

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4231104号

(P4231104)

(45) 発行日 平成21年2月25日(2009.2.25)

(24) 登録日 平成20年12月12日(2008.12.12)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 F
GO 1 N 21/03 (2006.01)	GO 1 N 21/03 Z
GO 1 N 21/49 (2006.01)	GO 1 N 21/49 Z
GO 1 N 21/59 (2006.01)	GO 1 N 21/59 Z

請求項の数 11 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2008-536359 (P2008-536359)	(73) 特許権者	000005821
(86) (22) 出願日	平成19年9月21日(2007.9.21)		パナソニック株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/068444		大阪府門真市大字門真1006番地
(87) 国際公開番号	W02008/038597	(74) 代理人	110000556
(87) 国際公開日	平成20年4月3日(2008.4.3)		特許業務法人 有古特許事務所
審査請求日	平成20年9月8日(2008.9.8)	(72) 発明者	湯川 系子
(31) 優先権主張番号	特願2006-260168 (P2006-260168)		大阪府門真市大字門真1006番地 松下
(32) 優先日	平成18年9月26日(2006.9.26)		電器産業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	田中 真司
(31) 優先権主張番号	特願2006-260169 (P2006-260169)		大阪府門真市大字門真1006番地 松下
(32) 優先日	平成18年9月26日(2006.9.26)		電器産業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	池田 信
早期審査対象出願			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】 免疫センサ及びそれを用いた測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

その内部空間が検体試料を保持するための試料保持部を構成する容器状の基体と、前記試料保持部に連通するように前記基体に形成された試料導入口と、前記検体試料に含まれる被測定物質に対する抗体を含む乾燥状態の第1の試薬体と、ポリエチレングリコールを含む乾燥状態の第2の試薬体と、を備え、前記試料保持部には、前記第1の試薬体が前記第2の試薬体よりも前記試料導入口に近く位置するように配置されている、免疫センサ。

【請求項2】

前記第1の試薬体が前記基体の内面に接着された状態で配置されている、請求項1に記載の免疫センサ。

【請求項3】

前記第2の試薬体の前記第1の試薬体と対向する部分が前記第2の試薬体に向けて突出する部分を有する、請求項1に記載の免疫センサ。

【請求項4】

前記第2の試薬体の前記第1の試薬体と対向する部分が球状である、請求項1に記載の免疫センサ。

【請求項5】

前記第2の試薬体はフタル酸の金属塩を含む、請求項1に記載の免疫センサ。

【請求項6】

10

20

前記フタル酸の金属塩がフタル酸水素カリウムである、請求項 5 に記載の免疫センサ。

【請求項 7】

前記ポリエチレングリコールに対する前記フタル酸水素カリウムの重量比が 0.26 以上、かつ、1.02 以下である、請求項 6 に記載の免疫センサ。

【請求項 8】

前記第 2 の試薬体はフタル酸水素カリウム、クエン酸三ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、及び塩化カリウムからなる群から選ばれる 1 の塩を含む、請求項 1 に記載の免疫センサ。

【請求項 9】

前記基体は、該基体を構成する壁を貫通するように光が透過する光透過部を有する、請求項 1 に記載の免疫センサ。

10

【請求項 10】

その内部空間が検体試料を保持するための試料保持部を構成する容器状の基体と、前記試料保持部に連通するように前記基体に形成された試料導入口と、前記検体試料に含まれる被測定物質に対する抗体を含む乾燥状態の第 1 の試薬体と、ポリエチレングリコールを含む乾燥状態の第 2 の試薬体と、を備え、前記試料保持部には、前記第 1 の試薬体が前記第 2 の試薬体よりも前記試料導入口に近く位置するように配置されている、免疫センサを用いた測定方法であって、

前記試料導入口から前記試料保持部に前記検体試料を導入する工程を有し、それにより、前記試料保持部に導入された前記検体試料が前記第 1 の試薬体と接触して、該第 1 の試薬体が前記検体試料に溶解した後、前記第 1 の試薬体が溶解した前記検体試料が前記第 2 の試薬体と接触して、該第 2 の試薬体が前記検体試料に溶解する、免疫センサを用いた測定方法。

20

【請求項 11】

前記試料保持部に導入された前記検体試料の全量に対する前記ポリエチレングリコールの濃度が、1 重量% 以上、かつ、15 重量% 以下である、請求項 10 に記載の免疫センサを用いた測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、免疫センサ及びそれを用いた測定方法、特に免疫センサの構造に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、試料中の成分を簡易に測定する方法として、試料中の成分（タンパク質）と特異的に認識する抗体を用いた抗原抗体反応により生じた凝集体を光学測定する、免疫比濁法や免疫比濁法が知られている。このような免疫比濁法や免疫比濁法により試料中の成分を測定する際に、容易に測定値の向上が可能で、高い測定感度が得られる免疫反応測定用試薬キットが知られている（例えば、特許文献 1 参照）。

【0003】

特許文献 1 に開示されている免疫反応測定用試薬キットでは、測定対象成分である被測定物質を含む試料と、その被測定物質に対する抗体と、フタル酸またはフタル酸の塩と、を含む反応系が構築されたときに、反応系の pH が 7 未満に設定されるように構成されている。これにより、反応系（溶液）の粘性を増大させることなく容易に測定値の向上が可能で、高い測定感度が得られる。なお、特許文献 1 では、抗原抗体反応を促進させ、微量成分を高感度に測定するために、反応系に、ポリエチレングリコール（以下、PEG とする）を添加することが開示されている。

40

【0004】

また、免疫比濁法や免疫比濁法により試料中の成分を測定するセンサとして、センサを構成する容器の内部に乾燥状態の抗体試薬を配置したセンサが知られている（例えば、特許文献 2 及び 3 参照）。特許文献 2 に開示されているセンサでは、試料を保持するための

50

試料保持部と、試料保持部に試料を供給するための試料導入口と、試料保持部内に設けられた試薬保持部と、を備えている。試薬保持部は、具体的には、抗ヒトアルブミン抗体を乾燥状態で担持したガラス繊維製の担体を、試料保持部を構成する容器の内周面に貼付することにより形成されている。なお、特許文献2の実施例においては、抗原抗体反応系へのNaCl、KCl及びCaCl<sub>2</sub>の添加が及ぼす影響を調べるために、反応系にポリエチレングリコールを添加して免疫比濁法により測定を行ったことが開示されている。

【0005】

一方、特許文献3には、管状容器と、該管状容器よりも小径の第2の管状容器と、管状容器と第2の管状容器との間の空隙に固定された血液検査用測定試薬と、前記空隙を封止するためのシール材と、を備える血液検査用容器が開示されている。この血液検査用容器では、シール材が、血液検査用測定試薬よりも上方の位置で第2の管状容器の外周面上端近傍と、管状容器の内周面との間に固着されている。そして、血液検査用測定試薬として凍結乾燥した抗体、シール材としてポリエチレングリコールを用いることが開示されている。

【特許文献1】国際公開第03/056333号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2005/108960号パンフレット

【特許文献3】特開2000-074910号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、特許文献1及び特許文献2に開示されている免疫反応測定用試薬キット及びセンサには、どのようにしてPEGを添加することについては、何ら開示されていない。また、特許文献3に開示されている血液検査用容器では、試料にシール材であるPEGが先に溶解するので、試料の粘度が高くなり、試薬である抗体が試料中に溶解し難いという問題があった。

【0007】

本発明は、上記課題を解決するためになされたもので、検体試料中の被測定物質の濃度を精度良く測定することができる免疫センサ及びそれを用いた測定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、免疫センサにおいて、抗体とPEGとを乾燥状態で担持する際に、両者が混合した状態で担持すると、検体試料中の抗原濃度に依存したセンサ応答が得られないことを見出した。そして、本発明者等は、抗体とPEGとの位置関係を規定することが、上記本発明の目的を達成する上で極めて有効であるということを見出し、本発明を想到した。

【0009】

すなわち、本発明に係る免疫センサは、その内部空間が検体試料を保持するための試料保持部を構成する容器状の基体と、前記試料保持部に連通するように前記基体に形成された試料導入口と、前記検体試料に含まれる被測定物質に対する抗体を含む乾燥状態の第1の試薬体と、ポリエチレングリコールを含む乾燥状態の第2の試薬体と、を備え、前記試料保持部には、前記第1の試薬体が前記第2の試薬体よりも前記試料導入口に近く位置するように配置されている。

【0010】

これにより、ポリエチレングリコールを含む第2の試薬体よりも第1の試薬体の方が、検体試料に先に接触するので、第1の試薬体に含まれている抗体が検体試料に容易に溶解することができる。また、抗体が、容易に溶解するので、検体試料中に含まれる被測定物質（抗原）と十分に反応するため、検体試料中の被測定物質の濃度を精度良く測定することができる。

【0011】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記第 1 の試薬体が前記基体の内面に接着された状態で配置されていてもよい。

【0012】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記第 2 の試薬体の前記第 1 の試薬体と対向する部分が前記第 2 の試薬体に向けて突出する部分を有していてもよい。

【0013】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記第 2 の試薬体の前記第 1 の試薬体と対向する部分が球状であってもよい。

【0014】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記第 2 の試薬体はフタル酸の金属塩を含むことが好ましい。

【0015】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記フタル酸の金属塩がフタル酸水素カリウムであってもよい。

【0016】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記ポリエチレングリコールに対する前記フタル酸水素カリウムの重量比が 0.26 以上、かつ、1.02 以下であってもよい。

【0017】

また、本発明に係る免疫センサでは、前記第 2 の試薬体は、クエン酸三ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、及び塩化カリウムからなる群から選ばれる 1 の塩を含んでもよい。

【0018】

さらに、本発明に係る免疫センサでは、前記基体は、該基体を構成する壁を貫通するように光が透過する光透過部を有してもよい。

【0019】

また、本発明に係る免疫センサを用いた測定方法は、その内部空間が検体試料を保持するための試料保持部を構成する容器状の基体と、前記試料保持部に連通するように前記基体に形成された試料導入口と、前記検体試料に含まれる被測定物質に対する抗体を含む乾燥状態の第 1 の試薬体と、ポリエチレングリコールを含む乾燥状態の第 2 の試薬体と、を備え、前記試料保持部には、前記第 1 の試薬体より前記試料導入口に近く位置するように配置されている、免疫センサを用いた測定方法であって、前記試料導入口から前記試料保持部に前記検体試料を導入する工程を有し、それにより、前記試料保持部に導入された前記検体試料が前記第 1 の試薬体と接触して、該第 1 の試薬体が前記検体試料に溶解した後、前記第 1 の試薬体が溶解した前記検体試料が前記第 2 の試薬体と接触して、該第 2 の試薬体が前記検体試料に溶解する。

【0020】

これにより、ポリエチレングリコールを含む第 2 の試薬体よりも第 1 の試薬体の方が、検体試料に先に接触するので、第 1 の試薬体に含まれている抗体が検体試料に容易に溶解することができる。また、抗体が、容易に溶解するので、検体試料中に含まれる被測定物質（抗原）と十分に反応するため、検体試料中の被測定物質の濃度を精度良く測定することができる。

【0021】

また、本発明に係る免疫センサを用いた測定方法では、前記試料保持部に導入された前記検体試料の全量に対する前記ポリエチレングリコールの濃度が、1 重量%以上、かつ、15 重量%以下であってもよい。

【発明の効果】

【0022】

本発明に係る免疫センサ及びそれを用いる測定方法によれば、簡易な構成で、抗体の劣化を抑制し、検体試料中の被測定物質の濃度を精度良く測定することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 3 】

以下、本発明を実施するための最良の形態について、図面を参照しながら詳細に説明する。なお、全ての図面において、同一又は相当部分には同一符号を付し、重複する説明は省略する。

## 【 0 0 2 4 】

(実施の形態 1)

本発明の実施の形態 1 では、検体試料が尿であり、被測定物質がヒトアルブミンであり、免疫比濁法により被測定物質を検出する場合を例示する。

## 【 0 0 2 5 】

[免疫センサの構成]

まず、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサの構成について、図 1 及び図 2 を参照しながら説明する。

## 【 0 0 2 6 】

図 1 は、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサの構成を模式的に示す斜視図である。また、図 2 は、図 1 に示す免疫センサの I I - I I 線における断面を模式的に示す断面図である。

## 【 0 0 2 7 】

図 1 及び図 2 に示すように、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサ 1 0 0 は、透明でポリスチレン製の基体 1 0 1 を備えている。基体 1 0 1 は、直方体状の容器で形成されており、第 1 乃至第 4 の面 1 0 5 ~ 1 0 8 を有する。基体 1 0 1 の内部には、検体試料を保持するための空間 1 0 2 (以下、試料保持部 1 0 2 という) が設けられている。また、基体 1 0 1 の一方の端部は閉鎖され、他方の端部は外部に開放されている。そして、この開放端部が、吸引口 1 0 4 として機能する。

## 【 0 0 2 8 】

また、基体 1 0 1 の第 1 の面 1 0 5 の下部には、厚み方向に貫通する貫通孔 1 0 3 が設けられており、該貫通孔 1 0 3 が、試料導入口 1 0 3 として機能する。なお、本発明の実施の形態では、後述するように、免疫センサ 1 0 0 を測定装置 3 0 0 に装着し、免疫センサ 1 0 0 の一部を、例えば、基体内に採取された尿に浸漬した後、測定装置 3 0 0 のピストン機構 4 0 4 (図 3 及び図 4 参照) により吸引口 1 0 4 から試料保持部 1 0 2 の内部の空気を吸引することで、試料保持部 1 0 2 に検体試料としての尿を導入することができる。

## 【 0 0 2 9 】

また、基体 1 0 1 における試料保持部 1 0 2 の下部には、抗体(ここでは、抗ヒトアルブミン抗体)を含む、直方体状の第 1 の試薬体 1 0 9 が配置され、その上方には、ポリエチレングリコール(以下、PEG という)を含む、球状の第 2 の試薬体 1 1 0 が配置されている。換言すれば、第 1 の試薬体 1 0 9 は、第 2 の試薬体 1 1 0 よりも試料導入口 1 0 3 に近い側に分離して配置されている。これにより、試料導入口 1 0 3 から導入された検体試料は、第 2 の試薬体 1 1 0 よりも第 1 の試薬体 1 0 9 の方が、先に溶解するので、第 2 の試薬体 1 1 0 に含まれる PEG により、検体試料の粘度が増加することがなく、第 1 の試薬体に含まれる抗体を容易に溶解することができる。

## 【 0 0 3 0 】

なお、第 1 の試薬体 1 0 9 とは、抗体を含む溶液を凍結乾燥して作製したものをいい、第 2 の試薬体 1 1 0 とは、PEG を含む溶液を凍結乾燥して作製したものをいう。また、第 1 の試薬体 1 0 9 と第 2 の試薬体 1 1 0 が分離して配置されているとは、抗体と PEG とが、それぞれ単一の化合物として、第 1 の試薬体 1 0 9 及び第 2 の試薬体 1 1 0 に含まれることを意味し、抗体と PEG との混合物を凍結乾燥したものを含まないことを意味する。

## 【 0 0 3 1 】

また、基体 1 0 1 の外周面を構成する 4 つの面のうち、第 2 の面 1 0 6 が、光入射部 1 0 6 として機能し、第 3 の面 1 0 7 が、光出射部 1 0 7 として機能する。そして、本発明

10

20

30

40

50

の実施の形態においては、これらの第2の面（光入射部）106と第3の面（光出射部）107とにより、試料保持部102が保持する検体試料の光学測定を行うための光透過部111が構成される。

#### 【0032】

ここで、光入射部106及び光出射部107は、光学的に透明な材料、又は、可視光を実質的に吸収しない材料により形成されていることが好ましい。その材料としては、例えば、石英、ガラス、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチル等が挙げられる。特に、免疫センサ100を使い捨てタイプの免疫センサとする場合には、コストの観点から、ポリスチレンにより形成することが好ましい。

#### 【0033】

なお、本発明の実施の形態では、基体101全体を透明にする構成としたが、これに限定されず、後述する測定装置300の光源407から出射される光が照射される部分（光入射部106）と、照射された光が基体101から測定装置300の受光器408に出射される部分（光出射部107）とが、透明に構成されていればよい。また、本発明の実施の形態では、基体101の光入射部106に入射された光の散乱光を検出する免疫比濁法を用いたために、光出射部107を光入射部106に対向しないように設けたが、免疫比濁法により被測定物質を検出する場合は、光入射部106と光出射部107は、互いに対向するように設けられる。

#### 【0034】

また、本発明の実施の形態において、免疫センサ100は、後述する測定装置300の免疫センサ取付け部301に着脱可能な状態で取付けられることが好ましい。また、免疫センサ100は、検体試料に含まれる被検物質の正確な測定を実現するために、使い捨てとすることが好ましい。

#### 【0035】

##### [第1の試薬体及び第2の試薬体の構成]

次に、本発明の実施の形態1に係る免疫センサ100における第1の試薬体109と第2の試薬体110の構成について、図2を参照しながら詳細に説明する。

#### 【0036】

第1の試薬体109は、第1の試薬体109に含まれる抗体をより溶解しやすくする観点から、基体101の内周面と接着するように配置されていることが好ましく、基体101の内周面及び底面と接着するように配置されていることがより好ましい。そして、第1の試薬体109と第2の試薬体110は、第1の試薬体109に含まれる抗体の劣化を抑制する観点から、分離して配置されていることが好ましく、第1の試薬体109に含まれる抗体をより溶解しやすくする観点から、近接して配置されていることが好ましい。

#### 【0037】

したがって、第1の試薬体109に含まれる抗体の劣化を抑制し、抗体をより溶解しやすくする観点から、第1の試薬体109と第2の試薬体110との距離 $h$ が、小さい方が好ましい。なお、第1の試薬体109と第2の試薬体110は、接触して配置されていてもよい。この場合、第1の試薬体109と第2の試薬体110との接触面積を小さくする観点から、第2の試薬体110における第1の試薬体109の上面と対向する部分が、下方に突出していることが好ましく、球状に形成されていることがより好ましい。

#### 【0038】

また、第1の試薬体109に含まれる抗体は、ポリクローナル抗体を用いてもよく、モノクローナル抗体を用いてもよい。また、複数種類のモノクローナル抗体を組み合わせ用いてもよい。ポリクローナル抗体は、作製するのが容易であり、一方、モノクローナル抗体は、抗体産生細胞を作製すれば、同じ抗体が得られるので、品質管理が容易である。また、第1の試薬体109に含まれる抗体としては、アルブミンやC反応性タンパク（CRP）等の尿に含まれるタンパク質に対する抗体や、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG：ヒト妊娠ホルモン）、LH（黄体形成ホルモン）等の尿に含まれるホルモンに対する抗体等が挙げられる。なお、抗ヒトアルブミン抗体を用いる場合には、試料中のアルブミ

10

20

30

40

50

ンとの抗原抗体反応を過不足なく行わせる観点から、基体100の試薬保持部102に導入された検体試料の全量に対して、0.1~20mg/mLとなるように第1の試薬体109に含まれていることが好ましい。

#### 【0039】

また、第2の試薬体110に含まれるPEGは、非測定物質以外との非特異的な凝集が生じにくいという観点から、その重合度が、158~204であることが好ましく、その平均分子量が、7000~9000であることが好ましい。また、PEGは、良好な凝集促進効果が得られる観点から、基体100の試薬保持部102に導入された検体試料の全量に対して、1重量%以上になるように、第2の試薬体110に含まれていることが好ましく、試料の粘度を的確にする観点から、15重量%以下になるように第2の試薬体110に含まれていることが好ましく、これらの観点から、4重量%になるように第2の試薬体110に含まれていることがより好ましい。

10

さらに、第2の試薬体110には、免疫比濁の応答値を増幅する、すなわち、測定装置300で測定したときに、容易に測定値の向上が可能で、高い測定感度が得られる観点から、フタル酸の金属塩が含まれていることが好ましい。フタル酸の金属塩としては、フタル酸のカリウム塩、フタル酸のナトリウム塩が挙げられ、これらの金属塩は、水に溶解しやすいので好ましい。また、免疫比濁の応答値を増幅し、水への溶解度が高いことから、第2の試薬体110には、フタル酸水素カリウムが含まれるのがより好ましい。

#### 【0040】

そして、第2の試薬体110に含まれるPEGの重量Xに対するフタル酸水素カリウムの重量Yの比Y/Xが、PEGの溶解度が高くなる観点から、0.26~1.02であることが好ましく、0.26~0.51であることがより好ましい。

20

#### 【0041】

また、第2の試薬体110に含まれるPEGの溶解度を高くする観点から、第2の試薬体110には、クエン酸三ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、及び塩化カリウムからなる群から選ばれる1の塩が含まれていてもよい。

#### 【0042】

なお、PEGに塩を加えることにより、溶解度が高くなるのは、以下の理由によるものと推察する。すなわち、PEGに塩を加えて、凍結乾燥すると難溶性の高分子化合物の周辺に塩を囲みこんだような微細構造を持った固体（以下、塩含有高分子化合物）が形成されると推察される。そして、塩に易溶性のものを選択すると、塩含有高分子化合物に検体試料（水溶液）が接したときに、塩が水を直ちに抱き込むことにより、塩含有高分子化合物の周囲が水が充満するために、高分子化合物（PEG）の溶解度が高くなると推察する。また、塩により、同じ極性同士の高分子化合物が集まるのを阻止することにより、PEGの溶解度が高くなると推察する。

30

#### 【0043】

[免疫センサの作製方法]

次に、本発明の実施の形態1に係る免疫センサ100の作製方法について説明する。

#### 【0044】

まず、図1及び図2に示す基体101の形状となるように鋳型を作成し、基体101を構成する材料（例えば、ポリスチレン等）を液状にして鋳型に流し込むことで製造する。このとき、基体101全体を透明になるように透明な材料を溶解して鋳型に流し込んでよく、また、透過部111のみを透明になるように形成してもよい。

40

#### 【0045】

次に、50mM フタル酸水素カリウム水溶液（pH5.0）に抗アルブミン抗体試薬（8mg/mL）を加えた抗アルブミン抗体試薬溶液を作製し、基体101の試料供給口103を接着テープで塞いだ後、抗アルブミン抗体試薬溶液を吸引口104から試薬保持部102の下部に注入し、-80の冷凍庫に移す。これにより、抗アルブミン抗体試薬溶液が凍結して、基体101の内周面及び底面と接着し、試薬保持部102の下部に第1の試薬体109が形成される。

50

## 【 0 0 4 6 】

次に、250 mM フタル酸水素カリウム水溶液 (pH 5.0) に、PEG の濃度が 20 重量% になるまで PEG を加えて、攪拌し、PEG 試薬溶液を作製する。ついで、第 1 の試薬体 109 を形成した基体 101 を、液体窒素の入った容器の中に移し、吸引口 104 から PEG 試薬溶液を注入する。これにより、第 1 の試薬体 109 に含まれる抗アルブミン抗体が凍結されることなく、第 1 の試薬体 109 の上部に、該第 1 の試薬体 109 と接触するように、球状の PEG 試薬溶液が配置される。そして、この PEG 試薬溶液は、直ちに凍結するので、第 2 の試薬体 110 が、第 1 の試薬体 109 と接触するように形成される。

## 【 0 0 4 7 】

なお、PEG 試薬溶液を液体窒素の入った容器の中に、滴下して、PEG 試薬溶液を凍結させて、球状の第 2 の試薬体 110 を作製し、このようにして作製した第 2 の試薬体 110 を吸引口 104 から圧入することにより、第 2 の試薬体 110 を試薬保持部 102 に配置してもよい。このように圧入すると、第 1 の試薬体 109 と第 2 の試薬体 110 とを分離して、試薬保持部 102 に配置することができる。

## 【 0 0 4 8 】

次に、試薬保持部 102 に第 1 及び第 2 の試薬体 109、110 を配置した基体 101 をすばやく凍結乾燥機のチャンパー内に設置し、オーバーナイトで凍結乾燥することにより、免疫センサ 100 が作製される。

## 【 0 0 4 9 】

## [測定装置の構成]

次に、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサ 100 を用いる測定装置について、図 3 及び図 4 を参照しながら説明する。なお、本発明の実施の形態に係る測定装置自体の構成は、公知の測定装置の構成と同様であるため、以下の説明では、測定装置の構成の詳細な説明は省略する。

## 【 0 0 5 0 】

図 3 は、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサ 100 を用いる測定装置の構成を模式的に示す斜視図である。また、図 4 は、図 3 に示す測定装置の機能上の構成を模式的に示すブロック図である。

## 【 0 0 5 1 】

図 3 に示すように、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサ 100 を用いる測定装置 300 は、免疫センサ取付け部 301、表示部 302、試料吸引開始ボタン 303、及び免疫センサ取外しボタン 304 を備えている。免疫センサ取付け部 301 には、免疫センサ 100 の吸引口 104 に着脱可能に接合するためのセンサ装着口 305 が設けられている。また、センサ装着口 305 の内側には、シリンダ (図示せず) とシリンダ内を摺動するピストン (図示せず) からなるピストン機構 404 (図 4 参照) が設けられている。そして、このピストン機構 404 のピストンによって吸引されることにより、吸引口 104 から空気が吸引されて免疫センサ 100 の試薬保持部 102 に検体試料が導入される。

## 【 0 0 5 2 】

また、測定装置 300 の主面側には、測定結果が表示されるディスプレイである表示部 302 と、試料吸引開始ボタン 303 と、免疫センサ取外しボタン 304 と、が設けられている。

## 【 0 0 5 3 】

一方、図 4 に示すように、測定装置 300 の内部には、光源 407、受光器 408、ピストン機構 404、及び免疫センサ取外し機構 410 が設けられている。光源 407 は、免疫センサ取付け部 301 に取り付けられた免疫センサ 100 の光入射部 106 に入射させるための光を出射し、受光器 408 は、免疫センサ 100 の光出射部 107 から出射した光を受光するように構成されている。

## 【 0 0 5 4 】

また、ピストン機構 404 は、ピストンをリニア型のステップモータにより進退動作さ

10

20

30

40

50

せるように構成されており、免疫センサ取外し機構410は、免疫センサ取外しボタン304を作業者が押すと、免疫センサ100が測定装置300から脱離するように構成されている。なお、ピストン機構404は、ここでは、リニア型のステップモータによりピストンを進退動作させる構成としたが、これに限定されず、手動によりピストンを進退動作させる構成としてもよい。手動によりピストンを進退動作させるための機構としては、従来のシリンジ、ディスペンサー等が挙げられる。但し、ピストンを進退動作させるための形態としては、手動であっても自動であってもよいが、作業者の負担を軽減することができるという観点から、ピストンを自動的に進退動作させる形態が好ましい。また、ピストン機構404においてピストンを進退動作させる動力源としては、必ずしもリニア型のステップモータを用いる必要はなく、ステップモータや直流モータ等の一般的な動力源を用いてもよい。

10

#### 【0055】

ここで、ステップモータは、入力された1パルスの信号に応じて特定の回転角度だけ回転子が回転するモータであり、入力するパルス数により回転子の回転角度を決定することができるため、位置決めのためのエンコーダーを必要とはしない。つまり、ステップモータとは、入力するパルス数によりピストンの動作距離を適宜制御することが可能なモータである。そして、ステップモータによるピストンの進退動作は、ステップモータの回転子の回転運動を歯車機構と雄ネジ及び雌ネジを組み合わせた直進機構等により直進運動に変換することにより可能となる。また、直流モータを用いてピストンを進退動作させるためには、回転子の回転運動を直進運動に変換する直進機構等が必要になると共に、ピストンの動作距離を適切に制御するために、回転子の回転位置を検出するためのエンコーダーが必要になる。

20

#### 【0056】

一方、リニア型のステップモータは、その内部に雄ネジと雌ネジとを組み合わせた直進機構が組み入れられており、入力するパルス数に依存して、棒状の可動部が直進運動するように構成されている。このため、この棒状の可動部にピストンを直接連結することでピストン機構404を構成することができるので、ピストン機構404の構成を比較的単純な構成とすることが可能になる。

#### 【0057】

さらに、測定装置300の内部には、受光器408により受光された免疫センサ100の光出射部107からの出射光に基づき検体試料に含まれる被測定物質を検出、又は定量するための演算部を備えるコントローラ401と、被測定物質であるヒトアルブミンの濃度と受光器408により受光される光出射部107からの出射光の強度との相関関係を表す検量線に関するデータを格納するメモリ409と、測定結果を記録するための記録部411と、測定結果を外部に送信するための送信部412と、外部から分析結果を受信するための受信部413と、経過時間を計測するための計時部406と、が設けられている。

30

#### 【0058】

##### [免疫センサを用いた測定方法]

次に、本発明の実施の形態1に係る免疫センサ100を用いる測定装置300による検体試料に含まれる被測定物質の測定方法について、図1～図5を参照しながら説明する。

40

#### 【0059】

図5は、本発明の実施の形態1に係る免疫センサ100を用いた測定装置の被測定物質の測定方法を模式的に示すフローチャートである。なお、図5では、便宜上、測定装置の動作に付随する作業者の操作及びそれに伴い進行する化学反応等についても図示している。

#### 【0060】

作業者は、まず、免疫センサ100の吸引口104を測定装置300の免疫センサ取付け部301のセンサ装着口305に接合して、免疫センサ取付け部301に免疫センサ100を取付ける(ステップS1)。

#### 【0061】

50

免疫センサ 100 が取付けられると、測定装置 300 では、免疫センサ取付け部 301 の内部に設けられたマイクロスイッチからなる免疫センサ挿入検出スイッチ（図示せず）が作動して、制御部として機能するコントローラ 401 が免疫センサ 100 の挿入を検知する。これにより、測定装置 300 の電源が ON 状態とされる（ステップ S 2）。

【0062】

次に、作業者は、例えば、便器の内部に設けられた受尿容器又は紙コップ等の運搬可能な容器に採取された尿に、免疫センサ 100 を少なくともその試料導入口 103 が浸漬する位置まで浸漬させる（ステップ S 3）。

【0063】

続いて、作業者は、測定装置 300 の試料吸引開始ボタン 303 を押下することにより、ピストン機構 404 を作動させる。これにより、ピストン機構 404 の内部に設けられたピストンが動き、免疫センサ 100 の試料導入口 103 から試料保持部 102 に所定量（例えば、3 mL）の尿が導入される（ステップ S 4）。

【0064】

このとき、試薬保持部 102 内に導入された尿は、試料導入口 103 に近い側に配置されている第 1 の試薬体 109 の抗アルブミン抗体と接触して、該抗アルブミン抗体が尿中に溶解される。ついで、第 2 の試薬体 110 の PEG 及びフタル酸水素ナトリウム等の塩が尿中に溶解される。このように、検体試料である尿が、第 1 の試薬体 109 に含まれる抗アルブミン抗体と先に接触するので、尿の粘度が増加することがない。このため、抗アルブミン抗体が、容易に尿中に溶解することができる。また、第 2 の試薬体 110 には、PEG とフタル酸水素ナトリウム等の塩が含まれているので、PEG が容易に尿中に溶解することができる。

【0065】

そして、尿中に第 1 の試薬体 109 と第 2 の試薬体 110 が溶解すると、免疫センサ 100 の試料保持部 102 では、尿に含まれる抗原であるヒトアルブミンと抗ヒトアルブミン抗体との抗原抗体反応が進行する（ステップ S 6）。

【0066】

一方、ステップ S 4 において免疫センサ 100 の試料保持部 102 に検体試料が導入されると、測定装置 300 のコントローラ 401 は、計時部 406 としてのタイマーを作動させることにより、試料保持部 102 に検体試料が導入されてからの経過時間の測定を開始させる（ステップ S 7）。

【0067】

次いで、測定装置 300 のコントローラ 401 は、計時部 406 の出力信号により試料保持部 102 への検体試料の供給完了からの経過時間  $T_d$  が所定の経過時間  $T_{pd}$ （例えば、45 秒間）に到達したと判定すると（ステップ S 8 で YES）、免疫センサ 100 の試料保持部 102 が保持する検体試料の光学測定を開始させる（ステップ S 9）。

【0068】

この検体試料の光学測定が行われる際、測定装置 300 のコントローラ 401 は、光源 407 による免疫センサ 100 の光入射部 106 への光の照射が行われるよう制御する。具体的には、コントローラ 401 は、光源 407 から出射して、免疫センサ 100 の光入射部 106 を通して試料保持部 102 に光を入射し、検体試料としての尿を透過及び散乱し、光出射部 107 から出射した光を、所定の時間（例えば、50 ミリ秒間）、測定装置 300 に設けられた受光器 408 により受光するように制御する。

【0069】

なお、測定装置 300 のコントローラ 401 は、計時部 406 の出力信号により試料保持部 102 への検体試料の供給完了からの経過時間  $T_d$  が所定の経過時間  $T_{pd}$  に到達してはいないと判定すると（ステップ S 8 で NO）、経過時間  $T_d$  の測定を継続するように制御する。

【0070】

そして、測定装置 300 のコントローラ 401 は、メモリ 409 に格納されている出射

10

20

30

40

50

光強度とヒトアルブミン濃度との相関関係を示す検量線を読み出し、この検量線を参照することにより、受光器408により受光された出射光の強度をヒトアルブミン濃度に換算する。これにより、測定装置300は、検体試料としての尿に含まれる被検物質としてのヒトアルブミンの定量を行う(ステップS10)。

【0071】

ステップS10において被検物質としてのヒトアルブミンの定量が行われると、その定量動作により得られたヒトアルブミン濃度は、測定装置300の表示部302に表示される。これにより、測定装置300のユーザーは、尿に含まれるヒトアルブミン濃度の測定の完了を知ることができる。この際、好ましくは、定量動作により得られたヒトアルブミン濃度は、計時部406により計時された時刻と共に、メモリ409に保存される。

10

【0072】

本発明の実施の形態に係る測定装置300の構成によれば、定量動作により得られたヒトアルブミン濃度に関するデータを、記録部411によりSDカード等の取り外し可能な記憶媒体に記録することができる。これにより、測定結果を測定装置300から容易に取り出すことができるので、記憶媒体を分析専門業者に持参若しくは郵送して、その詳細な分析を依頼することが可能になる。

【0073】

また、本発明の実施の形態に係る測定装置300の構成によれば、定量動作により得られたヒトアルブミン濃度に関するデータを、送信部412により測定装置300の外部に送信することができる。これにより、測定結果を病院内の分析関連部門又は分析関連業者等に送信し、それを分析関連部門又は分析関連業者等において分析することができるので、測定から分析までの所要時間を短縮することが可能になる。

20

【0074】

さらに、本発明の実施の形態に係る測定装置300の構成によれば、分析関連部門又は分析関連業者等において分析した結果を受信するための受信部413が設けられているので、分析結果をユーザーに向けて迅速にフィードバックすることが可能になる。

【0075】

最後に、作業者により測定装置300の免疫センサ取外しボタン304が押下されると、免疫センサ取外し機構410が作動して、ピストン機構404の内部のピストンが移動されることにより、免疫センサ100aの試料保持部102が保持する尿が試料導入口103から便器内や紙コップ等の基体内に排出され、免疫センサ100が測定装置300から自動的に取り外される(ステップS11)。

30

【0076】

免疫センサ100が取り外されると、測定装置300では、免疫センサ取付け部301の内部に設けられた免疫センサ挿入検知スイッチが作動して、コントローラ401が免疫センサ100の脱離を検知する。これにより、測定装置300の電源がOFF状態とされる(ステップS12)。

【0077】

なお、本発明の実施の形態では、測定装置300が免疫センサ100から検体試料を排出させ、かつ、それを自動的に脱離させる構成としたが、これに限定されず、例えば、免疫センサ100の取外し及び検体試料排出の機構を設けることなく、ユーザーが手動により免疫センサ100を免疫センサ取付け部301から取り外す構成としてもよい。

40

【0078】

このように、本発明の実施の形態1に係る免疫センサ100及びそれを用いる測定装置では、第1の試薬体109に含まれる抗体と、第2の試薬体110に含まれるPEGと、を純物質として、試薬保持部102に配置することにより、抗体の劣化を抑制することができる。また、第1の試薬体109を試料導入口103の近い側に配置することにより、検体試料に第1の試薬体109の抗体が先に接触するので、抗体を検体試料中に容易に溶解させることができる。さらに、第2の試薬体110にフタル酸水素カリウム等の塩を含有させることにより、第2の試薬体110に含まれるPEGの検体試料への溶解を容易に

50

行うことができる。そして、検体試料中に P E G 及びフタル酸水素カリウム等のフタル酸の金属塩を溶解させることにより、免疫比濁の応答値を増幅し、高い測定感度を得ることができる。

【 0 0 7 9 】

なお、本発明の実施の形態における検体試料としては、血清、血漿、尿、間質液、リンパ液等の体液、培地の上清液等の液体が挙げられる。特に、尿素を含む検体試料としての尿は、非侵襲的に在宅での日常の健康管理を行うことができるので好ましい。また、上記体液中の特定の成分と反応する試薬、例えば、酵素、抗体、若しくは色素等を体液と混合したものを、検体試料として免疫センサ 1 0 0 に導入してもよい。

【 0 0 8 0 】

また、健康管理の最初の段階で行われる尿の定性検査、腎機能検査、妊娠検査・排卵検査等を鑑みると、蛋白や、微量アルブミン、h C G、L H 等のホルモン等に関する測定の実望があり、その測定には抗原 - 抗体反応に基づいた光学測定が適している。従って、本発明における被測定物質としては、例えば、アルブミン、h C G、L H、C R P、I g G、内臓脂肪関連のホルモン等が挙げられる。また、光学測定方法としては、免疫比濁法、免疫比濁法、ラテックス免疫凝集法等の、抗原 - 抗体反応に基づいて検体試料に生じた濁り具合を測定する方法が挙げられる。

【実施例】

【 0 0 8 1 】

以下、本発明の実施例について、本発明の効果を理解しやすくするために比較例と比較しながら説明する。

【 0 0 8 2 】

[ 実施例 1 ]

実施例 1 では、本発明の実施の形態 1 に係る免疫センサ 1 0 0 を上記製造方法に従って、作製した。

【 0 0 8 3 】

まず、表 1 に示す産生細胞株からそれぞれ産生された第 1 の抗体 ~ 第 5 の抗体を重量比 1 : 1 : 1 : 1 : 1 で混合し、5 0 m M フタル酸水素カリウム水溶液 ( p H 5 . 0 ) 中に抗アルブミンモノクローナル抗体が 8 m g / m L の濃度となるように調整して、抗アルブミン抗体試薬を作製した。また、2 5 0 m M フタル酸水素カリウム水溶液 ( p H 5 . 0 ) に、平均分子量が 7 3 0 0 ~ 9 3 0 0 である P E G ( ポリエチレングリコール 6 0 0 0 ( 和光純薬工業株式会社製 ) ) を加えて、P E G が 2 0 重量 % になるように調整して、P E G 試薬溶液を作製した。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

【表 1】

	抗体が産生される産生細胞株の受託番号 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)
第1の抗体	FERM BP-7938号
第2の抗体	FERM BP-10460号
第3の抗体	FERM BP-10637号
第4の抗体	FERM BP-10459号
第5の抗体	FERM BP-7937号

10

20

30

40

次に、免疫センサ100の基体101は透明のポリスチレンで作製した。このとき、基体101の寸法(内寸)は、幅を8mm、奥行きを8mm、高さを45mmとした。

## 【0085】

そして、基体101の試料供給口103を接着テープで塞いだ後、抗アルブミン抗体試薬溶液125 $\mu$ Lを吸引口104から試薬保持部102の下部に注入し、-80の冷凍庫で凍らせ、第1の試薬体109を作製した。約3時間後、上記冷凍庫から液体窒素の入った容器の中に基体101をすばやく移し、吸引口104から試薬保持部102にPEG試薬溶液100 $\mu$ Lを注入して、第1の試薬体109の上部と接触するように第2の試薬体110を形成した。

50

## 【0086】

続いて、第1及び第2の試薬体109、110が形成された基体101をすばやく凍結乾燥機のチャンバー内に設置し、オーバーナイトで凍結乾燥することにより、本実施例1の免疫センサ100を作製した。最後に、作製した免疫センサ100の吸引口104をパラフィルム（登録商標）でシールし、シリカゲルを含む密閉容器中に4で保管した。

## 【0087】

## [比較例1]

比較例1では、上記実施例1と同様に、免疫センサ100を作製したが、第1の試薬体109を構成する抗アルブミン抗体試薬と、第2の試薬体を構成するPEG試薬溶液と、を混合して、試薬保持部102に配置した点が、実施例1の免疫センサ100と異なる。具体的には、実施例1で作製した抗アルブミン抗体試薬125 $\mu$ LとPEG試薬溶液100 $\mu$ Lとを混合して、混合溶液を作製した。そして、この混合溶液を吸引口104から試薬保持部102の下部に注入して、-80の冷凍庫で約3時間凍らせた。それから、基体101をすばやく凍結乾燥機のチャンバー内に設置し、オーバーナイトで凍結乾燥することにより、比較例1の免疫センサ100を作製した。最後に、作製した免疫センサ100の吸引口104をパラフィルム（登録商標）でシールし、シリカゲルを含む密閉容器中に4で保管した。

10

## 【0088】

## [比較例2]

比較例2では、上記実施例1と同様に、免疫センサ100を作製したが、第2の試薬体110が第1の試薬体109よりも下側に配置されている（換言すると、第2の試薬体110の方が、第1の試薬体109よりも試料導入口103に近い側に配置されている）点が、実施例1の免疫センサ100と異なる。具体的には、実施例1で作製したPEG試薬溶液100 $\mu$ Lを先に、吸引口104から試薬保持部102の下部に注入し、-80の冷凍庫で凍らせ、第2の試薬体110を作製した。そして、実施例1で作製した抗アルブミン抗体試薬125 $\mu$ Lを吸引口104から注入して、第2の試薬体110の上部と接触するように第1の試薬体109を形成した。

20

## 【0089】

## 《評価試験1》

実施例1及び比較例1の免疫センサ100を用いて、ヒトアルブミン（以下、hSAと略称する）を含む検体試料の測定を行った。検体試料としては、hSA濃度がそれぞれ0、1、5、10、15、20mg/dLのhSA水溶液を用いた。

30

## 【0090】

まず、シリカゲルを含む密閉容器から免疫センサ100を取り出し、免疫センサ100の吸引口104を覆っているパラフィルム（登録商標）を剥がした後、吸引口104を吸引ポンプと接続した。吸引ポンプとしては、ピストンをステップモータで動作させることにより吸引する構成のものを用いた。

## 【0091】

次に、試料供給口103を塞いでいる接着テープを取り除いた後、試料供給口103が検体試料中に浸漬するように、免疫センサ100を検体試料が保持されている容器中に浸漬した。浸漬後、直ちに吸引ポンプを作動させ、試料供給口103から試薬保持部102内に500 $\mu$ Lの検体試料を15秒間で吸引した。この際、吸引ポンプによる吸引速度は、吸引開始から約0.5秒までは約1140 $\mu$ L/sec、約0.5秒から14.5秒までは10 $\mu$ L/sec、約14.5秒から15秒までは再び1140 $\mu$ L/secとした。

40

## 【0092】

そして、検体試料の吸引開始から45秒後に、光源407から出射された640nmのレーザー光を光入射部106である第2の面106に照射し、光出射部107である第3の面107から出射した90度の散乱光を受光器408により測定した。

## 【0093】

50

図6は、実施例1及び比較例1の免疫センサ100についての評価試験1の結果を示したものである。図6において、横軸は検体試料中におけるhSA濃度(mg/dL)、縦軸は受光器において検出された散乱光強度(任意強度)であり、黒丸のシンボルにより示されるデータ(実線)は、実施例1の結果を示し、黒三角のシンボルにより示されるデータ(点線)は比較例1の結果を示す。

【0094】

図6に示すように、実施例1の免疫センサを用いた場合は、0~20mg/dLの濃度範囲において、抗体濃度に比例した散乱光強度を得ることができ、応答特性は良好な直線性を示した。一方、比較例1の免疫センサを用いた場合は、hSA濃度が0の検体試料を測定したときの散乱光強度で定義されるブランク値が、実施例1の免疫センサと比較して高くなった。また、hSA濃度に比例した散乱光強度は得られなかった。

10

【0095】

以上の結果から、本発明の免疫センサ100により、検体試料中のアルブミン濃度を精度良く測定することができることが確認された。

【0096】

《評価試験2》

実施例1及び比較例2の免疫センサ100を用いて、試薬保持部102に配置された第1及び第2の試薬体109、110の検体試料に対する溶け方を比較した。検体試料としては、hSA濃度が0である水溶液を用いた。

【0097】

20

検体試料を試薬保持部102に導入する手順は、評価試験1の手順と同様であるため、説明を省略する。なお、試薬保持部102に配置された第1及び第2の試薬体109、110の検体試料に対する溶け方は、検体試料吸引の終了後に目視で評価した。

【0098】

実施例1の免疫センサ100を用いた場合は、試薬保持部102に配置された抗アルブミン抗体試薬(第1の試薬体109)及びPEG試薬(第2の試薬体110)は共に検体試料に溶解することが確認された。一方、比較例2の免疫センサ100を用いた場合は、抗アルブミン抗体試薬が約40%溶け残っているのを確認した。

【0099】

以上の結果から、本発明の免疫センサ100では、第1及び第2の試薬体109、110が検体試料中に容易に溶解できることが確認された。

30

【0100】

[実施例2]

本実施例2では、抗体試薬として、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体、抗ヒト絨毛性ゴナドトロピンモノクローナル抗体、及び抗ヒトC反応性タンパクモノクローナル抗体を使用し、上記実施例1と同様にして、免疫センサ100を作製した。なお、これらの抗体は、表2に示す産生細胞株から産生された抗体を使用した。

【0101】

【表 2】

抗体が産生される産生細胞株の受託番号 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)			
	抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体	抗ヒト絨毛性ゴナドトロピンモノクローナル抗体	抗ヒトC反応性タンパク抗体

10

20

30

40

[比較例 3]

比較例 3 では、実施例 2 で使用した各モノクローナル抗体試薬と PEG 試薬とを混合して、上記比較例 1 と同様にして、免疫センサ 100 を作製した。

50

## 【0102】

## 《評価試験3》

実施例2及び比較例3の免疫センサ100を用いて、ELISA法により、各抗体の生存率を測定した。

<酵素免疫測定法(ELISA法)>。

## 【0103】

(A) 抗原(ヒト絨毛性ゴナドトロピン(以下、hCG)、ヒトアルブミン(以下、hSA)、及びヒトC反応性タンパク(以下、CRP))のコーティング

まず、各抗原を、PBS-Az(Az:アザイドナトリウム塩)溶液で0.1mg/mL濃度になるように調整した。この調整液をマイクロプレート(ポリスチレン製高結合型平底#2580、コスター社製)に、100μL/ウェル注入し、室温で飽和水蒸気中に一晩保存した。なお、実験直前に、アスピレータで抗原溶液を除去した。

## 【0104】

## (B) ブロッキング

1重量%カゼイン-PBS-Az溶液を200μL/ウェル注入し、30分間室温で放置した。その後、アスピレータで1重量%カゼイン-PBS-Azを除去した。なお、以降の実験を即日に行わないときは、この状態で、飽和水蒸気中に4℃で保存した。

## 【0105】

## (C) 抗体の反応

実施例2及び比較例3の免疫センサ100の吸引口104を覆っているパラフィルム(登録商標)を剥がした後、吸引口104から100μLの蒸留水を注入して、第1及び第2の試薬体109、110を溶解させた。ついで、第1及び第2の試薬体109、110が溶解した溶液を10倍ずつ1億倍まで1重量%カゼイン-PBS-Azで希釈した。そして、抗原をコーティングしたマイクロプレートに、希釈した溶液と1重量%カゼイン-PBS-Azをそれぞれ、50μL/ウェル注入し、120分間室温で放置した。その後、PBSで洗浄し、アスピレータで残存するPBSを除去する操作を3回行った。

## 【0106】

## (D) 第2抗体の反応

0.2μg/mLのペルオキシダーゼ標識したヤギ由来の抗マウスIgG抗体(KPL社製)を1重量%BSAのPBS溶液に溶解したものを、または0.2μg/mLのペルオキシダーゼ標識したヤギ由来の抗マウスIgM抗体(KPL社製)を1重量%BSAのPBS溶液に溶解したものを、抗体反応させたマイクロプレートに、50μL/ウェル注入し、常温で30分放置した。その後、PBSで洗浄し、アスピレータで残存するPBSを除去する操作を3回行った。

## 【0107】

## (E) 基質の反応と停止

O-フェニレンジアミン(生化学用)40mgを10mLのクエン酸-リン酸バッファ- (pH5)に溶解し、使用直前に30重量%過酸化水素水4μLを加えた溶液(基質溶液)を、第2抗体と反応させたマイクロプレートに100μL/ウェル注入し、室温放置した。約3分後、4N硫酸を25μL/ウェル注入して反応を停止した。

## (F) 測定

マイクロプレートリーダー(東洋ソーダ社製)を用いて492nmの吸光度を測定した。

## 【0108】

なお、本実施例では免疫測定法として酵素免疫測定法を用いたが、他にRIA法、蛍光抗体法等を用いてもよい。

## 【0109】

## (G) 測定結果

図7は、実施例2及び比較例3の免疫センサ100について、ELISA法で測定した結果を示すものである。図7に示すように、各抗体の生存率は、hCGの場合には、実施例2の免疫センサ100を100%とした場合、比較例3の免疫センサ100では、約4

10

20

30

40

50

0%であり、hSAの場合には、実施例2の免疫センサ100を100%とした場合、比較例3の免疫センサ100では、約54%であり、CRPの場合には、実施例2の免疫センサ100を100%とした場合、比較例3の免疫センサ100では、約60%であった。いずれの抗体についても、実施例2の免疫センサ100の方が、比較例3の免疫センサ100よりも約2倍保存性能が高かった。

【0110】

以上の結果から、本発明の免疫センサ100により、試薬保持部102に配置されている第1の試薬部109に含まれる抗体の劣化を抑制できることが確認された。

【0111】

[実施例3]

実施例3では、上記実施例1と同様に、免疫センサ100を作製したが、PEG試薬溶液を以下のようにして作製した点が、実施例1の免疫センサ100と異なる。具体的には、PEGとフタル酸水素カリウムとの重量比が、1:0、1:0.26、1:0.38、1:0.51、1:0.77、及び1:1.02となるように調整して、PEG試薬溶液を作製した。なお、PEGとフタル酸水素カリウムとの重量比は、PEG水溶液とpH5.0のフタル酸水素カリウム水溶液とを用いて、互いに混合比を変えて混合することにより調製した。

【0112】

そして、このように調整したPEG試薬溶液を用いて、6種類の免疫センサ100（以下、免疫センサ100A～F）を作製した。

【0113】

《評価試験4》

実施例3の免疫センサ100A～Fを用いて、PEGの溶解率を測定した。なお、検体試料として水を使用した。

【0114】

まず、評価試験1と同様に、検体試料を試薬保持部102に導入し、検体試料の吸引開始から4.5秒後に、免疫センサの基体101の側面から、試薬保持部102の第2の試薬体110が配置されている部分を撮影した。検体試料の吸引前に撮影された写真における第2の試薬体110の面積から、検体試料の吸引後に撮影された写真における溶解しなかった第2の試薬体110の面積を差し引くことにより、試薬保持部102において検体試料に溶解した第2の試薬体110の面積を計算した。さらに、検体試料の吸引前に撮影された写真における第2の試薬体110の面積に対する検体試料に溶解した第2の試薬体110の面積の割合を、溶解したPEGの割合（溶解率）として算出した。

【0115】

図8は、実施例3の免疫センサ100についてのPEGの溶解率の測定結果を示すものである。図8において、横軸は、免疫センサ100のPEG試薬（第2の試薬体110）におけるPEGに対するフタル酸水素カリウムの重量比を示し、縦軸は、第2の試薬体110におけるPEGの溶解率を示す。

【0116】

図8に示すように、免疫センサB～Fでは、30%以上の溶解率が得られた。特に、PEGに対するフタル酸水素カリウムの重量比が0.26～0.51の免疫センサB～Dの場合には、80%以上の高い溶解率が得られた。一方、免疫センサAを用いた場合は、上記の手順では、PEG試薬を含む第2の試薬体110はほとんど溶解せず、溶解率は0であった。

【0117】

以上の結果から、第2の試薬体110にフタル酸水素カリウムを添加することにより、第2の試薬体110の溶解性が向上することが確認された。

【0118】

《評価試験5》

評価試験5では、第2の試薬体110にPEGと共に含有する塩の種類によるPEGの

10

20

30

40

50

溶解度について試験した。

【0119】

まず、40重量%PEG6000水溶液に500mMの塩溶液（フタル酸水素カリウム、クエン酸三ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、NaCl、又はKCl）を1：1で混合し、1.5mLエッペンドルフチューブ（商品名）に1mL注入後、キャップをし、-80の冷蔵庫で6時間冷凍した後、凍結乾燥機のチャンバー内に設置し、オーバーナイトで凍結乾燥して、塩含有高分子化合物試薬を形成した。凍結乾燥後、直ちにキャップを閉め、溶解試験直前までシリカゲルが入った容器内で保管した。

【0120】

溶解度試験は、以下のようにして行った。

10

【0121】

まず、エッペンドルフチューブ（商品名）の周面を撮影して、塩含有高分子化合物試薬の面積を測定した。次に、エッペンドルフチューブ（商品名）のキャップを開けて、精製水1.0mLを注入した。精製水を注入してから30秒後から1分後までマイクロピペットで3回ピペティングを行った。ついで、精製水注入後1分30秒後から30秒間Vortex（商品名）で攪拌した。攪拌後、エッペンドルフチューブ（商品名）の周面を撮影して、溶解されなかった塩含有高分子化合物試薬の面積を測定した。そして、精製水注入前の塩含有高分子化合物試薬の面積に対する溶解されなかった塩含有高分子化合物試薬の面積の比率を計算し、溶解した塩含有高分子化合物試薬の比率を求めた。

【0122】

20

また、比較例として、20重量%PEG6000水溶液を1.5mLエッペンドルフチューブ（商品名）に1mL注入して、凍結乾燥したものを作製して、溶解度試験を行った。

【0123】

図9は、評価試験5における溶解度試験の結果を示すものである。図9において、80～90%溶解したものを○、90%以上溶解したものを△、溶解しなかったものを×とした。

【0124】

図9に示すように、フタル酸水素カリウム、クエン酸三ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、又はNaClをPEGと共に含有した場合には、90%以上溶解し、KClをPEGと共に含有した場合には、80～90%溶解することがわかった。

30

【0125】

以上の結果から、第2の試薬体110にフタル酸水素カリウム、クエン酸三ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、NaCl、又はKClのいずれかをPEGと共に含有させると、PEGが容易に検体試料に溶解することが確認された。

【0126】

なお、上記説明から、当業者にとっては、本発明の多くの改良や他の実施形態が明らかである。従って、上記説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実行する最良の態様を当業者に教示する目的で提供されたものである。本発明の精神を逸脱することなく、その構造及び/又は機能の詳細を実質的に変更できる。

40

【産業上の利用可能性】

【0127】

本発明に係る免疫センサ及びそれを用いる測定方法は、検体試料中の被測定物質の濃度を精度良く測定することができるため、検査分野、特に医療及び医療関連の検査分野で、有用である。

【図面の簡単な説明】

【0128】

【図1】図1は、本発明の実施の形態1に係る免疫センサの構成を模式的に示す斜視図である。

【図2】図2は、図1に示す免疫センサのII-II線における断面を模式的に示す断面

50

図である。

【図3】図3は、本発明の実施の形態1に係る免疫センサを用いる測定装置の構成を模式的に示す斜視図である。

【図4】図4は、図3に示す測定装置の機能上の構成を模式的に示すブロック図である。

【図5】図5は、本発明の実施の形態1に係る免疫センサを用いた測定装置の被測定物質の測定方法を模式的に示すフローチャートである。

【図6】図6は、実施例1及び比較例1の免疫センサについての評価試験1の結果を示すものである。

【図7】図7は、実施例2及び比較例3の免疫センサについて、ELISA法で測定した結果を示すものである。

10

【図8】図8は、実施例3の免疫センサ100についてのPEGの溶解率の測定結果を示すものである。

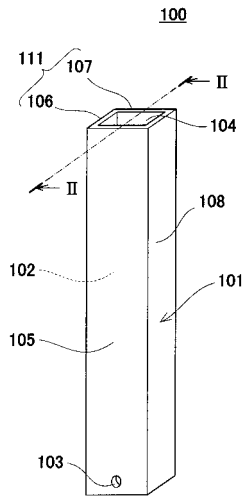
【図9】図9は、評価試験5における溶解度試験の結果を示すものである。

【符号の説明】

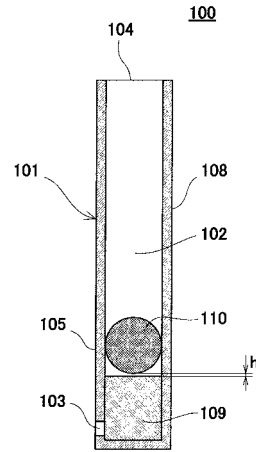
【0129】

100	免疫センサ	
101	基体	
102	空間(試料保持部)	
103	貫通孔(試料導入口)	
104	吸引口	20
105	第1の面	
106	第2の面(光入射部)	
107	第3の面(光出射部)	
108	第4の面	
109	第1の試薬体	
110	第2の試薬体	
111	光透過部	
300	測定装置	
301	免疫センサ取付け部	
302	表示部	30
303	試料吸引開始ボタン	
304	免疫センサ取外しボタン	
305	センサ装着口	
401	コントローラ	
404	ピストン機構	
406	計時部	
407	光源	
408	受光器	
409	メモリ	
410	免疫センサ取外し機構	40
411	記録部	
412	送信部	
413	受信部	

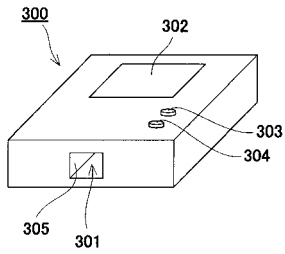
【 図 1 】



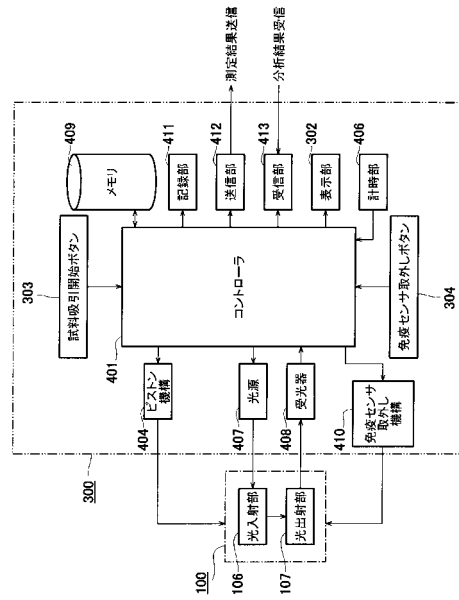
【 図 2 】



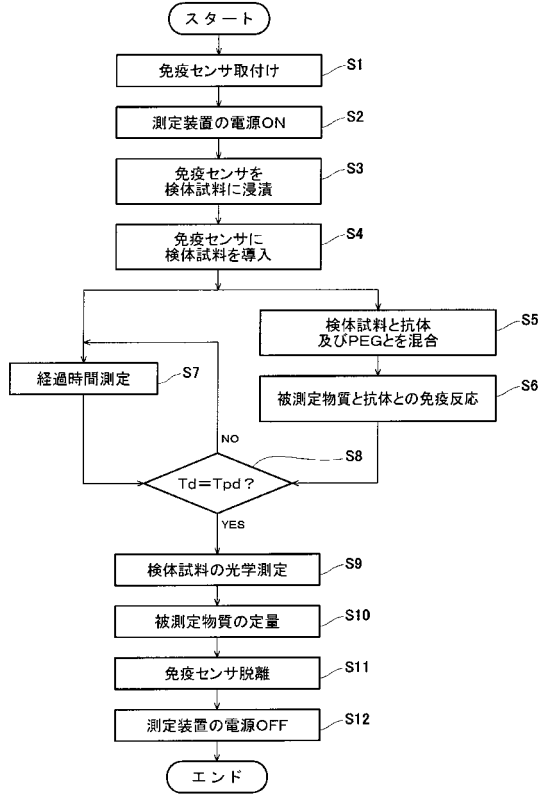
【 図 3 】



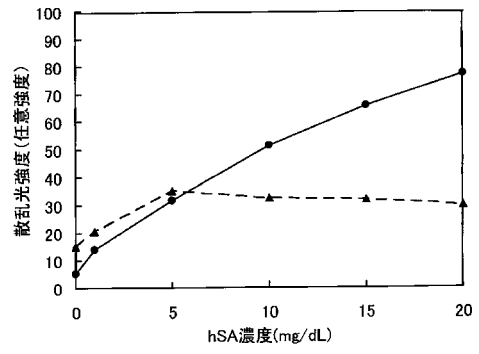
【 図 4 】



【 図 5 】



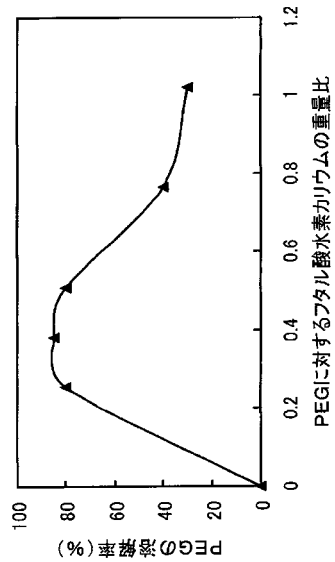
【 図 6 】



【 図 7 】

生存率 (%)	hCG		hSA		CRP	
	実施例2	比較例3	実施例2	比較例3	実施例2	比較例3
100	100	40	100	54	100	60

【 図 8 】



【 図 9 】

混合した塩	溶解評価
フタル酸水素カリウム	◎
クエン酸三ナトリウム	◎
コハク酸二ナトリウム	◎
NaCl	◎
KCl	○
なし	×

---

フロントページの続き

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第03/056333(WO, A1)  
特開2005-345464(JP, A)  
国際公開第2005/031353(WO, A1)  
特開平06-213890(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/536

G01N 33/543

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	免疫传感器和使用其的测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4231104B2</a>	公开(公告)日	2009-02-25
申请号	JP2008536359	申请日	2007-09-21
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	湯川系子 田中真司 池田信		
发明人	湯川 系子 田中 真司 池田 信		
IPC分类号	G01N33/536 G01N21/03 G01N21/49 G01N21/59		
CPC分类号	G01N33/536 B01L3/508 B01L2200/026 B01L2200/16 B01L2300/0858 B01L2400/0487 G01N21/03 G01N2021/0325		
FI分类号	G01N33/536.F G01N21/03.Z G01N21/49.Z G01N21/59.Z		
优先权	2006260168 2006-09-26 JP 2006260169 2006-09-26 JP		
其他公开文献	JPWO2008038597A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

(101)具有用于保持样品样品的样品保持部分(102),与样品保持部分(102)连通并将样品样品引入样品保持部分(102)的样品引入口(101)103),干燥状态的第一次试验,包括样品样品中包含的针对待测物质的抗体含有聚乙二醇的干燥状态的第二试剂体(110),其中第一试剂体(109)在样品保持部(102)中设置有第二试剂体(109)并且布置成比主体(110)更靠近样品入口(103)。。

抗体が産生される産生細胞株の登録番号 (独立行政法人産業技術総合研究所特許センター)	
第1の抗体	FERM BP-7938号
第2の抗体	FERM BP-10460号
第3の抗体	FERM BP-10637号
第4の抗体	FERM BP-10459号
第5の抗体	FERM BP-7937号