

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5407150号  
(P5407150)

(45) 発行日 平成26年2月5日(2014.2.5)

(24) 登録日 平成25年11月15日(2013.11.15)

|               |           |               |       |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| (51) Int.Cl.  |           | F I           |       |
| GO 1 N 33/543 | (2006.01) | GO 1 N 33/543 | 5 3 1 |
| GO 1 N 33/53  | (2006.01) | GO 1 N 33/53  | P     |
| GO 1 N 35/00  | (2006.01) | GO 1 N 35/00  | D     |

請求項の数 11 (全 20 頁)

|   |  |
|---|--|
| <p>(21) 出願番号 特願2008-44161 (P2008-44161)</p> <p>(22) 出願日 平成20年2月26日 (2008.2.26)</p> <p>(65) 公開番号 特開2008-241698 (P2008-241698A)</p> <p>(43) 公開日 平成20年10月9日 (2008.10.9)</p> <p>審査請求日 平成23年2月22日 (2011.2.22)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2007-50359 (P2007-50359)</p> <p>(32) 優先日 平成19年2月28日 (2007.2.28)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>前置審査</p> | <p>(73) 特許権者 000003159<br/>東レ株式会社<br/>東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号</p> <p>(74) 代理人 100089118<br/>弁理士 酒井 宏明</p> <p>(72) 発明者 石井 健太郎<br/>神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内</p> <p>(72) 発明者 日笠 雅史<br/>神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内</p> <p>(72) 発明者 平松 紳吾<br/>神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p> |
|---|--|

(54) 【発明の名称】 免疫分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原および/または抗体が結合した担体を収容した反応室を有する分析装置を、前記分析装置外 of 回転軸に対して公転させることにより、検体および試薬を前記反応室に送液して、前記反応室内の被検物質量を測定する免疫分析方法であって、異なる2つ以上の公転速度により前記分析装置を公転させて前記分析装置に対し異なる2以上の遠心力を与え、前記異なる2以上の遠心力のうち最大の遠心力を最小の遠心力の2.5倍以上とすることにより、被検物質を希釈することによる測定範囲の調整を行わずに、該被検物質について、測定範囲の異なる2以上の測定結果を得る免疫分析方法。

【請求項2】

前記異なる2つ以上の遠心力を与えるにあたり、異なる2つ以上の回転半径により前記分析装置を公転させる、請求項1に記載の免疫分析方法。

【請求項3】

前記反応室内の被検物質量を測定するにあたり、被検物質の検出を光学的手段を用いて行うことを特徴とする請求項1又は2のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

【請求項4】

前記光学的手段が蛍光測定であることを特徴とする請求項3に記載の免疫分析方法。

【請求項5】

前記光学的手段が発光測定であることを特徴とする請求項3に記載の免疫分析方法。

【請求項6】

前記光学的手段が吸光度測定であることを特徴とする請求項 3 に記載の免疫分析方法。

【請求項 7】

前記反応室内の被検物質量を測定するにあたり、放射線検知手段を用いて行うことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の免疫分析方法。

【請求項 8】

前記分析装置が、抗原および/または抗体が結合した担体を収容する反応室を有し、遠心分離器のアングルローターおよび/またはスイングローターに装着可能である免疫分析チップであることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

【請求項 9】

前記免疫分析チップは、前記反応室に通じ、反応室と反対側に開口部を有する試薬・検体リザーバを更に備えるチップである、請求項 8 に記載の免疫分析方法。

10

【請求項 10】

前記被検物質が、サイトカインおよび/またはケモカインである請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

【請求項 11】

前記被検物質が、IL - 6、IL - 8、またはTNFである請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は免疫分析方法に関し、詳しくは、検体中の被検物質量にかかわらず迅速かつ正確な分析の可能な免疫分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

検体中の微量の被検物質を分析するための免疫分析において、Lab-on-chip ( $\mu$ TAS) と呼ばれる小型のチップの利用が提案されている。近年、このような回転による遠心力を利用して送液させるチップに関する技術が開発されている。

【0003】

例えば、特許文献 1 には、2 つまたはそれ以上のマイクロチャンネル構造体の第 1 の集合を有し、マイクロチャンネル構造体それぞれが有する特定の構造ユニットが、マイクロ導路で接続されているマイクロ流体デバイスを、回転させることによって遠心力を利用して液体を流して、化学的、生物学的化学領域内の合成、分解準備などを行う技術が記載されている。さらに、特許文献 2 には、微細チャンネルを埋設した微量システムプラットフォームを回転させて、これにより生じる向心力を利用してプラットフォーム上の流体運動を誘導する技術が記載されている。

30

【0004】

【特許文献 1】特表 2005 - 507762 号公報

【特許文献 2】特表 2000 - 514928 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0005】

しかし、上述の従来技術では、チップの構造が複雑であり、また、特別な送液装置を必要とするため、検体と試薬や基質等との接触時間や接触量等の条件を制御することが難しいという問題があった。特に ELISA 法の場合、測定できる範囲 (ダイナミックレンジ) が狭いため、検体中の被検物質濃度が高い場合には希釈系列を作成してから測定する必要があり、短時間で簡便な測定をするための手段が望まれていた。また、被検物質濃度を下げる目的で行う希釈作業により、血液などの生体由来の検体と希釈液の組成の違いにより、被検物質の測定結果に誤差が生じる現象が見受けられることがあった。

本発明は、このような従来の問題点に鑑み、検体と試薬や基質等との接触時間や接触量等の条件の制御が容易であり、被検物質濃度にかかわらず効率よい分析が可能な免疫分析

50

方法の提供を目的とする。一方、測定誤差や作業間違いの原因となる、被検物質濃度を下げる目的で行う希釈溶液を用いた希釈作業を必要とせず、希釈による被検物質の測定結果の誤差を引き起こさない免疫分析方法を提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下の〔1〕～〔12〕を提供するものである。

〔1〕 抗原および/または抗体が結合した担体を収容した反応室を有する分析装置を、前記分析装置外の回転軸に対して公転させることにより、検体および試薬を前記反応室に送液して、前記反応室内の被検物質を測定する免疫分析方法であって、前記分析装置に対し異なる2以上の遠心力を与えることにより、測定範囲の異なる2以上の被検物質の測定結果を得る免疫分析方法。

10

〔2〕 前記異なる2つ以上の遠心力を与えるにあたり、異なる2つ以上の公転速度により前記分析装置を公転させる、〔1〕に記載の免疫分析方法。

〔3〕 前記異なる2つ以上の遠心力を与えるにあたり、異なる2つ以上の回転半径により前記分析装置を公転させる、〔1〕に記載の免疫分析方法。

〔4〕 前記反応室内の被検物質を測定するにあたり、被検物質の検出を光学的手段を用いて行うことを特徴とする〔1〕～〔3〕のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

〔5〕 前記光学的手段が蛍光測定であることを特徴とする〔4〕に記載の免疫分析方法。

〔6〕 前記光学的手段が発光測定であることを特徴とする〔4〕に記載の免疫分析方法。

20

〔7〕 前記光学的手段が吸光度測定であることを特徴とする〔4〕に記載の免疫分析方法。

〔8〕 前記反応室内の被検物質を測定するにあたり、放射線検知手段を用いて行うことを特徴とする〔1〕～〔3〕のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

〔9〕 前記分析装置が、抗原および/または抗体が結合した担体を収容する反応室を有し、遠心分離器のアンクルロータおよび/またはスイングロータに装着可能である免疫分析チップであることを特徴とする〔1〕～〔8〕のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

〔10〕 前記免疫分析チップは、前記反応室に通じ、反応室と反対側に開口部を有する試薬・検体リザーバを更に備えるチップである、〔9〕に記載の免疫分析方法。

30

〔11〕 前記被検物質が、サイトカインおよび/またはケモカインである〔1〕～〔10〕のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

〔12〕 前記被検物質が、IL-6、IL-8、またはTNFである〔1〕～〔11〕のいずれか一項に記載の免疫分析方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明の免疫分析方法によれば、測定範囲の異なる2以上の測定結果を容易に得ることができるので、検体中の被検物質の量にかかわらず、正確な分析が可能である。加えて、測定誤差や作業間違いの原因となる、被検物質濃度を下げる目的で行う希釈溶液を用いた希釈作業を必要とせず、希釈による被検物質の測定結果の誤差を引き起こさない免疫分析方法を提供することも可能となる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明において免疫分析方法とは、検体中の被検物質を、抗原抗体反応を利用して分析する手法を意味し、その代表的なものとしてELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 固相酵素免疫検定法)、RIA(Radioimmunoassay 放射線免疫検定法)、FIA(Fluorescence immunoassay 蛍光免疫検定法)、FLISA(Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay 固相蛍光免疫検定法)を挙げることができる。

50

## 【0009】

分析の方法としては

- 1) 標識した抗体により目的とする物質を直接認識し検出する直接法、
  - 2) 目的とする物質を抗体により認識し、目的物質と結合した抗体を、標識した抗体により認識し検出する間接法、
  - 3) 競合法、
  - 4) 目的とする物質を固相化した抗体(1次抗体)により捕捉し、さらに別の標識した抗体(2次抗体)により検出する二抗体サンドイッチ法、
  - 5) 目的とする物質を固相化した抗体により捕捉し、さらに別の抗体により目的とする物質を認識し、目的とする物質を認識した抗体を標識した抗体により検出する三抗体サンドイッチ法、
- 等が挙げられる。

10

また、ABC法などの、アビジン、ストレプトアビジン等を用いて、被検物質を検出する手法を利用しても良い。

## 【0010】

免疫分析方法における免疫分析における被検物質は、タンパク質、糖、脂質、核酸、糖タンパク質、糖脂質など、抗原や抗体と特異的に結合する物質であればいずれであってもよい。例えばサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、アレルゲン、DNA、RNA、抗体、脂質、酵素、その他化学物質等を挙げることができる。特に、IL-6、IL-8、TNFが好ましい。被検物質の由来生物は問わない。被検物質は1種類であってもよし、2種類以上であってもよい。

20

## 【0011】

また、免疫分析方法の目的は特に限定されず、検体中の被検物質の有無の検出、被検物質の定量などが挙げられる。本発明における免疫分析は、臨床検査、食品検査、環境検査などにおける分析に用いることができる。

## 【0012】

検体とは、前記被検物質を含む可能性がある試料をいい、液体であることが好ましい。例えば、血液、尿、髄液、唾液、痰、細胞懸濁液などの体液をはじめとする生体から採取される液体を挙げることができる。

## 【0013】

本発明の免疫分析方法においては、抗原および/または抗体を結合する担体を収容する反応室を有する分析装置を前記分析装置外の回転軸を公転させることにより、検体および試薬を前記反応室に送液して、検体中の被検物質を分析する。

30

## 【0014】

本発明においては、抗原および/または抗体を結合する担体を収容する反応室を有する分析装置を用いる。反応室の形状およびサイズは、抗原および/または抗体を結合する担体を収容できればよい。形状は管状であることが好ましく、管の横断面は円、多角形等特に限定されない。反応室のサイズは、検体中の被検物質が、担体の抗原および/または抗体に幅がある程度狭いことが望ましく、横断面の短径が通常0.1~1mm、好ましくは0.2~0.5mmであり、長さが通常0.5~10mm、好ましくは0.5~5mmである。

40

## 【0015】

反応室には、抗原および/または抗体が結合した担体が収容される。担体の収容数は1つ以上であればよく、免疫分析の効率を上げる観点から、複数の担体を収容することが好ましい。また、複数の担体を反応室に収容することにより、液体に対して圧力損失を生じるため、試薬・検体リザーバに液体を注入しても重力による作用だけでは液体は反応室を通じて流出しないという効果もある。

## 【0016】

担体の形状は、球状、楕円球状などのマイクロビーズのほか、円柱、多角柱などのいわゆるマイクロロッド、板状のマイクロプレートであってもよい。

50

担体のサイズは、反応室のサイズによるが、担体の形状にかかわらず、短径が1～1000 $\mu\text{m}$ 、好ましくは10～200 $\mu\text{m}$ の範囲であることが好ましい。

【0017】

担体の材料は特に限定されず、ガラス、セラミック（例えばイットリウム部分安定化ジルコニア）、金属（例えば金、白金、ステンレス）、樹脂（例えばナイロンやポリスチレン、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリルアミド）、アガロース等を用いることができるが、この中でも樹脂、特にポリスチレンが好ましい。

反応室に複数の担体が収納される場合、各担体の形状、サイズ、素材は均一であってもよいし、多様であってもよい。また、反応室に格納する担体のすべてに抗原および/または抗体が結合されている必要はなく、何も結合しない担体が一部含まれていてもよい。

10

【0018】

担体に結合させる抗原および/または抗体は、種々の抗体、FabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような抗体の抗原結合性断片、並びに種々の抗原などの中から、免疫分析における検体中の被検物質に特異的に結合する抗原や抗体を適宜選択することができ、1種類であっても、また複数であってもよい。抗原や抗体の担体への結合密度、結合数、結合様式などに特に制限はない。

【0019】

担体に抗原および/または抗体を結合させる方法は、例えば、担体と抗原や抗体とを緩衝液等の溶液中で混合し接触し結合させる方法によることができる。接触による結合は、通常1時間～24時間（日）、低温、一般には4～37 $^{\circ}\text{C}$ の条件で、必要に応じて攪拌しながら実施することができる。得られた担体は、使用前に緩衝液、洗浄液等で洗浄してもよい。尚、結合方法はこれに限定されず、例えば抗原や抗体と担体とを親水性ポリマー（ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリスルホン酸ナトリウム等）を含む架橋剤を使って化学的に結合させる方法などを利用することもできる。

20

【0020】

反応室には、免疫分析のための検体や試薬が送り込まれる。検体についてはすでに説明したとおりである。試薬とは、免疫分析の際に用いられる検体以外の化学物質や薬剤を意味する。例えば、被検物質の検出等のための薬剤、物質、洗浄液などであり、更に具体的には、蛍光や酵素で標識された標識抗体（二次抗体）、抗原、結合性タンパク質、蛍光基質等を挙げることができる。

30

【0021】

本発明の免疫分析方法においては、上述の分析装置を装置外の回転軸を公転させることにより検体および試薬を分析装置の反応室に送液して、検体中の被検物質を分析するが、送液の際に、前記分析装置に対し異なる2以上の遠心力を与えることにより、測定範囲の異なる2つ以上の被検物質の測定結果を得ることを特徴とする。すなわち、分析装置を公転させることにより生じる遠心力を利用して、反応室に検体と試薬を送液すると共に、反応室に収納された担体に結合した抗原および/または抗体に、検体中の被検物質、試薬を順次結合させた後、被検物質の濃度を測定する検体の免疫分析操作を、異なる2以上の遠心力を利用して同時又は順次行い、測定範囲の異なる2つ以上の被検物質の測定結果を得るものである。

40

【0022】

本発明の免疫分析方法における、分析装置の回転方向は、前記分析装置外の回転軸を公転する方向となるように調整する必要がある。すなわち、回転軸は分析装置の外側にあり、この回転軸を中心とした軌道に沿って分析装置の、少なくとも反応室が回転する（公転する）ことが必要である。軌道は略円形であればよく、楕円軌道などであってもよい。

【0023】

本発明においては、分析装置に対し異なる2つ以上の遠心力を与えることにより、測定範囲の異なる2つ以上の被検物質の測定結果を得る。これにより、被検物質濃度に応じた正確な測定結果を得ることができる。

50

異なる2つ以上の遠心力の具体的な数値は、分析装置、被検物質の種類や被検物質の検体中の濃度、測定方法などの諸条件に応じて適宜選択することができる。また、異なる2つ以上の遠心力の具体的な数値は、異なる測定範囲の測定結果を得られるよう設定する必要がある。

【0024】

分析装置に対し異なる2つ以上の遠心力を与えるための手法としては、例えば、(1)異なる2つ以上の公転速度により前記分析装置を公転させる手法、(2)異なる2つ以上の回転半径により前記分析装置を公転させる手法、(3)公転速度および回転半径のいずれかが異なる2以上の組み合わせにより前記分析装置を公転させる手法、を挙げることができる。公転速度については、公転速度が速いほど高い遠心力が得られ、速度が遅いほど低い遠心力が得られる。一方、回転半径については、回転半径が大きいほど高い遠心力が得られ、回転半径が小さいほど低い遠心力が得られる。異なる2つ以上の回転半径により分析装置を公転させることにより、一つのローターを用いて、一度の公転操作で、同時に2つ以上の遠心力を分析装置に与えることができる。そのため、測定を一度で行えることから、測定時間の短縮効果がある。更に、ローターを一つ用いるだけで測定が行えることにより、コスト面でのメリットが生じる効果もある。

10

【0025】

分析装置に対し異なる2つ以上の遠心力を与える処理は、同時にあるいは順次行うことができる。2以上の分析装置を用意して、遠心力が相違する以外は同じ条件として、同時に行うことができる。また、1つの分析装置を用いて、或いは測定条件ごとに分析装置を用意して、遠心力を変えて2回以上行うこともできる。

20

【0026】

分析装置に対し異なる2つ以上の遠心力を与えることによる、被検物質の測定結果は、測定範囲(検体中の被検物質の濃度範囲)の異なるものとなる。通常、分析装置に高い遠心力(例えば、1000~5000G)を与えると、検体及び試薬が反応室中を高速で送液されることにより、測定上限が高濃度まで拡大し、広い濃度領域の測定結果を得ることができる。一方、分析装置に低い遠心力(例えば、10~500G)を与えると、検体及び試薬が反応室中を低速で送液されることにより、測定上限は低くなるが、低濃度領域を正確に測定することができる。

【0027】

本発明において測定範囲が異なるとは、測定範囲に一部でも重複しない範囲があればよいことを意味し、測定上限が様々な数値となるような測定範囲の測定結果を得ることが望ましい。例えば、測定上限として10倍離れるような測定範囲で測定を行えば、被検物質の溶液を希釈する作業が省略できる点からより好ましい。

30

【0028】

本発明の測定方法においては、これらの測定結果を参照して、あるいは両方の測定結果を参照して被検物質の濃度(量)を得ることができる。すなわち、得られる測定結果すべてにおいて濃度が判明すれば、いずれの結果からも被検物質濃度を得ることができる。一方、測定結果のうちいずれかにおいて濃度が測定範囲を逸脱していれば、それ以外の測定結果から被検物質濃度を得ることができる。

40

【0029】

本発明の免疫分析方法において抗原および/または抗体を結合する担体を収容する反応室を有する分析装置を前記分析装置外の回転軸に対して公転させるにあたり、具体的には、異なる2以上の遠心力を設定し、各遠心力により以下の(a)および(b)の2工程を、同時に、或いは順次実施することが好ましい。

(a) 前記チップを公転させることにより生じる遠心力を用いて検体を前記反応室に通過させ、被検物質を前記抗原および/または抗体が結合した担体に結合せしめる工程、および

(b) 前記チップを公転させることにより生じる遠心力を用いて標識用の試薬を含む溶液を反応室に通過させる工程

50

( a ) 工程においては、検体のほか、各種の試薬をあわせて添加することができる。( b ) 工程においては、標識用の試薬として酵素標識または蛍光標識を有する標識抗体を含む溶液を用いることができる。

【 0 0 3 0 】

また、抗原および/または抗体を結合する担体を収容する反応室を有する分析装置を前記分析装置外の回転軸に対して公転させる工程は、以下の 1 工程 ( A ) により実施するものであってもよい。

( A ) 前記チップを公転させることにより生じる遠心力を用いて検体・試薬を、被検物質を前記抗原および/または抗体が結合した担体に結合せしめる工程。

ここでいう試薬とは、酵素標識または蛍光標識を有する標識抗体などの標識試薬などを含む意味である。

10

【 0 0 3 1 】

本発明の免疫分析方法においては、上述の分析装置の反応室内の被検物質量の測定を、光学的手段、放射線検知手段を用いて行うことが好ましく、特に光学的手段を用いて行うことが好ましい。これらの手段による測定においては上述のような被検物質濃度と測定上限との問題が生じやすいが、本発明に基づいて測定すれば問題が解消できるので、本発明の目的が達成されるためである。光学的手段としては、例えば、蛍光測定、発光測定、吸光度測定を挙げることができ、好ましくは蛍光測定が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

上記のような分析装置として最も好ましいものとして、抗原および/または抗体が結合した担体を収容する反応室を有し、遠心分離器の角度ローターおよび/またはスイングローターに装着可能であることを特徴とする免疫分析チップが挙げられる。

20

【 0 0 3 3 】

前記免疫分析チップの第 1 のタイプとしては、遠沈管内部に挿入嵌合が可能なものを挙げることができる。すなわち、遠沈管内部に嵌合させた状態で遠心分離器の角度ローターおよび/またはスイングローターに装着可能なタイプであってもよい。このタイプのチップの場合には、遠沈管内に本発明のチップを入れた場合に、遠沈管の内壁面にチップが固定される。言い換えれば、免疫分析チップの外側面のいずれかの点または面が遠沈管の内壁面の任意の点または面で固定される。代表的なものとしては、図 1 ~ 図 4、図 7 のそれぞれに示す免疫分析チップ A、B、C、D、F を挙げることができる。これらのチップは、図 8 に示すように遠沈管に挿入し嵌合させて用いることができる。

30

【 0 0 3 4 】

一方、前記免疫分析チップの第 2 のタイプとしては、遠心分離機の角度ローターやスイングローターの遠沈管装着部位にそのまま装着できるタイプのものを挙げることができる。代表的なものとしては、図 5 や図 6 に示す免疫分析チップ E を挙げることができる。

【 0 0 3 5 】

ここで、本発明において遠沈管とは、遠心機に適用可能ないわゆる試験管 ( 通常は、キャップのついたもの ) を意味し、遠心チューブ、コニカルチューブ、エッペンドルフチューブなどと呼ばれるものをすべて含む。遠心機も遠沈管に対応するものであれば特に限定はなく、遠沈管を装着できるものであれば、小型の卓上型遠心機などでよい。

40

【 0 0 3 6 】

上記免疫分析チップの反応室の形状およびサイズは、抗原および/または抗体が結合した担体を収容することができればよい。形状は管状であることが好ましく、管の横断面は円、多角形等特に限定されない。反応室のサイズは小さいほど、抗原および/または抗体が結合した担体の量を少なくしてコストダウンを図り、かつリザーバとの容積比を大きくすることを容易にし、市販の遠心機に装着可能なサイズでおおきな濃縮効果が得られる。反応室の容積は、通常は 1 n L ~ 1 0 0 μ L、好ましくは 1 0 n L ~ 1 0 μ L である。

【 0 0 3 7 】

上記免疫分析チップにおける反応室について、図 1、図 5 および図 6 に示す実施例に基

50

づいて説明する。図1の免疫分析チップAは、反応室11が後述の試薬・検体リザーバ12に連結して設けられており、試薬・検体リザーバ12の開口部12Aと反対側に開口部11Aを有する。反応室11には、抗原および/または抗体を結合する担体13が収納されている。また、図5および図6の免疫分析チップEの反応室11は、免疫分析チップEの中部の管壁に隣接して設けられており、試薬・検体リザーバ12の開口部12Aと反対側に開口部11Aを有する。

【0038】

上記免疫分析チップにおいて、反応室は、開口部(第2の開口部)を備えることができる。開口部の位置は、後述の試薬・検体リザーバを設ける場合には該リザーバと反対側であることが望ましい。この開口部には、更に担体の堰き止め手段を設けることができ、これによりチップから担体が漏れないよう保持することができる。堰き止め手段としては、例えば金網やフィルタを用いることができる。金網の場合、適当なサイズのコメツメ(例えば開口部分が $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ のもの)を開口部にプレスして堰き止め手段とすることができる。また、フィルタの場合はセルロース・アセテート製フィルタ等を開口部に圧入して得ることができる。尚、堰き止め手段は金網には限定されず、フィルタ、キャップ等を用いることができる。

10

【0039】

反応室の開口部を堰き止め手段としてのフィルタで塞いだ場合を図2の実施例を例にとって説明する。図2は、本発明の実施例の免疫分析チップBの縦断面を模式的に示す図である。反応室11の開口部11A'は、反応室11よりも幅が広く取られており、この部分11A'にフィルタが圧入される。尚、堰き止め手段を設けるにあたり開口部の幅が広く取られている必要はなく、図1の免疫分析チップAなどの開口部11Aや、図5及び図6に示す免疫分析チップEの開口部11Aにおいてに金網を開口部にプレスして堰き止め手段(図示せず)を設けることができる。

20

【0040】

上記免疫分析チップにおいては、反応室に抗原および/または抗体が結合した担体が收容されている。抗原、抗体、担体等の定義は既に述べたとおりである。抗原および/または抗体が結合した担体を、チップ本体の反応室に収納する方法は、例えば以下のように行うことができる。すなわち、抗原および/または抗体が結合したビーズを界面活性剤および/またはブロッキング剤などを含有する緩衝液で懸濁し、この懸濁液を、チップ本体の検体・試薬リザーバに注いだ後に、チップ本体を遠沈管に挿入し遠心機にかけて10秒~1分遠心する。

30

【0041】

反応室には、免疫分析のための検体や試薬が送り込まれる。検体についてはすでに説明したとおりである。試薬とは、免疫分析の際に用いられる検体以外の化学物質や薬剤を意味する。例えば、被検物質の標識等のための薬剤、物質、洗浄液などであり、更に具体的には、蛍光や酵素で標識された標識抗体(二次抗体)、抗原、洗浄液、蛍光基質等を挙げることができる。

【0042】

上記免疫分析チップは、試薬・検体リザーバを備えるものであってもよい。これにより、直接反応室に試薬や検体を送り込む場合に比べて操作が容易である。すなわち、試薬や検体を試薬・検体リザーバに保持してから遠心機にかけるだけで反応を行うことができ、かつ、反応室をより狭い管状として、担体の収納密度を向上させて免疫分析の効率を高めることができる。

40

【0043】

図1の免疫分析チップAは、反応室11に連結して試薬・検体リザーバ12が設けられており、試薬・検体リザーバ12は外部に開口部12Aを有する。また、図5及び図6の免疫分析チップEでも、同様に、試薬・検体リザーバ12が反応室11に連結して設けられている。

【0044】

50

前記試薬・検体リザーバの容積（サイズ）は、前記反応室のそれよりも大きいことが好ましい。反応室がリザーバに比べて十分小さいことにより、被検物質の濃縮効果があるからであり、さらにリザーバに試薬や検体を保持させることが容易となるからである。具体的には例えば、試薬・検体リザーバの反応室に対する容積比が通常は100以上で、中でも100～ $5 \times 10^8$ の範囲で、特に100～3000の範囲で、適宜定められることが好ましい。ディスク上に分析機構を集積化させた従来技術では約15倍程度が限界であることから、上述の範囲とすることにより、被検物質の濃縮効果が、従来技術と比較して非常に大きいものとなる。

尚、試薬・検体リザーバの容積は、一般には $30 \mu\text{L} \sim 500 \text{mL}$ であり、好ましくは $30 \mu\text{L} \sim 1000 \mu\text{L}$ （1mL）である。

10

#### 【0045】

一方、前記試薬・検体リザーバの送液方向の投影断面積（送液方向と垂直な面に投影したときの面積）と、前記反応室の送液方向の投影断面積の比は、通常は50以上であり、好ましくは100以上である。また、上限は、一般には10000以下とする。ディスク上に分析機構を集積化させた従来技術の場合、装置全体が2次元構造であるためにリザーバと反応室の送液方向の投影断面積比がせいぜい10数倍程度までしか差を着けられないが、立体構造である本発明のチップの場合には、同面積比を拡大し、被検物質の濃縮効率を著しく向上させることができる。

#### 【0046】

さらに、前記試薬・検体リザーバの送液方向に対して平行の最大断面積と、前記反応室の送液方向に対して平行の最大断面積の比は、被検物質の濃縮効果を得る観点から、2～400であることが好ましい。尚、試薬・検体リザーバの送液方向に対して平行の最大断面積は、 $10 \text{mm}^2 \sim 200 \text{mm}^2$ とすることが好ましい。また、反応室の送液方向に対して平行の最大断面積は、 $0.5 \text{mm}^2 \sim 5 \text{mm}^2$ とすることが好ましい。

20

#### 【0047】

試薬・検体リザーバの形状は特に限定されず、円筒形、多角形などの各種形状から適宜選択することができるが、遠心力で試薬や検体を反応室へ円滑に送り込む観点から、横断面の面積が、反応室への接続側に向かって徐々に狭くなる形状であることが好ましい。例えば、図1に示す免疫分析チップAにおける試薬・検体リザーバ12の形状は、基本的には直方体であり、反応室11側の4つの隅の角が丸みを帯びた形状となっている。一方、図2、図3および図4のそれぞれに示す免疫分析チップB、C、Dにおける試薬・検体リザーバ12の形状も、基本的には直方体であり、4つの側面が反応室側で反応室に向けて絞られている。図5および図6の免疫分析チップEの試薬・検体リザーバ12の形状も図2～図4に示す実施例と同様である。

30

#### 【0048】

試薬・検体リザーバは反応室に直接接続しており、反応室と反対側に開口部（第1の開口部）を有する。外部への開口部の形状は特に問わないが、注入した試薬や検体が外に漏出しない程度の大きさで適宜定めることができる。例えば短径が $1 \text{mm} \sim 100 \text{mm}$ 、好ましくは $1 \sim 20 \text{mm}$ の範囲となるよう適宜定めることができる。

#### 【0049】

上記免疫分析チップにおいては更に、廃液槽を備えるものであってもよい。廃液槽を備えることにより、遠心機に廃液が飛散することを防ぐことができる。廃液槽は、反応室と、その第2の開口部で接続される。前述のように第2の開口部に堰き止め手段を設ける場合には、廃液槽は堰き止め手段の先に接続される。

40

本発明において廃液槽は、廃液を蓄積できる空間であればよい。例えば、図1～図4に示すような遠沈管内部に挿入嵌合が可能なタイプの免疫分析チップの場合、図8のように遠沈管に装着した際に遠沈管GとチップHとの間に形成される空間が廃液槽16となりうる。一方、図1～4中には図示しないが、第2の開口部11Aに何らかの袋或いは容器を装着して廃液槽とすることも可能である。

また、図5および図6に示すような、アングルローターやスイングローターにそのまま

50

装着できるタイプの免疫分析チップの場合には、チップ内に廃液槽 16 を設けることができる。

【0050】

また、上記の免疫分析チップのうち、遠沈管内部に挿入嵌合が可能なチップの場合には、その外壁に突出部が更に設けられていてもよい。突出部を設けることにより、チップを遠沈管に嵌合させる際に、遠沈管壁面に前記突出部が接触した状態で嵌合させて、遠沈管の底部に前述したような廃液槽としてのスペースを確保することができる。また、チップの遠沈管からの取り出しを容易にすることができる。さらに、チップを遠沈管から取り出す際に、廃液を遠沈管に残した状態でチップのみを取り出して分析することができるので、廃液由来の測定ノイズの影響を無くすることができる。

10

【0051】

突出部はチップの外壁に設けられるものであればよく、その形状や位置は特定されない。チップを遠沈管に納めた際に遠沈管の内壁面の任意の点又は面で固定されるような位置および形状を、適宜定めることができる。遠沈管の内壁面における固定の態様としては、例えばチップが懸垂して固定される態様、チップが遠沈管底部に足場を介して底上げされる態様が挙げられる。

【0052】

例えば突出部はチップの側面に設けて、遠沈管の内壁面と突出部との接点又は接面によりチップを懸垂させて固定することができる。具体的には、前記試薬・検体リザーバの開口部の周囲に垂直方向に突出した耳を設けることができる。図4の免疫分析チップDでは、開口部12Aの周囲に耳14Aが設けられている。耳の形状及びサイズは、遠沈管のサイズとの関係で適宜定めることができる。

20

【0053】

また、突出部をチップの底面に設けて、遠沈管の底面まで延伸させてチップを固定することができる。具体的には、前記試薬・検体リザーバの底面から延伸する足を設けることができる。図7の免疫分析チップFでは、チップ底面からチップの延伸する2本の足14Bが設けられている。遠沈管に免疫分析チップFを装着した場合、2本の足14Bにより底上げがなされ、遠沈管底面とチップとの間（主に足14Bの間の空間14C）が廃液槽として確保される。

【0054】

前記免疫分析チップのうち、遠沈管内部に嵌合するタイプのチップの場合には、その後の操作の便宜から、遠沈管から取り外し可能に嵌合することが好ましい。

30

【0055】

前記の免疫分析チップの、チップ本体のサイズおよび形状は、そのタイプにより適切なサイズを定めることができる。

すなわち、遠沈管に着脱自在に嵌合するタイプのチップの場合、チップ本体のサイズは、上述したように遠沈管内部に挿入嵌合可能とすることを考慮して定めることができる。一般的に用いられる遠沈管のサイズは、短径8～40mm、高さ5～120mmであるので、これを考慮すると、例えば、チップ本体の短径は通常6～40mm、高さは通常5～120mmの範囲で定めることができる。遠沈管として好ましく用いることができるエッペンデュルフチューブのように、容積が0.5ml～2.5mlの小型の遠沈管を用いる場合は、そのサイズが、8～10mmであるので、これを考慮すると、チップ本体のサイズは、短径は通常6～10mm、高さは通常5～30mm、より好ましくは5～15mmの範囲で定めることができる。一方、遠心分離機のアングルローターやスイングローターの遠沈管装着部位にそのまま装着できるタイプのチップの場合には、装着先の遠心分離機のローターのサイズに合わせたサイズであればよい。

40

【0056】

また、前記の免疫分析チップのチップ本体の形状も、成形の容易さも考慮して定めることができる。例えば遠沈管に着脱自在に嵌合するタイプのチップの場合、三角柱、四角柱などの多角柱形、円柱形、角錐形、円錐形などから選択することができる。図1～図4に

50

示す実施例においては、いずれも立方体形状である。一方、遠心分離機のアングルロータやスイングロータの遠沈管装着部位にそのまま装着できるタイプのチップの場合には、装着先の遠心分離機のロータのサイズに合わせた形状、すなわち遠沈管と同様の形状であればよい。

**【 0 0 5 7 】**

免疫分析チップの材料は特に限定されず、例えば、樹脂、ガラスなどが挙げられる。特に、反応室を外部から観察することが容易になる観点から、少なくとも反応室の一部が透明であることが好ましい。反応室の少なくとも一部が透明とすることにより、より濃縮された被検物質を容易に検出することができる。したがって、反応室の一部に透明材料を用いることが好ましく、特に全体を透明材料から形成することが好ましい。また、反応室の透明材料からなる部分の表面は、平面であってもよいし、レンズ状（凹面）であってもよい。

10

**【 0 0 5 8 】**

透明材料としては、各種有機材料、無機材料を挙げることができ、例えば、ポリメチルメタクリル酸メチル（P M M A）、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリメチルペンテン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、A B S樹脂、ポリジメチルシロキサン、シリコン等の樹脂、それらの高分子化合物を含む共重合体あるいは複合体；石英ガラス、パイレックス（登録商標）ガラス、ソーダガラス、ホウ酸ガラス、ケイ酸ガラス、ホウケイ酸ガラス等のガラス類およびその複合体；表面を絶縁材料で被覆した金属及びその複合体、セラミックス及びその複合体等が好ましく用いられる。このうち、ポリメチルメタクリル酸メチル（P M M A）が特に好ましく用いられる。

20

**【 0 0 5 9 】**

また、本発明の分析装置において、被検物質の溶液が接触する表面（すなわち、上述の免疫分析チップの場合、反応室、試薬・検体リザーバの内表面）は、被検物質の非特異的吸着を抑制する吸着抑制処理が施されていることが好ましい。吸着抑制処理の方法は、親水性高分子材料を静電的に表面に吸着させるコーティング処理、高エネルギー線を照射し、親水性高分子を樹脂表面に共有結合させて強固に固定化する方法などが用いられる。

**【 0 0 6 0 】**

以下、本発明の免疫分析方法において、抗原および/または抗体が結合した担体を収容した反応室を有する分析装置を、前記分析装置外の回転軸に対して公転させることにより、検体および試薬を前記反応室に送液して、前記反応室内の被検物質量を測定する手順（1回ごとの測定結果を得るための手順）を、前記免疫分析チップを用いてE L I S A法によりサイトカインを分析する場合を例にとりて図9を参照しつつ説明する。免疫分析チップの反応室には、サイトカインの1次抗体吸着ビーズが収納されている。

30

**【 0 0 6 1 】**

本発明の免疫分析方法は、前記免疫分析チップを用いて実施する場合、一つの遠心力での測定につき、以下のようにして実施することができる。以下、図9を利用して説明する。

**【 0 0 6 2 】**

本発明の工程（I）を、（a）および（b）の2工程により実施する場合には、以下のようにして行う。

40

工程（a）については、まず、検体・試薬リザーバに検体を注入（図9の（1））した後、検体を遠心力により反応室に移送し（図9の（2））ビーズ上の1次抗体と抗原抗体反応させる（図9の（3））。すなわち、検体注入後の免疫分析チップを遠沈管に挿入し、この遠沈管を遠心機にセットして、回転させる。この処理により、遠心力により検体が検体・試薬リザーバから反応室に移送されると同時に反応が行われる。

**【 0 0 6 3 】**

続いて、工程（b）においては、基質を検体・試薬リザーバに注入した後（図9の（1））、この基質を同様に遠心力により反応室に移送し（図9の（2））、ビーズ上の二次抗体と反応させる（図9の（3））。すなわち、上記検体の移送において、検体を基質に

50

代えたほかは同様にして遠心処理を行う。

【0064】

続いて、工程（b）の後、遠沈管からチップを取り出して、あるいはチップを遠沈管に挿入したまま、反応室内の蛍光強度を蛍光検出装置（蛍光顕微鏡など）により測定する。被検物質が検体中のサイトカインの有無検出の場合は、蛍光強度が測定可能な場合には、検体中にサイトカインが存在することが確認される。一方、検体中のサイトカインの定量を目的とした免疫分析の場合には、予めサイトカインの濃度を変えて同様に測定して作成しておいた検量線と比較して、サイトカインの濃度を特定する。

一方、本発明の工程（I）を、工程（A）、前記チップを公転させることにより生じる遠心力を用いて検体・試薬を、被検物質を前記抗原および/または抗体が結合した担体に結合せしめる工程のみで実施する場合には、上述の工程（a）の説明において、検体に代えて検体に標識抗体などを添加した液体を注入することにより実施することができる。

10

【0065】

ここまで説明したように、本発明の免疫分析方法を、上述の免疫分析チップを用いる場合の操作は、図9に示すように（1）検体・試薬の導入、（2）遠心力による送液、（3）ビーズ部におけるELISAの各反応、の3工程を繰り返すにより進めることができる。尚、検体注入後、および基質注入後には、反応室洗浄のため、必要に応じて洗浄液や緩衝液をリザーバに注入し、同様に遠心処理を行ってもよい。本発明においては、このような測定手順を、異なる遠心力により2回以上繰り返して、2以上の被検物質の測定結果を得るものである。

20

【実施例】

【0066】

実施例1

（1）1回目の測定

以下のようにして、遠心型ELISAチップを製作した。図4にチップの横断面図を示す。遠心型ELISAチップは円筒形のチップ本体からなり、内部に管状の反応室と円筒形で反応室側が絞り形状の検体・試薬リザーバを備え、両者は連結している。検体・試薬リザーバと反応室はそれぞれ外部への開口部を有し、検体・試薬リザーバの開口部には、外部に突出した耳が設けられている。反応室には一次抗体を結合したビーズ担体が充填されるので、その開口部には、ビーズ堰き止め用のフィルタ圧入穴が設けられている。

30

【0067】

まず、ポリメチルメタクリレート製の樹脂（クラレ製）を切削加工でチップ本体を製作した。直径2mm、長さ2mmのセルロース・アセテート製フィルタをフィルタ圧入穴より圧入し遠心型ELISAチップを製作した。

【0068】

続いて、遠心型ELISAチップの反応室にビーズ担体を充填した。

ポリスチレンビーズ（Polyscience社、粒径：25 $\mu$ m）をリン酸緩衝液で洗浄し、ポリスチレンビーズと同量の0.1 $\mu$ g/ml抗hIL-8抗体リン酸緩衝液を添加し、4で一晩浸透させた。浸透後、ポリスチレンビーズ2 $\mu$ lを150 $\mu$ lの0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で懸濁した。この懸濁物を上記遠心型ELISAチップのリザーバに注いだ後に、チップを遠沈管（商品名：エッペンマイクロチューブ、メーカー名：エッペンドルフ、サイズ：1.5mL）に入れ、遠心機にて2000Gで30秒間遠心した。反応室の容積に対する抗体結合ポリスチレンビーズの密度は、9 $\times$ 10<sup>4</sup>個/mm<sup>3</sup>であった。

40

【0069】

遠心型ELISAチップのリザーバに、0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを注いで、遠心機にて2000Gで60秒間遠心し、ビーズを洗浄した。その後、0.25%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させたhIL-8（ヒトインターロイキン-8、鎌倉テクノサイエンス社）50 $\mu$ lと、0.25%BSA、0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させた0

50

．6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）標識抗hIL-8抗体（鎌倉テクノサイエンス社）50  $\mu\text{l}$ とを混合し、上記チップのリザーバに注入した。そしてチップを500Gで120秒間遠心し反応させた。反応後0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液100  $\mu\text{l}$ を上記リザーバに注入し、チップを2000Gで60秒間遠心し再びビーズを洗浄した。洗浄後、20  $\mu\text{M}$ 過酸化水素水、13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Amplex Red（Molecular Probes社）を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）100  $\mu\text{l}$ をリザーバに注ぎ2000Gで10秒間遠心して送液した。その後、チップを遠沈管から出して、反応室内で産生されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡IX-71（オリンパス社）を用いて測定した。各濃度でのhIL-8の蛍光強度の測定結果を図10に示す（励起波長510-560nm、発光波長575-650nm、露光時間0.5秒）。

10

## 【0070】

## (2) 2回目の測定

(1)と同様の遠心型ELISAチップの反応室に、(1)と同様にビーズ担体を充填した。

遠心型ELISAチップのリザーバに、0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液100  $\mu\text{l}$ を注いで、遠心機にて2000Gで60秒間遠心し、ビーズを洗浄した。その後、0.25%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液で溶解させたhIL-8（鎌倉テクノサイエンス社）50  $\mu\text{l}$ と、0.25%BSA、0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液で溶解させた0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）標識抗hIL-8抗体（鎌倉テクノサイエンス社）50  $\mu\text{l}$ とを混合し、上記チップのリザーバに注入した。そしてチップを100Gで60秒間遠心し反応させた。反応後0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液100  $\mu\text{l}$ を上記リザーバに注入し、チップを2000Gで60秒間遠心し再びビーズを洗浄した。洗浄後、20  $\mu\text{M}$ 過酸化水素水、13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Amplex Red（Molecular Probes社）を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）100  $\mu\text{l}$ をリザーバに注ぎ2000Gで10秒間遠心して送液した。その後、反応室内で産生されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡IX-71（オリンパス社）を用いて測定した。各濃度でのhIL-8の蛍光強度の測定結果を図11に示す（励起波長510-560nm、発光波長575-650nm、露光時間0.5秒）。

20

30

## 【0071】

## (3) 3回目の測定

(1)と同様の遠心型ELISAチップの反応室に、(1)と同様にビーズ担体を充填した。

## 【0072】

遠心型ELISAチップのリザーバに、0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液100  $\mu\text{l}$ を注いで、遠心機にて2000Gで60秒間遠心し、ビーズを洗浄した。その後、0.25%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液で溶解させたhIL-8（鎌倉テクノサイエンス社）50  $\mu\text{l}$ と、0.25%BSA、0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液で溶解させた0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）標識抗hIL-8抗体（鎌倉テクノサイエンス社）50  $\mu\text{l}$ とを混合し、上記チップのリザーバに注入した。そしてチップを2000Gで60秒間遠心し反応させた。反応後0.05%トウイン20含有リン酸緩衝液100  $\mu\text{l}$ を上記リザーバに注入し、チップを2000Gで60秒間遠心し再びビーズを洗浄した。洗浄後、20  $\mu\text{M}$ 過酸化水素水、13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Amplex Red（Molecular Probes社）を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）100  $\mu\text{l}$ をリザーバに注ぎ2000Gで10秒間遠心して送液した。その後、反応室内で産生されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡IX-71（オリンパス社）を用いて測定した。各濃度でのhIL-8の蛍光強度の測定結果を図12に示す（励起波長510-560nm、発光波長575-650nm、露光時間0.5秒）。

40

50

## 【 0 0 7 3 】

上記(1)～(3)のいずれの測定においても、図10～図12に示すような測定範囲で検量線を作成することができた。ここで、図10の検量線の傾きと、図11および図12の各検量線の傾きとから、以下のような考察が可能である。すなわち、測定(1)と測定(2)の測定結果比較から、測定(2)の様に遠心力を小さくするために回転速度を遅くすると検量線の傾きを大きくすることができ、より高感度に測定することが可能となる。また、測定(1)と測定(3)の比較から、測定(3)の様に遠心力を大きくするために回転速度を速くすると検量線の傾きを小さくすることができ、広いレンジで測定することが可能となることが証明された。図10と図11では、測定範囲が、その測定上限で10倍異なる範囲で測定結果を得ることが出来た。図10と図12でも、同様に10倍異なる測定範囲で測定結果を得ることができた。図11と図12では、100倍異なる測定範囲で測定結果を得ることが出来た。

10

## 【 0 0 7 4 】

## 実施例2

## (1) 1回目の測定

以下のようにして、遠心型ELISAチップを製作した。図4にチップの横断面図を示す。遠心型ELISAチップは円筒形のチップ本体からなり、内部に管状の反応室と円筒形で反応室側が絞り形状の検体・試薬リザーバを備え、両者は連結している。検体・試薬リザーバと反応室はそれぞれ外部への開口部を有し、検体・試薬リザーバの開口部には、外部に突出した耳が設けられている。反応室には一次抗体を結合したビーズ担体が充填されるので、その開口部には、ビーズ堰き止め用のフィルタ圧入穴が設けられている。

20

## 【 0 0 7 5 】

まず、ポリメチルメタクリレート製の樹脂(クラレ製)を切削加工でチップ本体を製作した。直径2mm、長さ2mmのセルローズ・アセテート製フィルタをフィルタ圧入穴より圧入し遠心型ELISAチップを製作した。

## 【 0 0 7 6 】

続いて、遠心型ELISAチップの反応室にビーズ担体を充填した。

ポリスチレンビーズ(Poly Science社、粒径:25 $\mu$ m)をリン酸緩衝液で洗浄し、ポリスチレンビーズと同量の0.1 $\mu$ g/ml抗hIL-6抗体リン酸緩衝液を添加し、4で一晚浸透させた。浸透後、ポリスチレンビーズ2 $\mu$ lを150 $\mu$ lの0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で懸濁した。この懸濁物を上記遠心型ELISAチップのリザーバに注いだ後に、チップを遠沈管(商品名:エッペンマイクロチューブ、メーカー名:エッペンドルフ、サイズ:1.5mL)に入れ、遠心機にて2000Gで30秒間遠心した。反応室の容積に対する抗体結合ポリスチレンビーズの密度は、 $9 \times 10^4$ 個/mm<sup>3</sup>であった。

30

## 【 0 0 7 7 】

遠心型ELISAチップのリザーバに、0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを注いで、遠心機にて2000Gで60秒間遠心し、ビーズを洗浄した。その後、0.25%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させたhIL-6(ヒトインターロイキン-6、鎌倉テクノサイエンス社)50 $\mu$ lと、0.25%BSA、0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させた0.1 $\mu$ g/mlのHRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)標識抗hIL-6抗体(鎌倉テクノサイエンス社)50 $\mu$ lとを混合し、上記チップのリザーバに注入した。そしてチップを500Gで120秒間遠心し反応させた。反応後0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを上記リザーバに注入し、チップを2000Gで60秒間遠心し再びビーズを洗浄した。洗浄後、200 $\mu$ M過酸化水素水、13 $\mu$ g/ml Amplex Red(Molecular Probes社)を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)100 $\mu$ lをリザーバに注ぎ2000Gで10秒間遠心して送液した。その後に、チップを遠沈管から出して、反応室内で産生されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡IX-71(オリンパス社)を用いて測定した。各濃度でのhIL-6の蛍光強度

40

50

の測定結果を図13に示す。(励起波長510 - 560 nm、発光波長575 - 650 nm、露光時間0.5秒)

【0078】

(2) 2回目の測定

(1)と同様の遠心型ELISAチップの反応室に、(1)と同様にビーズ担体を充填した。

【0079】

遠心型ELISAチップのリザーバに、0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを注いで、遠心機にて2000Gで60秒間遠心し、ビーズを洗浄した。その後、0.25%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させたhIL-6(鎌倉テクノサイエンス社)50 $\mu$ lと、0.25%BSA、0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させた0.1 $\mu$ g/mlのHRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)標識抗hIL-6抗体(鎌倉テクノサイエンス社)50 $\mu$ lとを混合し、上記チップのリザーバに注入した。そしてチップを2000Gで60秒間遠心し反応させた。反応後0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを上記リザーバに注入し、チップを2000Gで60秒間遠心し再びビーズを洗浄した。洗浄後、200 $\mu$ M過酸化水素水、13 $\mu$ g/ml Amplex Red(Molecular Probes社)を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)100 $\mu$ lをリザーバに注ぎ2000Gで10秒間遠心して送液した。その後、反応室内で産生されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡IX-71(オリンパス社)を用いて測定した。各濃度でのhIL-6の蛍光強度の測定結果を図14に示す。(励起波長510 - 560 nm、発光波長575 - 650 nm、露光時間0.5秒)

【0080】

(3) 3回目の測定

(1)と同様の遠心型ELISAチップの反応室に、(1)と同様にビーズ担体を充填した。

【0081】

遠心型ELISAチップのリザーバに、0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを注いで、遠心機にて2000Gで60秒間遠心し、ビーズを洗浄した。その後、0.25%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させたhIL-6(鎌倉テクノサイエンス社)50 $\mu$ lと、0.25%BSA、0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液で溶解させた0.1 $\mu$ g/mlのHRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)標識抗hIL-6抗体(鎌倉テクノサイエンス社)50 $\mu$ lとを混合し、上記チップのリザーバに注入した。そしてチップを2000Gで60秒間遠心し反応させた。反応後0.05%トウイーン20含有リン酸緩衝液100 $\mu$ lを上記リザーバに注入し、チップを2000Gで60秒間遠心し再びビーズを洗浄した。洗浄後、200 $\mu$ M過酸化水素水、13 $\mu$ g/ml Amplex Red(Molecular Probes社)を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)100 $\mu$ lをリザーバに注ぎ2000Gで10秒間遠心して送液した。その後、反応室内で産生されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡IX-71(オリンパス社)を用いて測定した。各濃度でのhIL-6の蛍光強度の測定結果を図15に示す。(励起波長510 - 560 nm、発光波長575 - 650 nm、露光時間0.5秒)

【0082】

上記(1)~(3)のいずれの測定においても、図13~図15に示すような測定範囲で検量線を作成することができた。ここで、図13の検量線の傾きと、図14および図15の各検量線の傾きとから、以下のような考察が可能である。すなわち、測定(1)と測定(2)の測定結果比較から、測定(2)の様に遠心力を小さくするために回転速度を遅くすると検量線の傾きを大きくすることができ、より高感度に測定することが可能となる。また、測定(1)と測定(3)の比較から、測定(3)の様に遠心力を大きくするために回転速度を速くすると検量線の傾きを小さくすることができ、広いレンジで測定するこ

10

20

30

40

50

とが可能となることが証明された。図 1 3 と図 1 4 では、測定範囲が、その測定上限で 4 倍異なる範囲で測定結果を得ることが出来た。図 1 3 と図 1 5 でも 5 倍異なる測定範囲で測定結果を得ることができた。図 1 4 と図 1 5 では、20 倍異なる測定範囲で測定結果を得ることが出来た。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】図 1 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す斜視図である。

【図 2】図 2 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す縦断面図である。

【図 3】図 3 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す縦断面図である。

【図 4】図 4 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す上面図および縦断面図である。 10

【図 5】図 5 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す縦断面図である。

【図 6】図 6 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す上面図および縦断面図である。

【図 7】図 7 は、本発明で用いる分析装置の一例を模式的に示す縦断面図である。

【図 8】図 8 は、本発明で用い得る分析装置を遠沈管に挿入した状態を模式的に示す斜視図である。

【図 9】図 9 は、本発明の分析方法の手順の一例を示す説明図である。

【図 10】図 10 は、実施例 1 の ( 1 ) の結果を示す図である。

【図 11】図 11 は、実施例 1 の ( 2 ) の結果を示す図である。 20

【図 12】図 12 は、実施例 1 の ( 3 ) の結果を示す図である。

【図 13】図 13 は、実施例 2 の ( 1 ) の結果を示す図である。

【図 14】図 14 は、実施例 2 の ( 2 ) の結果を示す図である。

【図 15】図 15 は、実施例 2 の ( 3 ) の結果を示す図である。

【符号の説明】

【0084】

1 1 反応室

1 1 A、1 1 A' 開口部

1 2 検体・試薬リザーバ

1 2 A 開口部 30

1 3 抗原および/または抗体が結合した担体

1 4 A 耳

1 4 B 足

1 4 C 空間

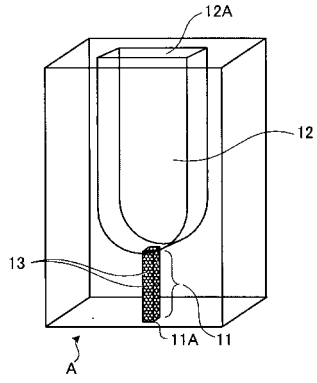
1 5 免疫分析チップの側面の角

1 6 廃液槽

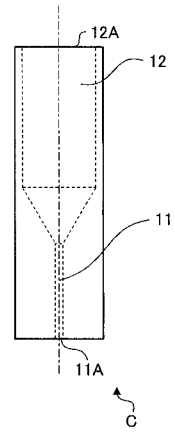
A ~ D, E, F, H 免疫分析チップ

G 遠沈管

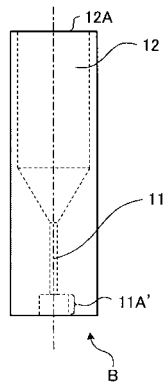
【図1】



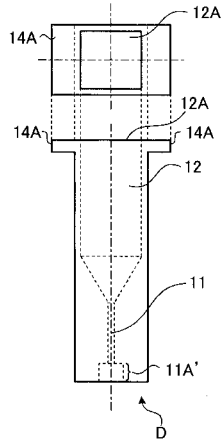
【図3】



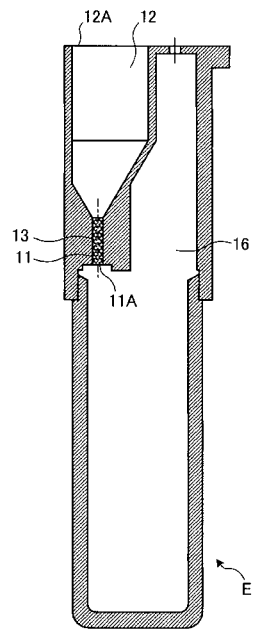
【図2】



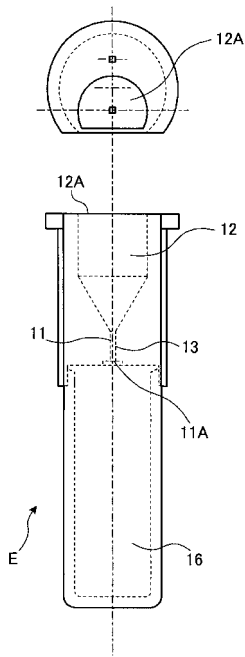
【図4】



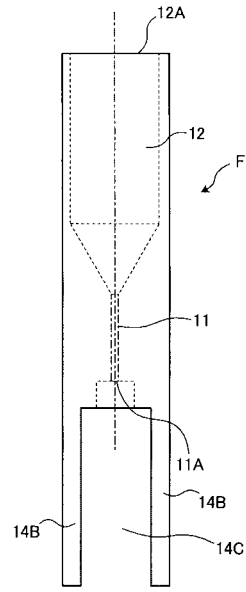
【図5】



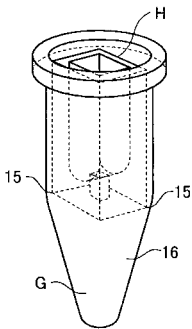
【図6】



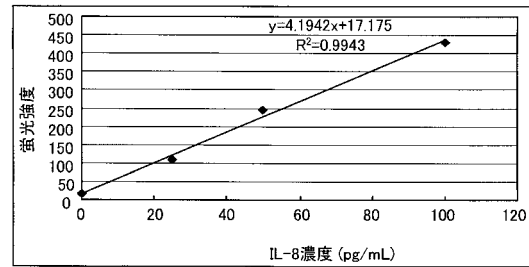
【図7】



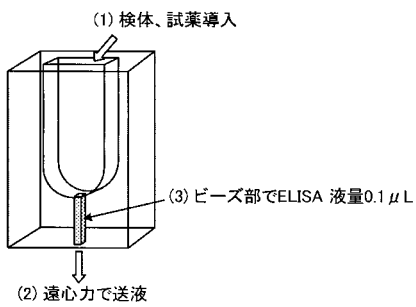
【図8】



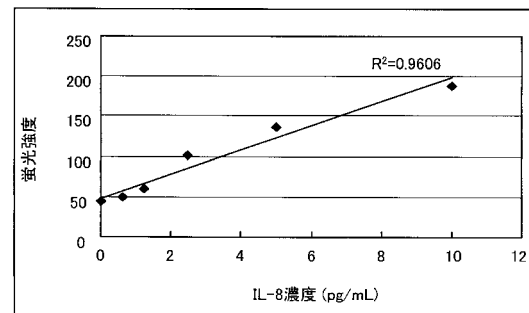
【図10】



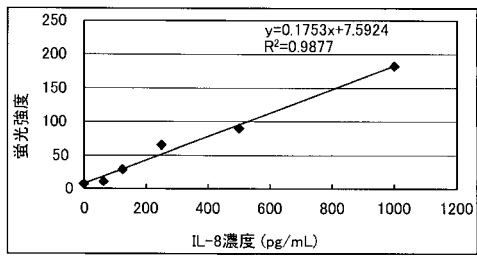
【図9】



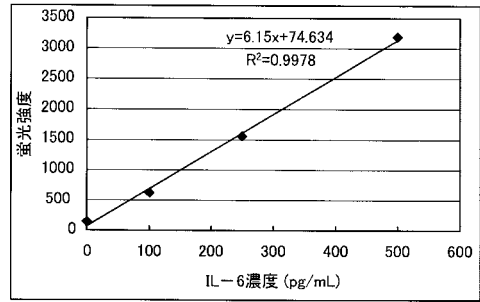
【図11】



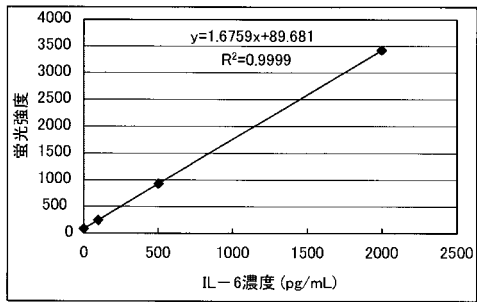
【 図 1 2 】



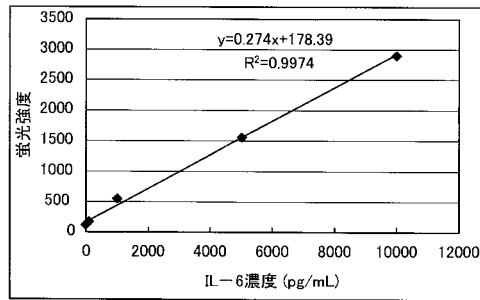
【 図 1 4 】



【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



---

フロントページの続き

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 特開2006-110523(JP,A)  
国際公開第2006/028174(WO,A1)  
特開2002-355025(JP,A)  
特開2006-329966(JP,A)  
国際公開第2006/080186(WO,A1)  
特開平04-059798(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
G01N 33/48-98  
G01N 35/00

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 免疫分析方法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP5407150B2</a>                                       | 公开(公告)日 | 2014-02-05 |
| 申请号            | JP2008044161  | 申请日     | 2008-02-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东丽株式会社  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 东丽株式会社  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 东丽株式会社  |         |            |
| [标]发明人         | 石井健太郎<br>日笠雅史<br>平松紳吾   |         |            |
| 发明人            | 石井 健太郎<br>日笠 雅史<br>平松 紳吾  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/543 G01N33/53 G01N35/00                                    |         |            |
| FI分类号          | G01N33/543.531 G01N33/53.P G01N35/00.D G01N33/543.521             |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G058/AA09 2G058/CC08 2G058/CC14 2G058/CD04 2G058/EA14 2G058/GA02 |         |            |
| 代理人(译)         | 酒井宏明  |         |            |
| 审查员(译)         | 吉田正志  |         |            |
| 优先权            | 2007050359 2007-02-28 JP  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2008241698A   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫测定方法，其能够容易地控制样品，试剂，基质等中的接触时间或接触量等条件，并且无论样品浓度如何都能进行有效的分析。解决方案：在该免疫测定方法中，具有存储与抗原和/或抗体结合的载体13的反应室11的分析仪相对于分析仪外部的旋转轴旋转，从而将样本和试剂12送入测量反应室和反应室中的样品质量。在该方法中，通过向分析器施加两个或更多个不同的离心力，可以获得具有每个不同测量范围的样本的两个或更多个测量结果。Ž

