体を形成する工程、および形成された免疫複合体と前記蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体とを反応させて前記サンドイッチ型免疫複合体を形成する工程を含む、請求項 1 に記載の免疫学的測定法。

**【請求項 3】**

前記固相化された抗ミオグロビン抗体が 1 種または 2 種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体であり、前記蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体が、前記固相化された抗ミオグロビン抗体としての 1 種または 2 種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体とは異なる、1 種または 2 種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 に記載の免疫学的測定法。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の免疫学的測定法に用いられる、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体が測定領域に形成された、S P F S 用センサーチップ。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、医療、バイオテクノロジー等の分野で利用される S P F S (Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy : 表面プラズモン励起増強蛍光分光法) および心筋梗塞等のバイオマーカーとして知られているミオグロビンに関する。

**【背景技術】****【0002】**

急性心筋梗塞は冠動脈の閉塞により心筋が壊死に陥る疾患であるが、この疾患の検査方法としては、胸痛、心電図及び心筋梗塞マーカーを利用することができてきている。この心筋梗塞マーカーも大別すると、生化学的指標と免疫学的指標に二分される。生化学的指標には、クレアチニナーゼ (C K) やその心筋特異性アイソザイム (C K M B) が用いられているが、測定が簡便ではあるものの、C K は心筋梗塞特異性が低く、C K M B もトロポニン T に比し特異性が低いことから、有用性に限界がある。一方、免疫学的指標には、ミオグロビン、ミオシン軽鎖及びトロポニン等が実用化されている。

**【0003】**

ミオグロビンは、筋細胞の細胞質内に豊富に存在する低分子蛋白であるので、壊死心筋から容易に血中に流出し、心筋梗塞の発症後 1 ~ 3 時間で異常値を示す。しかし、骨格筋のミオグロビン含量は心筋より多いため、ミオグロビンの心筋特異性は低い。従って、ミオグロビンは心筋特異性が低いという欠点はあるが、ミオグロビン濃度は簡便・迅速に測定できるため、現時点では急性心筋梗塞の早期診断及び経静脈的血栓溶解療法の成否の判定における有用なマーカーの一つである。

**【0004】**

高感度でミオグロビンを検出または定量するための手段として、以下のような発明も提案されている。

特許文献 1 には、透明基板、該透明基板上に配置される金属膜、該金属膜上に固定される、心筋梗塞マーカーに対する抗体を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー (S P R) 用測定チップや、このような測定用チップを用いて心筋梗塞マ-

10

20

30

40

50

カーマーを測定する方法が記載されている。心筋梗塞マーカーとしては、cTnT、ミオグロビン等が挙げられている。

#### 【0005】

一方、各種の生体関連物質を検出または定量するための測定システムの一つとしてSPFSが知られている（たとえば特許文献2参照）。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アナライト（分析対象物）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、サンプル中にアナライト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。10

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0006】

【特許文献1】特開平11-023575号公報

【特許文献2】特開2010-145272号公報

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

心筋梗塞等のバイオマーカーとなる血液検体中のミオグロビンは極力低濃度で定量ないし検出できることが望ましい。本発明が解決しようとする課題は、試料中のミオグロビンを高感度で定量ないし検出するための手段を提供することにある。20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明者は、SPFSにおいて、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体を形成し、当該免疫複合体に含まれる蛍光体から発せられる蛍光強度を測定することにより、試料中にミオグロビンが極微量しか含まれない場合であっても定量することができることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

#### 【0009】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[1] 試料中のミオグロビンを対象とする免疫学的測定法であって、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体を形成する工程、および形成されたサンドイッチ型免疫複合体に含まれる蛍光体から発せられる蛍光強度をSPFS（表面プラズモン励起増強蛍光分光法）により測定する工程を含むことを特徴とする免疫学的測定法。30

#### 【0010】

[2] 前記サンドイッチ型免疫複合体を形成する工程が、前記固相化された抗ミオグロビン抗体と試料中のミオグロビンとを反応させて免疫複合体を形成する工程、および形成された免疫複合体と前記蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体とを反応させて前記サンドイッチ型免疫複合体を形成する工程を含む、[1]に記載の免疫学的測定法。40

#### 【0011】

[3] 前記固相化された抗ミオグロビン抗体が1種または2種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体であり、前記蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体が、前記固相化された抗ミオグロビン抗体としての1種または2種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体とは異なる、1種または2種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体である、[1]または[2]に記載の免疫学的測定法。

[4] [1]～[3]のいずれかに記載の免疫学的測定法に用いられる、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体が測定領域に形成された、SPFS用センサーチップ。50

## 【発明の効果】

## 【0012】

本発明のS P F Sを利用した免疫学的測定法により、従来のE L I Z Aのようなサンドイッチ型免疫複合体を形成する方法と比較して、ミオグロビンの定量性能ないし検出性能を著しく高めることができる。したがって、本発明によりミオグロビンが血液検体中に極微量しか含まれない場合であっても定量することが可能となり、ミオグロビンの心筋梗塞等のバイオマーカーとしての有用性を向上させ、診断に役立つ信頼性の高いデータを得ることが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】図1は、実施例1-1, 1-2および1-3におけるミオグロビンの定量限界の結果のプロットである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0014】

本明細書において、数値範囲を示す表現「X ~ Y」はX以上Y以下を意味する。

以下、本発明についてS P F S単独に基づく態様に則しながら説明するが、本発明は、たとえばS P F S - L P F S測定系など、S P F Sと他の測定系ないしシステムとを組み合わせる態様においても適用することができる。また、本発明のS P F Sに基づく免疫学的測定法に、公知または慣用の手段を適宜組み合わせることももちろんである。

## 【0015】

## - S P F S用測定部材 -

S P F S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S P F S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ーチップと、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(アナライトを含む試料、標識リガンド溶液、その他の反応試薬等)を測定領域上に保持することのできる、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。

## 【0016】

すなわち、本発明は一つの側面において、本発明の免疫学的測定法に用いられる、固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体が測定領域に形成された、S P F S用センサーチップを提供する。

## 【0017】

センサーチップは、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、アナライトをセンサー表面に捕捉するための反応層とを含み、さらに必要に応じて、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よい。

## 【0018】

なお、本明細書において、便宜上、センサーチップの金属薄膜、反応層等が形成される側を「上」または「表」、その反対側を「下」または「裏」と称することがある。

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ンで)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。たとえば、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。

## 【0019】

S P F S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

10

20

30

40

50

、センサーチップの上に、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ーチップ表面が、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。

10

## 【0020】

一方、S P F S 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、センサーチップの上に、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。

## 【0021】

上記フローセルは、たとえばシート状のポリジメチルシリコサン（P D M S ）製とすることができます。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（P M M A ）製とすることができます。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。

20

## 【0022】

センサー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。

## 【0023】

## (透明支持体)

透明支持体は、プリズムまたは平面基板の形態をとることができる。プリズム形状の透明支持体は、センサーチップ作製後にそのままS P F S 測定装置に装着して用いるようにし、平面基板状の透明支持体は、センサーチップ作製後に、S P F S 測定装置が備えるプリズムの水平面上に装着して用いるようにする。透明支持体のサイズは特に限定されるものではなく、S P F S 測定装置にあわせて調整することができる。透明支持体が平面基板の形態をとる場合、その厚さは通常0.01~10mmの範囲である。

30

## 【0024】

透明支持体の材料としては、ガラスや、ポリカーボネート（P C ）、シクロオレフィンポリマー（C O P ）などのプラスチックのように、透明な誘電体が挙げられ、d線（588nm）における屈折率〔n<sub>d</sub>〕が1.40~2.20の範囲にある物質が好ましい。透明支持体の表面は、金属薄膜を形成する前に、酸またはプラズマによる洗浄処理がなされていることが好ましい。

40

## 【0025】

## (金属薄膜)

金属薄膜は、酸化に対して安定であり、かつ表面プラズモンによる電場増強効果が大きい、金、銀、アルミニウム、銅、および白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属からなる（つまり、上記いずれかの金属単独からなるものであっても、複数の金属の合金からなるものであってもよい。）ことが好ましく、特に金からなることが好ましい。

## 【0026】

誘電体部材としてガラス製のもの用いる場合には、ガラスと金属薄膜とをより強固に接着するために、たとえばクロム、ニッケルクロム合金またはチタンからなる接着用薄膜を介在させ、ガラス製の誘電体部材／接着用薄膜／金属薄膜の順に積層することが好ましい

50

。

【0027】

金属薄膜および接着用薄膜を形成する方法としては、たとえば、スパッタリング法、蒸着法（抵抗加熱蒸着法、電子線蒸着法等）、電解メッキ、無電解メッキ法などが挙げられるが、薄膜形成条件の調整が容易なことから、スパッタリング法または蒸着法が好ましい。

【0028】

金属薄膜および接着用薄膜の厚さは、金属薄膜の材料に応じて、表面プラズモンが発生し易いように調整することが適切である。一般的には、金属薄膜の厚さは5～500nmが好ましく、接着用薄膜の厚さは1～20nmが好ましい。電場増強効果の観点からは、金属薄膜の厚さは、金：20～70nm、銀：20～70nm、アルミニウム：10～50nm、銅：20～70nm、白金：20～70nm、およびそれらの合金：10～70nmがより好ましい。また、接着用薄膜の厚さは、たとえばクロムであれば1～3nmがより好ましい。

【0029】

（反応層）

反応層は、一般的に、リガンドと、当該リガンドを金属薄膜または必要に応じて設けられるスペーサ層に固定化するための分子（リンカー）とにより構成される。

【0030】

上記リンカーは、リガンドをセンサー表面に固定化し、アナライトを捕捉してS P F Sによる分析を適切に行うことができるものであれば、その態様は特に限定されるものではなく、1種類の分子からなるものでも、2種類以上の分子からなるもの（複合体）であつてもよい。

【0031】

たとえば、リンカーとしてS A M（Self-Assembled Monolayer：自己組織化単分子膜）を用いる態様が挙げられ、この態様では、金属薄膜等の表面に形成されたS A M - リガンド結合体が反応層をなす。

【0032】

また、リンカーとしてS A Mおよび高分子化合物を併用する態様も挙げられ、この態様では、金属薄膜等の表面に形成されたS A M - 高分子化合物 - リガンド結合体が反応層をなす。なお、このような高分子化合物を介してリガンドをセンサー表面に固定化する、換言すれば高分子化合物にリガンドを担持させる態様において、高分子化合物からなる層を「固相化層」と称する場合もある。このような態様は、固相化層中にリガンドを三次元的に配置することで、S A Mの上層にリガンドを二次元的（平面的）に配置する態様に比べ、センサー表面に高密度でリガンドを固定化できることから、より好ましい態様といえる。

【0033】

・S A M

S A Mは、分子の一方の末端に金属薄膜（または必要に応じて設けられるスペーサ層）と結合可能な官能基（シラノール基、チオール基等）を、もう一方の末端に固定化する分子と結合可能な反応性官能基（アミノ基、カルボキシル基、グリシジル基等）を有する化合物により形成することができる。このような化合物はS A M形成試薬として容易に入手することができる。たとえば、炭素原子数4～20程度のカルボキシアルカンチオール（10-カルボキシ-1-デカンチオールなど）は、光学的な影響が少ない、つまり透明性が高く、屈折率が低く、膜厚が薄いS A Mを形成することができるため好適である。

【0034】

・高分子化合物

必要に応じて用いられる固相化層は、反応層を構成する他の分子（典型的にはS A M）または反応層の下に形成された層（金属薄膜、スペーサ層等）と結合させるための官能基と、リガンドと結合させるための官能基とを有する高分子化合物とにより構成される。

10

20

30

40

50

## 【0035】

また、S P F S で用いられる各種の溶液には通常水性溶媒が用いられることから、固相化層を構成する高分子化合物は、それとの親和性が高い、ヒドロキシル基やカルボキシル基などの親水性基に富んだ（これらの親水性基が上記所定の官能基として機能してもよい）親水性高分子であることが好ましい。上記親水性基は水素結合により水分子を包接するため、非特異的吸着が起こりにくいという利点も有する。一方、そのような親水性基が少ない（疎水性基が多い）、全体的に疎水的な高分子は、センサー表面に局在しやすいため反応効率が低下したり、疎水性相互作用により非特異的吸着が起こりやすくなったりするおそれがある。

## 【0036】

固相化層を構成する高分子化合物としては、たとえば、グルコースもしくはその誘導体（たとえばカルボキシメチル化グルコース）、ビニルエステル、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、オレフィン、スチレン、クロトン酸エステル、イタコン酸ジエステル、マレイン酸ジエステル、フマル酸ジエステル、アリル化合物、ビニルエーテル、ビニルケトンなどの単量体から誘導される単位を含む、単独重合体または共重合体（ランダム、ブロック、グラフト）を用いることができる。

## 【0037】

たとえば、デキストランやセルロースに（これらのグルコース単位中の水酸基を介して）カルボキシメチル基が導入されたカルボキシメチルデキストランやカルボキシメチセルロース、あるいは元来グルコース単位中にカルボキシル基を有しているアルギン酸などの多糖類は、上記所定の官能基を有するとともに、分岐構造が少なく冷水への溶解度が高いため、固相化層を構成する高分子化合物として好適である。また、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸などの高分子化合物も、固相化層を構成するために用いることが可能である。

## 【0038】

固相化層の湿潤状態における厚さは、リガンドに捕捉されたアナライトを標識する蛍光体が増強されたエバネッセント波で効率的に励起され、かつ金属薄膜による消光が起きないようにすることなどを考慮すると、3~80 nm程度が好ましい。したがって、高分子化合物としてはそのような厚さを生み出せる分子量を有するものが好ましい。たとえばカルボキシメチルデキストランであれば、分子量が約10~100万の範囲にあるものが好ましい。

## 【0039】

高分子化合物に結合させる（すなわち固相化層に担持される）リガンドの密度は、用いる高分子化合物およびリガンドの性状（反応に関係する一分子中の官能基の数等）や、高分子化合物とリガンドとの反応条件（添加量、pH、WSCの濃度等）によって調整することができる。

## 【0040】

## ・固相化リガンド

本発明におけるリガンドは、アナライトである試料中のミオグロビンと特異的に結合し得る物質、すなわち抗ミオグロビン抗体である。なお、本発明における「抗体」には、完全な免疫グロブリン（狭義の抗体）だけでなく、Fab、Fab'2、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、单鎖抗体（ScFv）等、本技術分野において公知の抗体断片または抗体誘導体が含まれる。

## 【0041】

本発明では、抗ミオグロビン抗体を、アナライトをセンサー表面に捕捉するためにセンサー表面に固定されたリガンド（すなわち「固相化リガンド」、サンドイッチ型イムノアッセイの一次抗体）として用いる。

## 【0042】

一方、本発明では、センサー表面に捕捉されたアナライトを蛍光標識化するための、蛍光体と複合体化したリガンド（すなわちを「蛍光標識化リガンド」、サンドイッチ型イム

ノアッセイの二次抗体)としても、抗ミオグロビン抗体を用いる。

【0043】

抗ミオグロビン抗体としては、ポリクローナル抗体を用いることも可能であるが、ミオグロビンに対する結合力に優れた固相化リガンドおよび蛍光標識化リガンドの組み合わせを構築できることから、モノクローナル抗体を用いることが好適である。ミオグロビンに対するモノクローナル抗体は、ミオグロビンの様々な部位をエピトープとするものが公知である。たとえば、ミオグロビンに対するモノクローナル抗体としては、表1に示すようなものが公知であり、容易に入手することができる。

【0044】

【表1】

品名・種由来(免疫動物)	メーカー名	品番	クローン・説明文
1 Anti Myoglobin , Human (Rabbit Mono)	EPITOMICS, INC.	2717-1	EP3080
2 Anti Myoglobin , Human (Rabbit Mono)	EPITOMICS, INC.	2472-1	EPR2581Y
3 Anti MB , Human (Mouse Mono)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB4271	BDI927
4 Anti MB , Human (Mouse Mono)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB4270	BDI572
5 Anti MB , Human (Mouse Mono)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB6609	MG-1
6 Anti MB , Human (Mouse Mono)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB5539	6H8B5,5A2G8,4D 7H3,3H
7 Anti MB , Human (Mouse Mono)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB5474	4E2
8 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	Advanced Immunochemical Inc.	HCM4-500-908	908
9 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C9186-1000	1.BB.120
10 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C9187-1000	1.BB.121
11 Anti myoglobin (14D6) , Human (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC-33723	14D6
12 Anti MB , Human (Mouse)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB0842	15H1
13 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	AbFrontier Co., Ltd.	LF-MA0243	15H1
14 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(164.3A4)	BIOCODE S.A.	1M-0077	164.3A4
15 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(164.3D5)	BIOCODE S.A.	1M-0079	164.3D5
16 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(164.5B10)	BIOCODE S.A.	1M-0078	164.5B10
17 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(164.5D5)	BIOCODE S.A.	1M-0080	164.5D5
18 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(164.6G2)	BIOCODE S.A.	1M-0076	164.6G2
19 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	Biotrend Chemikalien GmbH	4M23	1B4
20 Anti Myoglobin , Human (-)	Advanced Immunochemical Inc.	2-MYG	4E2, 7C3
21 Anti Myoglobin Cardiac , Human (Goat)	O. E. M. Concepts Inc.	G5C11-766	HU
22 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	コスモ・バイオ株式会社	KR-027	1C10
23 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	American Research Products, Inc.	05-50111	1F6
24 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C9195-1000	3.00E+01
25 Anti MB , Human (Mouse)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB1504	3982
26 Anti MB , Human (Mouse)	Abnova Corporation (Taiwan)	H00004151-M04	3F7
27 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	Biotrend Chemikalien GmbH	4M23(B)	400
28 Anti MB , Human (Mouse)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB0564	4E2
29 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	コスモ・バイオ株式会社	KR-028	5D6
30 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C9185-1	6A136
31 Anti myoglobin (6H8B5) , Human (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC-65982	6H8B5
32 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C47188-100	6H8B5, 5A2G8, 4D7H3, 3H6A7
33 Anti-Myoglobin (MB), Mouse-Mono	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C47188-100	6H8B5, 5A2G8, 4D7H3, 3H6A7
34 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	Antagene Inc.	MAB-606092	6H8B5,5A2G8,4D 7H3,3H6A7
35 Anti MB , Human (Mouse)	Abnova Corporation (Taiwan)	MAB0565	7C3
36 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C9194-1000	8.F.208
37 Anti-MYOGLOBIN, Mouse-Mono(8A10)	AbD	6450-0050	8A10
38 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	American Research Products, Inc.	05-50113	8H5
39 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C73048-100	8L875
40 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-C73052-100	8L877
41 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	Fitzgerald Industries International, Inc.	10C-CR8010M1	90427
42 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	Advanced Immunochemical Inc.	HCM4-200-908	908
43 Anti myoglobin (A-9) , Human (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC-74525	A-9
44 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(BDI572)	GENETEX, Inc.	GTX19610	BDI572
45 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(BDI927)	GENETEX, Inc.	GTX19607	BDI927
46 Anti myoglobin (F-9) , Human (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC-74404	F-9
47 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-001	KO-001
48 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-002	KO-002
49 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-021	KO-021
50 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-022	KO-022
51 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-023	KO-023
52 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-024	KO-024
53 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	株式会社日本バイオテスト研究所	MKO-026	KO-026
54 Anti Myoglobin , Human (Mouse)	MP Biomedicals,LLC (Former ICN Pharmaceuticals, Inc.)	691201	MG-1
55 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(Myo1)	Affinity BioReagents, Inc.	MA1-26216	Myo1
56 Anti-Myoglobin, Mouse-Mono(Myo2)	Affinity BioReagents, Inc.	MA1-26217	Myo2

10

20

30

40

50

本発明では、固相化リガンドとして1種または2種以上の抗ミオグロビン抗体を用いることができ、また蛍光標識化リガンドとしても1種または2種以上の抗ミオグロビン抗体を用いることができる。ただし、固相化リガンドと蛍光標識化リガンドがアナライトの同一のエピトープに対して競合的に結合することを避けるため、記固相化された抗ミオグロビン抗体は1種または2種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体であり、前記標識化された抗ミオグロビン抗体は、前記固相化された抗ミオグロビン抗体としての1種または

2種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体とは異なる、1種または2種以上の抗ミオグロビンモノクローナル抗体であることが好ましい。

#### 【0045】

固相化リガンド、蛍光標識化リガンドそれぞれに用いる抗ミオグロビン抗体の組み合わせによって、S P F Sによるミオグロビンの検出(定量)感度が相違する場合があるので、所望の感度を達成できる抗ミオグロビン抗体の組み合わせを用いることが適切である。たとえば、検出(定量)限界濃度が(1 p g / m L以上)10 p g / m L未満以下と低い、高感度の抗ミオグロビン抗体の組み合わせを用いることが望ましい。

#### 【0046】

- ・反応層の形成方法

反応層は、反応層の下に形成されている層(金属薄膜、スペーサ層等)に、反応層を構成するS A M、固相化層を構成する高分子化合物、リガンド等を、公知の手法を用いて順次結合させていくことにより形成することができる。

#### 【0047】

金属薄膜等の上層にS A Mを形成するためには、一般的に、S A M構成分子の溶液を金属薄膜等に接触させ、当該分子の一方の末端の官能基(たとえばチオール基)と金属薄膜等(たとえば金)とを反応させるようにする。

#### 【0048】

続いて、S A Mの上層にリガンドを固定化するためには、一般的に、リガンドの溶液をS A Mに接触させ、当該リガンドが有する官能基と前記S A M構成分子のもう一方の末端の官能基とを反応させるようする。たとえば、アミノ基を有するリガンド(本発明においては抗c T n抗体)と、カルボキシル基を有するS A M構成分子とは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)などの水溶性カルボジイミド(WSC)および必要に応じてカルボキシル基を活性化(エステル化)するためのN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を添加した前記リガンドの溶液をS A Mと接触させることにより、アミノ基とカルボキシル基との反応を介して結合させることができる。

#### 【0049】

一方、S A Mの上層に直接リガンドを固定化するのではなく、高分子化合物を結合させて固相化層を形成する(その後リガンドを当該固相化層に担持させる)ためには、一般的に、高分子化合物の溶液をS A Mに接触させ、当該高分子化合物が有する官能基と前記S A M構成分子のもう一方の末端の官能基とを反応させるようする。たとえば、高分子化合物としてカルボキシメチルデキストランを用いる場合、カルボキシメチルデキストランが有するアルデヒド基(還元性末端)とS A Mが有するアミノ基とを反応させてシップ塩基を形成させることにより、これらを結合させることができる。反応条件を調整することにより、S A M等に連結する高分子化合物の数を増減させることも可能である。

#### 【0050】

あるいは、金属薄膜等に吸着しうる官能基を有する高分子化合物(たとえばチオセミカルバジドで修飾された多糖類)を用いることにより、S A Mを介すことなく、金属薄膜等に直接高分子化合物を結合させ、これにリガンドを担持させることも可能である。

#### 【0051】

高分子化合物とリガンドとは、アミンカップリング法、チオールカップリング法、間接的捕捉法(キャプチャ法)等、公知の手法に従って結合させることができる。たとえば、アミンカップリング法を用いる場合は、アミノ基を有するリガンド(本発明においては抗c T n抗体)と、カルボキシル基を有する高分子化合物(固相化層)とは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)などの水溶性カルボジイミド(WSC)および必要に応じてカルボキシル基を活性化(エステル化)するためのN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を添加した前記リガンドの溶液を高分子化合物と接触させることにより、アミノ基とカルボキシル基との反応を介して結合させることができる。反応条件を調整することにより、直鎖状高分子に結合するリガンドの数を

増減させることも可能である。

【0052】

リガンドを固定化した後、アナライトの非特異的吸着を防止するため、センサー表面は（流路またはウェルの側壁・天板を含めて）牛血清アルブミン（B S A）、カゼイン等によりブロッキング処理をしておくことが望ましい。

【0053】

（スペーサ層）

必要に応じて設けられるスペーサ層は、誘電体により形成することができる。スペーサ層用の誘電体としては、光学的に透明な各種無機物や、天然または合成ポリマーを用いることができる。なかでも、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（ $\text{SiO}_2$ ）または二酸化チタン（ $\text{TiO}_2$ ）が好ましい。

10

【0054】

スペーサ層の厚さは、通常 $10\text{ nm} \sim 1\text{ mm}$ であり、共鳴角安定性の観点からは、好ましくは $30\text{ nm}$ 以下、より好ましくは $10 \sim 20\text{ nm}$ である。一方、電場増強効果の観点からは、好ましくは $200\text{ nm} \sim 1\text{ mm}$ であり、さらに電場増強効果の安定性から、 $400\text{ nm} \sim 1,600\text{ nm}$ がより好ましい。

20

【0055】

このようなスペーサ層は、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を用いた方法、またはスピノコータによる塗布などによって形成することができる。

20

【0056】

- S P F S 用測定装置 -

本発明の免疫学的測定法は、一般的な S P F S 用測定装置を使用して実施することができる。S P F S 用測定装置は、基本的に、S F P F S 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、励起光をセンサー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ー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。より具体的な態様は、たとえば特開 2010-145272 号公報（特許文献 2）など、各種の文献を参照することができる。

30

【0057】

- 免疫学的測定法 -

本発明の免疫学的測定法は、試料中のミオグロビンを対象として、その濃度の定量ないしその存在の検出を行うことができる方法であり、下記工程 1 および 2 を行うことを含む：

（工程 1）固相化された抗ミオグロビン抗体、ミオグロビン、および蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体を含むサンドイッチ型免疫複合体を形成する工程、および

40

（工程 2）形成されたサンドイッチ型免疫複合体に含まれる蛍光体から発せられる蛍光強度を S P F S（表面プラズモン励起増強蛍光分光法）により測定する工程。

【0058】

工程 1 として示したサンドイッチ型免疫複合体を形成する工程は、工程 2 に移る前にサンドイッチ型免疫複合体を形成することができれば、その態様は特に限定されるものではないが、たとえば下記工程 1 a および 1 b を含む態様が一般的である：

（工程 1 a）前記固相化された抗ミオグロビン抗体と試料中のミオグロビンとを反応させて複合体を形成する工程、および

（工程 1 b）形成された免疫複合体と前記蛍光標識化された抗ミオグロビン抗体とを反応させて前記サンドイッチ型免疫複合体を形成する工程。

【0059】

50

なお、必要に応じて、工程 1 a および工程 1 b の間、または工程 1 ( 工程 1 b ) と工程 2 の間に、流路またはウェルを洗浄液 ( たとえば界面活性剤溶液 ) を用いて洗浄するための洗浄工程を設けてもよい。

#### 【 0 0 6 0 】

一方、工程 2 は、一般的な S P F S と同様の態様で、金属薄膜に励起光を照射し、金属薄膜で起きる表面プラズモン共鳴によって増強されたエバネッセント波を発生させ、それによってサンドイッチ型免疫複合体に含まれる ( 蛍光標識化リガンドが有していた ) 蛍光体から発せられる蛍光の強度 ( 「シグナル」 に相当する。 ) を測定すればよい。また、工程 2 以前に、または測定領域とは別の領域において、サンドイッチ型免疫複合体が形成されていない状態で工程 2 と同様に金属薄膜に励起光を照射して、発生する蛍光の強度 ( 「ノイズ」 に相当する。 ) を測定し、前記シグナルの値を当該ノイズの値で補正する ( 引くまたは除する ) ようにすることが好適である。

10

#### 【 0 0 6 1 】

なお、工程 2 において蛍光体から発せられる蛍光強度を測定する際には、通常、アナライトも蛍光標識化抗体も含まない水性溶媒 ( たとえばリン酸緩衝液 ) で流路ないしウェルを満たした状態にするが、水性溶媒以外の溶媒または空気で満たした状態とすることも可能である。

#### 【 0 0 6 2 】

上記のようにして求められた ( 好ましくはノイズを用いて補正された ) シグナルと、濃度が既知の試料を用いて別途作製された検量線とに基づき、分析された試料中のアナライトの濃度を定量することができる。

20

#### 【 0 0 6 3 】

このようにして測定される試料 ( 特に血液検体 ) 中のミオグロビンの濃度は、そのミオグロビンがバイオマーカーとして機能する各種の疾患または症状の診断を行う際の参考データとして用いることができる。

#### 【 0 0 6 4 】

- ・ アナライト、試料 ( 血液検体等 )

本発明におけるアナライト ( S P F S により定量ないし検出すべき物質 ) は、血液検体中に含まれ心筋梗塞等のバイオマーカーとして利用することのできる、ミオグロビンである。

30

#### 【 0 0 6 5 】

本発明では、 S P F S 分析装置に投入し、センサーチップに設けられた反応層と接触させるための試料として、ミオグロビンを含有する可能性のある血液検体を分析に供する。血液検体としては、各種のバイオマーカーやその他の生体関連物質を分析する場合と同様のものを用いることができ、必要に応じて抗凝固処理した全血でもよいし、全血を凝固させて沈殿物 ( 血餅 ) を除去して得られる血清でもよいし、必要に応じてこれらを遠心分離、希釈、試薬との混合等の処理をしたものでもよい ( 本発明ではそれらすべてを「血液検体」と総称する。 ) 。

#### 【 0 0 6 6 】

なお、試験的な測定や検量線作成用の測定などのために、上記のような血液検体の代わりに、あらかじめ購入等により用意したミオグロビンをリン酸緩衝液等に溶解して調製したミオグロビン溶液を本発明における試料として用いてもよい。すなわち、本発明の免疫学的測定法は、血液検体中のミオグロビンと同様に、上記のような血液検体以外の試料中のミオグロビンを対象としてもよい。

40

#### 【 0 0 6 7 】

- ・ 蛍光標識化リガンド

本発明では、センサー表面に捕捉されたアナライトを蛍光標識化するための蛍光標識化リガンドとして、蛍光体と、抗ミオグロビン抗体との複合体を用いる。前述したように、固相化リガンド、蛍光標識化リガンドそれぞれに用いる抗ミオグロビン抗体の組み合わせによって、 S P F S によるミオグロビンの検出感度が異なる場合があるので、固相化リガ

50

ンドとして用いる抗ミオグロビン抗体に応じて、好適な抗ミオグロビン抗体を蛍光標識化リガンドの作製のために用いるようにする。

#### 【0068】

蛍光標識化リガンドは、一般的な免疫測定法でも用いられている蛍光体とリガンドとの複合体（コンジュゲート）と同様にして作製することができ、その態様は特に限定されるものではない。たとえば、市販の蛍光体のキット（たとえばAlexa Fluor タンパク質標識キット、インビトロゲン社）を用いて、添付のプロトコールに従い、蛍光体に導入されている官能基と抗cTn抗体が有する官能基とを所定の試薬の存在下に反応させることにより、蛍光体・抗cTn抗体複合体を作製することができる。蛍光体とリガンドとを結合させるためには、様々な官能基の組み合わせにおける反応を用いることができるほか、ビオチン化した蛍光体とアビジン化した抗ミオグロビン抗体とをビオチン・アビジン結合させる手法を用いることも可能である。

10

#### 【0069】

- ・蛍光体

本発明では、一般的なS P F Sや従来の蛍光測定法で用いられている、公知の各種の蛍光体を用いることができる。なお、「蛍光体」は、所定の励起光を照射する、または電界効果を利用して励起することによって蛍光を発光する物質の総称であり、「蛍光」には、狭義の蛍光のみならず、燐光やその他の発光も含まれる。

#### 【0070】

S P F Sに用いられる蛍光体としては蛍光色素が代表的であるが、半導体ナノ粒子など、公知のその他の蛍光体であってもよい。

20

蛍光色素の具体例としては、フルオレセイン・ファミリーの蛍光色素（Integrated DNA Technologies社）、ポリハロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素（アプライドバイオシステムズジャパン（株））、ヘキサクロロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素（アプライドバイオシステムズジャパン（株））、クマリン・ファミリーの蛍光色素（インビトロジェン（株））、ローダミン・ファミリーの蛍光色素（G Eヘルスケア バイオサイエンス（株））、シアニン・ファミリーの蛍光色素、インドカルボシアニン・ファミリーの蛍光色素、オキサジン・ファミリーの蛍光色素、チアジン・ファミリーの蛍光色素、スクアライン・ファミリーの蛍光色素、キレート化ランタニド・ファミリーの蛍光色素、B O D I P Y（登録商標）・ファミリーの蛍光色素（インビトロジェン（株））、ナフタレンスルホン酸・ファミリーの蛍光色素、ピレン・ファミリーの蛍光色素、トリフェニルメタン・ファミリーの蛍光色素、A l e x a F l u o r（登録商標）色素シリーズ（インビトロジェン（株））などの有機蛍光色素が挙げられる。

30

#### 【0071】

また、E u、T b等の希土類錯体系の蛍光色素（たとえばA T B T A - E u<sup>3+</sup>）、青色蛍光タンパク質（B F P）、シアン蛍光タンパク質（C F P）、緑色蛍光タンパク質（G F P）、黄色蛍光タンパク質（Y F P）、赤色蛍光タンパク質（D s R e d）またはA l l o p h y c o c y a n i n（A P C；L y o F l o g e n（登録商標））などに代表される蛍光タンパク質、ラテックスやシリカなどの蛍光微粒子なども、蛍光色素として挙げられる。

40

#### 【0072】

なお、血液検体に由来する試料を分析に供する場合は、血液中の血球成分由來の鉄による吸光の影響を最小限に抑えるため、C y 5やA l e x a F l u o r 6 4 7など、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望ましい。また、センサーチップの金属薄膜に含まれる金属による吸光の影響も考慮することが好ましい。たとえば、金属薄膜に金が用いられている場合には、最大蛍光波長が600 nm以上の蛍光色素が好ましく、金属薄膜に銀が用いられている場合には、最大蛍光波長が400 nm以上の蛍光色素が好ましい。

#### 【実施例】

#### 【0073】

50

## [実施例 1 - 1 ] 4 E 2 ( 固相 ) / 1 F 6 ( 標識 )

## ( 1 ) センサーチップの作製

厚さ 1 mm のガラス製の透明支持体「 S - L A L 10 」( ( 株 ) オハラ、屈折率 (  $n_d$  ) : 1.72 ) をプラズマ洗浄した後、該支持体の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成し、さらにその表面に金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは 1 ~ 3 nm 以下、金薄膜の厚さは 42 ~ 47 nm であった。

## 【 0074 】

上記工程により得られた金属薄膜を備えた透明支持体を、 1 mM に調整した 11 - アミノ - 1 - ウンデカンチオールのエタノール溶液 10 mL に 24 時間浸漬し、金薄膜の表面に SAM を形成した。この透明支持体をエタノール溶液から取り出し、エタノールおよびイソプロパノールそれぞれで洗浄した後、エアガンを用いて乾燥させた。  
10

## 【 0075 】

続いて、上記工程により得られた SAM を備えた透明支持体を、分子量 50 万 ~ 100 万のカルボキシメチルデキストラン ( CMD ) を 1 mg / mL と、 N - ヒドロキシコハク酸イミド ( NHS ) を 0.5 mM と、水溶性カルボジイミド ( WSC ) として 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド塩酸塩 ( EDC ) を 1 mM とを含む、 pH 7.4 の MES 緩衝生理食塩水 ( MES ) ( イオン強度 : 10 mM ) に 1 時間浸漬して、 SAM の表面に固相化層として CMD を固定化し、その後 1 M の NaOH 水溶液に 30 分間浸漬することで未反応のコハク酸エステルを加水分解した。 CMD からなる固相化層の平均膜厚は 70 nm であり、密度は 1.9 ng / mm<sup>2</sup> であった。  
20

## 【 0076 】

続いて、上記工程により得られた固相化層を備えた透明支持体を、 NHS を 50 mM と、 WSC を 100 mM とを含む MES に 1 時間浸漬させた後に、抗ミオグロビンモノクローナル抗体「 4 E 2 」溶液 ( IBL 社、 2.5 μg / mL ) に 30 分間浸漬することで、 CMD に当該モノクローナル抗体を固定化した。

## 【 0077 】

さらに、 1 質量 % の牛血清アルブミン ( BSA ) および 1 M のアミノエタノールを含む PBS を 30 分間循環送液することで、非特異的吸着防止処理を行なった。

上記のようにして得られたセンサーチップに、長さ 10 mm 、幅 5 mm の穴を有する厚さ 0.5 mm の P D M S 製シートを載せ、さらにこの P D M S 製シートの周囲にシリコーンゴム製スペーサを配置した。これらの P D M S 製シートおよびシリコーンゴム製スペーサの上に、当該 P D M S 製シートの穴に対応する位置に送液導入用の穴および送液排出用の穴が形成されている PMMA 製天板を載せた。これらのセンサーチップ、 P D M S 製シートおよびシリコーンゴム製スペーサ、ならびに PMMA 製天板の積層体を外周部で圧着し、ビスで固定して、 S P F S 用測定部材を作製した。  
30

## 【 0078 】

## ( 2 ) 蛍光標識化リガンドの作製

抗ミオグロビンモノクローナル抗体「 1 F 6 」溶液 ( IBL 社、 2.5 μg / mL ) と、 Alexa Fluor 647 標識キット ( Invitrogen 社 ) とを用いて、当該キットの所定の手順に従い、 Alexa Fluor 647 標識化 1 F 6 を作製した。その後、分子量カットフィルタ ( 日本ミリポア ( 株 ) ) を用いて未反応物を除去し、 Alexa Fluor 647 標識化 1 F 6 を精製し、下記アッセイの実施まで 4 で保存した。  
40

## 【 0079 】

## ( 3 ) アッセイの実施

前記工程 ( 1 ) で作製した測定部材の流路に、ミオグロビンを 1000 pg / mL ( = 1 ng / mL ) 含む PBS 溶液 0.1 mL を送液し、 25 分間循環させた。

## 【 0080 】

続いて、 Tween 20 を 0.05 質量 % 含むトリス緩衝生理食塩水 ( TBS ) を送液し、 10 分間循環させて流路を洗浄した後、前記工程 ( 2 ) で作製した Alexa Fluor 647 標識化 1 F 6 を 2 μg / mL 含む PBS 溶液を送液し、 5 分間循環させた。  
50

## 【0081】

再度、Tween 20を0.05質量%含むトリス緩衝生理食塩水(TBS)を送液し、10分間循環させて流路を洗浄した後、PBSバッファー(pH 7.4)で流路を満たした状態にしてから、測定領域の金属薄膜の裏面からレーザ光(640nm、40μW)を照射し、測定領域の上部に設置された光電子増倍管(PMT)で蛍光量を測定した。この測定値を、ミオグロビン濃度が1000pg/mLにおける「シグナル」(S)とした。

## 【0082】

一方、ミオグロビンを1000pg/mL含むPBS溶液の代わりにミオグロビンを全く含まない(0pg/mL)PBS溶液を送液し、それ以外は上記と同様の手順により、10蛍光量を測定した。この測定値を「ノイズ」(N)とした。

## 【0083】

また、送液するミオグロビンのPBS溶液の濃度を100000pg/mL、31600pg/mL、10000pg/mL、3160pg/mL、316pg/mL、100pg/mL、3.16pg/mL、10pg/mL、3.16pg/mL、1pg/mL、0.316pg/mLに変化させ、それ以外は上記と同様の手順により蛍光量を測定し、それらの測定値を各濃度における「シグナル」(S)とした。

## 【0084】

縦軸を「シグナル」-「ノイズ」(S-N)の値(単位:a.u.)、横軸をcTnIの濃度(単位:pg/mL)として、上記各濃度の結果をプロットした(図1、菱形)。このプロットに基づき、上記測定系によるミオグロビンの定量限界は2pg/mLであると判定した。

## 【0085】

## [実施例1-2] 5D6(固相)/15H1(標識)

前記センサーチップの作製工程(1)においてCMDに固定化した抗ミオグロビンモノクローナル抗体として「5D6」を用い、また前記蛍光標識化リガンドの作製工程(2)における抗ミオグロビンモノクローナル抗体として「15H1」を用い、得られたA1e<sub>x</sub>aF1uor647標識化15H1を前記アッセイの実施工程(3)で用いるように変更した以外は、実施例1-1と同様の操作を行い、「シグナル」および「ノイズ」を測定した。各濃度の結果をプロットし(図1、正方形)、上記測定系によるミオグロビンの定量限界は15pg/mLであると判定した。

## 【0086】

## [実施例1-3] 6H8B5(固相)/7C3(標識)

前記センサーチップの作製工程(1)においてCMDに固定化した抗ミオグロビンモノクローナル抗体として「6H8B5」を用い、また前記蛍光標識化リガンドの作製工程(2)における抗ミオグロビンモノクローナル抗体として「7C3」を用い、得られたA1e<sub>x</sub>aF1uor647標識化7C3を前記アッセイの実施工程(3)で用いるように変更した以外は、実施例1-1と同様の操作を行い、「シグナル」および「ノイズ」を測定した。各濃度の結果をプロットし(図1、三角形)、上記測定系によるミオグロビンの定量限界は210pg/mLであると判定した。

## 【0087】

上記以外にも、固定化した抗ミオグロビンモノクローナル抗体(固相抗体)および蛍光標識化リガンドに用いた抗ミオグロビンモノクローナル抗体(標識抗体)の様々な組み合わせについて、実施例1-1と同様の操作により検出限界ないし定量限界を求めた。結果(実施例1-1~1-3を含む。)を下記表に示す。

## 【0088】

10

20

30

40

【表2】

標識 抗体 固相 抗体	4E2	7C3	164.3A4	15H1	1B4	1F6	5D6	6A136	6H8B5	8A10	8L875	8L877
4E2	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7C3	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
164.3A4	○	○	-	○	○	△	○	○	×	○	○	○
15H1	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○
1B4	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○
1F6	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○
5D6	○	○	○	△	○	○	-	○	○	○	○	○
6A136	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○
6H8B5	○	×	○	○	○	△	○	○	-	○	○	○
8A10	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○
8L875	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	△
8L877	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-

○:検出限界(定量限界)1 pg/mL 以上 10 pg/mL 未満

△:検出限界(定量限界)10 pg/mL 以上 100 pg/mL 未満

×:検出限界(定量限界)100 pg/mL 以上 1000 pg/mL 未満

## [実施例2]

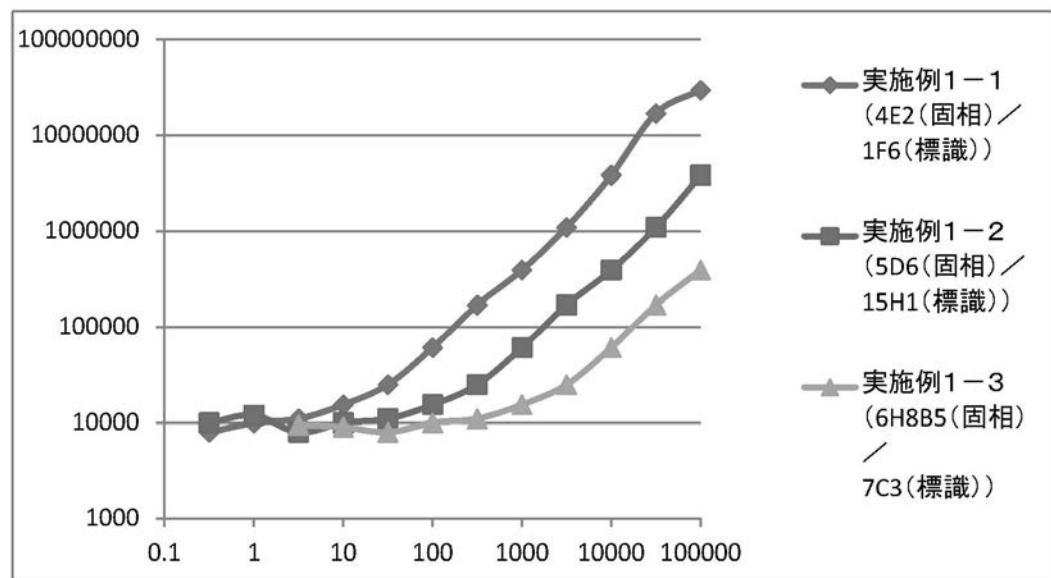
前記アッセイの実施工程(3)において、ミオグロビンを1000 pg/mL含むPBS溶液0.1mLの代わりに、ミオグロビンを1000 pg/mL含むヒト血清0.1mLを用いるよう変更した以外は、実施例1-1と同様の操作を行い、「シグナル」および「ノイズ」を測定した。各濃度の結果をプロットしたところ、実施例1-1と同様のシグモイド曲線が得られ、同様の定量限界を有すると判定した。

10

20

30

【図1】



---

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 21/64 G

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 DA05 DA06 EA01 GA07 GB01 GB02  
GB16 HA01 JA02 KA02 KA05 KA09 LA02

专利名称(译)	spfs ( 表面等离激元场增强荧光光谱法 ) 对肌红蛋白的免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013145139A</a>	公开(公告)日	2013-07-25
申请号	JP2012004967	申请日	2012-01-13
[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	磯田武寿 彼谷高敏 大谷真紀子		
发明人	磯田 武寿 彼谷 高敏 大谷 真紀子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/64		
F1分类号	G01N33/543.595 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/543.575 G01N21/64.F G01N21/64.G		
F-Term分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/DA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB01 2G043/GB02 2G043/GB16 2G043/HA01 2G043/JA02 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA02		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

**摘要：**要解决的问题：提供能够高度灵敏地定量测定或检测样品中肌红蛋白的方法。**解决方案：**样品中肌红蛋白的免疫测定包括以下步骤：形成夹心型免疫复合物，包括固相抗肌红蛋白抗体，肌红蛋白和荧光标记的抗肌红蛋白抗体；通过SPFS（表面等离子体场增强荧光光谱法）测量由形成的夹心型免疫复合物中包含的荧光材料发射的荧光强度。