

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-520956

(P2009-520956A)

(43) 公表日 平成21年5月28日(2009.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	S 2 G O 5 4
<b>GO 1 N 21/27 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/27	C 2 G O 5 9
<b>GO 1 N 21/78 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/78	C

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2008-546202 (P2008-546202)	(71) 出願人	507212506 バイエル・テクノロジー・サービス・ゲ ゼルシヤフト・ミット・ベシユレンクテル ・ハフツング ドイツ5 1 3 6 8 レーフエルクーゼン・
(86) (22) 出願日	平成18年12月13日 (2006.12.13)	(71) 出願人	302063961 バイエル・クロツプサイエンス・アクチエ ンゲゼルシヤフト ドイツ4 0 7 8 9 モンハイム・アルフレー トーノベルーシユトラーセ5 0
(85) 翻訳文提出日	平成20年6月20日 (2008.6.20)	(74) 上記1名の代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/012000	(72) 発明者	ブルマイスター, イエンス ドイツ5 1 0 6 1 ケルン・アンデアルーテ ン5
(87) 国際公開番号	W02007/079893		
(87) 国際公開日	平成19年7月19日 (2007.7.19)		
(31) 優先権主張番号	102005062377.8		
(32) 優先日	平成17年12月23日 (2005.12.23)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコトキシン類を同定するための装置および方法

(57) 【要約】

本発明はマイコトキシン類を同定するための装置および方法並びに該方法を実施するために適するキットに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の段階：

- a) 導波管特異的および/または親和性結合相手が空間的に分離された方法でマイコトキシシン類および/または結合相手のための化学的または生化学的認識成分として固定化される、第二の光学的に透明な層 (b) の頂部に第一の光学的に透明な導波管層 (a) を含んでなり、(b) が (a) より低い屈折率を有する薄膜導波管を準備し、
- b) 1 種もしくは複数のマイコトキシシンを含有する試料および結合相手を該薄膜導波管上の固定化された結合相手に適用し、
- c) 薄膜導波管上の固定化された結合相手と試料からのマイコトキシシン類および/または結合相手との相互作用による消失場における信号を検出し、
- d) 試料内に存在する 1 種もしくは複数のマイコトキシシンの量を測定することを含んでなるマイコトキシシン類の迅速検出方法。

10

## 【請求項 2】

以下の式 (I)



の有機リン酸類および/もしくは以下の式 (II)



の有機ホスホン酸類並びに/またはそれらの塩類の単層または多層を薄膜導波管に適用し、ここで R が C<sub>10</sub> ~ C<sub>24</sub> アルキルであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

R が好ましくは非分枝鎖状の C<sub>12</sub> ~ C<sub>18</sub> アルキルを含んでなる群から選択される非分枝鎖状の C<sub>10</sub> ~ C<sub>20</sub> アルキルを含んでなる群から選択される有機リン酸類、有機ホスホン酸類、有機リン酸塩類および/または有機ホスホン酸塩類、好ましくはドデシルリン酸、ドデシルリン酸塩、オクタデシルホスホン酸塩および/またはオクタデシルホスホン酸を含んでなる群から選択される有機リン酸類、有機ホスホン酸類、有機リン酸塩類および/または有機ホスホン酸塩類を使用することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

TiO<sub>2</sub>、ZnO、Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、HfO<sub>2</sub> および/または ZrO<sub>2</sub> を含んでなる群から選択される、好ましくは TiO<sub>2</sub>、Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> および/または Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を含んでなる群から選択される酸化物を含んでなる光学的に透明な導波管層 (a) を含んでなる薄膜導波管を使用することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 5】

結合相手が抗 - マイコトキシシン抗体、抗 - マイコトキシシン - 抗体抱合体、マイコトキシシン類、マイコトキシシン抱合体、抗 - マイコトキシシン抗体の断片、マイコトキシシン - 結合ペプチド類、マイコトキシシン - 結合アンチカリン類、マイコトキシシン - 結合アプタマー類、マイコトキシシン - 結合スピアゲルマー類および/またはマイコトキシシン - 結合インプリンテド重合体を含んでなる群から選択される、好ましくは抗 - マイコトキシシン抗体、抗 - マイコトキシシン - 抗体抱合体、マイコトキシシン類および/またはマイコトキシシン抱合体を含んでなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 6】

標識付け成分、好ましくは発蛍光団をマイコトキシシン類に蛋白質により、好ましくはウシ血清アルブミンにより結合させることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

試料が、好ましくは穀類、ワイン、ジュース、果実を含んでなる群から選択される人間もしくは動物用の食品、並びに/または穀類、ワイン、ジュースおよび/もしくは果実を含有する製品、或いは溶媒または溶媒混合物で抽出された該食品または製品の抽出物であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8】

50

信号の検出前に、試料を化学的もしくは生化学的認識成分としての固定化された結合相手および/または結合相手と共に15分間未満、好ましくは10分間未満にわたりインキュベートすることを特徴とする請求項1~7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

マイコトキシン類がアフラトキシン類、オクラトキシン類、エルゴット・アルカロイド類、パツリンおよび/またはフサリウム毒素を含んでなる群から選択される、例えばデオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素および/またはフモニシン類を含んでなる群から選択される、好ましくはオクラトキシンA、デオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素、フモニシンB1、フモニシンB2および/またはフモニシンB3を含んでなる群から選択されることを特徴とする請求項1~8のいずれかに記載の方法。

10

【請求項10】

マイコトキシン類が穀類抽出物中で0.1pM~100nMのマイコトキシンの範囲内、好ましくは1pM~1nMのマイコトキシンの範囲内でさえ検出されることを特徴とする請求項1~9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

検出を免疫検定、好ましくは競合免疫検定、特に好ましくは間接的な競合免疫検定により行うことを特徴とする請求項1~10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

第二の光学的に透明な層(b)の頂部に第一の光学的に透明な導波管層(a)を含んでなり、(b)が(a)より低い屈折率を有する薄膜導波管を有することを特徴とするマイコトキシン類の迅速検出方法を実施するための装置。

20

【請求項13】

第二の光学的に透明な層(b)の頂部に第一の光学的に透明な導波管層(a)を含んでなり、(b)が(a)より低い屈折率を有する薄膜導波管の光学的に透明な層(b)がシリケート類、例えばガラスもしくは石英から、または好ましくはポリカーボネート類、ポリイミド類、ポリメタクリレート類、ポリスチレン類、環式ポリオレフィン類および/もしくは環式ポリオレフィン共重合体を含んでなる群から、好ましくは環式ポリオレフィン類から選択される透明なプラスチックから製造されることを特徴とする請求項12に記載の装置。

30

【請求項14】

光学的に透明な導波管層(a)が40nm~1000nmの範囲内、好ましくは40nm~300nmの範囲内、より好ましくは80nm~200nmの範囲内の厚さを有することを特徴とする請求項12または13に記載の装置。

【請求項15】

1種もしくはそれ以上の格子構造を用いることにより励起光を光学的に透明な導波管層(a)中にカップリングさせることを特徴とする請求項12~14のいずれかに記載の装置。

【請求項16】

励起光の中へのカップリングのために使用可能な格子構造が200nm~1000nmの範囲内、好ましくは200nm~400nmの範囲内の周期を有することを特徴とする請求項12~15のいずれかに記載の装置。

40

【請求項17】

格子が3nm~60nmの範囲内、好ましくは10nm~40nmの範囲内変調伝達因子を有することを特徴とする請求項12~16のいずれかに記載の装置。

【請求項18】

励起光が300nm~1100nmの範囲内、好ましくは300nm~800nmの範囲内、より好ましくは500nm~700nmの範囲内の波長を有することを特徴とする請求項12~17のいずれかに記載の装置。

【請求項19】

50

以下の式 ( I )



の有機燐酸類および / もしくは以下の式 ( I I )



の有機ホスホン酸類並びに / またはそれらの塩類の単層または多層を薄膜導波管に適用し、ここで R が  $C_{10} \sim C_{24}$  アルキルであることを特徴とする請求項 12 ~ 18 のいずれかに記載の装置。

【請求項 20】

認識成分が 100000 までの測定場により二次元配置で適用され、単一の測定場が好ましくは  $0.001 \text{ mm}^2 \sim 6 \text{ mm}^2$  の範囲内、好ましくは  $0.1 \text{ mm}^2 \sim 1 \text{ mm}^2$  の範囲内の面積を有することを特徴とする請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載の装置。

10

【請求項 21】

1 平方センチメートル当たり 10 より多い、好ましくは 50 より多い測定場が薄膜導波管に適用されることを特徴とする請求項 12 ~ 20 のいずれかに記載の装置。

【請求項 22】

導波管特異的および / または親和性結合相手が空間的に分離された方法でマイコトキシン類および / または結合相手のための化学的または生化学的認識成分として固定化される、第二の光学的に透明な層 ( b ) の頂部に第一の光学的に透明な導波管層 ( a ) を含んでなり、( b ) が ( a ) より低い屈折率を有する少なくとも 1 つの薄膜導波管を含んでなることを特徴とするマイコトキシン類の迅速検出用のキット。

20

【請求項 23】

好ましくは蛍光的に標識付けされた結合相手を含んでなる試薬を含んでなることを特徴とする請求項 22 に記載のキット。

【請求項 24】

マイコトキシン類の迅速検出のための請求項 22 または 23 に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はマイコトキシン類の検出用の装置および方法並びに該方法を実施するために適するキットに関する。

30

【0002】

マイコトキシン類の検出は、例えば食品および飼料分野における、環境分析における、作物保護における、そして生化学研究における大きな適用分野を含んでなる。

【背景技術】

【0003】

マイコトキシン類は、非常に異なる化学構造を有するカビにより製造される毒素である。マイコトキシン類は収穫製品、例えば穀粒、油を含有する種子および果実、の中で見出され、そして人間および動物の中毒を引き起こしうる。300 種を超える異なるマイコトキシン類が現在同定されており、それらは約 25 の構造タイプに分類されそして異なる有毒作用を示す。毒素のタイプによって、マイコトキシン類は急性または慢性の中毒をもたらしうる。マイコトキシン類のよく知られた群はアフラトキシン類、オクラトキシン類、エルゴット・アルカロイド類、パツリンまたはフサリウム毒素である。フサリウム毒素の中ではデオキシニバレノール、ゼアラレノン、ニバレノール、T - 2 - / HT - 2 毒素およびフモニシン類はそれらが穀類製品中でしばしば見出されるため特に重要である。従って、マイコトキシン類に関する、例えばカビ分野の毒素、例えばフサリウム毒素に関する、または貯蔵カビの毒素に関する検定は、穀倉、穀粒取引および穀粒 - 処理事業、例えば製粉所、麦芽製造所、飼料 - 製造事業、農耕事業、アドバイセンター、大学または政府部門、例えば消費者保護部門において、食品の品質を確保するために行わなければならない。

40

【0004】

50

マイコトキシン類を検出するための多くの方法が先行技術で開示されてきた。マイコトキシン類は、例えば、HPLCの如きクロマトグラフィー方法により検出され、それらは蛍光 - ベースの、吸収または質量分光検出と一緒にすることができる。例えば穀粒試料のHPLC分析の前に、分析試料は普通は濃縮されそして免疫親和カラムにより精製される。全てのHPLC - ベースの検出方法は膨大な資本経費、比較的複雑な試料処理および長引く分析の欠点を有する。該欠点のために、HPLCをベースとした方法は、穀粒を生産し、受け入れ、取引しまたは処理する事業における例えば穀粒試料の迅速な安価な且つ簡単な分析には適さない。HPLC - ベースの分析はその代わりに特定の分析研究所内で実施される。従って、実際には、数日間の遅延時間後にのみ結果が入手可能である。

【0005】

マイコトキシン類を検出する別の方法はELISA（酵素結合された免疫吸着検定）技術である。ELISAには、ウエルが、例えば、マイコトキシンに特異的に結合する捕獲抗体でコーティングされている微量滴定板が装備されている。ELISAの欠点は、30分間より長い比較的長くかかる分析をもたらす多くの滴下、洗浄およびインキュベーション段階である。これが、この検定を分析研究所以外の場所で迅速に行うことを妨げる。さらに、それぞれの微量滴定板は一般的には1つの抗体タイプでのみコーティングされているため、この検定は複数の分析試料の同時検出を可能にしない。

【0006】

マイコトキシン類を検出する他の方法は側流検定（LFA類）である。マイコトキシン類はLFAにより、例えば、ニトロセルロース片上で直接的な競合免疫検定を行うことにより検出することができ、分析しようとする試料は毛管力によりニトロセルロース片全体を通過して引っ張られる。不利なことに、この方法は定性的なマイコトキシン検出だけを可能にする。この検定の他の欠点はそれぞれのマイコトキシンに対する別個の片の必要性である。

【0007】

先行技術は、例えば非特許文献1により記載された、マイコトキシン類の検出方法の開発に関する研究も包含する。この方法は、オクラトキシンAをガラススライド上に固定化することによりオクラトキシンAを検出するための間接的な競合免疫検定の実施を含んでなる。オクラトキシンAに対する蛍光的に標識付けされた抗体と測定しようとする試料との混合物をスライドに適用し、それを結合されなかった抗体を洗浄により除去した後に読み取ることができる。不利なことに、この方法は洗浄段階および10～20分間のインキュベーション時間並びに結果を読み取るための複雑な蛍光造影システムを必要とする。その結果、分析研究所以外の場所で実施することができるこれに基づく迅速な検定を開発することは不可能である。

【0008】

マイコトキシン類を検出するための先行技術において既知である方法はそれ故、複雑な読み取り装置のために膨大な資本経費を必要とし、多くの手動段階を包含し、または分析研究所以外では使用できない。

【0009】

【非特許文献1】M. M. Ngundi et al., Anal. Chem. 2005, 77, 148 - 154

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、従って、先行技術の上記の欠点の少なくとも1つを克服する方法、特にマイコトキシン類を試料内で迅速な、安価な且つ実施が容易な方法で検出可能にする方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

この目的は、以下の段階：

10

20

30

40

50

- a) 導波管特異的および/または親和性結合相手が空間的に分離された方法でマイコトキシン類および/または結合相手のための化学的または生化学的認識成分として固定化される、第二の光学的に透明な層(b)の頂部に第一の光学的に透明な導波管層(a)を含んでなり、(b)が(a)より低い屈折率を有する薄膜導波管を準備し、
- b) 1種もしくは複数のマイコトキシンを含有する試料および結合相手を該薄膜導波管上の固定化された結合相手に適用し、
- c) 薄膜導波管上の固定化された結合相手と試料からのマイコトキシン類および/または結合相手との相互作用による消失場における信号を検出し、
- d) 試料内に存在する1種もしくは複数のマイコトキシンの量を測定すること
- を含んでなるマイコトキシン類の迅速検出方法により達成される。

10

## 【0012】

本発明は、さらに、マイコトキシン類の検出方法を実施するための装置にも関する。

## 【0013】

別の課題は、マイコトキシン類の検出方法を実施するために適するキットである。

## 【0014】

本発明の別の有利な態様は従属請求項から生ずる。

## 【0015】

驚くべきことに、マイコトキシン類の検出用の本発明の方法は容易に且つ特定の分析研究所以外で実施できることが見出された。これが、試料を分析用の研究所に必ずしも移さずに、本発明の方法を迅速な検定方法により実施可能にする。さらに、本発明の方法に従うマイコトキシン検出は有利なことにたとえあるとしてもわずかだけの洗浄段階を必要とする。これは特に、洗浄段階の実施は時間がかかり、分析の結果が得られるまでの時間を長引かせ、そして分析の結果を歪ませたり、または、特に後者をほとんど注意せずにまたは不適切に行う時には、検出全体を不可能にさえする点で有利である。

20

## 【0016】

本発明の方法の有利な性質の組み合わせが、食品中で、例えば穀倉において、穀粒取引および穀粒-処理事業において、マイコトキシン類を検出可能にする。特に、この方法は容易に且つ迅速に実施可能でありそしてこれが専門研究所の特定分析者でない人々でさえ該方法の実施を可能にする。

## 【0017】

この方法の好ましい態様は、薄膜導波管をベースにした消失場バイオチップ、好ましくは薄膜導波管をベースにした平らな光学的導波管バイオチップの形状の薄膜導波管を使用する。

30

## 【0018】

光学的導波管は、導波管層に隣接する媒体、典型的には誘電体の光学的性質における変化を検出するために使用できる信号変換器の一種である。光が導波管層の中で案内された方式で伝達される時に、光場は媒体/導波管界面で不意に低下するというよりむしろ導波管に隣接する検出媒体の中で指数関数的に衰退する。この指数関数的に衰退する光場は消失場と称する。消失場内の導波管に隣接する媒体の光学的性質における変化は適当な測定設定を用いて検出されうる。

40

## 【0019】

信号変換器としての導波管の使用は、導波管界面で固定化された認識成分の場合には、検出媒体の光学的性質が導波管との界面で変化する時に該認識成分への結合またはその反応が検出可能である点で有利である。

## 【0020】

従って、該検出を行う時に時間を節約し且つ工程を簡素化することの両方が可能である。

## 【0021】

それ故、媒体の、例えば分析しようとする試料の変化する光学的性質により、信号変換器または薄膜導波管の表面上で直接的に、例えば吸収、蛍光、燐光、ルミネセンスなどに

50

おける変化により信号または標識付けされた成分が検出されうる。

【0022】

蛍光信号を消失場において検出することが好ましい。結合相手、例えばマイコトキシン類、マイコトキシン抱合体、抗体抱合体または抗体を標識付けするために本発明に従い使用できる標識付け成分は、好ましくは有機発蛍光団、ナノ粒子、蛍光ナノ粒子、球、蛍光球、蛍光蛋白質または他の信号化分子もしくは単位或いは種々の標識付け成分のいずれかの組み合わせである。ルミネッセンス - 可能方法で標識付けされた結合相手の使用が好ましい。好ましい標識付け成分は有機発蛍光団および/または蛍光蛋白質である。

【0023】

本発明の方法によると、好ましく蛍光標識付けされた結合相手は消失場により励起されうる。好ましい態様では、消失場はD u v e n e c k他の米国特許第5,959,292号明細書に記載されたような平らな光学的導波管により発生する。等方的に発生した蛍光は適当な設定を用いて検出されうる。他の態様では、導波管の中に結合された蛍光が適当な光学的成分により再び導波管から脱結合されそして適当な光学的設定を用いて検出されうる。

10

【0024】

特に有利には、信号の検出前の好ましくは蛍光的に標識付けされた結合相手または試料または標識付けされた結合相手を含む溶液の洗浄を制限することができまたは完全に省略することさえできる。通常は使用される洗浄プロトコルの種々の緩衝溶液の準備も省略できるため、これがマイコトキシンをより短い時間で且つ簡素化された方法で検出可能にする。

20

【0025】

使用可能な薄膜導波管は好ましくは、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  および/または $ZrO_2$ を含んでなる群から選択される、好ましくは $TiO_2$ 、 $Ta_2O_5$  および/または $Nb_2O_5$ を含んでなる群から選択される酸化物を含んでなる光学的に透明な導波管層(a)を含んでなる。好ましくは、光学的に透明な導波管層(a)は $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$ または $ZrO_2$ 、好ましくは $TiO_2$ 、 $Ta_2O_5$ または $Nb_2O_5$ から製造される。五酸化チタンの使用が、特に蛍光信号の検出のために、特に有利であることが証明された。

【0026】

特定の態様は、薄膜導波管への、特に $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  および/または $ZrO_2$ を含んでなる群から選択される酸化物を含んでなる光学的に透明な導波管層(a)への、以下の式(I)



の有機燐酸類および/もしくは以下の式(II)



の有機ホスホン酸類並びに/またはそれらの塩類の単層または多層の適用を含んでなり、ここでRは $C_{10} \sim C_{24}$ アルキルである。

30

【0027】

好ましくはドデシル燐酸、ドデシル燐酸塩、オクタデシルホスホン酸塩および/またはオクタデシルホスホン酸を含んでなる群から選択される、Rが非分枝鎖状の $C_{10} \sim C_{20}$ アルキルを含んでなる群から選択される、好ましくは非分枝鎖状の $C_{12} \sim C_{18}$ アルキルを含んでなる群から選択される有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類、好ましくは有機燐酸塩類および/または有機ホスホン酸塩類が好ましく使用可能である。

40

【0028】

水溶液からの水溶性塩類により薄膜導波管に適用されうる有機燐酸類または有機燐酸塩類が好ましく使用可能である。

【0029】

好ましい態様では、有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類、好ましくは有機燐酸塩類が単層により薄膜導波管、特に消失場バイオチップ、好ましくは平らな光学的な導波

50

管バイオチップに適用される。それらは浸漬方法により適用されうる。

【0030】

単層は付着 - 促進層として酸化物から製造される光学的に透明な層に適用されうる。有利には、有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類は認識成分と、特に蛋白質または蛋白質と結合された認識成分と相互作用しそしてバイオチップに対する該認識成分の結合を促進させうる。

【0031】

使用可能な結合相手は好ましくは、抗 - マイコトキシン抗体、抗 - マイコトキシン - 抗体抱合体、マイコトキシン類、マイコトキシン抱合体、抗 - マイコトキシン抗体の断片、マイコトキシン - 結合ペプチド類、マイコトキシン - 結合アンチカリン類、マイコトキシン - 結合アプタマー類、マイコトキシン - 結合ス PIE ゲルマー類および/またはマイコトキシン - 結合インプリントド ( i m p r i n t e d ) 重合体を含んでなる群から選択され、好ましくは抗 - マイコトキシン抗体、抗 - マイコトキシン - 抗体抱合体、マイコトキシン類および/またはマイコトキシン抱合体を含んでなる群から選択される。

10

【0032】

結合相手は各場合とも他の結合相手とおよび/またはそれと親和力で各場合とも特異的に相互作用する。例えば、薄膜導波管に適用される抗 - マイコトキシン抗体は該薄膜導波管上で固定化されたマイコトキシン類と親和力で結合する。同様に、薄膜導波管上で固定化された抗 - マイコトキシン抗体は該薄膜導波管に適用されるマイコトキシン類またはマイコトキシン抱合体と親和力で結合する。結合特異性はここでは使用される親和相手に依存する。それ故、使用可能な交差 - 反応性の抗 - マイコトキシン抗体は、例えば、フモシン類の群の対応するマイコトキシン類と親和力で結合するが、例えばフモシン B 1 に対する特異的抗体より特異性は少ない。固定化される結合相手は認識成分または「捕獲分子」とも称する。

20

【0033】

抗 - マイコトキシン - 抗体抱合体およびマイコトキシン抱合体は、例えば、蛋白質および抗 - マイコトキシン抗体またはマイコトキシンから製造することができる。

【0034】

好ましい態様では、例えば間接的な競合検定では、固定化された結合相手はマイコトキシン抱合体である。マイコトキシン抱合体は好ましくは蛋白質、例えばウシ血清アルブミン ( B S A )、に結合されたマイコトキシンから製造されうる。そのようなマイコトキシン - B S A 抱合体を使用する特別の利点は、薄膜導波管に対するマイコトキシンの結合が蛋白質と有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類との間の相互作用により促進されうることである。これが該薄膜導波管に対する認識成分の付着性を改良しうる。

30

【0035】

標識付け成分、例えば蛍光染料または発蛍光団は結合相手と、例えば抗 - マイコトキシン抗体またはマイコトキシンと、直接的に、或いはスパーサー成分、例えば蛋白質またはアルキル連鎖もしくはポリエチレングリコール連鎖を介して結合されうる。標識付け成分、例えば蛍光染料または発蛍光団は好ましくは蛋白質を介してマイコトキシン類に結合される。適する蛋白質の例は B S A である。B S A によるマイコトキシンに対する発蛍光団の結合は結合相手、例えば抗体に対する標識付け成分の結合を顕著に改良しうる。例えばマイコトキシンに発蛍光団を直接的に結合させるための複雑な方法を回避しうる。別の特長を構成する。直接的な競合検定において使用できる固定化された抗 - マイコトキシン抗体のための好ましい結合相手は、例えば、蛍光的に標識付けされたマイコトキシン - B S A 抱合体である。

40

【0036】

マイコトキシン類は原則的に試料、溶液または他の媒体の中で検出することができ、これらの全てが薄膜導波管に適用可能である。好ましい態様では、試料は人間または動物用の食品である。マイコトキシン類は好ましくは本発明の方法に従い、穀類、穀類製品、ワイン、ジュース、もしくは果実の中で、並びに/または穀類、ワイン、ジュースおよび/

50

もしくは果実を含有する製品の中で検出される。分析しようとする試料、例えば食品または製品はここでは薄膜導波管に適用されるかまたは溶媒もしくは溶媒混合物で抽出されることができ、抽出された抽出物が使用される。該抽出物は希釈されたまたは濃縮された形態で使用可能でありうる。

【0037】

マイコトキシン類は試験しようとする試料、例えば穀類または他の食品から溶媒または溶媒混合物を用いる処理により除去されうる。例えば、マイコトキシン類は穀粒試料から、粉碎およびその後の水または有機溶媒もしくは溶媒混合物を用いる、例えば場合により緩衝物質、塩類、酸類もしくは塩基類および他の添加剤と混合されていてもよい水と有機溶媒との混合物を用いる、例えば水とメタノールもしくはエタノールとのまたは水とアセトニトリルとの混合物を用いる抽出により除去されうる。マイコトキシン類を抽出する他の方法は当業者に既知である。得られた溶解したマイコトキシン類を次に直接的にまたは希釈もしくは濃縮後に薄膜導波管またはチップ上で分析することができる。

10

【0038】

好ましくは抗 - マイコトキシン抗体、抗 - マイコトキシン - 抗体抱合体、マイコトキシン類および/またはマイコトキシン抱合体を含んでなる群から選択される、「捕獲分子」とも称する使用可能な認識成分、好ましくは2種もしくはそれ以上の異なるものを例えば疎水性吸着により、薄膜導波管表面またはチップ表面上に、共有的にまたは非共有的に固定化することができる。それらは、例えば、滴下とも称する方法である認識成分を点と称する測定場により薄膜導波管表面またはチップ表面に適用することにより、固定化される。スポットと称する自動適用装置を用いる、滴下溶液、好ましくは認識成分として1種もしくは複数の結合相手を含む緩衝溶液が好ましい。認識成分を該薄膜導波管またはチップに付けることを可能にするためには、滴下後に薄膜導波管またはチップを少なくとも1時間、好ましくは数時間にわたりインキュベートすることが好ましい。

20

【0039】

滴下後に、バイオチップを蛋白質溶液、好ましくは使用可能な阻止蛋白質、例えばBSA、の溶液で少なくとも1時間、好ましくは2時間~6時間、特に好ましくは3時間~4時間にわたり処理することが好ましい。溶液を除去した後に、薄膜導波管またはバイオチップを乾燥しそして貯蔵することができる。

【0040】

試料および好ましくは蛍光的に標識付けされた結合相手を薄膜導波管、好ましくは消失場バイオチップ、好ましくは平らな光学的な導波管バイオチップ上の固定化された認識成分に同時にまたは連続的に適用することができる。それ故、好ましくは蛍光的に標識付けされた結合相手、例えば1種もしくはそれ以上の好ましくは蛍光的に標識付けされたマイコトキシン類、マイコトキシン抱合体または抗体を1種もしくはそれ以上のマイコトキシン類に例えばチップ上の試料の抽出物のインキュベーションの前にまたは最中に加えることが可能である。例えば、好ましくは標識付けされた、好ましくは蛍光的に標識付けされた、マイコトキシン類、マイコトキシン抱合体または1種もしくはそれ以上のマイコトキシンに対する抗体と混合されている分析しようとする試料の抽出物をチップに適用することも可能である。

30

40

【0041】

特に有利には、信号の検出前に、試料を本発明の方法に従い薄膜導波管上の化学的もしくは生化学的認識成分としての固定化された結合相手および/または結合相手と15分間未満、好ましくは10分間未満、特に好ましくは4分間未満にわたりインキュベートすることができる。

【0042】

これは、標識付けされたマイコトキシン抗体の溶液とのマイコトキシン抱合体の適用と共に時には2時間までのインキュベーション時間を必要とする既知の方法または標識付けされた抗 - マイコトキシン抗体を用いる予備インキュベートする試料を必要とする重複工程より非常に有利である。これが、本発明の方法により既知の方法によるよりもはるかに

50

迅速にマイコトキシン類を測定することが可能にする。より具体的には、インキュベーション時間は相応して短縮されうる。特に好ましい態様では、インキュベーション時間は10分間以内または5分間以内でありうる。これは、特に洗浄段階を省略しうる別の利点と組み合わせられて、本発明の方法により結果を20分間未満、好ましくは15分間未満、特に好ましくは10分間未満、与えることを可能にする。

【0043】

本発明の方法を使用して、マイコトキシン類は定量的にそして好ましくはわずかな変動度で検出されうる。例えば、再現性の測定値である「研究所内変動係数」を50%より低く、好ましくは40%より低くすることができる。さらに、再現性の測定値である「研究所内変動係数」を20%より低くすることもできる。これが、本発明の方法を食品、例えば穀類、穀類製品またはワイン、の中でマイコトキシン類を測定するための標準化されたそして簡単な方法の枠内で使用することを可能にする。

【0044】

検出可能なマイコトキシン類は、好ましくはアフラトキシン類、オクラトキシン類、エルゴット・アルカロイド類、パツリンおよび/またはフサリウム毒素を含んでなる群から選択され、例えばデオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素、オクラトキシンAおよび/またはフモニシン類を含んでなる群から選択される。フモニシン類は好ましくはフモニシンB1、フモニシンB2および/またはフモニシンB3を含んでなる群から選択される。

【0045】

従って、使用可能な結合相手は、好ましくは例えばデオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素、オクラトキシンAおよび/またはフモニシン類を含んでなる群から選択されるアフラトキシン類、オクラトキシン類、エルゴット・アルカロイド類、パツリンおよび/またはフサリウム毒素を含んでなる群、並びに例えばデオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素、オクラトキシンAおよび/またはフモニシン類を含んでなる群から選択されるアフラトキシン類、オクラトキシン類、エルゴット・アルカロイド類、パツリンおよび/またはフサリウム毒素を含んでなる群から選択されるマイコトキシン類に対する抗体を含んでなる群から選択される。

【0046】

使用される免疫検定のタイプによって、結合相手の1種、例えば間接的な競合免疫検定の場合には1種もしくはそれ以上のマイコトキシン類を認識成分として薄膜導波管上で固定化しながら、他の結合相手、例えば間接的な競合免疫検定の場合には1種もしくはそれ以上の抗-マイコトキシン抗体を薄膜導波管に試料の前にまたは同時に適用する。加えられる結合相手はここでは好ましくは冷光発生的に、好ましくは発蛍光団を用いて標識付けされる。

【0047】

使用可能な結合相手は、好ましくはデオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素、オクラトキシンA並びに/またはフモニシンB1、フモニシンB2および/もしくはフモニシンB3、並びにデオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン、T-2毒素、HT-2毒素、オクラトキシンA並びに/またはフモニシンB1、フモニシンB2および/もしくはフモニシンB3を含んでなる群から選択されるマイコトキシン類に対する抗体を含んでなる群から選択される。

【0048】

好ましくは、マイコトキシンに対するモノクローン性の抗体、例えば抗-フモニシンB1、抗-フモニシンB2または抗-フモニシンB2をここで使用することができる。フモニシン類の群に対して作用する抗体を使用することもできる。使用可能な結合相手、好ましくはマイコトキシン類に対する抗体は個別にまたは混合して使用することができ、そして交差-反応性抗体を使用することもさらに可能である。

【0049】

本発明の方法の特別な利点は、本発明の方法がマイコトキシン類を高められた感度で検出できることから生ずる。例えば、特に人間または動物用の食品、例えば穀類、ワイン、ジュースおよび/もしくは果実、並びに/またはそれらからの製品、或いは溶媒または溶媒混合物で抽出された該食品または製品の抽出物の中で、マイコトキシン類をナノモルまたはピコモルのマイコトキシン濃度範囲内でも検出可能である。例えば、マイコトキシン類は穀類抽出物の中で $0.1 \text{ pM} \sim 100 \text{ nM}$ のマイコトキシンの範囲内、好ましくは $1 \text{ pM} \sim 1 \text{ nM}$ のマイコトキシンの範囲内でさえ検出可能でありうる。より具体的には、 $1 \text{ nM}$ より低い、好ましくは $100 \text{ pM}$ より低いマイコトキシン、好ましくは $10 \text{ pM}$ より低いマイコトキシン、特に好ましくは $1 \text{ pM}$ より低いマイコトキシンの濃度を検出可能でありうる。

10

**【0050】**

さらに、マイコトキシン類は穀類抽出物の中で $10^{-4} \text{ ppb} \sim 10000 \text{ ppb}$ のマイコトキシンの範囲内、穀類の中で $10^{-2} \text{ ppb} \sim 10000 \text{ ppb}$ のマイコキシンの範囲内で検出可能でありうる。好ましくは、マイコトキシン類は穀類抽出物の中で $\leq 0.1 \text{ ppb}$ のマイコトキシンの範囲内、好ましくは $\leq 0.01 \text{ ppb}$ のマイコトキシンの範囲内、特に好ましくは $\leq 10^{-4} \text{ ppb}$ の範囲内で、穀類中では $\leq 0.1 \text{ ppb}$ のマイコトキシンの範囲内、好ましくは $\leq 0.01 \text{ ppb}$ のマイコトキシンの範囲内、特に好ましくは $\leq 10^{-4} \text{ ppb}$ の範囲内で検出可能でありうる。

**【0051】**

これが、食品中に存在するマイコトキシン類を分析研究所以外でこれまでに可能であるより正確に測定することを可能にする。

20

**【0052】**

本発明の方法は少なくとも2種のマイコトキシン類、好ましくは2～1000種のマイコトキシン類、好ましくは5～100種のマイコトキシン類を検出可能にさせる。より具体的には、マイコトキシン類を同時に測定することが可能である。これは、ほとんどが単一のマイコトキシンだけを一回に検出可能である既知の方法と比べると大きな利点である。

**【0053】**

マイコトキシン類の検出方法の好ましい態様は、特異的および/または親和性結合相手を空間的に分離された方法でマイコトキシン類および/または結合相手のための化学的または生化学的認識成分として、第二の光学的に透明な層(b)の頂部に第一の光学的に透明な導波管層(a)を含んでなり、(b)が(a)より低い屈折率を有する薄膜導波管の表面上で固定化することを提供する。分析しようとする試料および好ましくは発蛍光団-標識付けされた結合相手を次に同時にまたは連続的に加えることができる。薄膜導波管上に固定化された結合相手、試料の1種もしくは複数のマイコトキシンおよび/または好ましくは発蛍光団-標識付けされた結合相手の間の特異的および/または親和性相互作用は消失場における信号変化として検出されうる。試料内のマイコトキシンの存在は消失場における信号の変化を生ずる。

30

**【0054】**

本発明によると、マイコトキシン類は検定、例えば免疫検定によりチップ上で検出されうる。マイコトキシン類の検出は好ましくは免疫検定、好ましくは競合免疫検定、例えば直接的なまたは間接的な競合免疫検定により、特に好ましくは間接的な競合免疫検定により、行われる。

40

**【0055】**

直接的な競合免疫検定によるマイコトキシン類の検出方法の好ましい態様は、抗-マイコトキシン抗体を空間的に分離された方法でマイコトキシン類のための化学的または生化学的認識成分として、第二の光学的に透明な層(b)の頂部に第一の光学的に透明な導波管層(a)を含んでなり、(b)が(a)より低い屈折率を有する薄膜導波管の表面上で固定化することを提供する。好ましくは、発蛍光団-標識付けされたマイコトキシン類または発蛍光団-標識付けされたマイコトキシン-BSA抱合体を次に分析しようとする試

50

料と同時にまたはその前に加えることができる。薄膜導波管上に固定化された結合相手、試料の1種もしくは複数のマイコトキシンおよび/または好ましくは発蛍光団 - 標識付けされたマイコトキシンもしくはマイコトキシン - B S A 抱合体の間の相互作用は消失場における信号変化として検出されうる。

【0056】

直接的な競合免疫検定の場合には、好ましくは2種もしくはそれ以上の異なる抗 - マイコトキシン抗体を例えば滴下により、チップ表面上に共有的にまたは非共有的に固定化することができる。例えば、試験しようとする試料の抽出物を好ましくは蛍光的に標識付けされたマイコトキシン類またはマイコトキシン抱合体と混合してチップに適用して、該チップ上で利用可能な抗体結合部位と競合する該標識付けされたもしくは標識付けされないマイコトキシン類またはマイコトキシン抱合体を生ずる。蛍光的に標識付けされたマイコトキシン類をチップ上の抽出物のインキュベーションの前にまたは最中に加えることができる。固定化された抗体に結合された標識付けされたマイコトキシンの量は抽出物中に存在するマイコトキシン類の量に反比例する。

10

【0057】

検出はサンドイッチ検定により行うこともできる。この場合には、標識付けされたマイコトキシン類またはマイコトキシン抱合体よりむしろ、チップ上に固定化された抗体とマイコトキシンとの固定化された複合体に結合する標識付けされた検出抗体が使用される。サンドイッチ検定では、抗体に結合される発蛍光団の量は抽出物中のマイコトキシン類の濃度に比例する。

20

【0058】

間接的な競合免疫検定によるマイコトキシン類の検出方法の別の好ましい態様は、マイコトキシン類または好ましくは発蛍光団 - 標識付けされたマイコトキシン - B S A 抱合体を空間的に分離された方法でマイコトキシン類および/または結合相手のための化学的または生化学的認識成分として、第二の光学的に透明な層 ( b ) の頂部に第一の光学的に透明な導波管層 ( a ) を含んでなり、 ( b ) が ( a ) より低い屈折率を有する薄膜導波管の表面上で固定化することを提供しうる。好ましくは発蛍光団 - 標識付けされた抗 - マイコトキシン抗体を次に分析しようとする試料と同時にまたはその前に加えることができる。薄膜導波管上に固定化されたマイコトキシン類または好ましくは発蛍光団 - 標識付けされたマイコトキシン - B S A 抱合体の間の相互作用は消失場における信号変化として検出されうる。

30

【0059】

本発明によると、マイコトキシン類は間接的な競合免疫検定によっても検出されうる。この場合には、マイコトキシン類またはマイコトキシン - 抱合体、例えばマイコトキシン - 蛋白質抱合体、好ましくはマイコトキシン - B S A 抱合体をチップ上で固定化することができる。試験しようとする試料の抽出物を好ましくは蛍光的に標識付けられた抗 - マイコトキシン抗体と混合してチップに適用して、蛍光的に標識付けられた抗体の利用可能な抗体結合部位と競合するマイコトキシン類および溶液中のマイコトキシン類を生ずる。蛍光的に標識付けされた抗 - マイコトキシン抗体をチップ上に抽出物のインキュベーションの前にまたは最中に加えることができる。この場合には、結合された標識付けされた抗体の量は抽出物中に存在するマイコトキシン類の量に反比例する。

40

【0060】

さらに、信号を有利には消失場において読み取り装置により検出することができる。該読み取り装置は、例えば、頑丈で且つ安価な読み取り装置でありうる。

【0061】

信号強度、例えば蛍光強度、を評価しそして試料内に存在するマイコトキシン類の量を計算するために適するソフトウェアを使用することができる。

【0062】

本発明の方法、特に実施が容易な方法の組み合わせにより提供される利点である複数のマイコトキシン類を頑丈で且つ安価な読み取り装置上で同時にそして定量的に検出可能に

50

する可能性が、分析研究所以外でマイコトキシン類を容易に且つ迅速に検出することを可能にする。

【0063】

本発明はさらにマイコトキシン類の検出方法を実施するための装置にも関する。

【0064】

マイコトキシン類の検出方法を実施するための装置は、薄膜導波管、好ましくは第二の光学的に透明な層 ( b ) の頂部に第一の光学的に透明な導波管層 ( a ) を含んでなり、 ( b ) が ( a ) より低い屈折率を有する薄膜導波管をベースとする平らな光学的な導波管パイオチップを有する。認識成分は好ましくは層 ( a ) の上に固定化される。

【0065】

適する平らな光学的な導波管は国際公開第 0 1 / 9 2 8 7 0 号パンフレット中にまたは米国特許第 5 , 9 5 9 , 2 9 2 号明細書中に記載されている。

【0066】

装置の好ましい態様では、薄膜導波管の光学的に透明な層 ( b ) 、好ましくは平らな光学的な導波管パイオチップは、シリケート類、例えばガラスもしくは石英から、または好ましくはポリカーボネート類、ポリイミド類、ポリメタクリレート類、ポリスチレン類、環式ポリオレフィン類および / もしくは環式ポリオレフィン共重合体を含んでなる群から、好ましくは環式ポリオレフィン類もしくは環式ポリオレフィン共重合体から選択される透明なプラスチックから製造されうる。光学的に透明な層 ( b ) を製造するために適するプラスチック類の例は国際公開第 0 3 / 9 0 2 0 4 8 8 号パンフレット中に記載されている。

【0067】

例えばポリカーボネート、ポリイミド、アクリレート、特にポリメチルメタクリレート、またはポリスチレンを含んでなる群から選択される透明な熱可塑性または射出可能なプラスチック類が好ましい。

【0068】

装置の特別な態様では、光学的に透明な導波管層 ( a ) は、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  および / または  $ZrO_2$  を含んでなる群から選択される、好ましくは  $TiO_2$ 、 $Ta_2O_5$  および / または  $Nb_2O_5$  を含んでなる群から選択される酸化物を含んでなりうる。数種のそのような酸化物の組み合わせも使用できる。光学的に透明な導波管層 ( a ) が  $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  または  $ZrO_2$ 、好ましくは  $TiO_2$ 、 $Ta_2O_5$  または  $Nb_2O_5$  から製造されることが好ましい。五酸化チタンの使用が特に有利であることが証明された。

【0069】

好ましい態様では、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  および / または  $ZrO_2$  を含んでなる群から選択される酸化物を、特に光学的に透明な層の上に含んでなる薄膜導波管層が、以下の式 ( I )



の有機燐酸類および / もしくは以下の式 ( II )



の有機ホスホン酸類並びに / またはそれらの塩類の単層または多層を含んでなり、ここで R は  $C_{10} \sim C_{24}$  アルキルである。

【0070】

好ましくはドデシル燐酸、ドデシル燐酸塩、オクタデシルホスホン酸塩および / またはオクタデシルホスホン酸を含んでなる群から選択される、R が非分枝鎖状の  $C_{10} \sim C_{20}$  アルキルを含んでなる群から選択される、好ましくは非分枝鎖状の  $C_{12} \sim C_{18}$  アルキルを含んでなる群から選択される有機燐酸類および / または有機ホスホン酸類、好ましくは有機燐酸塩類および / または有機ホスホン酸塩類が好ましく使用可能である。

【0071】

水溶液からの水溶性塩類により薄膜導波管に適用できる有機燐酸類または有機燐酸塩類

10

20

30

40

50

が好ましい。

【0072】

好ましい態様では、有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類、好ましくは有機燐酸塩類が単層により薄膜導波管、特に消失場バイオチップ、好ましくは平らな光学的な導波管バイオチップに適用される。

【0073】

単層は付着 - 促進層として酸化物から製造される光学的に透明な層に適用できる。有利には、有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類は認識成分と、特に担体蛋白質にカップリングされた認識成分と、相互作用しそしてバイオチップに対する該認識成分の結合を促進させうる。

【0074】

装置の好ましい形態では、有機燐酸類および/または有機ホスホン酸類、好ましくは有機燐酸塩類が薄膜導波管に、好ましくは酸化物から製造された光学的に透明な層に付着 - 促進層により適用される。該付着 - 促進層は薄膜導波管またはバイオチップに対する認識成分の結合を促進させうる。

【0075】

200 nmより薄い、好ましくは20 nmより薄い厚さを有する付着 - 促進層が好ましい。

【0076】

励起光は好ましくは光学的に透明な導波管層(a)中に1種もしくはそれ以上の格子構造を用いることによりカップリングされうる。

【0077】

該格子構造は好ましくは、本質的に平らな光学的に透明な層(a)内の屈折率の周期的変調のある、いずれかの形状、例えば正方形、三角形もしくは半円形の形状、を有するレリーフ格子または相格子または容量格子である。格子構造は均一な周期を有する回折格子であることもできまたは多重回折格子であることもできる。格子構造は空間内で光学的に透明な導波管層(a)の中に結合された励起光の伝播方向に対して垂直にまたは平行に変動する周期性を有することができる。

【0078】

200 nm ~ 1000 nmの範囲内、好ましくは200 nm ~ 400 nmの範囲内の周期を有する励起光の結合に使用可能な格子構造が好ましい。さらに、格子の変調伝達因子が3 nm ~ 60 nmの範囲内、好ましくは10 nm ~ 40 nmの範囲内であることも好ましい。変調伝達因子対第一の光学的に透明な導波管層(a)の比が0.4もしくはそれより低いことが好ましい。同様に、屈折率の変調が層aおよび層bの間の界面並びに分析媒体に対する層aの界面の両方で明白であることも好ましい。

【0079】

光学的に透明な導波管層(a)が40 nm ~ 1000 nmの範囲内、好ましくは40 nm ~ 300 nmの範囲内、より好ましくは80 nm ~ 200 nmの範囲内の厚さを有することが好ましい。

【0080】

層(a)および(b)の間の屈折率における差異は好ましくは $\geq 0.2$ 、好ましくは $\geq 0.5$ 、そしてより好ましくは0.56である。

【0081】

励起光は好ましくは300 nm ~ 1100 nmの範囲内、好ましくは300 nm ~ 800 nmの範囲内、より好ましくは500 nm ~ 700 nmの範囲内の波長を有する。

【0082】

適する励起光は格子構造を介してカップリングされることができ、その下流で、層(a)内に案内された結合された光の伝播の方向に、層(a)の変調されない領域があり、それは複数の測定領域の列を含有し、その上で種々のマイコトキシン類が検出される。その下流で、案内された光の伝播の方向に、その下流にある測定領域の別の列を有する1種も

10

20

30

40

50

しくはそれ以上の別の格子構造が有利にはありうる。或いは、列のまたは複数の列の測定領域が層(a)の変調された領域内にもありうる。

【0083】

好ましくは、各々の下流に、カップリングされた(coupled)励起光、測定領域の列の伝播の方向に、該励起光を脱結合するための格子構造が指定され、その構造は該列に特異的であり、格子構造が結合された励起光の伝播の方向に垂直な個々の列に特異的に形成されるかまたはこの方向に薄膜導波管全体を越えて伸びることが可能である。

【0084】

装置は非常に多数の個々の測定場を有することができる。装置の好ましい態様では、特異的および/または親和性結合相手は化学的または生化学的認識成分として100000までの測定場または点により二次元配置で適用され、単一の測定場または点は好ましくは $0.001\text{mm}^2 \sim 6\text{mm}^2$ の範囲内、好ましくは $0.1\text{mm}^2 \sim 1\text{mm}^2$ の範囲内の面積を有する。1平方センチメートル当たり10より多い、好ましくは50より多い測定場が薄膜導波管またはバイオチップに適用されることが好ましい。

【0085】

本発明はさらにマイコトキシン類の検出用のキットにも関する。キットは導波管特異的および/または親和性結合相手が空間的に離された方法でマイコトキシン類および/または結合相手のための化学的または生化学的認識成分としてそれに固定化される、第二の光学的に透明な層(b)の頂部に第一の光学的に透明な導波管層(a)を含んでなり、(b)が(a)より低い屈折率を有する少なくとも1つの薄膜導波管を含んでなる。

【0086】

キットはさらに、好ましくは標識付けされた結合相手を含んでなる少なくとも1種の試薬を含んでなりうる。キットは、また、好ましくは標識付けされた結合相手を含んでなる複数の試薬または種々の標識付けされた結合相手の混合物を含んでなる試薬も含んでなりうる。キットは前記請求項のいずれかに記載の検出を実施するために必要な緩衝剤および/または溶媒もさらに含んでなりうる。本発明は、キットが検出単位を含んでなることも提供する。

【0087】

キットはマイコトキシン類の迅速検出のために使用できる。

【0088】

本発明を説明するために役立つ実施例を以下に示す。

【実施例】

【0089】

実施例 1

消失場バイオチップ上での間接的な競合免疫検定においてゼアラレノン測定するための標準曲線の確定

18nmの格子深さを有する光学格子が刻印されそして155nmの五酸化チタンの層が備えられたガラス製の1cm×2cmの外寸法を有する7個のバイオチップ(ユナキシス(Unaxis)、リヒテンスタイン)にオクタデシルホスホン酸を、500μMのオクタデシルホスホン酸のn-ヘプタン/イソプロパノール(9:1)中溶液内にそれらを浸漬することにより、コーティングした。ゼアラレノンおよびウシ血清アルブミンの抱合体(ZEA-BSA、ZEA対BSA比=50:1、バイオピュア(Biopure)、ツルン、オーストリアにより製造された)並びに染料DyLight 647(ピアース(Pierce)、ドイツ)で標識付けされたBSA分子(DyLight 647-BSA)を「Biochip Arrayer」(パーキン・エルマー(Perkin Elmer)、ドイツ)タイプのスポッターを用いてバイオチップに適用した。滴下溶液は、0.1%のBSAおよび0.1%のTween 20を含有するPBS(137mMのNaCl、2.8mMのKCl、10mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4)中の $5 \times 10^{-4}$ mg/mlの濃度のDyLight 647-BSA、0.1%のBSAおよび0.1%のTween 20を含有するPBS中の0.5mg/

10

20

30

40

50

mlのBSA-ZEA抱合体を含有していた。点を各場合とも10個のDyLight 647-BSA点およびBSA-ZEA抱合体点の新しい交互列の中にあるチップに2つの場(列)により適用した。

#### 【0090】

点を高い湿度(40%)において一晩にわたりインキュベートしそしてバイオチップを次にBSAのPBS中3%強度溶液で4時間にわたり処理した。測定室をチップに、離れた反応室を有する2つの列が各チップ上に形成されるような方法で、適用した。ゼアラレノンの水溶液を0 $\mu$ g/l~31 $\mu$ g/lの範囲内の種々の濃度で製造しそしてDyLight 647で標識付けされたモノクロー性抗-ゼアラレノン抗体(バイオテズ(Biotez)、ベルリン)と混合して、各場合とも1nMの抗体溶液を製造した。

10

#### 【0091】

種々の濃度の混合物を各場合とも測定室に入れ、そしてバイオチップをさらなる処理段階なしに「Minifluo IV」蛍光読み取り器(バイエル・テクノロジー・サービス(Bayer Technology Services)、ドイツ)上で10分間もしくはそれ以内にわたり測定した。各ゼアラレノン点に関して得られた蛍光強度を特定点の上および下にあるDyLight 647-BSA点の蛍光強度の平均により割り算した。列の40個全ての点の蛍光強度の平均を測定した。得られた濃度-依存性蛍光強度をOrigin 7G(オリジン・ラブ・コーポレーション(Origin Lab Corporation)、米国)コンピュータプログラムを用いてS字状適合度により適合させた。

20

#### 【0092】

試料の蛍光強度の評価が溶液中で使用される1mM~10nMのZEA濃度の範囲に相当する適合されたS字状曲線中の最大蛍光強度のそれぞれ80%および20%に相当する0.4ppb~4ppbのゼアラレノンの範囲内のZEA濃度を定量化可能にしたことが見出された。

#### 【0093】

##### 実施例2

デオキシニバレノール(DON)を測定するためおよび汚染された飼料穀類試料を測定するための標準曲線の確定

光学格子(18nmの格子深さ)が刻印され、五酸化チタン層(155nm)が備えられたガラス製の1cm $\times$ 2cmの外寸法を有する15個のバイオチップ(ユナキシス、リヒテンスタイン)を、オクタデシルホスホン酸で(それらをオクタデシルホスホン酸のn-ヘプタン/イソプロパノール(9:1)中溶液の中に浸漬することにより)コーティングした。デオキシニバレノールおよびウシ血清アルブミンの抱合体(DON-BSA、DON:BSA比=100:1、バイオピュア、ツルン、オーストリアにより製造された)並びにイヌIgG(ロックランド(Rockland)、米国)をNanoplotter(ゲシム(Gesim)、ドイツ)タイプのスポッターを用いてバイオチップに適用した。滴下溶液は、トレハロースを含有するPBS(137mMのNaCl、2.8mMのKCl、10mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4)中の0.2mg/mlの濃度のイヌIgG、並びにトレハロースを含有するPBS中の1mg/mlの濃度のBSA-DON抱合体よりなっていた。点を各場合とも12個のイヌIgG点の2列および間にある12個のBSA-DON抱合体点の1列の形態でチップに2つの場(列)により適用した。

30

40

#### 【0094】

点を37において1時間にわたりインキュベートし、そしてバイオチップを次にBSAのPBS中溶液で4時間までにわたり処理した。測定室をチップに、別個の反応室を有する2つの列が各チップ上に形成されるような方法で、適用した。5gの汚染されなかった小麦粉を、メタノールの70%(v/v)水溶液と共に5分間にわたり振ることにより、抽出した。抽出物を遠心しそして次にBSA、カゼイン、低脂肪乾燥粉ミルク、Tween 20、ポリエチレングリコールおよびスクロースを含有するクエン酸トリス緩衝液

50

(pH 7.4)の中に、1:4(v/v、抽出物:緩衝液)の比で希釈した。種々の濃度(15~150 µg/l)でデオキシニバレノールの溶液を製造しそしてDyLight 647で標識付けされたモノクローン性の抗-デオキシニバレノール抗体と、そして同様にDyLight 647で標識付けされたモノクローン性のヤギ抗-イヌIgG抗体と混合して、各場合とも1 nMの抗体溶液を製造した。

【0095】

種々の濃度の溶液を各場合とも測定室に入れ、そしてバイオチップをさらなる処理段階なしに「Minifluo IV」蛍光読み取り器(バイエル・テクノロジー・サービス、ドイツ)上で10分間もしくはそれ以内にわたり測定した。各デオキシニバレノール点に関して得られた蛍光強度を特定点の上および下にあるイヌIgG点の蛍光強度の平均により割り算した。列の12個全てのDON点の蛍光強度の正規化平均を測定した。得られた濃度-依存性の正規化蛍光強度をコンピュータプログラムを用いてポテンシャル適合度により適合させた。

10

【0096】

以上で示された抽出方法と同様にして、5gのDON-汚染された飼料穀類挽き割り試料(コーニング(Corning)、ドイツ、証明付きの526 ppbのDON)を抽出し、そして抽出物を希釈した。300 µlの希釈された抽出物に、DyLight 647で標識付けされたモノクローン性の抗-デオキシニバレノール抗体および同様にDyLight 647で標識付けされたモノクローン性のヤギ抗-イヌIgG抗体を、各場合とも1 nMの抗体溶液が製造されるような方法で加えた。各場合とも100 µlの溶液を測定室に入れ、そしてバイオチップをさらなる処理段階なしに「Minifluo IV」蛍光読み取り器(バイエル・テクノロジー・サービス、ドイツ)上で10分間もしくはそれ以内にわたり測定した。各デオキシニバレノール点に関して得られた蛍光強度を特定点の上および下にあるイヌIgG点の蛍光強度の平均により割り算した。列の12個全てのDON点の蛍光強度の正規化平均を測定した。得られた蛍光強度を上記の標準曲線を用いて飼料穀類挽き割り内のDON濃度に転換して、3回の測定に関して590 ppbの平均を生じた。

20

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/012000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N21/77 G01N33/543 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIGLER FRANCES S ET AL: "Array biosensor for detection of toxins." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY OCT 2003, vol. 377, no. 3, October 2003 (2003-10), pages 469-477, XP002430514 ISSN: 1618-2642	1,5, 7-11, 22-24
Y	the whole document	2-4,6
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 April 2007		Date of mailing of the international search report 07/05/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schlegel, Birgit

2

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/012000

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/20873 A (ZEPTOSENS AG [CH]; HOFER ROLF [CH]; PAWLAK MICHAEL [DE]; TEXTOR MARCUS) 14 March 2002 (2002-03-14)	12-21
Y	page 1, paragraph 1 - page 2, paragraph 2 page 6, paragraph 5 - page 7, paragraph 3 page 10, paragraph 3 - page 11, paragraph 6 page 16, paragraph 6 - page 17, paragraph 2 page 29, paragraph 4 - paragraph 5 page 30, paragraph 6 - page 31, paragraph 3 example 3 abstract	2-4
T	MARK J FELDSTEIN ET AL: "Array Biosensor: Optical and Fluidics Systems" BIOMEDICAL MICRODEVICES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 1, no. 2, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 139-153, XP019205048 ISSN: 1572-8781 page 139, column 2, paragraph 3 - page 141, column 2, paragraph 1	1-24
Y	WO 00/43552 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY RES COR [US]; VO DINH TUAN [US] UT BATTELLE LLC) 27 July 2000 (2000-07-27) page 32, paragraph 4	6
A	NGUNDI MIRIAM M ET AL: "Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages." ANALYTICAL CHEMISTRY 1 JAN 2005, vol. 77, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 148-154, XP002430515 ISSN: 0003-2700 cited in the application the whole document	1-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2006/012000

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0220873	A	14-03-2002	AU 8985901 A 22-03-2002
			EP 1315968 A2 04-06-2003
			US 2003186914 A1 02-10-2003
WO 0043552	A	27-07-2000	AU 2740000 A 07-08-2000
			CA 2358699 A1 27-07-2000
			EP 1151139 A2 07-11-2001
			US 6743581 B1 01-06-2004

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/012000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N21/77 G01N33/543 G01N33/569		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfgebiet (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfgebiet gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LIGLER FRANCES S ET AL: "Array biosensor for detection of toxins." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY OCT 2003, Bd. 377, Nr. 3, Oktober 2003 (2003-10), Seiten 469-477, XP002430514 ISSN: 1618-2642	1,5, 7-11, 22-24
Y	das ganze Dokument	2-4,6
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden ** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nachvollziehbar ist *a* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
23. April 2007		07/05/2007
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Bevollmächtigter Bediensteter Schlegel, Birgit

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2006)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/012000

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/20873 A (ZEPTOSENS AG [CH]; HOFER ROLF [CH]; PAWLAK MICHAEL [DE]; TEXTOR MARCUS) 14. März 2002 (2002-03-14)	12-21
Y	Seite 1, Absatz 1 - Seite 2, Absatz 2 Seite 6, Absatz 5 - Seite 7, Absatz 3 Seite 10, Absatz 3 - Seite 11, Absatz 6 Seite 16, Absatz 6 - Seite 17, Absatz 2 Seite 29, Absatz 4 - Absatz 5 Seite 30, Absatz 6 - Seite 31, Absatz 3 Beispiel 3 Zusammenfassung	2-4
T	MARK J FELDSTEIN ET AL: "Array Biosensor: Optical and Fluidics Systems" BIOMEDICAL MICRODEVICES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, Bd. 1, Nr. 2, 1. Dezember 1998 (1998-12-01), Seiten 139-153, XP019205048 ISSN: 1572-8781 Seite 139, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 141, Spalte 2, Absatz 1	1-24
Y	WO 00/43552 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY RES COR [US]; VO DINH TUAN [US] UT BATTELLE LLC) 27. Juli 2000 (2000-07-27) Seite 32, Absatz 4	6
A	NGUNDI MIRIAM M ET AL: "Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages." ANALYTICAL CHEMISTRY 1 JAN 2005, Bd. 77, Nr. 1, 1. Januar 2005 (2005-01-01), Seiten 148-154, XP002430515 ISSN: 0003-2700 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-24

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/012000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0220873      A	14-03-2002	AU      8985901 A	22-03-2002
		EP      1315968 A2	04-06-2003
		US      2003186914 A1	02-10-2003
WO 0043552      A	27-07-2000	AU      2740000 A	07-08-2000
		CA      2358699 A1	27-07-2000
		EP      1151139 A2	07-11-2001
		US      6743581 B1	01-06-2004

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ドルン, イングマル  
ドイツ 5 0 6 6 8 ケルン・ウルスラガルテンシユトラーセ 2 9

(72)発明者 ラベ, ウベ  
東京都大田区田園調布 3 - 1 3 - 1

(72)発明者 ホイザー - ハーン, イゾルデ  
ドイツ 5 1 3 7 5 レーフエルクーゼン・デユンフエルダーシユトラーセ 2 2

Fターム(参考) 2G054 AA10 BB01 BB11 BB13 CA20 CE02 EA03 EB01  
2G059 AA01 BB12 CC16 DD01 EE01 JJ17 KK01

