

(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2012-225726

(P2012-225726A)

(43) 公開日 平成24年11月15日(2012.11.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 521	4B029
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 33/53 Q	
C12M 1/34 (2006.01)	GO1N 37/00 101	
	C12M 1/34 F	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2011-92703 (P2011-92703)  
 (22) 出願日 平成23年4月19日 (2011.4.19)

(出願人による申告) 平成20年度、21年度、および22年度独立行政法人科学技術振興機構産学イノベーション加速事業「先端計測分析技術・機器開発」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 000005821  
 パナソニック株式会社  
 大阪府門真市大字門真1006番地  
 (74) 代理人 100109667  
 弁理士 内藤 浩樹  
 (74) 代理人 100109151  
 弁理士 永野 大介  
 (74) 代理人 100120156  
 弁理士 藤井 兼太郎  
 (72) 発明者 曾我部 誠司  
 愛媛県東温市南方2131番地1 パナソニックヘルスケア株式会社内  
 Fターム(参考) 4B029 AA07 BB16 BB17 CC01 CC02 FA12

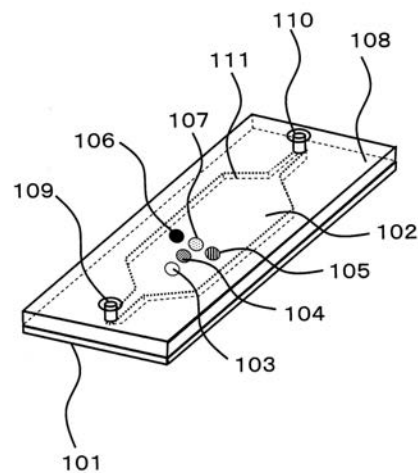
(54) 【発明の名称】 サンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサー

(57) 【要約】

【課題】 検体液を作製する際に医療従事者が誤って検体を入れ忘れた場合には偽陰性と判定できるサンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサーを提供する。

【解決手段】 凹部が形成された光学的に透明な板を支持体に載せて前記板と前記支持体との間に流路を形成し、前記流路の一端に検体を含む測定溶液を順次注排液するための注排水口と他端に排気口とを設けたバイオセンサーにおいて、前記測定溶液に含まれるIgE抗体を捕捉するための抗IgE抗体捕捉部と、前記IgE抗体の中の特定のIgE抗体を捕捉するためのアレルゲン捕捉部と、を前記流路中の前記注排水口側から前記排気口との間の前記支持体表面に配置したバイオセンサー。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

凹部が形成された光学的に透明な板を支持体に載せて前記板と前記支持体との間に流路を形成し、前記流路の一端に検体を含む測定溶液を順次注排液するための注排水口と他端に排気口とを設けたバイオセンサ - において、

前記測定溶液に含まれる I g E 抗体を捕捉するための抗 I g E 抗体捕捉部と、前記 I g E 抗体の中の特定の I g E 抗体を捕捉するためのアレルゲン捕捉部と、を前記流路中の前記注排水口側から前記排気口との間の前記支持体表面に配置したバイオセンサ - 。

## 【請求項 2】

さらに、

前記測定溶液に含まれる標識抗 I g E 抗体を捕捉するための I g E 抗体捕捉部と、前記測定溶液に含まれる標識用酵素を捕捉するための標識蛋白捕捉部と、前記測定溶液に含まれる検出試薬を捕捉するための標識酵素捕捉部と、を前記流路中の前記注排水口側から前記排気口との間の前記支持体表面に配置した請求項 1 に記載のバイオセンサ - 。

## 【請求項 3】

前記抗 I g E 抗体捕捉部は、前記標識抗 I g E 抗体と結合しないものである請求項 2 に記載のバイオセンサ - 。

## 【請求項 4】

前記検体は、全血又は血漿又は血清とする請求項 1 に記載のバイオセンサ - 。

## 【請求項 5】

前記標識用酵素は、ルシフェラ - ゼ又はペルオキシダ - ゼ又はアルカリホスファタ - ゼ又はグルコ - スオキシダ - ゼ又はグルコ - ス - 6 - 燐酸脱水素酵素又は - ガラクトシダ - ゼからなる請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ - 。

## 【請求項 6】

前記測定溶液の基質は、ルシフェリン + A T P + マグネシウム、p - ニトロフェニルリン酸 ( p - N P P )、プロモクロロインドリル燐酸 / ニトロブル - テトラゾリウム ( B C I P / N B T )、プロモクロロインドリル燐酸 / ニトロブル - テトラゾリウム塩 ( B C I P / I N T )、燐酸ナフト - ル A S - T R / ファストレッド R C、フクシン、 - D - グルコ - ス + H R P + 3 , 3 ' - 5 , 5 ' - テトラメルベンチジン ( T M B )、グルコ - ス - 6 - 燐酸 + N A D P、2 , 2 ' - アジノジ ( 3 - エチルベンゾチアゾリソ 6 - スルホン酸 ) アンモニウム塩 ( A B T S )、ジアミノベンチジン ( D A B )、o - フェニレンジアミン ( O P D )、3 , 3 ' - 5 , 5 ' - テトラメルベンチジン ( T M B )、o - ジアニシジン、5 - アミノサリチル酸 ( 5 A S )、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾル ( A E C )、4 - クロロ - 1 - ナフト - ル ( 4 C 1 N )、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド ( X - G A L )、o - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシド ( o - N P G )、4 - メチルウンベリフェリルリン酸、4 - メチルウンベリフェリル - D - グルクロニド、ルミノ - ル、チラミン、p - ヒドロキシフェニルプロピオン酸の何れかからなる請求項 2 に記載のバイオセンサ - 。

## 【請求項 7】

検体を含む測定溶液に含まれる I g E 抗体を捕捉するための抗 I g E 抗体捕捉部と前記 I g E 抗体の中の特定の I g E 抗体を捕捉するためのアレルゲン捕捉部と前記測定溶液に含まれる標識抗 I g E 抗体を捕捉するための I g E 抗体捕捉部と前記測定溶液に含まれる標識用酵素を捕捉するための標識蛋白捕捉部と前記測定溶液に含まれる検出試薬を捕捉するための標識酵素捕捉部とを有する免疫反応系に、

検体を含む複数の試料溶液を順次注入し免疫反応させた後、

前記抗 I g E 抗体捕捉部にて酵素活性が検出されず、かつ前記 I g E 抗体捕捉部及び前記標識蛋白捕捉部及び標識酵素捕捉部の全てに酵素活性が検出されるときは、前記試料溶液に前記検体が含まれていないと判定とするサンドイッチイムノアッセイ法。

10

20

30

40

50

**【請求項 8】**

前記抗 I g E 抗体捕捉部にて酵素活性を検出したときは、前記アレルゲン捕捉部の酵素活性を検出して被検体中の特定の前記 I g E 量として算出する請求項 7 に記載のサンドイッチイムノアッセイ法。

**【請求項 9】**

前記抗 I g E 抗体捕捉部及び前記 I g E 抗体捕捉部にて酵素活性が検出されず、かつ前記標識蛋白捕捉部及び標識酵素捕捉部の全てに酵素活性が検出されるときは、前記試料溶液に前記標識抗 I g E 抗体が含まれていないと判定とする請求項 7 に記載のサンドイッチイムノアッセイ法。

**【請求項 10】**

前記抗 I g E 抗体捕捉部及び前記 I g E 抗体捕捉部及び前記標識蛋白捕捉部の全てに酵素活性が検出されず、かつ標識酵素捕捉部において酵素活性が検出されるときは、前記試料溶液に前記標識用酵素が含まれていないと判定とする請求項 7 に記載のサンドイッチイムノアッセイ法。

**【請求項 11】**

前記抗 I g E 抗体捕捉部及び前記 I g E 抗体捕捉部及び前記標識蛋白捕捉部及び標識酵素捕捉部の全てに酵素活性が検出されないときは、前記試料溶液に検出用試薬が含まれていないと判定とする請求項 7 に記載のサンドイッチイムノアッセイ法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、検体中の被検出物質をサンドイッチイムノアッセイ法により検出する検出装置およびそれを用いて検出する方法に関するものである。

**【0002】**

本発明は、国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 20 年度、21 年度、および 22 年度独立行政法人 科学技術振興機構、産学イノベーション加速事業「先端計測分析技術・機器開発」、産業技術力強化法第 19 条の適用を受ける特許出願）である。

**【背景技術】****【0003】**

検体中の特定成分を検出する方法の一つにサンドイッチアッセイ法がある。サンドイッチアッセイ法は、検出したい物質を 2 種類の物質で挟み込み定量する方法で、迅速かつ高感度に検出できるように化学物質の測定や臨床検査などで広く利用されている。サンドイッチアッセイ法の中でも、検出した物質を抗体で挟み込み定量する方法を特にサンドイッチイムノアッセイ法と呼ぶ。

**【0004】**

サンドイッチイムノアッセイ法を利用した臨床用検査キットには、インフルエンザの診断用迅速測定キットがある。このキットには、試料混合容器とラテラルフロ-を原理とした検出装置が用意されている。ここでラテラルフロ-とは、一般的には、イムノクロマトとも言われメンブレン上で行なうイムノアッセイのことである。本検出装置には、アッセイを行なうための反応場としてニトロセルロ-スメンブレンが備えられており、このメンブレンを覆う形でプラスチック容器が設置されている。さらに、メンブレンの一角には検査結果を目視判定するための捕捉試薬部が用意されている。これによるインフルエンザウイルスの診断は以下のようにして行う。まず、採取した検体と金コロイド標識抗インフルエンザウイルス抗体とを試料混合容器内で混合し検体液とする。その後、検体液を検出装置に設けた供給部へ添加する。添加された検体液は、毛細管現象により吸水性担体方向にむかって展開される。最後に、捕捉試薬部で金コロイドが発する色の変化を確認することで、検体中のヒトインフルエンザウイルスの有無を検出する。

**【0005】**

ところが、こうした検体の検出では、被検出物質が検体中に存在しているにも係わらず陰性と判定される、いわゆる偽陰性が問題となる。この偽陰性が生じると、原因特定を遅

10

20

30

40

50

らせるばかりでなく、不適切な措置で病状がより重篤になるなど、重大な医療事故の要因となる。すなわち、偽陰性を防止することは、極めて重要な課題である。

【0006】

そのため、ニトロセルロースメンブレンの捕捉試薬部よりも下流側に対照部として試料中の標識試薬と特異的反応する組換え体のインフルエンザウイルス抗原を固定化し、対照部の発色を確認することで検体液が捕捉試薬部に到達したことを見分ける方法により、偽陰性を防ぐ手段が知られている（例えば特許文献1を参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2007-333426号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、前記従来構成では、検体液を作製する際に医療従事者が誤って検体を入れ忘れた場合にも陰性と表示し、誤った結果（偽陰性）が生じるという課題を有していた。

【0009】

本発明は、前記従来課題を解決するもので、検体液を作製する際に医療従事者が誤って検体を入れ忘れた場合には偽陰性と判定できるサンドイッチイムノアッセイ法及びそれを

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記従来課題を解決するために、本発明のサンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサは、凹部が形成された光学的に透明な板を支持体に載せて前記板と前記支持体との間に流路を形成し、前記流路の一端に検体を含む測定溶液を順次注排液するための注排水口と他端に排気口とを設けたバイオセンサにおいて、前記測定溶液に含まれるIgE抗体を捕捉するための抗IgE抗体捕捉部と、前記IgE抗体の中の特定のIgE抗体を捕捉するためのアレルゲン捕捉部と、を前記流路中の前記注排水口側から前記排気口との間の前記支持体表面に配置したことを特徴としたものである。

また、本発明は、サンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサにおいて、検体を含む測定溶液に含まれるIgE抗体を捕捉するための抗IgE抗体捕捉部と前記IgE抗体の中の特定のIgE抗体を捕捉するためのアレルゲン捕捉部と前記測定溶液に含まれる標識抗IgE抗体を捕捉するためのIgE抗体捕捉部と前記測定溶液に含まれる標識用酵素を捕捉するための標識蛋白捕捉部と前記測定溶液に含まれる検出試薬を捕捉するための標識酵素捕捉部とを有する免疫反応系に、検体を含む複数の試料溶液を順次注入し免疫反応させた後、前記抗IgE抗体捕捉部にて酵素活性が検出されず、かつ前記IgE抗体捕捉部及び前記標識蛋白捕捉部及び標識酵素捕捉部の全てに酵素活性が検出されるときは、前記試料溶液に前記検体が含まれていないと判定とすることを特徴としたものである。

【発明の効果】

【0011】

本発明のサンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサによれば、検体が検体液に正しく添加されているかどうかを判別出来れば偽陰性の発生を防止できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の実施の形態1におけるバイオセンサの構成図

【図2】本発明の実施の形態1におけるバイオセンサの分解図

【図3】本発明の実施の形態1におけるサンドイッチイムノアッセイ法の測定手順を示す図

10

20

30

40

50

【図 4】本発明の実施例 1 ~ 6 におけるバイオセンサ - の構成図

【図 5】本発明の実施例 1 における測光画像を示す図

【図 6】本発明の実施例 2 における測光画像を示す図

【図 7】本発明の実施例 3 における測光画像を示す図

【図 8】本発明の実施例 4 における測光画像を示す図

【図 9】本発明の実施例 5 における測光画像を示す図

【図 10】本発明の実施例 6 における測光画像を示す図

【図 11】従来のバイオセンサ - の構成図

【発明を実施するための形態】

【0013】

10

まず、図 11 に示した従来技術を説明する。従来の捕捉方法は、ニトロセルロースメンブレン 1101 上に設けた捕捉試薬部 1102 よりも下流域に対照部 1103 として標識試薬である金コロイド標識抗インフルエンザウイルス抗体を捕捉可能なものを設けている。そのため、供給部 1104 から検体 1107 及び標識試薬 1108 を含む検体液 1109 が注液されると検体液 1109 が毛細管現象によりニトロセルロースメンブレン 1101 内を吸水性担体 1105 方向にむかって展開される。最後に、捕捉試薬部 1102 及び対照部 1103 で金コロイドが発する色の変化を確認することで、検体液 1109 の注液の有無を確認している。しかし従来の構成では、標識成分のみで判定しているので、検体が含まれていないときは陰性と判定（偽陰性）し誤判定する。

【0014】

20

そのため、本法では、偽陰性を完全に防止するために、標識成分だけでなく、検体成分を始めとする各試料溶液成分を捕捉可能なものを捕捉部に捕捉することで、検体成分を始めとする試料溶液がバイオセンサ - 内に正常に展開されたことを判定できるようにした。以下に、本発明のサンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサ - の実施の形態を図面とともに詳細に説明する。

【0015】

（実施の形態 1）

図 1 は、本発明の第 1 の実施の形態におけるバイオセンサ - の構成図を示す。

図 1 の支持体 101 は、生体分子を捕捉することが出来る捕捉部領域 102 を設けている。その上に、前記捕捉部領域 102 を覆うように流路 111 が形成された上カバ - 108 を接続されている。前記上カバ - 108 の一端には、流路 111 内に検体を含む測定に必要な複数の種類の試料溶液を順次注排液するための注排水口 109 と、他端に排気口 110 を有している。さらに、流路 111 内の捕捉部領域 102 には、アレルゲン捕捉部 103 と、抗 IgE 抗体捕捉部 104 と、IgE 抗体捕捉部 105 と、標識蛋白捕捉部 106 と、標識酵素捕捉部 107 とを配置することで構成されている。ここで、標識蛋白捕捉部 106 における標識物とは、ビオチン又はアビジン又はストレプトアビジン標識物のことである。また、標識酵素捕捉部 107 は、酵素を直接又は酵素標識抗体を捕捉することができる。

30

【0016】

本実施の形態では、各捕捉部を利用することで、偽陰性を発生させることなく、検体中の特定の IgE 量を検出する方法を例に説明する。

図 2 は、図 1 に示したバイオセンサ - の分解図である。本実施例では、支持体 201 の寸法は、縦 25 ~ 40 mm、横 40 ~ 80 mm とした。また、上カバ - 208 の寸法は支持体と同程度とし、上下方向の厚さは、2 ~ 10 mm とし、形成する流路 211 の厚みは、0.1 ~ 0.5 mm とした。ただし、図 2 に示したバイオセンサ - を構成するための各部材の寸法は自由に変更できる。また、上カバ - の材質は、透明なものであれば利用できる。

40

【0017】

支持体 201 は、捕捉部領域 202 を設けることが可能な材質で構成され、例えば、合成樹脂、ガラス、金属、ニトロセルロース、フッ化ビニリデンが利用できる。捕捉部領域

50

202は、生体分子を捕捉できるものが利用可能で、例えば、ガラス、ポリスチレン、金被膜、アルミニウム被膜、ニトロセルロース、フッ化ビニリデン、カチオン性ポリマ被膜、親水性ポリマ被膜、表面化学処理及び支持体を多孔質化したものが利用できる。表面化学処理としては、シラン化、アミノ化、アルデヒド化、チオール化、エポキシ化や活性エステル化がある。上カバーは、透明なガラス又は透明樹脂素材のものが利用できる。透明樹脂としては、例えば、アクリル、ポリカーボネート、ポリスチレン、PET（ポリエチレンテレフタレート）がある。

【0018】

図2の中図に示す粘着シート212を用いて上図の上カバー208と下図の支持体201を接合した。各捕捉部を作製した支持体201と上カバー208の接合は、流路内に注液した液が、液漏れを起こさないように密閉空間を形成できるものが利用可能である。粘着シート以外の接合方法としては、例えば、UV接着、熱圧着、超音波接着を挙げることができる。

10

【0019】

以下に支持体201中の各捕捉部について作製方法と理由を簡単に説明する。詳細については後述する。

【0020】

アレルギー捕捉部203は、検体中の目的の被検出物質である各アレルギー由来のIgEを特異的に捕らえるためのもので、精製したアレルギーを用いて作製する。ここには、検体中のIgGも結合可能であるが、後に述べる試料溶液の一つである標識抗IgE抗体が、IgGとは結合しないため本サンドイッチ免疫アッセイ法による測定には影響しないので、以降IgGの結合については省略する。

20

【0021】

抗IgE抗体捕捉部204は、検体中のIgEを捕らえるためのもので、抗IgE抗体を用いて作製する。ここで、抗IgE抗体捕捉部で捕捉する抗体は、IgEであれば、どんなIgEでも捕捉可能なものを使用する。この捕捉部が、各試料溶液にうち、バイオセンサ内への検体注入の有無を評価する。

【0022】

IgE抗体捕捉部205は、試料溶液中の抗IgE抗体を特異的に捕らえるためのもので、IgE抗体を用いて作製する。この捕捉部が、各試料溶液にうち、バイオセンサ内への抗IgE抗体の有無を評価する。

30

【0023】

標識蛋白捕捉部206は、試料溶液中の標識酵素を捕らえるためのもので、標識蛋白を用いて作製する。この捕捉部が、各試料溶液にうち、バイオセンサ内への標識用酵素注入の有無を評価する。標識蛋白捕捉部に捕捉する蛋白は、試料溶液中のビオチン又はアビジン又はストレプトアビジン標識酵素のビオチン又はアビジン又はストレプトアビジンと結合可能なものを標識したものとする。

【0024】

標識酵素捕捉部207は、試料溶液中の検出用試薬を捕らえるためのもので、標識用酵素を用いて作製する。この捕捉部が、各試料溶液にうち、バイオセンサ内への検出用試薬の有無を評価する。

40

【0025】

各捕捉部は、上カバー208の注排水口209から排気口210の間の流路211内に位置する支持体の捕捉部領域202に設けることができる。

【0026】

また、アレルギー捕捉部203は、検体中の被検出物質が1種でも複数箇所に捕捉することが可能である。また、検体中の被検出物質が複数種ある場合は、それぞれに対応した捕捉部を設けることもできる。アレルギー捕捉部203に捕捉するアレルギーの例としては、スギ、ダニ、コムギ等から抽出した精製アレルギーが利用できる。

【0027】

50

同様に、アレルゲン以外の捕捉部も、複数箇所に設けることができる。また、アレルゲン捕捉部 203 よりも、注排水口 209 側から遠い箇所に捕捉すると、流路 211 内に確実に注液が行われていると判定できるので好ましい。さらに、アレルゲン捕捉部 203 を挟むように注排水口 209 側から近い箇所と遠い箇所に捕捉させれば、前後の捕捉部の値から攪拌の様子を推察することもできる。これは、送液が一定しないような例えば、新規の流路開発段階で有効である。このようにして各捕捉部を作製する。

#### 【0028】

また、I g E 抗体捕捉部 205、標識蛋白捕捉部 206、及び標識酵素捕捉部 207 をバイオセンサ - 内に設けることにより、検体成分以外の試料溶液注液不良も検出可能となり、不良箇所の検索を行なうことができる。

10

#### 【0029】

また、捕捉部以外の捕捉部領域に生体分子が捕捉されるとノイズとなってしまうので、捕捉部以外の場所とは、試料溶液が反応することが無いようにブロッキング処理を実施する。ブロッキング剤としては、一般的なものが利用可能で、例えば、BSA、カゼイン、スキムミルク、ゼラチン、正常ヤギ血清、人工合成高分子等が挙げられる。

#### 【0030】

このようにして作製したバイオセンサ - に対し、図 3 に示したフロ - チャ - トに従って検体を含む測定に必要な複数の試料溶液を順次注入し反応させ、各捕捉部における酵素活性の有無を検出することで実施した試料溶液処理が正しく行なわれたか判定できる。

まず、検体の注液判定の方法を説明する前に、アレルゲン捕捉部 203 が検体の注液判定に利用できないことを説明する。これは、アレルゲン捕捉部 203 が捕捉できる抗体が、捕捉アレルゲンに対し結合できる I g E 抗体が、捕捉アレルゲンに特異的な I g E 抗体のみであることに起因する。つまり、アレルゲン捕捉部 203 に対し、特異的に結合できる I g E 抗体を保有しない検体を使用した場合、アレルゲン捕捉部 203 では全く酵素活性が確認されないことがあり得る。そのため、アレルゲン捕捉部 203 で、検体注液の有無を正確に判定することはできない。

20

#### 【0031】

次に、検体注液の有無を正確に判定できる抗 I g E 抗体捕捉部 204 について理由と合わせて説明する。ここで、人が有する I g E について説明すると、人が保有する I g E 量は、全免疫グلوبリンの約 0.004% を占め、血中濃度としては、約 0.03 mg / d l を占めている。つまり、I g E 抗体であれば、どんな I g E 抗体でも捕捉可能な抗体を捕捉してある抗 I g E 抗体捕捉部 204 においては、検体さえ注液されれば、人体に必ず一定の割合で存在している I g E 抗体と結合できる。そのため、検体注液の判定に使用でき、抗 I g E 抗体捕捉部 204 で酵素活性が検出されたときに、アレルゲン捕捉部 203 の酵素活性を検出することで、正しく検体処理が行なわれたことを確認した上で、被検体中の特定の I g E 量を算出できる。

30

#### 【0032】

次に、試料溶液の検体注液が正常に実施できていないと判定する方法を説明する。判定は、抗 I g E 抗体捕捉部 204 において試料溶液に酵素活性が検出されず、かつ I g E 抗体捕捉部 205 及び標識蛋白捕捉部 206 及び標識酵素捕捉部 207 において標識酵素の活性が検出されるときを、試料溶液に検体が含まれていないと判定できる。そのため、偽陰性を防止することが出来る。これは、前述した抗 I g E 抗体捕捉部 204 が検体注液され、以降の処理も正確に実施されれば必ず酵素活性を示すことに加え、I g E 抗体捕捉部 205 が、フロ - チャ - ト S 07 以降の処理が正常に行なわれたときには必ず酵素活性を有する試薬を予めバイオセンサ - として捕捉しておくことで判定できる。

40

#### 【0033】

つまり、I g E 抗体捕捉部 205 には、本来検体処理を実施することで捕捉する I g E 抗体をバイオセンサ - 作製時点で既に捕捉しておくので、検体の有無に係わらず、バイオセンサ - 内に I g E 抗体が存在する状態となっているため S 07 以降の処理に参与できる。よって、抗 I g E 抗体捕捉部 204 において試料溶液に酵素活性が検出されず、かつ I

50

g E抗体捕捉部205及び標識蛋白捕捉部206及び標識酵素捕捉部207において標識用酵素の活性が検出されるときを、試料溶液に検体が含まれていないと判定できる。I g E抗体捕捉部205で酵素活性が確認できれば、標識蛋白捕捉部206及び標識酵素捕捉部207においては必ず酵素活性が確認できるが、その詳細については後述する。

【0034】

以下、図3のフロ-チャ-トに従い、第1から第7の試料溶液を順次注入した際に生じる現象を詳細に述べる。

【0035】

まず、バイオセンサ-の注排水口からシリンジを使用し、検体を含んだ第1の試料溶液を注入する(S01)。ここで第1の試料溶液は、検体を含んだものである。その後、流路内の密閉空間で、シリンジを上下にピストン運動させながら、攪拌操作を実施し、各捕捉部と検体を一定時間反応させる(S02)。その後、注排水口から第1の試料溶液を廃棄する(S03)。ここで使用可能な検体は、全血又は血漿又は血清である。バイオセンサ-内に、検体を直接注入することも可能だが、少量の検体を使用する場合には、希釈液で希釈を行い添加する。希釈液は、目的の免疫反応を阻害しないように、使用する緩衝液の種類やpH、塩濃度、界面活性剤濃度、及び高分子化合物の添加等を考慮した上で実施する。希釈液としては、一般的に知られている希釈液が利用でき、例えば、PBS buffer、TBS buffer、PBST buffer、TBST buffer、Can Get Signal Solution I (ToYoBo)、Can Get Signal Solution II (ToYoBo)等が挙げられる。

10

20

【0036】

第1の試料溶液との反応で、抗I g E抗体捕捉において、検体中に存在するI g E抗体を捕捉し、アレルゲン捕捉部において、検体中に存在するアレルゲンに特異なI g Eのみを捕捉する。

【0037】

次に、バイオセンサ-の注排水口からシリンジを使用し、第2の試料溶液を注入する(S04)。ここで、第2の試料溶液は、洗浄液を含んだものである。その後、流路内の密閉空間で、シリンジを上下にピストン運動させながら、攪拌操作を実施し、各捕捉部と第2の試料溶液を一定時間反応させる(S05)。その後、注排水口から第2の試料溶液を廃棄する(S06)。ここで使用可能な洗浄液は、一般的に知られている洗浄液が利用でき、例えば、PBST buffer、TBST bufferが利用できる。洗浄液は、希釈液に比べ、より高塩濃度にすることや、より界面活性剤濃度を高くすることで、非特異に捕捉された成分を除去できる。

30

【0038】

第2の試料溶液との反応で、未反応な検体を除去するとともに、非特異的に捕捉した成分を除去する。この工程を実施することで、ノイズを低減させることができる。

【0039】

次に、バイオセンサ-の注排水口からシリンジを使用し、第3の試料溶液を注入する(S07)。ここで第3の試料溶液は、標識抗I g E抗体を含んだものである。ここで、標識抗I g E抗体の標識物とは、ビオチン又はアビジン又はストレプトアビジン標識物のことである。その後、流路内の密閉空間で、シリンジを上下にピストン運動させながら、攪拌操作を実施し、各捕捉部と標識抗I g E抗体を一定時間反応させる(S08)。その後、注排水口から第3の試料溶液を廃棄する(S09)。バイオセンサ-内に、標識抗I g E抗体を直接注入することも可能だが、少量の標識抗I g E抗体を使用する場合には、希釈液で希釈を行い添加する。希釈液は、第1の試料溶液を希釈するとき使用したものを使用できる。免疫反応を阻害しないように緩衝液の種類やpH、塩濃度、界面活性剤濃度、及び高分子化合物の添加等を変更して使用することもできる。

40

【0040】

第3の試料溶液との反応で、アレルゲン捕捉部が捕捉したI g E抗体及び抗I g E抗体捕捉部が捕捉したI g E抗体及びI g E抗体捕捉部が、標識抗I g E抗体の抗I g E抗体部

50

分を捕捉する。

【0041】

次に、バイオセンサ - の注排水口からシリンジを使用し、第4の試料溶液を注入する（S10）。ここで、第4の試料溶液は、洗浄液を含んだものである。その後、流路内の密閉空間で、シリンジを上下にピストン運動させながら、攪拌操作を実施し、各捕捉部と第4の試料溶液を一定時間反応させる（S11）。その後、注排水口から第4の試料溶液を廃棄する（S12）。ここで使用する洗浄液は、第2の試料溶液として使用した洗浄液と同一のものを使用できる。第2の試料溶液とは、洗浄力を変更したい場合は、試薬組成を変更して使用することも出来る。

【0042】

第4の試料溶液との反応で、未反応な標識抗IgE抗体を除去するとともに、非特異的に捕捉した成分を除去する。この工程を実施することで、ノイズを低減させることができる。

【0043】

次に、バイオセンサ - の注排水口からシリンジを使用し、第5の試料溶液を注入する（S13）。ここで第5の試料溶液は、標識用酵素を含んだものである。ここで、標識用酵素の標識は、アビジン又はストレプトアビジン又はビオチンであり、第3の試料溶液で注入した標識抗IgE抗体の標識部と結合可能なものとする。例えば、標識抗IgE抗体として、アビジン標識抗IgE抗体を使用するなら、標識用酵素は、ビオチン標識酵素を使用する。また、ここで利用できる酵素としては、ルシフェラゼ又はペルオキシダゼ又はアルカリホスファターゼ又はグルコ - スオキシダゼ又はグルコ - ス - 6 - 燐酸脱水素酵素又は - ガラクトシダゼを挙げることができる。その後、流路内の密閉空間で、シリンジを上下にピストン運動させながら、攪拌操作を実施し、各捕捉部と標識用酵素を一定時間反応させる（S14）。その後、注排水口から第5の試料溶液を廃棄する（S15）。バイオセンサ - 内に、標識用酵素を直接注入することも可能だが、少量の標識用酵素を使用する場合には、希釈液で希釈を行い添加する。希釈液は、第1の試料溶液を希釈するとき使用したものを使用できる。免疫反応を阻害しないように使用する緩衝液の種類及びpH、塩濃度、界面活性剤濃度、高分子化合物の添加等を変更して使用することもできる。

【0044】

第5の試料溶液との反応で、アレルギー捕捉部が捕捉した標識抗IgE抗体の標識部分、及び抗IgE抗体捕捉部が捕捉した標識抗IgE抗体の標識部分、及びIgE抗体捕捉部が捕捉した標識抗IgE抗体の標識部分、及び標識蛋白捕捉部の標識部分が、標識用酵素の標識部分を捕捉する。ここで使用する標識蛋白捕捉部として捕捉する蛋白は、第3の試料溶液として注液した標識抗IgE抗体の標識部分と結合可能なものを標識した蛋白を使用する。

【0045】

次に、前記バイオセンサ - の注排水口からシリンジを使用し、第6の試料溶液を注入する（S16）。ここで、第6の試料溶液は、洗浄液を含んだものである。その後、流路内の密閉空間で、シリンジを上下にピストン運動させながら、攪拌操作を実施し、各捕捉部と第6の試料溶液を一定時間反応させる（S17）。その後、注排水口から第6の試料溶液を廃棄する（S18）。ここで使用する洗浄液は、第2の試料溶液として使用した洗浄液と同一のものを使用できる。第2の試料溶液とは、洗浄力を変更したい場合は、試薬組成を変更して使用することも出来る。

【0046】

第6の試料溶液との反応で、未反応な標識用酵素を除去するとともに、非特異的に捕捉した成分を除去する。この工程を実施することで、ノイズを低減させることができる。

次に、バイオセンサ - の注排水口からシリンジを使用し、第7の試料溶液を注入する（S19）。ここで第7の試料溶液は、検出用試薬を含んだものである。また、検出用試薬とは、酵素と反応する基質成分を含み効率よく酵素反応が行なわれるようにpH等を調整し

10

20

30

40

50

た試料溶液のことである。ここで利用できる基質としては、ルシフェリン + ATP + マグネシウム、p-ニトロフェニルリン酸 (p-NPP)、プロモクロロインドリル燐酸/ニトロプル-テトラゾリウム (BCIP/NBT)、プロモクロロインドリル燐酸/ニトロプル-テトラゾリウム塩 (BCIP/INT)、燐酸ナフト-ルAS-TR/ファストレッドRC、フクシン、 $\beta$ -D-グルコ-ス + HRP + 3,3'-5,5'-テトラメルベンチジン (TMB)、グルコ-ス-6-燐酸 + NADP、2,2'-アジノジ(3-エチルベンゾチアゾリソ6-スルホン酸)アンモニウム塩 (ABTS)、ジアミノベンジジン (DAB)、o-フェニレンジアミン (OPD)、3,3'-5,5'-テトラメルベンチジン (TMB)、o-ジアニシジン、5-アミノサリチル酸 (5AS)、3-アミノ-9-エチルカルバゾル (AEC)、4-クロロ-1-ナフト-ル (4C1N)、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (X-GAL)、o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (o-NPG)、4-メチルウンベリフェリルリン酸、4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルクロニド、ルミノ-ル、チラミン、p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸を挙げることができる。その後、流路内の密閉空間で、各捕捉部が捕捉した酵素が基質と反応する。

#### 【0047】

第7の試料溶液との反応で、抗IgE抗体捕捉部が捕捉した標識用酵素、及びアレルギーン捕捉部が捕捉した標識用酵素、及びIgE抗体捕捉部が捕捉した標識用酵素、及び標識蛋白捕捉部が捕捉した標識用酵素、及び標識酵素捕捉部の各酵素が、基質と反応する。ここで、標識酵素捕捉部として捕捉する酵素は、第7の試料溶液として注液した標識用酵素の酵素部分と同一のものを使用する。これにより全ての捕捉部で同一の基質が利用できる。

#### 【0048】

次に、第7の試薬反応により生じる各捕捉部から生じる酵素活性を測光する (S20)。測光方法としては、例えば、CCD (Charge Coupled Devices) カメラ等で捕捉部を一度に測光画像として撮影する方法がある。

#### 【0049】

次に、撮影した測光画像の各捕捉部から得られる光量を算出し、判定を行う (S21)。判定方法は、前述したように抗IgE抗体捕捉部において酵素活性が検出されるとき、検体をはじめとする試料溶液処理が正常にできたと判定する。

#### 【0050】

ここで、検体処理以外の処理に不備があったときの判定方法を説明する。

まず、試料溶液の標識抗IgE抗体注液が正常に実施できていないと判定する方法を説明する。これは、抗IgE抗体捕捉部204及びIgE抗体捕捉部205において試料溶液に酵素活性が検出されず、かつ標識蛋白捕捉部206及び標識酵素捕捉部207において標識用酵素の活性が検出されるときは、試料溶液に標識抗IgE抗体が含まれていないと判定とすることができる。これは、前述した抗IgE抗体捕捉部204及びIgE抗体捕捉部205の役割に加え、標識蛋白捕捉部206が、フロ-チャ-トS13以降の処理が正常に行なわれると必ず酵素活性を有することから判定できる。これは、標識蛋白捕捉部206は、本来検体処理を実施することで捕捉する抗IgE抗体をバイオセンサ-作製時点で既に捕捉しておくので、試料溶液として注液する検体及び標識抗IgE抗体の有無に係わらず、S13以降の処理に関与できるためである。また、このことから、IgE抗体捕捉部205で酵素活性が確認できれば、標識蛋白捕捉部206でも酵素活性が確認できると言える。

#### 【0051】

次に、試料溶液の標識用酵素注液が正常に実施できていないと判定する方法を説明する。これは、抗IgE抗体捕捉部204及びIgE抗体捕捉部205及び標識蛋白捕捉部206において試料溶液に酵素活性が検出されず、かつ標識酵素捕捉部207において標識用酵素の活性が検出されるときは、試料溶液に標識用酵素が含まれていないと判定とすることができる。これは、前述した抗IgE抗体捕捉部204及びIgE抗体捕捉部205

10

20

30

40

50

及び標識蛋白捕捉部 206 の役割に加え、標識酵素捕捉部 207 が、フロ - チャ - ト S 19 以降の処理が正常に行なわれると必ず酵素活性を有することから判定できる。

【0052】

これは、標識酵素捕捉部 207 は、本来標識用酵素注液を実施することで捕捉する標識用酵素をバイオセンサ - 作製時点で既に捕捉しておくので、試料溶液として注液する検体及び標識抗 I g E 抗体及び標識用酵素の有無に係わらず、S 19 以降の処理に關与できるためである。また、このことから、I g E 抗体捕捉部 205 で酵素活性が確認できれば、標識酵素捕捉部 207 でも酵素活性が確認できると言える。さらに、標識蛋白捕捉部 206 で酵素活性が確認できれば、標識酵素捕捉部 207 でも酵素活性が確認できるとも言える。

10

【0053】

次に、試料溶液の検出用試薬注液が正常に実施できていないと判定する方法を説明する。

【0054】

これは、抗 I g E 抗体捕捉部 204 及び I g E 抗体捕捉部 205 及び標識蛋白捕捉部 206 及び標識酵素捕捉部 207 において試料溶液に酵素活性が検出されないときは、試料溶液に検出用試薬が含まれていないと判定とすることができる。これは、前述したフロ - チャ - ト S 19 以降の処理が正常に行なわれると必ず酵素活性を有する標識酵素捕捉部 207 から酵素活性が確認できないことから判定できる。

20

【0055】

最後に、正常処理ができたと判定したときに、アレルゲン捕捉部の酵素活性を検出し、被検体中の特定の I g E 量として算出し、解析結果として表示する (S 22)。また、正常処理ができなかったときは、判定に従い、不備工程を表示する。

【0056】

このように、本法では、各試料溶液に対応する捕捉部を設け、被検出物質の測定結果を表示する前に、各捕捉部の酵素活性を判定し、正常処理ができたことを確認するので、試料の入れ忘れによる偽発光を防止できる。

【実施例 1】

【0057】

測定溶液には人の血清を用いて実験を行なった。実験のために作製したバイオセンサ - を図 4 に示す。

30

【0058】

上述したバイオセンサ - の支持体には、捕捉部領域にニトロセルロ - ス 402 処理が行なわれたガラス基板 401 (GenTel 社、PATH Protein Microarray Slide) を用いた。支持体上に、アレルゲン捕捉部としてスギアレルゲン 403 を捕捉し、抗 I g E 抗体捕捉部として抗 I g E 抗体 f 1974 404 (株式会社バイオマトリックス研究所製) を捕捉し、I g E 抗体捕捉部としてヒト I g E 抗体 405 (ヤマサ醤油株式会社製) を捕捉し、標識蛋白捕捉部としてビオチン化 BSA 406 を捕捉し、標識酵素捕捉部としてルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 407 (キッコ - マン株式会社製) を捕捉した。

40

【0059】

スギアレルゲン 403 捕捉部への塗布溶液中には、スギ花粉抗原 SBP (生化学工業株式会社製) にグリセロ - ル、BSA 及びホウ酸緩衝液を添加後、混合した。グリセロ - ルは自身が持つ粘性のために塗布時のばらつきを抑制できるので、塗布時の再現性向上剤として添加した。BSA 及びホウ酸緩衝液は、スギ花粉抗原 SBP の溶液時の構造安定化剤として添加した。塗布用混合液は、グリセロ - ル、BSA (牛血清アルブミン) 及びホウ酸緩衝液を混合することで、スギ花粉抗原 SBP が 1.5 倍希釈されるように調整した。調整した塗布用混合液を、1 スポットあたりの塗布量が 4.5 nL になるように、Nano - Plotter NP2.1 (Gesim 社製) を用いて支持体上へ塗布を行なった。塗布サンプルは、濡らした布を敷いたタッパ - 中で、30 の下、8 時間放置し固定化

50

させた。このようにしてアレルゲン捕捉部を作製した。

【0060】

スギアレルゲン403捕捉部と同様の方法で抗IgE抗体f1974 404捕捉部、ヒトIgE抗体405捕捉部、ビオチン化BSA406捕捉部、ルシフェラ-ゼ標識抗IgE抗体407補足部にも塗布を行なった。その際に、抗IgE抗体f1974 404捕捉部への塗布溶液中には、抗IgE抗体f1974 (株式会社バイオマトリックス研究所製、f1974はClone No.)にグリセロール、BSA及びホウ酸緩衝液を混合し、抗IgE抗体f1974が60倍希釈されるように調整した。また、ヒトIgE抗体405捕捉部への塗布溶液中には、ヒトIgE (ヤマサ醤油株式会社)にグリセロール、BSA及びホウ酸を混合し、ヒトIgEが6000倍希釈されるように調整した。また、ビオチン化BSA406捕捉部への塗布溶液中には、250 $\mu$ g/mLに調整したビオチン化BSA溶液(SIGMA社製)にグリセロール、BSA及びホウ酸を混合し、ビオチン化BSA溶液が40倍希釈されるように調整した。ルシフェラ-ゼ標識抗IgE抗体407補足部への塗布溶液中には、抗IgE抗体f0822 (株式会社バイオマトリックス研究所製、f0822はClone No.)にルシフェラ-ゼ(キッコ-マン株式会社製)を結合させた抗IgE抗体f0822標識ルシフェラ-ゼにグリセロール、BSA及びホウ酸を混合し、抗IgE抗体f0822標識ルシフェラ-ゼが10倍希釈されるように調整した。ルシフェラ-ゼ標識抗IgE抗体407補足部には、直接ルシフェラ-ゼを捕捉することも可能だが、酵素の可変性に影響が生じ、基質認識力が低下するので、酵素そのものでは無く、酵素に標識物を結合させたものを捕捉した。

10

20

【0061】

上述のように各試料を捕捉した支持体の捕捉面に対し、粘着シート412を支持体の幅に合わせてカットするとともに、上カバ-側に加工した流路411及び注排水口409及び排気口410の形状に合わせてカットし、粘着面の片側を支持体の固定化面に貼り、残る一面に流路形状を後加工したアクリルプレ-トを透明樹脂製上カバ-408として貼り合わせることでバイオセンサ-を作製した。

【0062】

次に、このバイオセンサ-を用いて測定を行なった。まず、ブロッキング剤としてN101 (日本油脂株式会社製)をバイオセンサ-内に満たした。ブロッキング処理は、37 $^{\circ}$ Cで1h静置させながら行なった。このブロッキング剤は、スギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部、ヒトIgE抗体405捕捉部、ビオチン化BSA406捕捉部、標識用酵素又は酵素標識抗体補足部以外のむき出しになっている捕捉部領域に結合するので、検体中に含まれるタンパク質をはじめ糖質、脂質やホルモンがアレルゲン捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部、ヒトIgE抗体405捕捉部、ビオチン化BSA406捕捉部、ルシフェラ-ゼ標識抗IgE抗体407補足部以外へ吸着し、この後の処理でノイズとなり悪影響を及ぼすことを抑制することができる。

30

【0063】

次に、スギアレルゲン403捕捉部及び抗IgE抗体f1974 404捕捉部と検体を反応させる工程を行なった。血清18 $\mu$ Lに対し、希釈液としてCan Get Signal I (ToYoBo社製)42 $\mu$ Lを混合した第1の試料溶液をバイオセンサ-内に展開させ反応させた。5分間、ピペティング方式による流路内攪拌を行なった後、第1の試料溶液をバイオセンサ-内から排除した。Can Get Signal Iは、反応効率を高めるために添加した。この工程により、スギアレルゲン403捕捉部に対しては、検体中のスギ由来のIgE抗体が特異的に結合し、抗IgE抗体f1974 404捕捉部に対しては、希釈液中のIgEが特異的に結合する。

40

【0064】

引き続き、第2の試料溶液を用い流路内の洗浄を行った。バイオセンサ-内の壁面に残った第1の試料溶液の除去やスギアレルゲン403捕捉部及び抗IgE抗体f1974 404捕捉部と非特異に捕捉した物質の除去を目的に実施した。この工程により、ノイズを低減することができる。洗浄剤としては、50mM Tris-HCl (pH7.8)

50

、0.45 M NaCl、0.1% Tween 20（東京化成工業株式会社製）を添加したものをバイオセンサ - 内に展開させ使用した。1分間、ピペッティング方式による流路内攪拌を行なった後、洗浄剤をバイオセンサ - 内から排除した。

【0065】

次に、スギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部に結合したIgE抗体及びヒトIgE抗体405捕捉部に対し、抗IgE抗体を添加し、捕捉反応を実施した。本実施例では、ビオチン標識した抗IgE抗体クロ - ンNo. f0822（株式会社バイオマトリックス研究所製）を含む抗体溶液を使用した。ビオチン標識した抗IgE抗体クロ - ンNo. f0822 4.5 μLに対し、Can Get Signal I（ToYoBo社製）55.5 μLを混合した第3の試料溶液をバイオセンサ - 内に展開させ反応させた。5分間、ピペッティング方式による流路内攪拌を行なった後、第3の試料溶液をバイオセンサ - 内から排除した。Can Get Signal Iは、反応効率を高めるために添加した。この工程により、スギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部及びヒトIgE抗体405捕捉部に存在するIgEに対し、抗体溶液中の抗IgE抗体クロ - ンNo. f0822が特異的に結合する。

10

【0066】

引き続き、第4の試料溶液を用い流路内の洗浄を行った。バイオセンサ - 内の壁面に残った第3の試料溶液の除去やスギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部及びヒトIgE抗体405捕捉部と非特異に結合した物質の除去を目的に実施した。この工程により、ノイズを低減することができる。洗浄剤としては、50 mM Tris - HCl（pH7.8）、0.45 M NaCl、0.1% Tween 20を添加したものをバイオセンサ - 内に展開させ使用した。1分間、ピペッティング方式による流路内攪拌を行なった後、洗浄剤をバイオセンサ - 内から排除した。

20

【0067】

次に、スギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部、ヒトIgE抗体405捕捉部に結合した抗IgE抗体及びビオチン化BSA406捕捉部に対し、標識酵素として、ストレプトアビジン標識ルシフェラ - ゼ（キッコ - マン株式会社製）を添加し、反応を行なった。1000×ストレプトアビジン標識ルシフェラ - ゼ6 μLに対し、ルシフェラ - ゼ希釈溶液（キッコ - マン株式会社製）54 μLを混合した第5の試料溶液をバイオセンサ - 内に展開させ反応させた。5分間、ピペッティング方式による流路内攪拌を行なった後、第5の試料溶液をバイオセンサ - 内から排除した。Can Get Signal Iは、反応効率を高めるために添加した。この工程により、スギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部、ヒトIgE抗体405捕捉部及びビオチン化BSA406捕捉部に存在するビオチン構造に対し、酵素溶液中のストレプトアビジンが特異的に結合する。

30

【0068】

引き続き、第6の試料溶液を用い流路内の洗浄を行った。バイオセンサ - 内の壁面に残った第5の試料溶液の除去やスギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部、IgE抗体捕捉部及びビオチン化BSA406捕捉部と非特異に結合した物質の除去を目的に実施した。この工程により、ノイズを低減することができる。洗浄剤としては、50 mM Tris - HCl（pH7.8）、0.45 M NaCl、0.1% Tween 20を添加したものをバイオセンサ - 内に展開させ使用した。1分間、ピペッティング方式による流路内攪拌を行なった後、洗浄剤をバイオセンサ - 内から排除した。

40

【0069】

次に、スギアレルゲン403捕捉部、抗IgE抗体f1974 404捕捉部、ヒトIgE抗体405捕捉部、ビオチン化BSA406捕捉部に結合したルシフェラ - ゼ及びルシフェラ - ゼ標識抗IgE抗体407補足部に対し、発光基質として、ルシフェリン、ATP、マグネシウムイオンが含まれたIntelite ABのルシフェラ - ゼ発光基質液（キッコ - マン株式会社製）を第7の試料溶液として添加し、発光反応を行なった。1

50

×ルシフェラ - ゼ発光基質液 60 μL をバイオセンサ - 内に展開させた。この工程により、スギアレルゲン 403 捕捉部、抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 捕捉部、ヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部、ビオチン化 B S A 4 0 6 捕捉部、ルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 4 0 7 補足部中のルシフェラ - ゼによる発光反応が起こる。

【 0 0 7 0 】

次に、発光量を測光した。第 7 の試料溶液をバイオセンサ - 内に展開後、速やかにバイオセンサ - の固定化面を C C D カメラと対向したステ - ジに固定し、発光量を 3 分間撮影し、C C D カメラの各画素の輝度の 3 分間の積算値をマッピングした測光画像を生成した。

【 0 0 7 1 】

そして、画像解析の工程で、バイオセンサ - 内の各スポットに対応する画素を特定し、その輝度値を測定値とした。

【 0 0 7 2 】

図 5 は、図 3 のフロ - チャ - トで説明したように測光の工程で出力された、各画素の輝度の 3 分間の積算値をマッピングした測光画像を示す図である。輝度値が大きいほど、白く表示されている。5 0 1 で示した破線は、注排液口付近の流路形状を示している。実際の測光画像では、流路部分は、確認できないが、ここでは分かり易くするために示している。5 0 2 がスギアレルゲン 4 0 3 捕捉部の発光スポットに相当し、5 0 3 が抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 捕捉部の発光スポットに相当し、5 0 4 がヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部の発光スポットに相当し、5 0 5 がビオチン化 B S A 4 0 6 捕捉部の発光スポットに相当し、5 0 6 がルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 4 0 7 補足部の発光スポットに相当する。

【 0 0 7 3 】

図 5 を見ると、5 0 3、5 0 4、5 0 5、5 0 6 において、発光が確認されることから、各工程における処理が正常に行なわれたことを示す。そのため、アレルギー - の測定ができる。

【 0 0 7 4 】

次に、5 0 2 から得られた輝度値を算出すると、1 4 9 2 5 1 4 であった。

【 0 0 7 5 】

ここで、スギ I g E 濃度既知の検体を使用し、スギアレルゲンのみを塗布したバイオセンサ - を使用して、検量線式を作成した。その結果得られた検量線式は、 $y = 2 5 2 7 6 X + 1 2 9 2 6 1$  であった。この検量線式にアレルゲン捕捉部から得られた輝度値 1 4 9 2 5 1 4 を入力し、血清中のスギ I g E 値を算出した。この数値を検量線式  $y = 2 5 2 7 6 X + 1 2 9 2 6 1$  に当てはめると、5 3 . 9 3 U I / m L と換算できた。これは、アレルギー - スコアの 0 ~ 7 で表示すると 5 であった。同様の血清を、検定機である D i a P a c k 2 0 0 0 (日本ケミファ株式会社製) で測定した際のアレルギー - スコアも同様に 5 であった。このことから、スコアの上で相関があることが確認できた。これは、正しく測定できたことを示す。

【 0 0 7 6 】

また、相関が得られたことから、抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 捕捉部、ヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部、ビオチン化 B S A 4 0 6 捕捉部、ルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 4 0 7 補足部がスギアレルゲン 4 0 3 捕捉部に対して、反応阻害物として作用していないことも確認できた。

【 実施例 2 】

【 0 0 7 7 】

故意に検体のみを添加せずに、実施例 1 と同様の工程を実施した。図 6 は、そのとき得られた測光画像を示す図である。輝度値が大きいほど、白く表示されている。6 0 1 で示した破線は、注排液口付近の流路形状を示している。実際の測光画像では、流路部分は、確認できないが、ここでは分かり易くするために示している。6 0 2 で示した丸の点線がスギアレルゲン 4 0 3 捕捉部の発光スポット位置に相当し、6 0 3 で示した丸の点線が抗

10

20

30

40

50

I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 捕捉部の発光スポット位置に相当する。丸の点線で示した部分は、目視レベルで輝度を確認できないが、捕捉位置に相当する箇所をわかり易くするために丸の点線で囲んである。6 0 4 がヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部の発光スポットに相当し、6 0 5 がビオチン化 B S A 4 0 6 捕捉部の発光スポットに相当し、6 0 6 がルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 4 0 7 補足部の発光スポットに相当する。

【 0 0 7 8 】

図 6 では、6 0 2 において輝度を確認できなかった。通常であれば、スギ I g E 抗体を保持しない検体として扱うが、6 0 3 において輝度が観察できない。一方、6 0 4 と、6 0 5 と、6 0 6 では輝度を確認できることから、検体が含まれていないと判定することができる。これにより、偽陰性が防止できた。

10

【 実施例 3 】

【 0 0 7 9 】

故意に抗 I g E 抗体 f 0 8 2 2 を含まない試料溶液で、実施例 1 と同様の工程を実施した。図 7 は、そのとき得られた測光画像を示す図である。輝度値が大きいほど、白く表示されている。7 0 1 で示した破線は、注排液口付近の流路形状を示している。実際の測光画像では、流路部分は、確認できないが、ここではわかり易くするために示している。7 0 2 で示した丸の点線がスギアレルゲン 4 0 3 捕捉部の発光スポット位置に相当し、7 0 3 で示した丸の点線が抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 捕捉部の発光スポット位置に相当し、7 0 4 で示した丸の点線がヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部の発光スポット位置に相当する。丸の点線で示した部分は、目視レベルで輝度を確認できないが、捕捉位置に相当する箇所をわかり易くするために丸の点線で囲んである。7 0 5 がビオチン化 B S A 4 0 6 捕捉部の発光スポットに相当し、7 0 6 がルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 4 0 7 補足部の発光スポットに相当する。

20

【 0 0 8 0 】

7 0 2、7 0 3 及び 7 0 4 において輝度を確認できない。一方、7 0 5 と、7 0 6 では輝度を確認できることから、試料溶液中に抗 I g E 抗体 f 0 8 2 2 が含まれていないと判定することができる。

【 実施例 4 】

【 0 0 8 1 】

故意にストレプトアビジン標識ルシフェラ - ゼを含まない試料溶液で実施例 1 と同様の工程を実施した。図 8 は、そのとき得られた測光画像を示す図である。輝度値が大きいほど、白く表示されている。8 0 1 で示した破線は、注排液口付近の流路形状を示している。実際の測光画像では、流路部分は、確認できないが、ここではわかり易くするために示している。8 0 2 で示した丸の点線がスギアレルゲン 4 0 3 捕捉部の発光スポット位置に相当し、8 0 3 で示した丸の点線が抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 捕捉部の発光スポット位置に相当し、8 0 4 で示した丸の点線がヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部の発光スポット位置に相当し、8 0 5 で示した丸の点線がビオチン化 B S A 4 0 6 捕捉部の発光スポットに相当する。丸の点線で示した部分は、目視レベルで輝度を確認できないが、捕捉位置に相当する箇所をわかり易くするために丸の点線で囲んである。8 0 6 がルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 4 0 7 補足部の発光スポットに相当する。

30

40

【 0 0 8 2 】

8 0 2、8 0 3、8 0 4 及び 8 0 5 において輝度を確認できない。一方、8 0 6 では輝度を確認できることから、試料溶液中にストレプトアビジン標識ルシフェラ - ゼが含まれていないと判定することができる。

【 実施例 5 】

【 0 0 8 3 】

故意に検出用試薬を含まない試料溶液で実施例 1 と同様の工程を実施した。図 9 は、そのとき得られた測光画像を示す図である。輝度値が大きいほど、白く表示されている。9 0 1 で示した破線は、注排液口付近の流路形状を示している。実際の測光画像では、流路部分は、確認できないが、ここではわかり易くするために示している。9 0 2 で示した丸

50

の点線がスギアレゲン403捕捉部の発光スポット位置に相当し、903で示した丸の点線が抗IgE抗体f1974 404捕捉部の発光スポット位置に相当し、904で示した丸の点線がヒトIgE抗体405捕捉部の発光スポット位置に相当し、905で示した丸の点線がビオチン化BSA406捕捉部の発光スポットに相当し、906がルシフェラ-ゼ標識抗IgE抗体407補足部の発光スポットに相当する。丸の点線で示した部分は、目視レベルで輝度を確認できないが、捕捉位置に相当する箇所をわかり易くするために丸の点線で囲んである。

【0084】

測光画像の何処からも輝度が得られないことから試料溶液中に検出用試薬が含まれていないと判定することができる。

10

【実施例6】

【0085】

実施例1と同様の工程を実施した。ただし、実施例1とは異なり、基準機によるスギIgEスコアが0の検体を使用した。図10は、そのとき得られた測光画像を示す図である。輝度値が大きいほど、白く表示されている。601で示した破線は、注排液口付近の流路形状を示している。実際の測光画像では、流路部分は、確認できないが、ここではわかり易くするために示している。602で示した丸の点線がスギアレゲン403捕捉部の発光スポット位置に相当する。丸の点線で示した部分は、目視レベルで輝度を確認できないが、捕捉位置に相当する箇所をわかり易くするために丸の点線で囲んである。603が抗IgE抗体f1974 404捕捉部の発光スポット位置に相当し、604がヒトIgE抗体405捕捉部の発光スポットに相当し、605がビオチン化BSA406捕捉部の発光スポットに相当し、606がルシフェラ-ゼ標識抗IgE抗体407補足部の発光スポットに相当する。

20

【0086】

602において輝度がほとんど確認できない。輝度値は、3856であった。一方、抗IgE抗体捕捉部では輝度を確認できる。このことから、正常に処理が行なわれたと判定することができるので、検量線式  $y = 25276X + 129261$  から  $0.153 \text{ UI/mL}$  と換算できた。これは、スコア表示で0に相当する。よって、本検体には、スギIgEに対するスコアが0の検体と判定することができる。以上の実施例1～6の結果より、正しく血清が注液されたかどうか判定できる。また、血清があっても測定が出来なかったとき、どこの工程が正常に実施できなかったか判定できる。

30

【産業上の利用可能性】

【0087】

本発明にかかるサンドイッチイムノアッセイ法及びそれを用いたバイオセンサ-は、検体が正しく添加されているかどうかを識別して偽陰性を識別する能力を有し、検体中の被検出物質をサンドイッチイムノアッセイ法により検出する検出装置およびそれを用いて検出する方法等として有用である。

【符号の説明】

【0088】

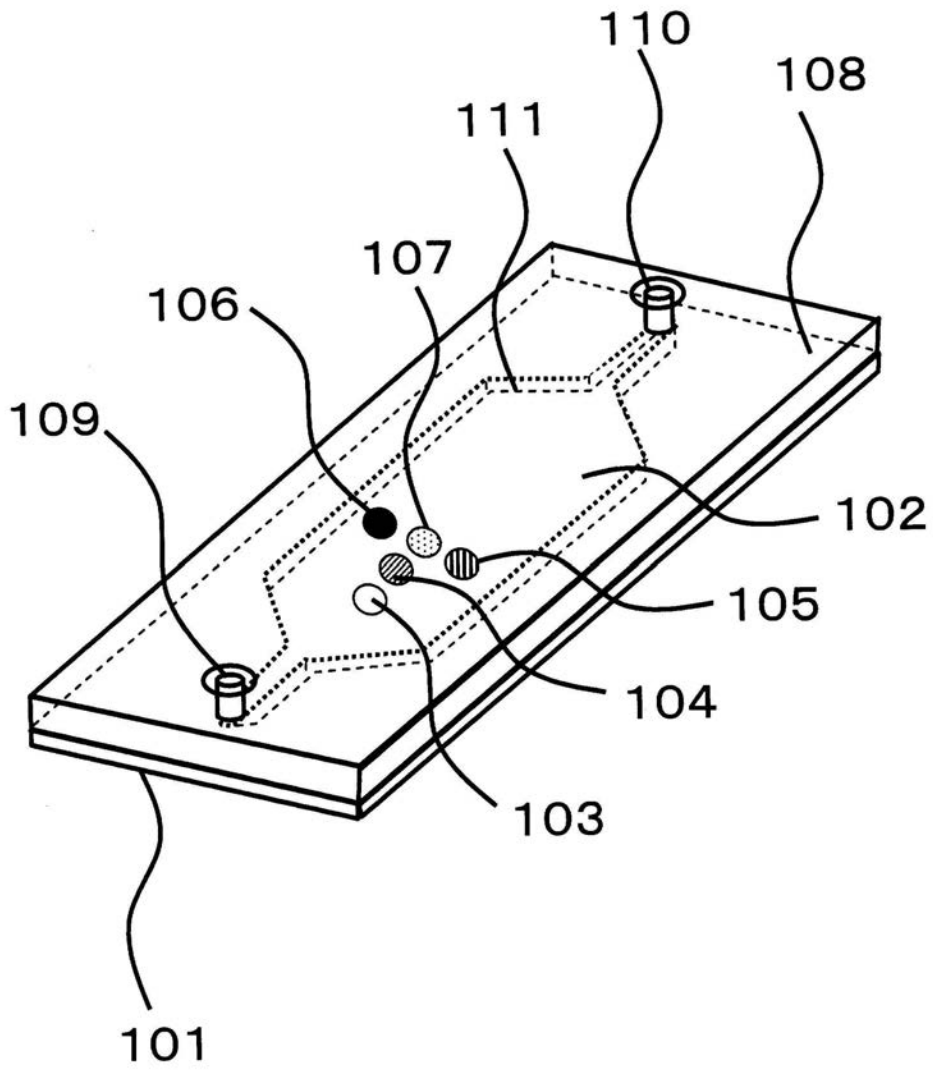
- 101、201 支持体
- 102、202 捕捉部領域
- 103、203 アレルゲン捕捉部
- 104、204 抗IgE抗体捕捉部
- 105、205 IgE抗体捕捉部
- 106、206 標識蛋白捕捉部
- 107、207 標識酵素捕捉部
- 108、208 上カバ-
- 109、209、409 注排水口
- 110、210、410 排気口

40

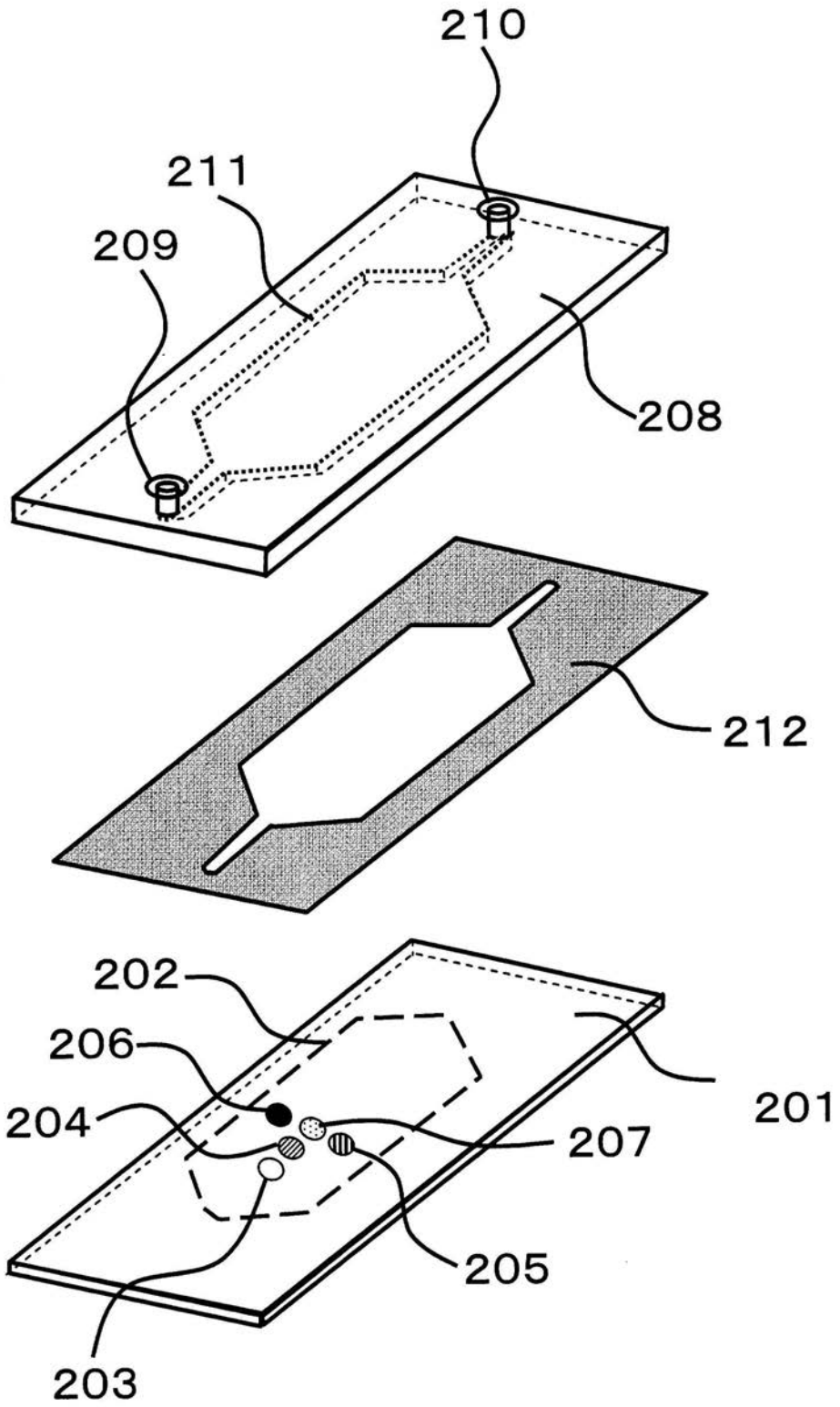
50

1 1 1、2 1 1、4 1 1	流路	
2 1 2、4 1 2	粘着シ - ト	
4 0 1	ガラス基板	
4 0 2	ニトロセルロ - ス	
4 0 3	スギアレルゲン	
4 0 4	抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4	
4 0 5	ヒト I g E 抗体	
4 0 6	ビオチン標識 B S A	
4 0 7	ルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体	
4 0 8	透明樹脂製上カバ -	10
5 0 1、6 0 1、7 0 1、8 0 1、9 0 1、1 0 0 1	注排液口付近の流路形状	
5 0 2、1 0 0 2	スギアレルゲン 4 0 3 捕捉部による発光スポット	
5 0 3、1 0 0 3	抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 による発光スポット	
5 0 4、6 0 4、1 0 0 4	ヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部による発光スポット	
5 0 5、6 0 5、7 0 5、1 0 0 5	ビオチン標識 B S A 4 0 6 捕捉部による発光スポット	
5 0 6、6 0 6、7 0 6、8 0 6、1 0 0 6	ルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 f 0 8	
2 2	4 0 7 捕捉部による発光スポット	
6 0 2、7 0 2、8 0 2、9 0 2	スギアレルゲン 4 0 3 捕捉部による発光スポット	
6 0 3、7 0 3、8 0 3、9 0 3	抗 I g E 抗体 f 1 9 7 4 4 0 4 による発光スポット	20
7 0 4、8 0 4、9 0 4	ヒト I g E 抗体 4 0 5 捕捉部による発光スポット	
8 0 5、9 0 5	ビオチン標識 B S A 4 0 6 捕捉部による発光スポット	
9 0 6	ルシフェラ - ゼ標識抗 I g E 抗体 f 0 8 2 2 4 0 7 捕捉部による発光スポット	
1 1 0 1	ニトロセルロ - スメンブレン	
1 1 0 2	捕捉試薬部	
1 1 0 3	対照部	
1 1 0 4	供給部	
1 1 0 5	吸水性担体	30
1 1 0 6	検体液の展開方向	
1 1 0 7	検体	
1 1 0 8	標識試薬	
1 1 0 9	検体液	

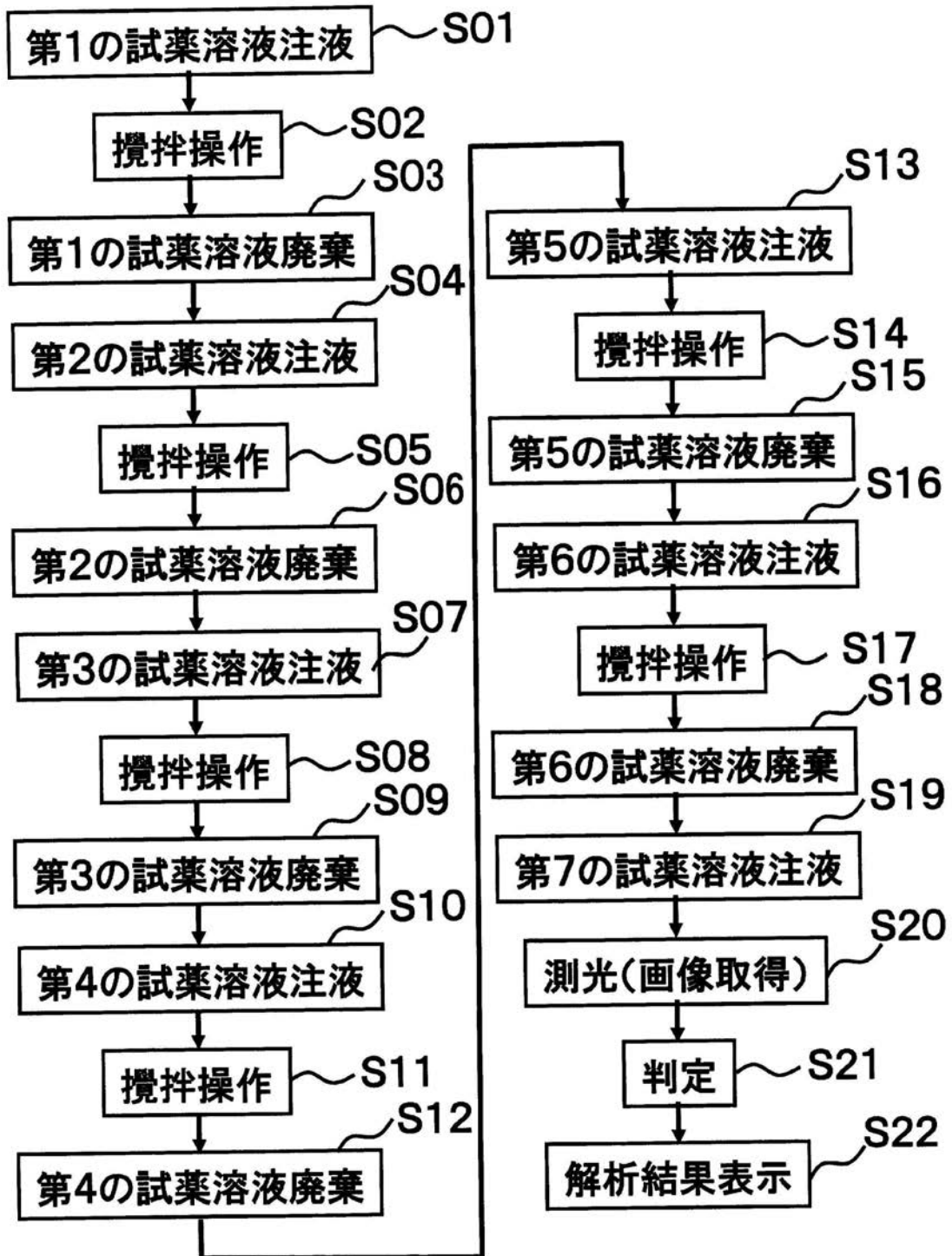
【図1】



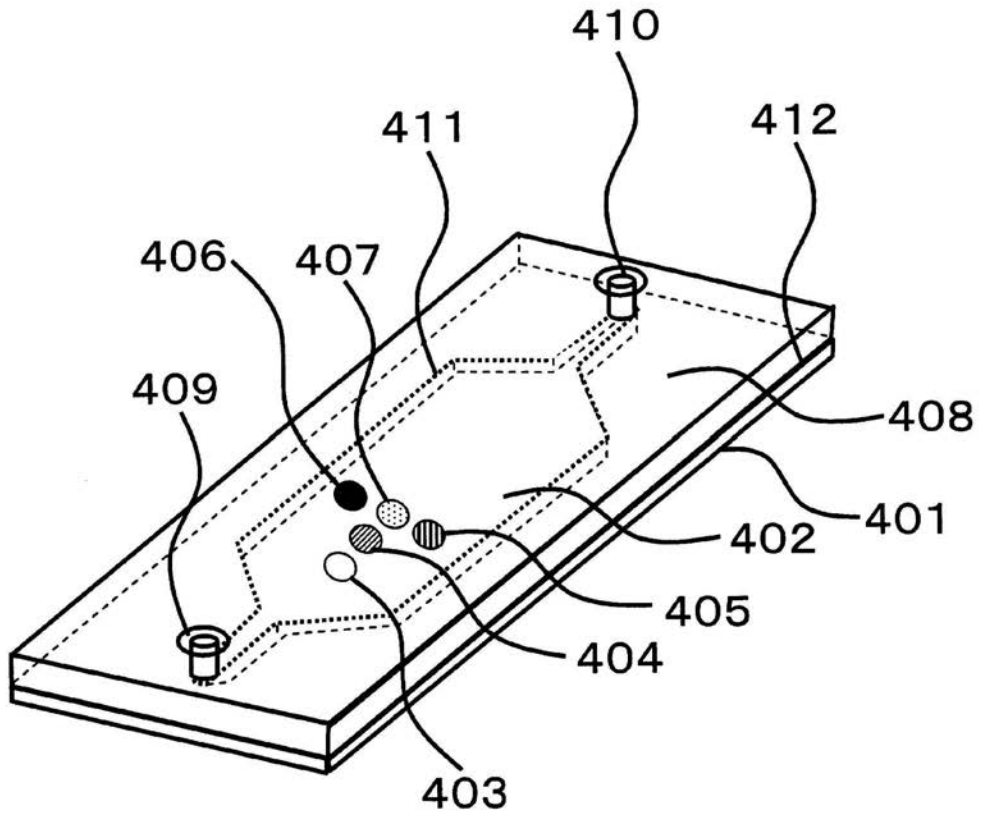
【図2】



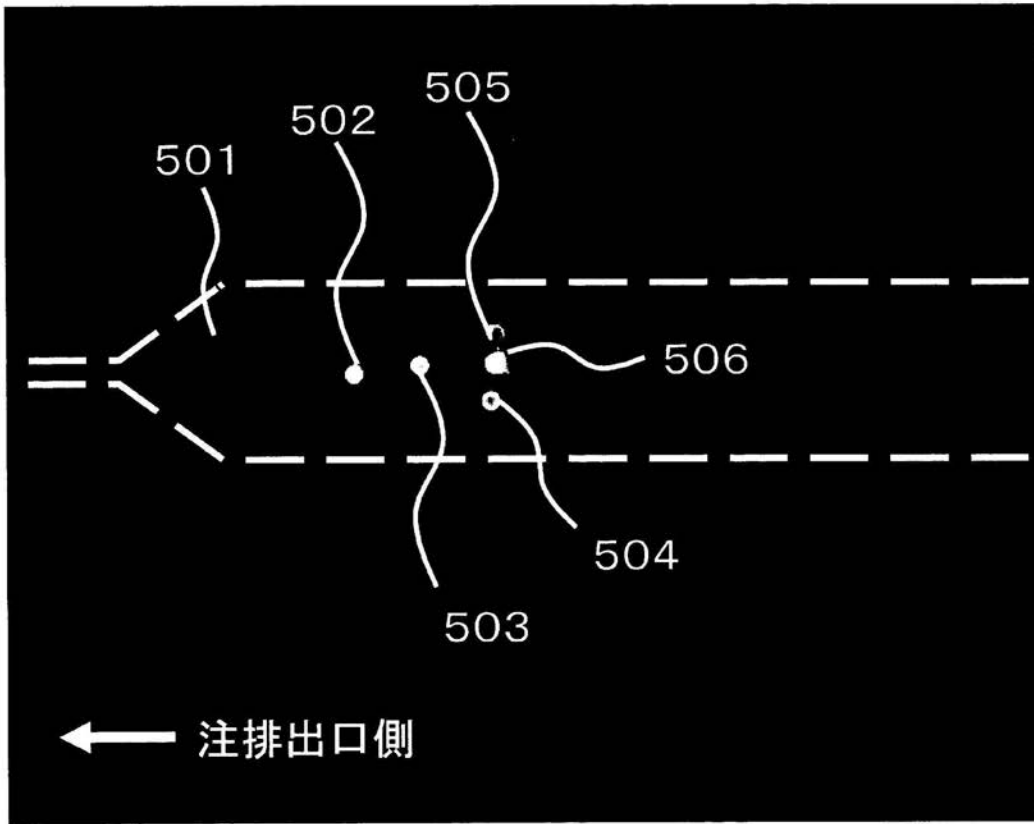
【図3】



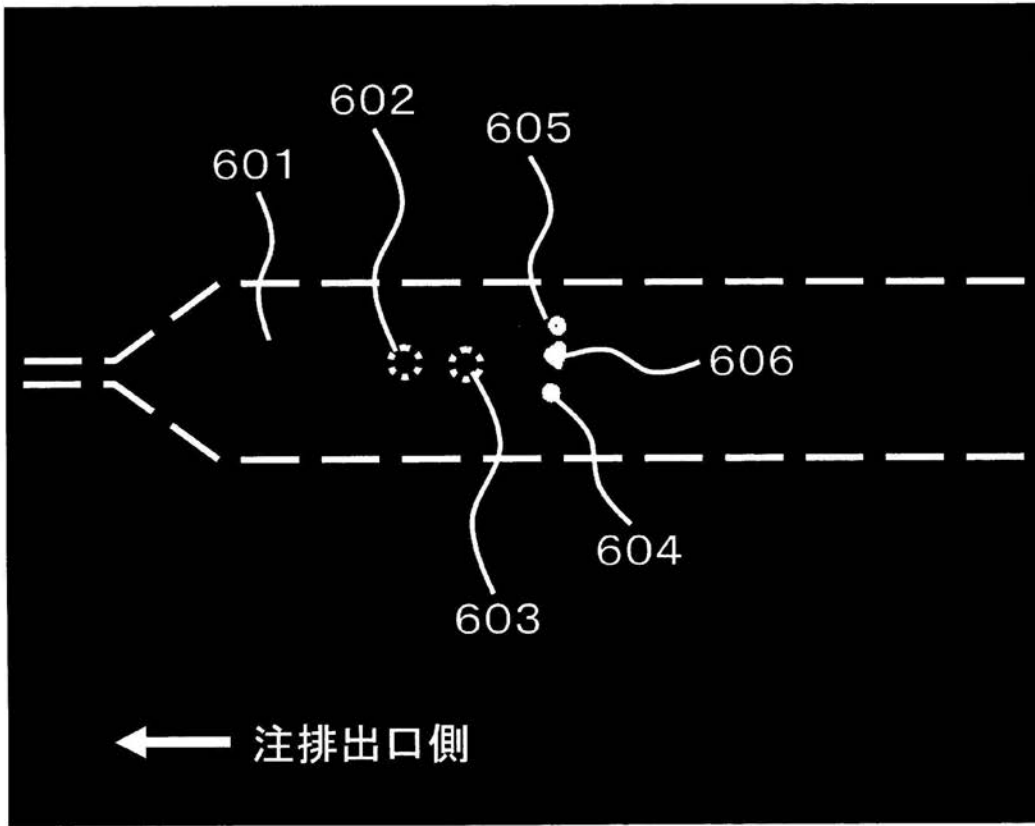
【 図 4 】



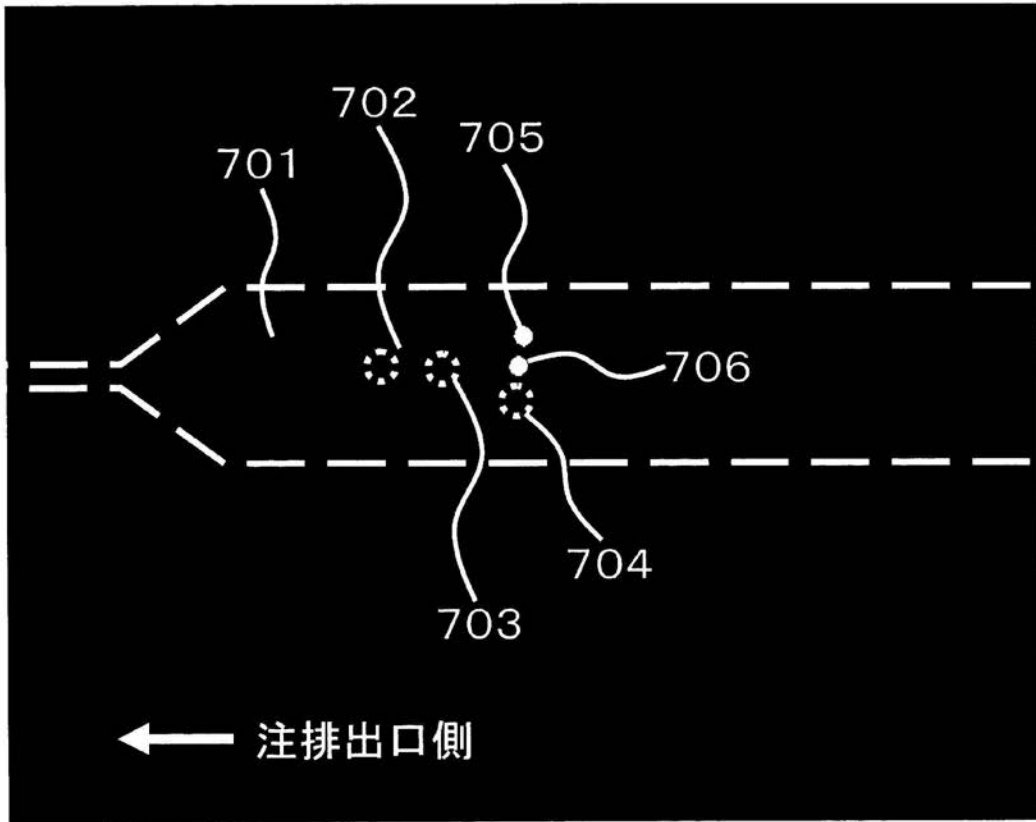
【 図 5 】



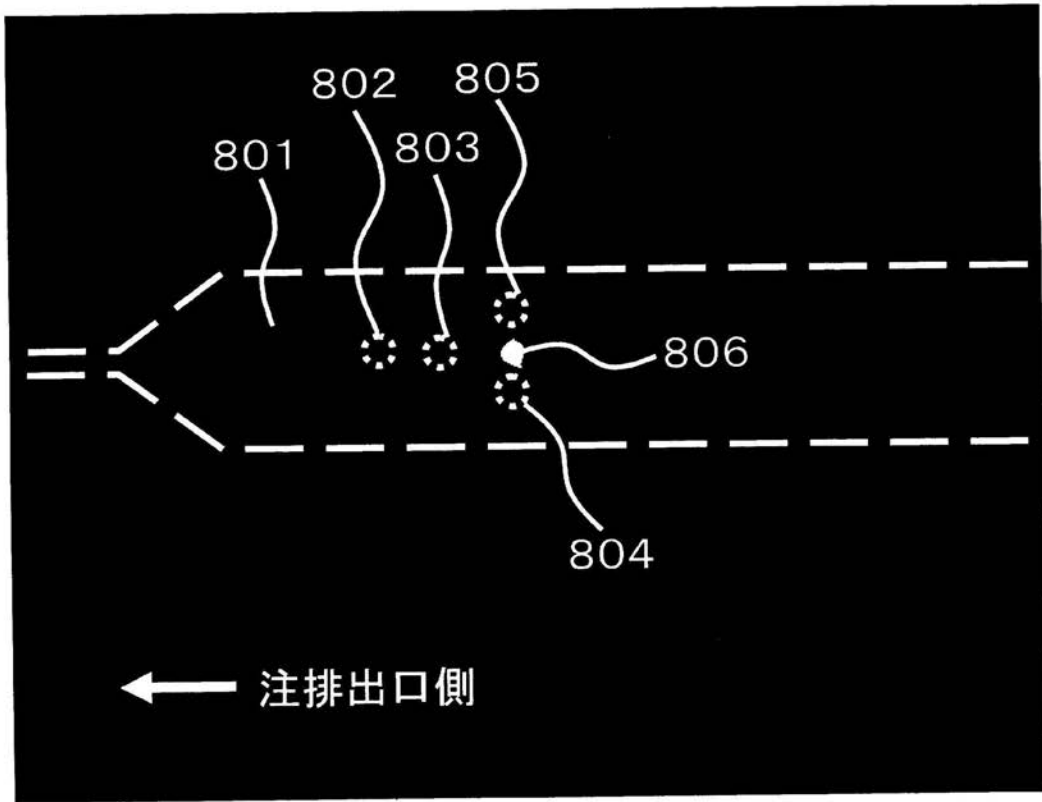
【 図 6 】



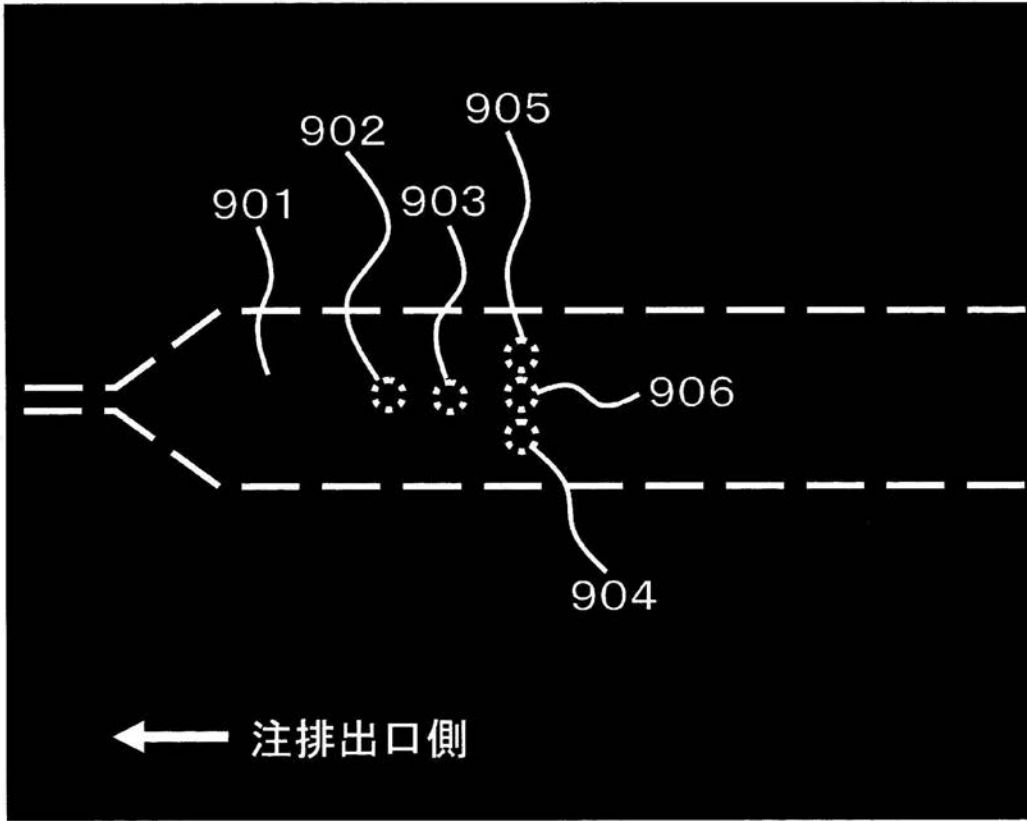
【 図 7 】



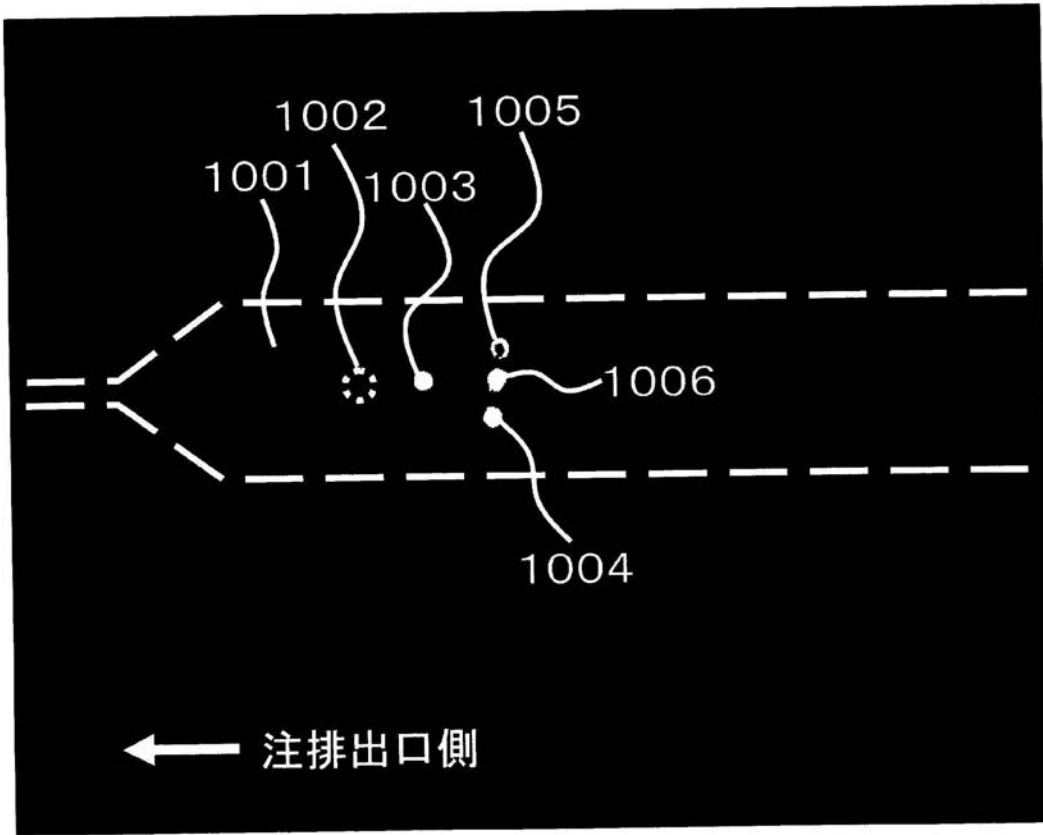
【 図 8 】



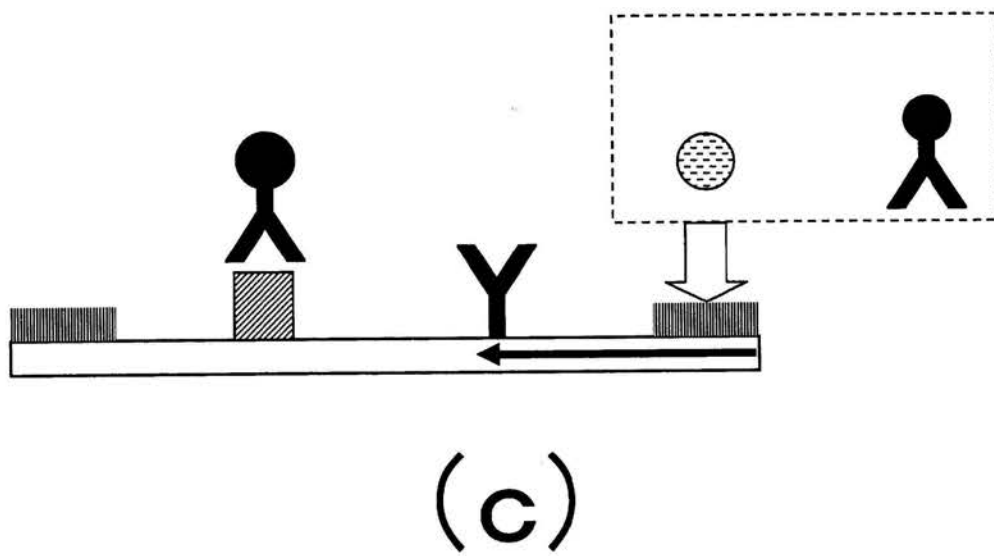
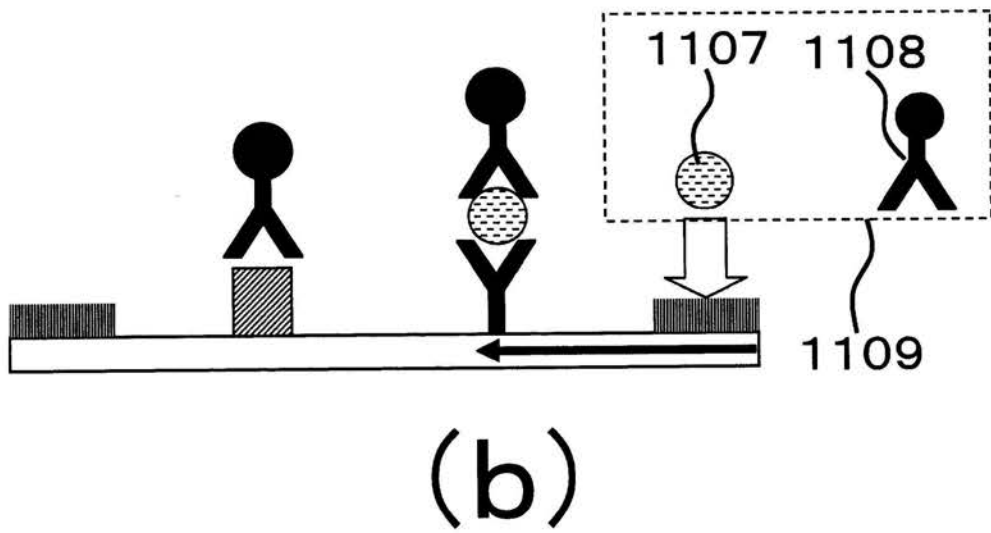
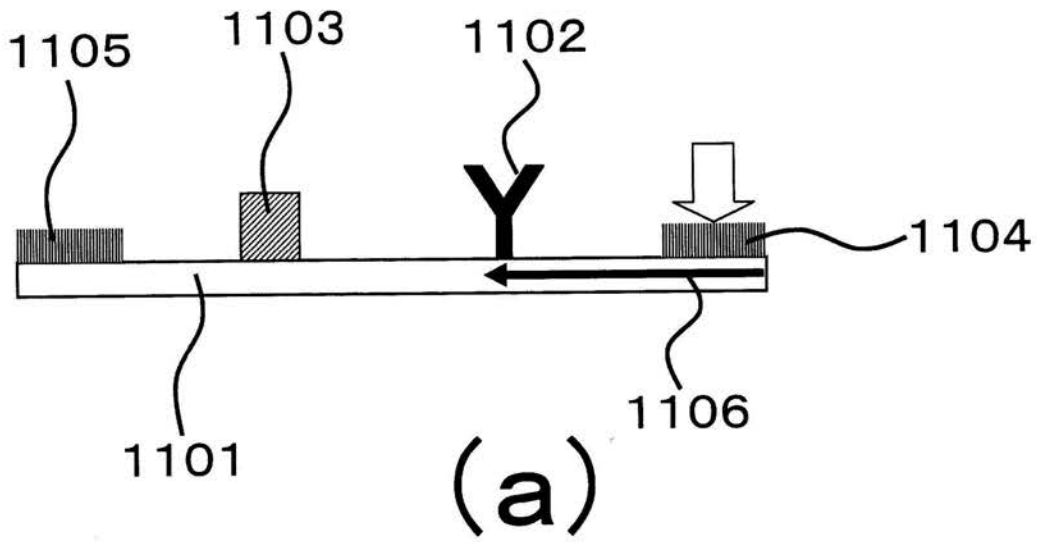
【 図 9 】



【図10】



【図 11】



专利名称(译)	夹心免疫测定方法和使用其的生物传感器 -		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012225726A</a>	公开(公告)日	2012-11-15
申请号	JP2011092703	申请日	2011-04-19
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	曾我部誠司		
发明人	曾我部 誠司		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 C12M1/34		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.N G01N33/53.Q G01N37/00.101 C12M1/34.F		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/FA12		
代理人(译)	内藤裕树 长野大辅 藤井 兼太郎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种夹心免疫测定方法，当医生在准备标本液时忽略错误设置标本时，能够确定假阴性，并使用夹心免疫测定法提供生物传感器。解决方案：在生物传感器中配置通过在支撑件上放置其上形成有凹槽的光学透明板，以在板和支撑件之间形成流动通道，形成注入/排出端口，用于在流动的一端连续地注入/排出包括样液的测量溶液在另一端形成通道并形成排气口，用于捕获测量溶液中包含的IgE抗体的抗IgE抗体捕获部分和用于捕获IgE抗体中的特异性IgE抗体的过敏原捕获部分排列在表面上。在流动通道中的液体注入/排出口侧与排出口之间的支撑。

