

(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2015-111095

(P2015-111095A)

(43) 公開日 平成27年6月18日(2015.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G 0 5 2
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
GO 1 N 1/38 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
	GO 1 N 33/543 5 4 5 B	
	GO 1 N 1/28 Y	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2014-147464 (P2014-147464)
 (22) 出願日 平成26年7月18日 (2014. 7. 18)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-227891 (P2013-227891)
 (32) 優先日 平成25年11月1日 (2013. 11. 1)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 307025159
 秋田エプソン株式会社
 秋田県湯沢市岩崎字壇ノ上1番地
 (74) 代理人 100095728
 弁理士 上柳 雅誉
 (74) 代理人 100116665
 弁理士 渡辺 和昭
 (72) 発明者 青木 太朗
 秋田県湯沢市岩崎字壇ノ上1番地 秋田エ
 プソン株式会社内
 Fターム(参考) 2G052 AA28 DA05 FB02 FB10 GA29

(54) 【発明の名称】 測定方法

(57) 【要約】

【課題】特定の生体組織に限定されないタンパク質を使用して免疫組織染色を容易に行う方法を提供する。

【解決手段】タンパク質の濃度測定方法は、基板面にタンパク質を付着させる付着工程と、酵素で標識した抗体を基板面に付着したタンパク質と結合させる結合工程と、基板面における抗体と発色基質とを反応させる発色反応工程と、発色基質による発色に基づいて基板面におけるタンパク質の濃度を測定する測定工程と、を有する。

【選択図】 図 1

工程	時間(min)	
1	検水円の捺印	1
2	抗体の固相	60
3	洗浄	1
4	ブロッキング	30
5	洗浄	1
6	一次抗体反応	60
7	洗浄	1
8	二次抗体反応	60
9	洗浄	1
10	発色反応	15
Total		230

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板の対象面にタンパク質を付着させる付着工程と、
 酵素で標識した抗体を前記対象面に付着した前記タンパク質と結合させる結合工程と、
 前記対象面における前記抗体と発色基質とを反応させる発色反応工程と、
 前記発色基質による発色に基づいて前記対象面における前記タンパク質の濃度を測定する測定工程と、を有することを特徴とする測定方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の測定方法において、
 前記抗体は前記対象面に定着されていることを特徴とする測定方法。

10

【請求項 3】

請求項 1 乃至 2 のいずれかに記載の測定方法において、
 前記タンパク質はアルブミンであることを特徴とする測定方法。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の測定方法において、
 前記付着工程で前記タンパク質を付着させる領域を前記基板の前記対象面に設定する設定工程を有することを特徴とする測定方法。

【請求項 5】

基板の対象面に第 1 の抗体を定着させる定着工程と、
 前記対象面に定着した前記第 1 の抗体にタンパク質を付着させる付着工程と、
 酵素で標識した第 2 の抗体を前記対象面に付着した前記タンパク質と結合させる結合工程と、
 前記対象面における前記第 2 の抗体と発色基質とを反応させる発色反応工程と、
 前記発色基質による発色に基づいて前記対象面における前記タンパク質の濃度を測定する測定工程と、を有することを特徴とする測定方法。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載の測定方法において、
 前記タンパク質はアルブミンであることを特徴とする測定方法。

【請求項 7】

前記付着工程、前記結合工程、前記発色反応工程のうち、少なくとも 1 つの工程では、
 電界攪拌法を用い、前記タンパク質と溶媒とを含む溶液を攪拌することを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の測定方法。

30

【請求項 8】

前記電界攪拌法は、互いに対向する、上電極と、前記溶液が液滴として滴下された基板が載置される下電極との間に電界を発生させ、前記電界によるクーロン力で前記液滴を攪拌する方法であって、
 前記第 1 の抗体または前記第 2 の抗体が前記液滴中でマイナスに帯電している場合、
 前記下電極に印加される電位の極性をマイナスとすることを特徴とする請求項 7 に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体組織内の特定タンパク質の発現や局在を明らかにすべく、特定タンパク質などの分子を認識して結合する抗体を用いて、組織標本中の抗原を検出する手法である免疫組織染色法が知られている。また、試料中に含まれる抗体や抗原の濃度を検出・定量する方法として、固相酵素免疫検定法（ELISA：Enzyme Linked Immuno Solvent Assay）が知られている。

50

このような免疫組織染色法では、特異性の高い抗体を用いて特定タンパク質を検出するために、非常に高精度な診断を行うことができるが、対象とする組織の抽出から、標本への固定、洗浄、ブロッキング、一次抗体による抗原抗体反応、二次抗体による抗原抗体反応、発色液による発色等の一連の工程に多くの時間を所要する。従って、下記特許文献1に示すように、試料の攪拌を効率的に行うことで抗原の検出に所要する時間の短縮を図り、手術中における病理判断を可能にすべく迅速な手法に関して種々の技術開発が行われている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

10

【特許文献1】特開2012-13598号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、抗原検出の迅速化を図るための技術を開発する場合、試料としてヒト等の生体組織を使う必要があるが、そのような生体組織を扱うに当たっての必要な資格や、生体組織を確保するために要する高額なコスト等の制約条件が多く、開発した技術の効果を容易に検証することは困難であった。

本発明は、上述の課題に鑑みてなされたものであり、特定の生体組織に限定されないタンパク質を使用して免疫組織染色を容易に行うことを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、上述の課題の少なくとも一部を解決するためになされたものであり、以下の形態又は適用例として実現することが可能である。

【0006】

[適用例1]

本適用例にかかる測定方法は、基板の対象面にタンパク質を付着させる付着工程と、酵素で標識した抗体を前記対象面に付着した前記タンパク質と結合させる結合工程と、前記対象面における前記抗体と発色基質とを反応させる発色反応工程と、前記発色基質による発色に基づいて前記対象面における前記タンパク質の濃度を測定する測定工程と、を有することを特徴とする。

30

【0007】

このような方法によれば、対象面に付着させたタンパク質と、酵素で標識した抗体と、を結合させ、発色基質を接触させて反応（発色）させた後、発色に基づいて対象面におけるタンパク質の濃度を測定することで、タンパク質に対する免疫組織染色を容易に行うことができる。

【0008】

[適用例2]

上記適用例にかかる測定方法において、前記抗体は前記対象面に定着されていることを特徴とする。

40

【0009】

[適用例3]

上記適用例にかかる測定方法において、前記タンパク質はアルブミンであっても良い。

【0010】

[適用例4]

上記適用例にかかる測定方法において、前記付着工程で前記タンパク質を付着させる領域を前記基板の前記対象面に設定する設定工程を有することが好ましい。

【0011】

このような方法によれば、タンパク質を付着させる基板の領域を適切に設定できる。

【0012】

50

[適用例 5]

本適用例にかかる測定方法は、基板の対象面に第 1 の抗体を定着させる定着工程と、前記対象面に定着した前記第 1 の抗体にタンパク質を付着させる付着工程と、酵素で標識した第 2 の抗体を前記対象面に付着した前記タンパク質と結合させる結合工程と、前記対象面における前記第 2 の抗体と発色基質とを反応させる発色反応工程と、前記発色基質による発色に基づいて前記対象面における前記タンパク質の濃度を測定する測定工程と、を有することを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

このような方法によれば、対象面に付着させたタンパク質と、酵素で標識した抗体と、を結合させ、発色基質を接触させて反応（発色）させた後、発色に基づいて対象面におけるタンパク質の濃度を測定することで、タンパク質に対する免疫組織染色を容易に行うことができる。

10

【 0 0 1 4 】

[適用例 6]

上記適用例にかかる測定方法において、前記タンパク質はアルブミンであっても良い。

【 0 0 1 5 】

[適用例 7]

上記適用例にかかる測定方法において、前記付着工程、前記結合工程、前記発色反応工程のうち、少なくとも 1 つの工程では、電界攪拌法を用い、前記タンパク質と溶媒とを含む溶液を攪拌することが好ましい。

20

【 0 0 1 6 】

このような方法によれば、反応のために上記溶液を放置する静置法に比べて、電界攪拌法を用いることにより、反応時間を短縮することができる。

【 0 0 1 7 】

[適用例 8]

上記適用例にかかる測定方法において、前記電界攪拌法は、互いに対向する、上電極と、前記溶液が液滴として滴下された基板が載置される下電極との間に電界を発生させ、前記電界によるクーロン力で前記液滴を攪拌する方法であって、前記第 1 の抗体または前記第 2 の抗体が前記液滴中でマイナスに帯電している場合、前記下電極に印加される電位の極性をマイナスとすることが好ましい。

30

【 0 0 1 8 】

このような方法によれば、第 1 の抗体または第 2 の抗体と下電極との間に斥力が働くので、引力が働いた場合に比べて非特異的な反応が起こり難くなるため、より適正な染色あるいは発色の結果が得られる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 9 】

【 図 1 】 本発明の実施形態 1 に係る抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図。

【 図 2 】 撥水円の捺印工程を説明する図。

【 図 3 】 サンドイッチ法による抗原抗体反応を説明する図。

【 図 4 】 実施形態 1 における発色の濃度と吸光度の関係を示す図。

40

【 図 5 】 実施形態 1 におけるアルブミン濃度に応じた発色の違いを示す図。

【 図 6 】 サンドイッチ法と直接法の違いを説明する図。

【 図 7 】 実施形態 2 に係る抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図。

【 図 8 】 直接法による抗原抗体反応を説明する図。

【 図 9 】 実施形態 2 における発色の濃度と吸光度の関係を示す図。

【 図 1 0 】 実施形態 2 におけるアルブミン濃度に応じた発色の違いを示す図。

【 図 1 1 】 実施形態 3 における抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図。

【 図 1 2 】 実施形態 3 におけるアルブミン濃度に応じた発色の違いを示す図。

【 図 1 3 】 実施形態 3 における発色の濃度と吸光度の関係を示す図。

【 図 1 4 】 実施形態 4 に係る電界攪拌装置の機械的及び電気的な構成を示すブロック図。

50

【図 15】(a) ~ (c) は実施形態 4 に係る電界攪拌法を説明する図。

【図 16】実施形態 4 における抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図。

【図 17】実施形態 4 における静置法および電界攪拌法での発色の違いを示す図。

【図 18】実施形態 4 における静置法および電界攪拌法での発色の濃度の違いを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明の実施形態について図面を参照して説明する。

【0021】

(実施形態 1)

図 1 は、本実施形態 1 に係る抗原抗体反応を検出する方法（測定方法）の工程を示す図である。本実施形態 1 では、ELISA の一方法であるスライドガラスを用いたサンドイッチ法を採用する。尚、サンドイッチ法は、同一タンパク質を捕獲抗体と一次抗体の 2 種類の抗体を用いて検出するため、夾雑物からどれだけ正確に区別できるかを示す特異性を高くできることが知られている。

図 1 に示すように、最初に、撥水円 300 の捺印工程（設定工程）を実行する。撥水円 300 の捺印工程は、図 2 に示すように、実験者が撥水性ペン 100 を使用し、通常のガラス製のスライドガラスのような親水性基板 200 の一方の面（対象面）に対して適切な大きさの撥水円 300（例えば、直径 20 mm）を定める。尚、撥水円 300 の捺印工程の所要時間は 1 分程度である。

次に、抗体の固相工程を実行する。尚、以降の工程については図 3 も参照して説明する。抗体の固相工程は、図 3 における抗体定着工程に相当する。本実施形態 1 では 60 分の静置を行う。本実施形態 1 において、定着させる抗体（捕獲抗体）は、抗ウシ血清アルブミン抗体（IgG）を採用している。

【0022】

次に、1 分の洗浄工程を実行した後、ブロッキング工程を実行する。ブロッキング工程は、非特異的な結合を阻止するために有益であり、例えば、血清やスキムミルク、ゼラチン等を採用できる。本実施形態 1 では 30 分の静置を行う。

次に、1 分の洗浄工程を実行した後、一次抗体反応工程（定着工程）を実行する。本実施形態 1 では、抗原としてタンパク質であるアルブミン濃度を 0 ~ 800 ng/ml（ミリリットル）に調整したものを採用する。アルブミンは牛等の脊椎動物の血液に含まれる血清アルブミンを採用したが、アルブミンには限定されない。例えば、炎症サイトカインやインシュリンも採用できる。

また、一次抗体（第 1 の抗体）として、例えば、抗原に特異的に結合する抗体を採用できる。尚、アルブミン濃度に応じて、後述する発色反応における発色濃度を調整できる。本実施形態 1 では 60 分の静置を行う。尚、一次抗体反応工程は、図 3 における抗原抗体（一次抗体）反応に相当する。この一次抗体反応工程により、固相表面には、固相 捕獲抗体 抗原 一次抗体の複合体が形成される。

【0023】

次に、1 分の洗浄工程を実行し、一次抗体反応工程で非反応の抗原や一次抗体を除去する。

次に、酵素で標識済みの二次抗体（第 2 の抗体）を作用させるべく二次抗体反応工程（結合工程）を実行する。二次抗体としては、例えば、酵素を標識した抗原に特異的に結合する抗体（酵素としてはペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等）を採用できる。本実施形態 1 では、二次抗体反応工程において 60 分の静置を行う。尚、二次抗体反応工程は、図 3 における抗原抗体（二次抗体）反応に相当する。

次に、1 分の洗浄工程を実行し、余分な二次抗体を除去した後、発色反応工程（接触工程）を実行する。本実施形態 1 では、図 3 に示すように、例えば、TMB（酵素が、アルカリフォスファターゼであれば NBT）のような発色基質を含む発色試薬を滴下して、二次抗体と TMB とを反応（発色）させた後、例えば、0.18 M・H₂SO₄ のような反応停止液を滴下する。滴下量は何れも 120 μl（マイクロリットル）である。本実施形態

10

20

30

40

50

1では発色反応工程の所要時間は15分程度である。

以上の一連の工程を実行するのに230分を所要する。尚、発色状況は顕微鏡等により目視で観察する(測定工程)。図4は本実施形態1における発色の濃度と吸光度の関係を示し、図5はアルブミン濃度に応じた発色の違いを示す写真である。図4および図5より、アルブミン濃度が高くなるに従い、吸光度も上昇し発色の強度が変化していることから、アルブミンを使用したサンドイッチ法によるELISAの有効性を確認できる。

【0024】

なお、図4における吸光度は、TMB(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine)の吸収波長450nmにおける吸光度であり、以下の数式で与えられる。

$$\text{吸光度 (Abs 450)} = \log(I_0 / I)$$

I_0 は入射光の強度、 I は透過光の強度である。つまり透過率の逆数の対数が吸光度である。以降、発色基質としてTMBを用いた場合の吸光度はAbs 450と表記する。

【0025】

以上述べた実施形態1によれば、以下のような効果を奏する。

(1)アルブミンは取り扱うための資格が不要であって、生体組織として低コストのタンパク質であることから、このアルブミンを使用して抗原検出反応を行うことで、抗原検出反応の迅速化を目指す技術開発の検証が容易になり、医療の発展に寄与できる。

(2)撥水円300の大きさは実験者が適宜設定できるため、反応に使用する溶液量に対して制限が生じることを回避できる。

(3)スライドガラスは親水性を有する普通のガラス基板を使用できるため、従来のような高価なたんぱく質マイクロアレイや、培養細胞が予め貼り付けられたスライドガラスを使用する場合と比較して安価に実験できる。

【0026】

(実施形態2)

次に、本発明の実施形態2について、図6~図10を参照して説明する。尚、以下の説明では、既に説明した部分と同じ部分については、同一名称を付してその説明を省略する。

実施形態1では、ELISAのサンドイッチ法を採用したが、本実施形態2ではスライドガラスを用いた直接法を採用する。

図6は、サンドイッチ法と直接法の違いを説明する図である。サンドイッチ法では、一次抗体反応工程により複合体を形成し、形成した複合体と二次抗体とで二次抗体反応工程を実行したが、直接法では、抗原に対して二次抗体を直接に作用させる。従って、一次抗体反応工程を省くことから、サンドイッチ法と比較して所要時間を短縮できることが知られている。

図7は、スライドガラスを用いた直接法により抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図である。また、工程を図示した図8も適宜参照する。

【0027】

最初に、撥水円300の捺印工程を実行する。撥水円300の捺印工程は、実施形態1と同様に、親水性基板200に対して撥水性ペン100で直径20mmの撥水円300を定める。尚、撥水円300の捺印工程の所要時間は1分程度である。

次に、抗原の固相工程を実行する。抗原の固相工程は、図8における抗原定着工程(付着工程)に相当する。本実施形態2では、抗原としてアルブミンを採用し、アルブミンを撥水円300に付着させた後、60分の静置を行う。

次に、1分の洗浄工程を実行した後、ブロッキング工程を実行する。本実施形態2では30分の静置を行う。

次に、1分の洗浄工程を実行した後、抗原としてタンパク質であるアルブミン濃度を0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したものを、酵素で標識した二次抗体に作用させるべく二次抗体反応工程(結合工程)を実行する。本実施形態2では、二次抗体反応工程において60分の静置を行う。尚、二次抗体反応工程は、図8における抗原抗体反応に相当する。

【0028】

10

20

30

40

50

次に、1分の洗浄工程を実行し、余分な二次抗体を除去した後、発色反応工程を実行する。本実施形態2では、図8に示すように、発色試薬を滴下して発色させた後、反応停止液を滴下する。滴下量は何れも120 μ lである。本実施形態2では発色反応工程の所要時間は15分程度である。

以上の一連の工程を実行するのに169分を要し、サンドイッチ法と比較して所要時間が61分短縮できる。尚、発色状況は顕微鏡等により目視で観察できる。図9は本実施形態2における発色の濃度と吸光度の関係を示し、図10はアルブミン濃度に応じた発色の違いを示す写真である。図9および図10より、アルブミン濃度が高くなるに従い、吸光度も上昇し発色の強度が変化していることから、アルブミンを使用した直接法によるELISAの有効性を確認できる。

10

【0029】

以上述べた実施形態2は実施形態1で述べた効果と同様な効果を奏することに加え、抗原抗体反応の所要時間を短縮させることができる。

【0030】

(実施形態3)

次に、本発明の実施形態3について、図11~図13を参照して説明する。

実施形態2ではスライドガラスを用いた直接法を採用し、抗体の固相工程および二次抗体反応工程において60分の静置を行ったが、本実施形態3では、それぞれの静置時間を短縮した。

図11は、実施形態3におけるスライドガラスを用いた直接法により抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図である。尚、図11においては、撥水円300の捺印工程を略したが、実施形態2と同様に実行する。

20

撥水円300の捺印工程の後、図11に示すように、抗原の固相工程を実行する。本実施形態3では30分の静置を行う。

次に、1分の洗浄工程を実行した後、ブロッキング工程を実行する。本実施形態3では30分の静置を行う。

【0031】

次に、1分の洗浄工程を実行した後、抗原としてタンパク質であるアルブミン濃度を0~200 μ g/mlに調整したものを二次抗体に作用させるべく二次抗体反応工程を実行する。本実施形態3では、二次抗体反応工程において30分の静置を行う。

30

次に、1分の洗浄工程を実行し、余分な二次抗体を除去した後、発色反応工程を実行する。発色反応工程では、発色試薬を滴下して発色させた後、反応停止液を滴下する。滴下量は何れも120 μ lである。本実施形態3では発色反応工程の所要時間は15分程度である。

以上の一連の工程を実行するのに108分を要し、実施形態2と比較して所要時間が略60分短縮できる。尚、発色状況は顕微鏡等により目視で観察できる。図12はアルブミン濃度に応じた発色の違いを示す写真であり、図13は本実施形態3における発色の濃度と吸光度の関係を示す。図12および図13より、アルブミン濃度が高くなるに従い、吸光度も上昇し発色の強度が変化していることから、アルブミンを使用して所要時間を短縮した直接法によるELISAの有効性を確認できる。

40

【0032】

以上述べた実施形態3は実施形態1で述べた効果と同様な効果を奏することに加え、抗原抗体反応の所要時間を実施形態2よりも更に短縮させることができる。

【0033】

(実施形態4)

次に、本発明の実施形態4について、図14~図18を参照して説明する。実施形態1~実施形態3では、二次抗体反応工程において静置する静置法を採用したが、本実施形態4では、電界攪拌法を採用する。

図14は実施形態に係る電界攪拌装置の機械的及び電気的な構成を示すブロック図である。図14に示すように、電界攪拌装置1は、下電極10と、上電極20と、下電極10

50

を上下方向に昇降させる昇降機構 50 と、支持部 30 を介して上電極 20 を前後方向に移動させる移動機構 60 と、下電極 10 と上電極 20 とに電氣的に接続され、電界を生じさせるための電圧を生成する電源装置 40 と、これらの構成を統括的に制御する制御部 70 と、を備えている。

【0034】

下電極 10 の上面（電極面）には、基板 W が載置される。基板 W は、絶縁性の材料からなり、例えばガラス基板やプラスチック基板を用いることができる。本実施形態では、ELISA で電界攪拌装置 1 を用いる例を示すことから、基板 W は顕微鏡用スライドガラスが用いられている。基板 W には試薬などの液体が滴下される。以降、基板 W に滴下された少量の液体を液滴 S と呼ぶ。

10

【0035】

昇降機構 50 は、例えば、下電極 10 を下方から支持するシリンダーと、シリンダーに取り付けられたボールネジと、ボールネジを回転させるステップモーターとを含んで構成される。

【0036】

移動機構 60 は、例えば、支持部 30 に対して前後方向に取り付けられたシリンダーと、シリンダーに取り付けられたボールネジと、ボールネジを回転させるステップモーターとを含んで構成される。

【0037】

電源装置 40 は、例えば、周波数を可変可能であって、交流電圧を発生する電圧発生部と、電圧発生部で発生した交流電圧を所望の電位に昇圧する昇圧部とを含んで構成される。

20

【0038】

制御部 70 は、演算部 71 と、記憶部 72 とを含んで構成される。演算部 71 は、例えば CPU や MPU などの小型演算回路である。記憶部 72 は、例えば ROM や RAM などであり、制御プログラムやデータテーブルを記憶したり、制御プログラムを展開するための記憶領域を提供したりする。制御部 70 は、記憶部 72 に記憶された制御プログラムを演算部 71 が実行することによって、電界攪拌装置 1 の各構成要素（電源装置 40、昇降機構 50、移動機構 60 など）を制御する。

【0039】

次に、図 15 を参照して、電界攪拌装置 1 を用いた電界攪拌法について説明する。図 15 は実施形態 4 に係る電界攪拌法を説明する図である。

30

【0040】

図 15 (a) に示すように、撥水処理が施された基板 W 上に試薬などの液体を滴下して液滴 S を形成すると、液滴 S は基板 W 上において盛り上がる。盛り上がった液滴 S の基板 W 上における高さ h は、主に、液滴 S の容量と、液滴 S の粘度と、液滴 S の表面張力と、液滴 S が接している基板 W の表面の界面張力とにより決定される。特に、液滴 S の粘度は、温度に依存するので、作業環境における温度管理は重要なファクターとなる。一方で試薬などの液体は少量の滴下や攪拌、化学反応などの用法を考慮して、一般的には低粘度（例えば 5 cps 以下）の状態となっている。液滴 S の粘度が高い場合には、粘度を低下させるために液滴 S を加温する例えばヒーターなどを基板 W が載置される下電極 10 を含む構造体に組み込むようにすればよい。

40

【0041】

なお、基板 W に滴下される液滴 S の容量は、検体の大きさや試薬の濃度などによるが、一般的には 50 μ l（マイクロリットル）～ 600 μ l である。

【0042】

次に、液滴 S が形成された基板 W を下電極 10 上に載置する。あるいは、下電極 10 上に基板 W を載置した後に試薬を滴下し液滴 S を形成してもよい。このとき、下電極 10 は上下方向における原点位置にある。原点位置は、電界攪拌装置 1 に通電して、電源スイッチを入れる（ON にする）と、制御部 70 が昇降機構 50 を駆動させて原点位置を確認し

50

、毎回リセットする制御プログラムが採用されている。

【0043】

次に、制御部70は、移動機構60を駆動させ、前後方向において上電極20を後退していた位置から、下電極10と対向する位置に移動させる。下電極10と上電極20とが所定の位置で対向すると、制御部70は昇降機構50を駆動させ、上下方向において互いに対向する電極面の距離が所定の距離D1となるように、下電極10を上電極20に向かって上昇させる。

【0044】

次に、所定の距離D1で対向配置された下電極10と上電極20とに電源装置40からそれぞれ電位を与えて交流電界を生じさせる。図15(b)に示すように、交流電界によって液滴Sの頂部が引き上げられる方向にクーロン力が働くと、液滴Sは変形して高さが増大する。また、交流電界によって液滴Sの頂部が引き上げられる方向のクーロン力が働かなくなる、あるいは液滴Sの頂部が引き下げられる方向にクーロン力が働くと、図15(c)に示すように、液滴Sは初期の盛り上がった状態から潰れた状態となり、液滴Sの高さは減少する。このようにして液滴Sを変形(振動)させることにより液滴Sを攪拌する。電界攪拌装置1を用いる電界攪拌法は、少量の液滴Sを非接触で攪拌することが可能である。

10

【0045】

下電極10と上電極20との間の所定の距離D1は、攪拌によって変化する液滴Sの高さの変化量hを考慮する必要がある。液滴Sが上述したクーロン力によって変形して液滴Sの頂部が上電極20に触れると、攪拌が阻害される。攪拌を効果的に行うには、液滴Sの高さの変化量hを最大化することが好ましいが、変化量hを最大化すると、液滴Sが上電極20に触れないように、上記所定の距離D1を大きくする必要がある。上記所定の距離D1を大きくすることは、下電極10と上電極20との間に生じさせる電界の強さが小さくなる方向に働く。電界の強さが小さくなることはクーロン力が小さくなることに他ならない。クーロン力が小さくなれば液滴Sの変化量hが小さくなる方向に働いてしまう。また、前述したように、液滴Sの初期的な高さhは、主に液滴Sの容量と、表面張力とにより影響を受けることから、試薬などの液体の種類や液滴Sの容量に応じて、予め攪拌試験を行って好ましい攪拌条件を選定しておく。攪拌条件としては、電極間距離、電極間に与える電圧、交流電界(交流電圧)の周波数などが挙げられる。試薬などの液体の種類や液滴Sの容量に応じた攪拌条件は、データテーブルとして制御部70の記憶部72に格納される。

20

30

尚、電界攪拌法は、例えば、特開2010-119388号公報に記載されているように、液滴Sに交流電界を印加して液滴Sを振動させることにより抗原抗体反応を加速させる方法であり、抗原抗体反応の所要時間を短縮する効果があることが知られている。

図16は、電界攪拌法の効果を確認すべく、スライドグラスを用いた直接法による静置法により抗原抗体反応を検出する方法の工程を示す図である。

最初に、静置法および電界攪拌法において、撥水円300の捺印工程を実行する。撥水円300の捺印工程の所要時間は何れの方法も1分程度である。

【0046】

40

次に、抗原の固相工程を実行し、静置法および電界攪拌法において30分の静置を行う。

次に、1分の洗浄工程を実行した後、ブロッキング工程を実行する。ブロッキング工程では、静置法および電界攪拌法において30分の静置を行う。

次に、1分の洗浄工程を実行した後、抗原としてタンパク質であるアルブミン濃度を0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したものを二次抗体に作用させるべく二次抗体反応工程を実行する。

ここで、静置法においては10分の静置を行う。他方で、電界攪拌法においては10分の電界攪拌を行う。

【0047】

50

次に、1分の洗浄工程を実行し、余分な二次抗体を除去した後、発色反応工程を実行する。発色反応工程の所要時間は、静置法および電界攪拌法において15分程度である。

以上の一連の工程を実行するのに、静置法および電界攪拌法においておよそ90分を要した。尚、発色状況は顕微鏡等により目視で観察できる。図17は、静置法および電界攪拌法において発色の違いを示す写真であり、図18は、静置法および電界攪拌法における発色の濃度の違いを示す図である。

図17および図18に示すように、電界攪拌を行うことで発色強度が増加すると言える。従って、実施形態4は実施形態1で述べた効果と同様な効果を奏することに加え、抗原抗体反応において電界攪拌法を採用することで、抗原抗体反応の迅速化を更に図ることが確認できる。電界攪拌法を採用する工程は、二次抗体反応工程（結合工程）に限らず、抗原の固相工程（付着工程）、ブロッキング工程、発色反応工程にも採用することができる。

10

【0048】

なお、電界攪拌法において、液滴Sが、抗体を含む試薬である場合は、下電極10に印加される電位の極性がマイナスであることが好ましい。具体的には、抗体は、電荷を持っているが、その極性は液滴Sにおける溶媒のpHに依存する。抗体の極性が変わる溶媒のpHの値を等電点といい、溶媒のpHが等電点より小さければ、抗体はプラス（正極性）に帯電する。溶媒のpHが等電点よりも大きければ、抗体はマイナスに帯電する。免疫組織染色やELISAの上記工程で用いられる溶媒のpHの値は、一般的に6.8~8.0程度であることから、抗体はマイナス（負極性）に帯電することになる。

20

【0049】

免疫組織染色における染色の濃さ、ELISAにおける発色強度は、抗原抗体反応の量に依存するが、反応にはネガティブコントロール（抗原もしくは抗体を持たない試料を入れておくことが望ましい。その理由は、試験後に得られた結果が抗原抗体反応に由来するものなのか、あるいは、抗原抗体反応以外の非特異的な反応に由来するものなのか判断するためである。一方で、ネガティブコントロールを導入した場合、電界攪拌法において、下電極10に与えられる電位の極性がプラス（正極性）であると、下電極10と抗体との引力によって、上記非特異的な反応が増えてしまうおそれがある。下電極10に与えられる電位の極性をマイナス（負極性）とすれば、下電極10と抗体の間には斥力が働くため上記非特異的な反応が起こり難くなると考えられる。つまり、ネガティブコントロールが導入された免疫組織染色やELISAにおいて、非特異的な反応が抑制され、より適正な試験結果が得られることとなる。

30

【0050】

各実施形態における各構成、およびそれらの組み合わせは一例であり、本発明の趣旨から逸脱しない範囲内で、構成の付加、省略、置換およびその他の変更が可能である。また、本発明は実施形態では限定されるものではなく、クレームの範囲によってのみ限定される。

【符号の説明】

【0051】

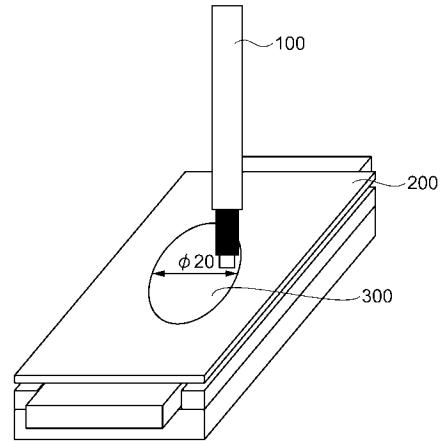
100...撥水性ペン、200...親水性基板、300...撥水円。

40

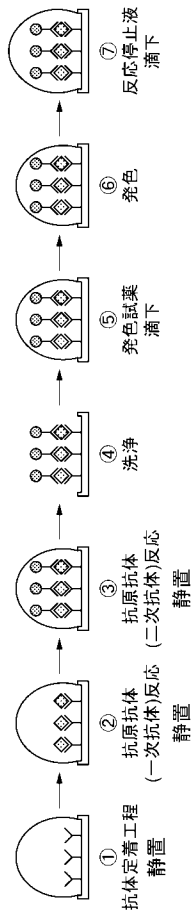
【 図 1 】

工程	時間(min)
1 撥水円の捺印	1
2 抗体の固相	60
3 洗浄	1
4 ブロッキング	30
5 洗浄	1
6 一次抗体反応	60
7 洗浄	1
8 二次抗体反応	60
9 洗浄	1
10 発色反応	15
Total	230

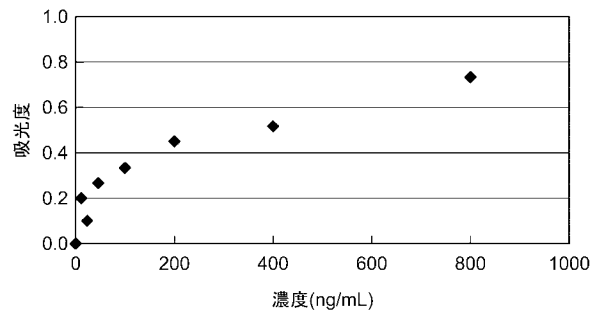
【 図 2 】



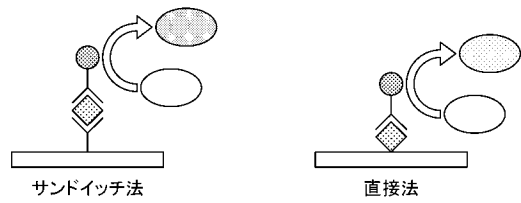
【 図 3 】



【 図 4 】



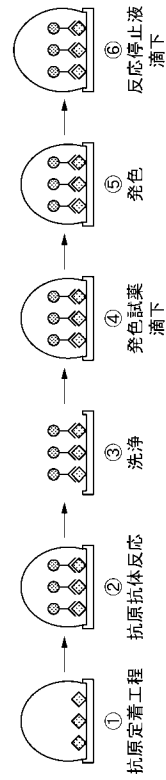
【 図 6 】



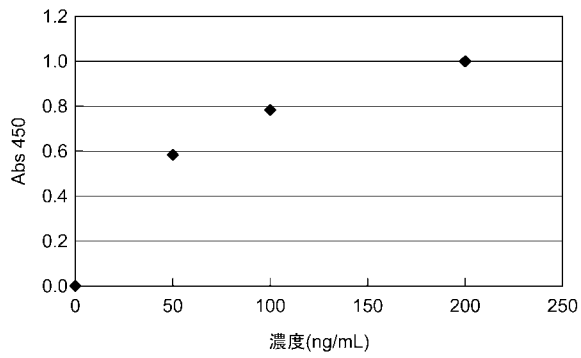
【 図 7 】

工程	時間(min)
1 撥水円の捺印	1
2 抗原の固相	60
3 洗浄	1
4 ブロッキング	30
5 洗浄	1
6 二次抗体反応	60
7 洗浄	1
8 発色反応	15
Total	169

【 図 8 】



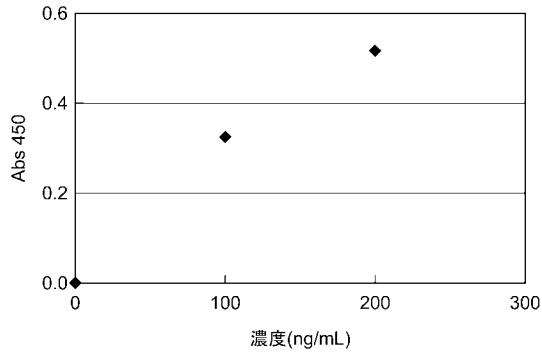
【 図 9 】



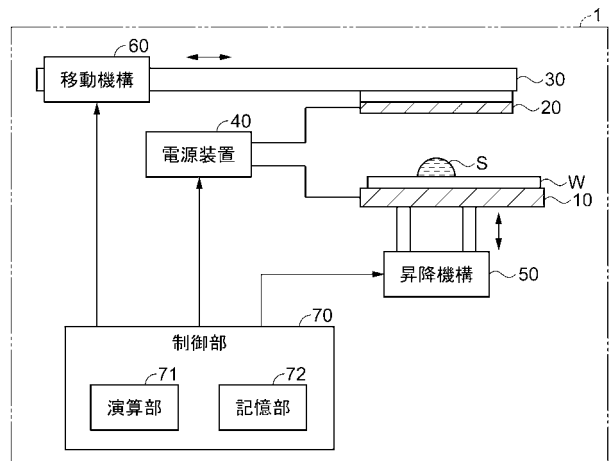
【 図 1 1 】

工程	時間(min)
1 抗原の固相	30
2 洗浄	1
3 ブロッキング	30
4 洗浄	1
5 二次抗体反応	30
6 洗浄	1
7 発色反応	15
Total	108

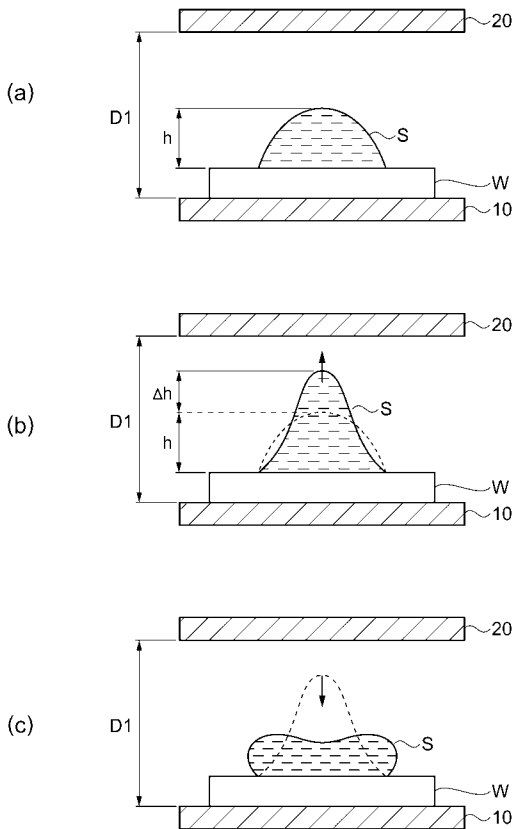
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



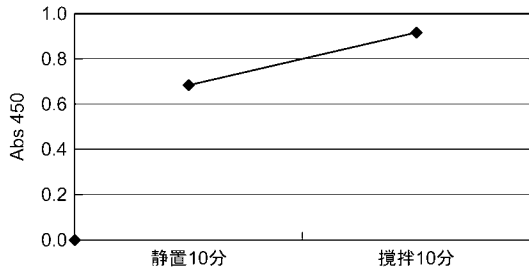
【 図 1 5 】



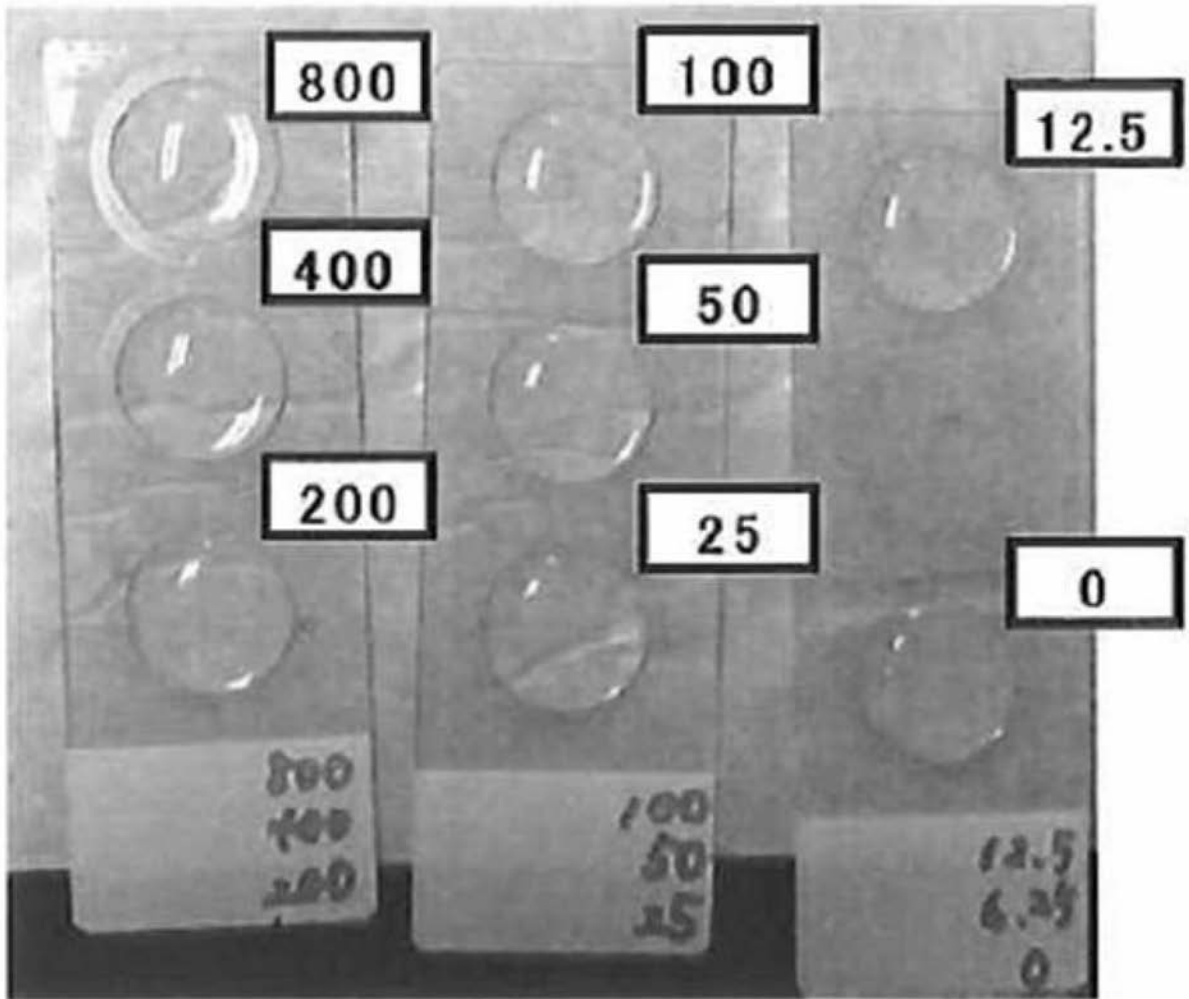
【 図 1 6 】

工程	静置法	電界攪拌法
1	撥水円の捺印 1分	撥水円の捺印 1分
2	抗原の固相 30分	抗原の固相 30分
3	洗浄 1分	洗浄 1分
4	ブロッキング 30分	ブロッキング 30分
5	洗浄 1分	洗浄 1分
6	二次抗体反応 静置10分	二次抗体反応 電界攪拌10分
7	洗浄 1分	洗浄 1分
8	発色反応 15分	発色反応 15分
Total	約90分	約90分

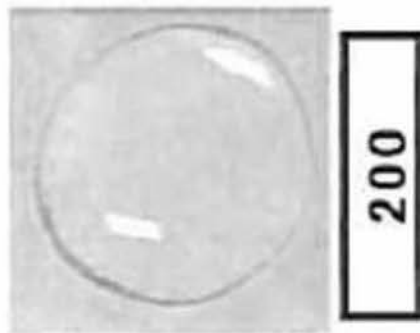
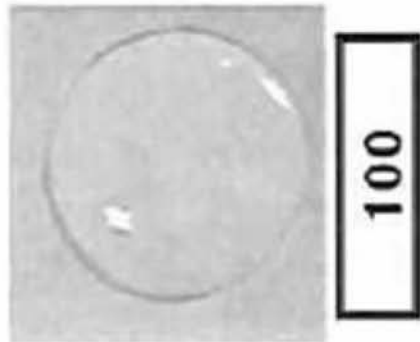
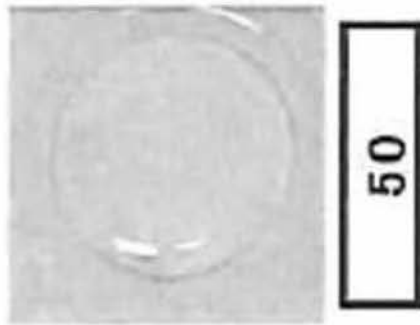
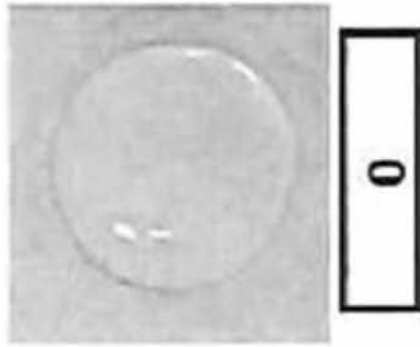
【 図 1 8 】



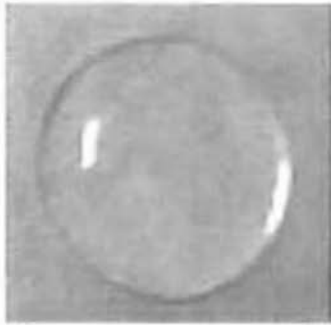
【 図 5 】



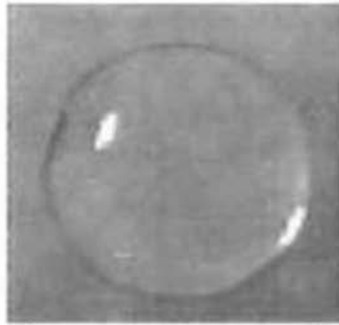
【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



200



100



0

【図 17】



静置



攪拌

专利名称(译)	测定方法		
公开(公告)号	JP2015111095A	公开(公告)日	2015-06-18
申请号	JP2014147464	申请日	2014-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	秋田爱普生		
申请(专利权)人(译)	秋田爱普生公司		
[标]发明人	青木太朗		
发明人	青木 太朗		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N1/38		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.525.W G01N33/543.525.U G01N33/543.545.B G01N1/28.Y		
F-TERM分类号	2G052/AA28 2G052/DA05 2G052/FB02 2G052/FB10 2G052/GA29		
代理人(译)	渡边和明		
优先权	2013227891 2013-11-01 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：使用不限于特定活组织的蛋白质轻松进行免疫组织染色提供一种方式。种类代码：A1测量蛋白质浓度的方法包括：将酶标记的抗体与附着于基质表面的蛋白质结合的結合步骤，和 以及使抗体与发色底物反应的显色反应步骤，以及基于由发色底物产生的颜色的组。d) 测量板表面蛋白质的浓度。[选图]图1

	工程	時間(min)
1	撥水円の捺印	1
2	抗体の固相	60
3	洗淨	1
4	ブロッキング	30
5	洗淨	1
6	一次抗体反応	60
7	洗淨	1
8	二次抗体反応	60
9	洗淨	1
10	発色反応	15
Total		230