

(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2006-153488
(P2006-153488A)

(43) 公開日 平成18年6月15日(2006.6.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	2GO43
GO 1 N 1/10 (2006.01)	GO 1 N 21/64 G	2GO45
GO 1 N 33/12 (2006.01)	GO 1 N 1/10 P	2GO52
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/12	
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-340501 (P2004-340501)	(71) 出願人	393002634 キヤノン化成株式会社 茨城県つくば市荊崎1888-2
(22) 出願日	平成16年11月25日(2004.11.25)	(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
		(74) 代理人	100106138 弁理士 石橋 政幸
		(74) 代理人	100120628 弁理士 岩田 慎一
		(74) 代理人	100127454 弁理士 緒方 雅昭
		(72) 発明者	児玉 真優子 茨城県つくば市荊崎1888-2 キヤノン化成株式会社内

最終頁に続く

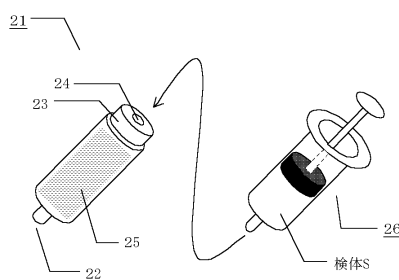
(54) 【発明の名称】 光学的測定法

(57) 【要約】

【課題】 検体に含まれる測定対象物を検出する光学的測定法において、検体中に含まれる脂肪分による光の散乱・吸収・屈折率変化などによると思われる、測定されるべき光の吸収や発光の妨害を軽減し、高感度かつ信頼性の高い光学的測定を行うこと。

【解決手段】 測定対象物を含有する固形試料に希釈液を加えて行う均質化工程と、固形物を取り除く濾過工程と、親油性を有する合成繊維を嵩密度が $0.06 \sim 0.2 \text{g/cm}^3$ となるよう充填した容器を用いて行う脂肪分除去工程と、測定対象物の測定評価工程を備える。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体に含まれる測定対象物を検出する光学的測定法において、該測定対象物を含有する固形試料に希釈液を加えて行う均質化工程と、固形物を取り除く濾過工程と、親油性を有する合成繊維を嵩密度が $0.06 \sim 0.2\text{g/cm}^3$ となるよう充填した容器を用いて行う脂肪分除去工程と、該測定対象物の測定評価工程を備えていることを特徴とする光学的測定法。

【請求項 2】

前記容器は筒状であり、検体導入口を有する蓋部と、検体を排出する排出口とを備え、シリンジを用いて検体を吸引し、該シリンジの筒先を前記容器の蓋部に取り付け、該シリンジの押し子を押し、検体を押し出すことで検体を前記容器に導入したのち排出口から排出することを特徴とする請求項 1 に記載の光学的測定法。

10

【請求項 3】

前記光学的測定法は、プローブの表面に測定対象物を捕捉させ、更に蛍光性発色団を有する色素を結合し、該プローブ内に励起光を導入して発生したエバネッセント光によって該蛍光性発色団を励起し、該プローブ内を伝播して収集された光量を測定することによって、該プローブ上に形成された測定対象物と色素との結合物を検出することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の光学的測定法。

【請求項 4】

前記プローブ表面への測定対象物の捕捉及び蛍光性発色団を有する色素との結合は、免疫反応によるものであり、測定対象物と色素とが抗体を介してプローブ表面に結合物を形成していることを特徴とする請求項 3 に記載の光学的測定法。

20

【請求項 5】

前記検体は肉・魚介類・乳製品・食用油脂及びこれらの加工品を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の光学的測定法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の光学的測定法で用いられる測定キットであって、親油性を有する合成繊維を嵩密度が $0.06 \sim 0.2\text{g/cm}^3$ となるよう充填した容器である、脂肪分除去手段と、測定対象物を捕捉し、該光導波路部を有して表面に光を伝播可能なプローブと、検体を収容する検体容器と、蛍光性発色団を有する色素を収容する容器と、該プローブを保持して測定を行うための測定容器とを有することを特徴とする、測定キット。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、検体中に含まれる測定対象物を高感度に検出する光学的測定法に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

検体による光の吸収や発光などの光学的変化を分析手法として利用する光学的測定は、食品、医療、環境といった様々な分野に普及しつつある。特に食品分野では、食の多様化、外食・中食の普及や流通の発達により、食中毒の発生原因が従来とは異なる傾向にあり、また大規模・広範囲に渡って病原性の強い集団食中毒が発生していることから、食中毒菌への対策として出荷前の迅速かつ高感度な検査等が求められている。

40

【0003】

光学的手法を用いた検査法としては、光透過性の容器(セル)に試料を入れ、容器内に光を通過させて観測を行う方法が挙げられる。または、光透過性の材料から成る光導波路をプローブとし、このプローブに光を導入又は/及び収集して、プローブ表面付近の測定対象物を光学的に観測することも行われている。特に、プローブ内に内部全反射光を伝播させ、その際のプローブ表面に発生するエバネッセント光を励起光とする方法は、プローブ表面近傍における免疫反応を選択的に観測することにおいて優れた方法である。

50

【0004】

また、前記の全反射を多重に行わせることにより、励起光をより効率良く用い、感度を向上させることもできる。この多重全反射を利用した測定法の一例としては、ファイバ型光導波路を検体溶液に浸漬して用いる方式が、知られている。(たとえば、特許文献1)また、内部全反射の効率を高めるために、独特な形状部分を有するファイバ型光導波路が開示されている。(例えば、特許文献2)これらの例は、装置に対して着脱可能な光学プローブとして使い易いものであり、使い捨て性やコストを考慮して、樹脂を射出成形などの成形法で加工して作製されることが多い。

【0005】

また従来からの免疫反応を利用する分析法は、夾雑物の多い検体から特定の測定対象物を選択的かつ簡便に測定する方法として優れており、免疫反応による結合物の直接的又は間接的な測定法として沈降反応や凝集反応などが用いられている。

【0006】

更に、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、酵素などの標識によって免疫反応を光学的に測定し定量化する標識免疫測定を行うことにより、測定感度が飛躍的に高まっている。標識法による放射免疫測定方法、酵素免疫測定方法、蛍光免疫測定方法などが知られており、幾つかの装置が市販されている。

【0007】

光学的測定の中でも特に、免疫反応を利用した方法においては、免疫反応による結合物を高感度かつ選択的に検出することができる一方で、測定される光の吸収や発光が何らかの妨害を受けることがある。特に、近年重要度が増している食品検査において、肉・魚介類・乳製品・食用油及びこれらの加工品を含む検体に含まれる動物性又は植物性脂肪によって上記の妨害を受けることが分った。

【0008】

これは非特異吸着やバックグラウンドと呼ばれるような、例えば免疫反応において標識された抗体が特異的な反応によらず、反応が起こるべき部位以外に吸着して検出されるものと異なる。詳細な機構は明らかではないが、検体中に含まれる脂肪分による光の散乱・吸収・屈折率変化などにより、測定されるべき光の吸収や発光が妨害されているものである。

【特許文献1】米国特許4582809号公報

【特許文献2】米国特許6136611号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

即ち本発明の目的は、上述の問題点を解消し、光学的測定における検体に含まれる脂肪による妨害を軽減し、高感度かつ信頼性の高い光学的測定法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記目的を達成するための本発明に係る光学的測定法は、検体に含まれる測定対象物を検出する光学的測定法において、測定対象物を含有する固形試料に希釈液を加えて行う均質化工程と、固形物を取り除く濾過工程と、親油性を有する合成繊維を嵩密度が $0.06 \sim 0.2 \text{g/cm}^3$ となるよう充填した容器を用いて行う脂肪分除去工程と、測定対象物の測定評価工程を備えていることを特徴とする光学的測定法である。

【0011】

また容器は筒状であり、検体導入口を有する蓋部と、検体を排出する排出口とを備え、シリンジを用いて検体を吸引し、シリンジの筒先を容器の蓋部に取り付け、シリンジの押し子を押し、検体を押し出すことで検体を容器に導入したのち排出口から排出する光学的測定法である。

【0012】

また本発明に係る光学的測定法は、プローブの表面に測定対象物を捕捉させ、更に蛍光

10

20

30

40

50

性発色団を有する色素を結合し、プローブ内に励起光を導入して発生したエバネッセント光によって蛍光性発色団を励起し、プローブ内を伝播して収集された光量を測定することによって、プローブ上に形成された測定対象物と色素との結合物を検出する測定法である。

【0013】

またプローブ表面への測定対象物の捕捉及び蛍光性発色団を有する色素との結合は、免疫反応によるものであり、測定対象物と色素とが抗体を介してプローブ表面に結合物を形成している光学的測定法である。

【0014】

また検体は肉・魚介類・乳製品・食用油脂及びこれらの加工品を含む光学的測定法である。

10

【0015】

また、本発明は、前記記載の光学的測定法で用いられる測定キットであって、親油性を有する合成繊維を高密度が $0.06 \sim 0.2 \text{g/cm}^3$ となるよう充填した容器である、脂肪分除去手段と、

レンズ部位と棒状の光導波路と、その境目にあるフランジ部と、該光導波路の先端部をなす光吸収部位とを有するプローブと、測定対象物の捕捉を行う検体容器と、蛍光性発色団を有する色素を収容する容器と、該プローブを保持して測定を行うための測定容器とを有することを特徴とする、測定キットに関する。

【発明の効果】

20

【0016】

本発明による光学的測定法によれば、検体中に含まれる脂肪分による光の散乱・吸収・屈折率変化などによると思われる、測定されるべき光の吸収や発光の妨害が軽減され、高感度かつ信頼性の高い光学的測定ができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明を図示の実施例に基づいて詳細に説明する。

【0018】

図1はプローブ1の側面図であり、このプローブ1は例えばポリスチレン樹脂を射出成型して製作され、フランジ部2を境に上部はレンズ部位3とされ、下部は棒状の光導波路4とされ、光導波路4の先端は光吸収部位5とされている。

30

【0019】

光導波路4の表面への測定対象物の捕捉方法は、直接的な物理吸着や予め表面に準備された吸着剤による捕捉を用いることができるが、予め表面に固定された測定対象物に特異的に結合する物質による捕捉、より好ましくは抗体による捕捉が選択性の高い方法として望ましい。

【0020】

図2は基本的な測定光学系の構成図である。測定容器12にフランジ部2を用いて保持したプローブ1の上方には、ビームスプリッタ14、半導体レーザー光源16が配置され、ビームスプリッタ14のプローブ1側からの光束の反射方向には、図示しないレンズ、フィルタを介して例えばフォトダイオードから成る光検出器15が配置されている。

40

【0021】

測定に際しては、まずプローブ1を測定光学系とは別に設けられた検体容器11中に固定することで、光導波路4は検体が満たされた検体容器11に浸漬され、測定対象物の捕捉を行う。

【0022】

次いで、プローブ1を測定容器12に移動して洗浄したのち、色素容器13に浸漬させて蛍光性発色団を有する色素により標識された抗体と接触させることで免疫反応の結合物を形成する。そして、半導体レーザー光源16からレーザー光をプローブ1に導入し蛍光の集光を行う。導波路4で得られる蛍光は、レンズ部位3からビームスプリッタ14、レンズ、フ

50

フィルタを経て、光検出器15により蛍光信号の光量を測定する。

【0023】

なお、検体中に蛍光性の不純物が存在する可能性がある場合には、本測定に先立って上記と同様な手順を行使し、測定対象物を含まないブランク検体の測定を行ってもよい。

【0024】

棒状の光導波路4は検体容器11、測定容器12、及び色素容器13中に配置されるために、浸漬、洗浄などの各種操作が行い易いという長所を持っている。しかし一方で、励起光の反射光、散乱光、或いは吸収や屈折率の変化が蛍光に混入して光検出器15で収集され易いという短所がある。

【0025】

この短所は光導波路4の端面の光吸収部位5に黒色体を配置すること、測定光学系中に光学フィルタを導入するなどによってかなり解決されるが、微量な蛍光量を扱う場合には実質的に問題になることが多い。例えば、肉・魚介類・乳製品・食用油脂及びこれらの加工品を含む検体Sに含まれる脂肪が原因となる上記課題で説明したような蛍光検出の妨害である。即ち、プローブ1が検体容器11に浸漬され、測定対象物の捕捉を行った後に、標識抗体と接触させる前に光量の測定を行うと、検体Sに浸漬させる前の光量よりも減少するという現象が生じ、更に減少した分の光量は洗浄により元の光量に戻ることが確認されている。

【0026】

この場合に、ベースラインが不明瞭になるため、標識抗体との接触の後に得られた光量が、免疫反応によるものか、洗浄により元の光量に戻ったものかが判別できなくなる。この影響を軽減させる方法として、検体に含まれる測定対象物を検出する光学的測定を行う際に、測定対象物を含有する固形試料に希釈液を加えて行う均質化工程と、固形物を取り除く濾過工程と、親油性を有する合成繊維を嵩密度が $0.06 \sim 0.2 \text{g/cm}^3$ となるよう充填した容器を用いて行う脂肪分除去工程と、測定対象物の測定評価工程を備える光学的測定を行うのが有効である。

【0027】

図3は、本発明による容器の構成図である。検体排出口22と、検体導入口24を有する蓋部23とを備える筒状容器に、親油性を有する合成繊維25を充填して用いる。

【0028】

親油性を有する合成繊維とは、石油、石炭、天然ガスなどを原料とし、化学的に合成したものであり、ナイロン、ポリエステル、アクリル、ポリプロピレン、ポリエチレンなどが挙げられる。これらは繊維状のものを用いるのが好ましく、また織布や不織布に加工してあってもよい。例えば織布や不織布を用いる場合は、シート状のまま容器に充填すると過剰な隙間のために検体の流路が自然に発生してしまい、検体が織布や不織布に十分に接しないまま排出されて、脂肪分を吸収して除去する効果が得られないことがある。そのため検体Sとの接触面積がなるべく大きくなるよう例えばほぐして綿状にする、または粒・棒状に切断して筒状容器に充填することが好適である。

【0029】

また、合成繊維の容器内における嵩密度は、 $0.06 \sim 0.2 \text{g/cm}^3$ となることが好適である。この範囲においては合成繊維が適度な空気を含み、親油性による検体中の脂肪分吸収の効果のみならず、繊維間の毛細管現象によって検体との接触面積が増大し、脂肪分の吸収が助けられることで脂肪分を取り除く効果が大きくなる。これより低密度では、合成繊維に隙間が多くできてしまい、検体は自然に生じた流路を通過するだけとなり、脂肪分を吸収して除去する十分な効果が得られない。またこれより高密度では、検体を導入した際の通過速度が遅くなり処理に時間がかかってしまうため、多数の検体を処理する場合には不都合である。

【0030】

容器に導入される検体Sは、肉・魚介類・乳製品・食用油脂及びこれらの加工品等を希釈液と共に例えばフィルタを備えた専用バッグに入れ、ストマッカー法等により均質化し

10

20

30

40

50

た後に、フィルタを通過することにより濾過され固形の成分を取り除かれたものである。この時希釈液は、各々が組むプロトコルにより液体培地や緩衝液などを適宜選択することができる。上記検体をシリンジ26を用いて吸引し、シリンジの筒先を上記容器の蓋部23に取り付け、シリンジの押し子を押すことで検体を容器に導入することで脂肪分の除去を行う。上記の濾過および脂肪分の除去工程を経た検体を用いて光学的測定を行うことにより、液状の検体に含まれる測定対象物を検出する。

【実施例】

【0031】

[実施例1]

(プローブ)

プローブ1は、ポリスチレン樹脂(極一般的なものであり、どこのメーカー品であっても良い)を射出成形したものであり、その形状は図1に示した通りである。光導波路4は、テーパ部が長さ41.3mm、円柱部が直径0.7mm、であり、使用状態に応じた所定の長さとし、レンズ部3とフランジ部2を有していてもよい。なお、プローブの形状は、本実施例を1例とするものにすぎない。

10

【0032】

(操作)

このプローブ1の光導波管4の表面に *Escherichia coli* O157:H7抗体(Kirkegaard & Perry Lab. Inc社製)を固定したものをを用いた。検体として、牛ひき肉に9倍量のTSB培地(日水製薬:トリプトソーヤブイオン)を加えて、ストマッカー法により均質化し、市販のフィルタバッグによる濾過を経たものに菌濃度 1.1×10^5 CFU/mlとなるよう不活化した *Escherichia coli* O157:H7を加えたものを、シリンジにて上記容器に導入して脂肪分を除去し検体とした。なお実用での測定では、菌濃度不明の検体を用いるのが常であるので、菌を加える操作はなく、上記は実験的に前もって菌濃度を知るための操作である。またこの時、合成繊維としてはポリプロピレンの不織布(3M社製:オイルソーベント、)をほぐしたものを嵩密度が 0.1g/cm^3 となるよう容器に充填した。

20

【0033】

(ア)始めに、測定前の信号を得るために、光導波路4を測定容器12内に配置し、0.5%ポリオキシメチレンソルビタンモノラウレートを含む 0.01mol/L りん酸緩衝液を満たして測定を行った。

30

【0034】

(イ)非特異的吸着分による信号を得るために、蛍光性発色団を有する色素として準備した $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の蛍光標識抗体(Amersham Biosciences社製:Cy5 bisfunctional reactive dyeにより抗体を標識)を含む緩衝液を満たした色素容器13に光導波路4を浸漬して、25℃で5分間静置した。光導波路4を緩衝液により洗浄し、緩衝液で測定容器12を満たして蛍光信号を3回測定した。これによって非特異的吸着分による僅かな信号増加と飽和を予め確認した。

【0035】

(ウ)免疫反応による信号を得るために、 10ml の検体Sを満たした検体容器11に光導波路4を10分間浸漬した後緩衝液により洗浄し、緩衝液で測定容器12を満たして標識前の信号を得た。

40

【0036】

(エ)光導波路4を測定容器12中の $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の蛍光標識抗体を含む緩衝液に浸漬して、25℃で5分間静置した。光導波路4を緩衝液により洗浄し、緩衝液で測定容器12を満たして標識後の蛍光信号を得た。

【0037】

[実施例2]

実施例1と同様にして用意したプローブ1を用いた。また、実施例1と同様にフィルタバッグによる濾過を経た検体を、ポリプロピレンの繊維を嵩密度が 0.1g/cm^3 となるよう充填した容器にて脂肪分を除去したものをを用いた。実施例1と同様に(ア)~(エ)の操作を

50

行った。

【0038】

【比較例】

実施例1と同様にして用意したプローブを用い、検体Sは実験1と同様に調製しフィルタバッグによる濾過を経たのち、上記実施例の何れの脂肪分除去処理も行わないものを用いた。実施例1と同様に(ア)~(エ)の操作を行った。

【0039】

図4は実施例1~3及び比較例における測定データのグラフ図を示している。脂肪分の除去を行わなかった比較例では、上記操作(ウ)において検出の妨害となる脂肪分の付着による散乱等と思われる蛍光信号の低下が観測されたが、脂肪分の除去を行った実施例1、2では信号の低下を小さく抑えることができた。また、何れの実施例でも、上記操作(エ)において、測定対象物である *Escherichia coli* O157:H7 による蛍光信号を得ることができ、脂肪分の除去の際に測定対象菌をも取り除いてしまうことはなかった。

10

【0040】

また比較例では、十分に検出できるだけの菌数であるにもかかわらず、操作(エ)において信号を得ることができなかつた。これはプローブに付着した脂肪分が免疫反応を妨げているものと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】プローブの側面図である。

20

【図2】測定光学系の構成図である。

【図3】本発明における容器の構成図である。

【図4】実施例および比較例における測定データのグラフである。

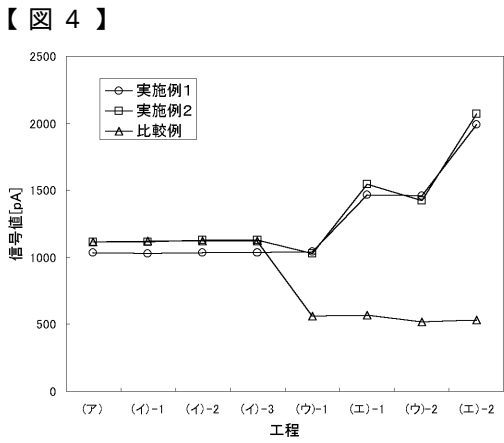
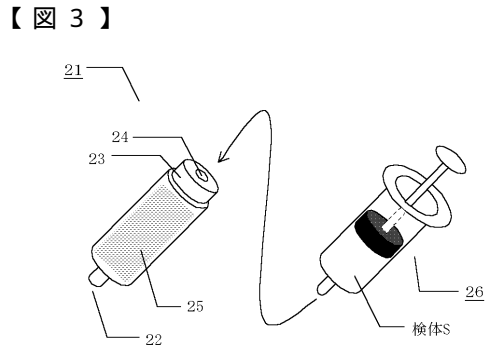
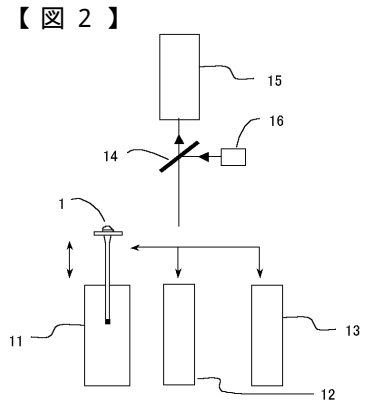
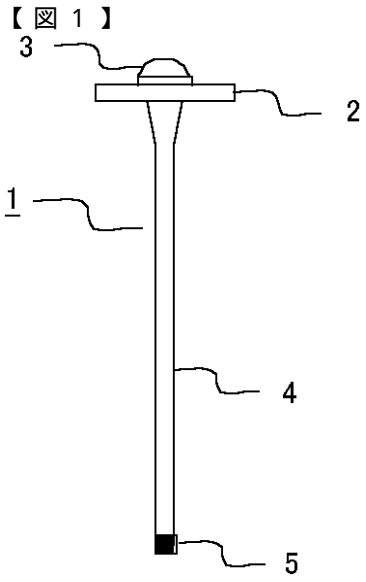
【符号の説明】

【0042】

1. プローブ
2. フランジ部
3. レンズ部
4. 光導波路
5. 光吸収部位
11. 検体容器
12. 測定容器
13. 色素容器
14. ビームスプリッタ
15. 光検出器
16. レーザー光源
21. 容器
22. 検体排出口
23. 蓋部
24. 検体導入口
25. 親油性を有する合成繊維
26. シリンジ

30

40



フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 1/28 (2006.01) G 0 1 N 33/533
G 0 1 N 1/28 J

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA04 DA01 DA02 EA01 GA07 GB21 HA09 LA01
2G045 BB05 FA11 FB12
2G052 AA28 AB16 AD29 AD49 EA03 FD01 GA11

专利名称(译)	光学的测定法		
公开(公告)号	JP2006153488A	公开(公告)日	2006-06-15
申请号	JP2004340501	申请日	2004-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	佳能化成株式会社		
申请(专利权)人(译)	キヤノン化成株式会社		
[标]发明人	児玉真優子		
发明人	児玉 真優子		
IPC分类号	G01N21/64 G01N1/10 G01N33/12 G01N33/483 G01N33/533 G01N1/28		
FI分类号	G01N21/64.F G01N21/64.G G01N1/10.P G01N33/12 G01N33/483.C G01N33/533 G01N1/28.J		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA01 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB21 2G043/HA09 2G043/LA01 2G045/BB05 2G045/FA11 2G045/FB12 2G052/AA28 2G052/AB16 2G052/AD29 2G052/AD49 2G052/EA03 2G052/FD01 2G052/GA11		
代理人(译)	宫崎昭雄 岩田慎一 绪方明		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过减少被测量的光的吸收或发射的阻碍来进行高灵敏度和高可靠性的光学测量，这被认为是由于脂肪引起的光的散射/吸收/折射率的变化引起的用于检测样本中的测量目标的光学测量方法中的样本中包含的成分。ZOLUTION：光学测量方法包括在将液体稀释剂添加到包含测量目标的固体样品之后执行的均质化过程，用于去除固体物质的过滤过程，使用填充有合成纤维的容器执行的脂肪组分去除过程。亲油性使得合成纤维的堆积密度变为0.06-0.2g / cm³，并且测量和评价测量目标的过程。Z

