

(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2004-333316

(P2004-333316A)

(43) 公開日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 1/00
GO 1 N 33/53
GO 1 N 33/531
GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 1/00 1 O 1 H
GO 1 N 33/53 U
GO 1 N 33/531 Z
GO 1 N 33/543 5 O 1 J

テーマコード (参考)

2 G O 5 2

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2003-130043 (P2003-130043)
(22) 出願日 平成15年5月8日 (2003.5.8)

(71) 出願人 393002634
キヤノン化成株式会社
茨城県つくば市茎崎 1 8 8 8 - 2
(74) 代理人 100075948
弁理士 日比谷 征彦
(72) 発明者 児玉 真優子
茨城県つくば市茎崎 1 8 8 8 - 2 キヤノ
ン化成株式会社内
Fターム(参考) 2G052 AA28 AB18 AD29 AD49 DA02
DA33 GA11 JA04 JA05

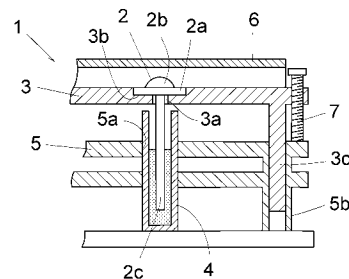
(54) 【発明の名称】 免疫測定用プローブの浸漬治具及び処理方法

(57) 【要約】

【課題】 溶液に浸漬させる免疫測定用プローブの長さを様々に変えることにより、高度な技術を必要とせず、複数種の抗体の固定・ブロック処理を行う。

【解決手段】 治具 1 は棒状のプローブ 2 を懸垂する懸垂部 3、抗体溶液を注入した円筒状の容器 4 を収納する収納部 5、プローブ 2 を保護する蓋部 6 から構成されている。懸垂部 3 にはプローブ 2 を懸垂するための孔部 3 a、段部 3 b が設けられ、プローブ 2 はその鉤部 2 a によって位置が固定されている。懸垂部 3 の四隅には円柱状の支柱 3 c が設けられ、収納部 5 に設けられたガイド 5 b に挿し込むことにより、懸垂部 3 を収納部 5 上に正確に降下できる。懸垂部 3 には下方に向けてストッパ 7 が取り付けられており、プローブ 2 の所望の長さを容器 4 内の溶液に浸漬させることができる。

【選択図】 図 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫測定用プローブを懸垂するための懸垂部と、溶液を注入し上部を開放した容器を収納するための収納部とから成り、前記収納部に前記懸垂部を降下して前記プローブを前記容器内の溶液に浸漬する際に、ストッパにより前記懸垂部を前記収納部に対して任意の位置で停止するようにしたことを特徴とする免疫測定用プローブの浸漬治具。

【請求項 2】

免疫測定用プローブを懸垂するための懸垂部と溶液を注入し上部を開放した容器を収納するための収納部とから成る治具を用い、前記収納部に前記懸垂部を降下して前記免疫測定用プローブを前記容器内の溶液に浸漬させる場合において、懸垂部、収納部の何れかに設けたストッパにより前記懸垂部を前記収納部に対して任意の位置で停止させ、前記溶液に前記免疫測定用プローブを所望の位置まで浸漬させることを特徴とする免疫測定用プローブの処理方法。

10

【請求項 3】

前記免疫測定用プローブは下端にファイバ部を備え、該ファイバ部を是容器内の溶液に浸漬させるようにした請求項 2 に記載の免疫測定用プローブの処理方法。

【請求項 4】

前記溶液は抗体を含む溶液であり、前記免疫測定用プローブに前記抗体を固定する請求項 2 又は 3 に記載の免疫測定用プローブの処理方法。

【請求項 5】

前記抗体は物理吸着により前記免疫測定用プローブに直接固定する請求項 4 に記載の免疫測定用プローブの処理方法。

20

【請求項 6】

前記抗体はビオチンを結合し、前記免疫測定用プローブに結合したアビジン又はストレプトアビジンを介して前記免疫測定用プローブに固定する請求項 4 に記載の免疫測定用プローブの処理方法。

【請求項 7】

前記溶液は抗体を固定した後に前記免疫測定用プローブの未反応部位への非特異的反応を防ぐブロック効果を有する成分を含み、抗体を固定した前記免疫測定用プローブにブロック処理を行う請求項 2 又は 3 に記載の免疫測定用プローブの処理方法。

30

【請求項 8】

前記免疫測定用プローブの下端から順に任意の長さを異なる複数種類の抗体溶液に浸漬することにより、複数の区画に区切って異なる抗体を固定する請求項 2 ～ 7 の何れか 1 つの請求項に記載の免疫測定用プローブの処理方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、主に抗原抗体反応により免疫測定を行うセンサにおいて、免疫測定用プローブに抗体を固定する免疫測定用プローブの浸漬治具及び処理方法に関するものである。

【0002】

40

【従来の技術】

従来において免疫測定を行う際には、例えば広く知られている E L I S A (酵素標識免疫測定法) のように、容器内に抗体を固定し抗原抗体反応を行わせる方法がある。このとき、容器はプローブを兼ねており、反応の場となる容器に抗体溶液を注入し抗体を固定する。目的の被加工物を液体に一部分だけ浸漬させて加工する装置としては、例えば特許文献 1 にめっきやコイルの先端を剥離させるための技術として提案されている。

【0003】

また、プローブ形状としては、例えば特許文献 2 でポリスチレン樹脂で成形したファイバ長 40 mm のプローブが知られている。

【0004】

50

【特許文献 1】

特開平 07 - 010265 号公報

【特許文献 2】

米国特許 6136611 号公報

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、免疫測定において高感度の測定を行うには、固定された抗体が安定した品質であることが重要である。固定に際して、温度や時間などが一定であることは勿論であるが、作業によって行われる場合に、高度な技術が必要であったり、技術の習熟度に左右されるようなことがあると、個人差が品質の要因となることがある。

10

【0006】

また、生産上コストを低く抑えることも求められ、例えば E L I S A の場合には容器がプローブを兼ねており、容器に抗体溶液を注入し所定の温度・時間で固定した後に抗体溶液を回収する。このときに使用する抗体溶液は、容器の容量によって決められ、回収・廃棄される抗体溶液には未反応の抗体が含まれる。また、複数のものを同時に浸漬処理する際には、全ての被処理物が納まる容量の液槽に、必要十分な量の溶液を用意することが一般的であるが、抗体には稀少であったり高価なものもあり、抗体溶液の使用量を最小限に抑えることが必須とされている。

【0007】

また、免疫測定がよく利用される食品や医療の分野では、安全性への期待から多種に渡る検査・分析を迅速に行うことが求められており、汎用性の高いセンサが必要となってくる。例えば、光ファイバの先端面を使用するセンサにおいては、反応に用いる面積は小さいため、複数種類の抗体を固定する方法は確立されておらず、1 個のセンサに対し 1 種類の免疫測定とならざるを得ない。複数種類の抗体を固定した免疫測定用プローブであれば、センサの汎用性が広がる可能性がある。

20

【0008】

本発明の目的は、上述の問題点を解消し、高品質のプローブを安定してかつ低コストで供給するために、必要量の溶液が注入された容器にプローブを浸漬させるための免疫測定用プローブの浸漬治具及び処理方法を提供することにある。

【0009】

30

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するための本発明に係る免疫測定用プローブの浸漬治具は、免疫測定用プローブを懸垂するための懸垂部と、溶液を注入し上部を開放した容器を収納するための収納部とから成り、前記収納部に前記懸垂部を降下して前記プローブを前記容器内の溶液に浸漬する際に、ストッパにより前記懸垂部を前記収納部に対して任意の位置で停止するようにしたことを特徴とする。

【0010】

また、本発明に係る免疫測定用プローブの処理方法は、免疫測定用プローブを懸垂するための懸垂部と溶液を注入し上部を開放した容器を収納するための収納部とから成る治具を用い、前記収納部に前記懸垂部を降下して前記免疫測定用プローブを前記容器内の溶液に浸漬させる場合において、懸垂部、収納部の何れかに設けたストッパにより前記懸垂部を前記収納部に対して任意の位置で停止させ、前記溶液に前記免疫測定用プローブを所望の位置まで浸漬させることを特徴とする。

40

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明を図示の実施の形態に基づいて詳細に説明する。

図 1 は治具の構成図を示し、図 2 は治具を使用して抗体を固定する場合の断面図である。抗体を固定させるための治具 1 は、主として、棒状の免疫測定用プローブ 2 を懸垂する懸垂部 3、抗体溶液を必要量注入し上部を開放した円筒状の容器 4 を収納する収納部 5、懸垂部 3 の上に被着し塵や埃の付着からプローブ 2 を保護する蓋部 6 から構成されている。

50

【0012】

懸垂部3には、プローブ2を懸垂するための複数の孔部3aが収納部5の容器4上に位置するように設けられており、これらの孔部3aの周囲には、プローブ2がその鍔部2aによって位置を固定できるように段部3bが設けられており、プローブ2を収納部5の孔部5aに取り付けた容器4の中心線に正確に一致させるようになっている。

【0013】

懸垂部3の四隅には円柱状の支柱3cが設けられ、これらの支柱3cを収納部5に設けられた円筒状のガイド5bに挿し込むことにより、懸垂部3は収納部5上に降下することができる。ガイド5bとしては、内部のローラにより円滑に昇降できるローラガイドを用いることが好ましい。また、懸垂部3には下方に向けて1個又は複数個のストッパ7が取り付けられており、このストッパ7は例えばねじにより適宜に長さを変え得るようにされている。このストッパ7により、懸垂部3を収納部5に重ねた場合に、プローブ2を容器4の底部まで挿し込まずに、途中の任意の位置で停止することができ、プローブ2の所望の長さを容器4内の溶液に浸漬させることが可能となる。

10

【0014】

プローブ2の形状の1つとして、鍔部2a上に設け光を導入するためのレンズ2b、レンズ2bに対して下方の垂直方向に配されたファイバ部2cが設けられている。プローブ2の材質には、透明度が高く耐水性に優れ、成型加工が容易かつ安価なポリスチレン、メタクリル樹脂、ポリカーボネート、或いはこれらを混合したものが好適である。

【0015】

抗体としては、*Escherichia coli* O157:H7（大腸菌O157）、*Salmonella Enteritidis*、*Salmonella Typhimurium*（サルモネラ菌）等の細菌に対する抗体、カゼイン、ヒスタミン等の化学物質に対する抗体、エンテロトキシン等の毒素に対する抗体を用いることができる。

20

【0016】

また、容器4に注入する溶液は抗体溶液に限らず、アビジン又はストレプトアビジンを介してビオチンを結合した抗体を固定する際に、プローブ2にアビジン又はストレプトアビジンを付着させるために使用してもよい。また、抗体を固定した後に、プローブ2の未反応部位への非特異的反応を防止するブロック処理を行うためのブロック溶液を注入して使用することもできる。ブロック溶液としては、カゼイン、スキムミルク、ウシ血清アルブミンを緩衝液に溶解したものが好適である。

30

【0017】

容器4の容量は特に限定されないが、プローブ2に固定される抗体又はブロックが十分足りる量であればよく、100～400 μ l程度でよい。溶液の性状によっては容器4が大きくなることもあるが、品質確認に基づいて数回使用してもよく、また容器4に溶液を注入する際には市販の分注機を使用することもできる。

【0018】

更に、プローブ2の下端から順に任意の長さで、異なる抗体をそれぞれ固定した後にブロック処理を行えば、複数種類の抗体が1つの区画に混在することなく、1個のプローブ2で複数種の抗体を固定することができ、つまり1個のセンサを用いるのみで、複数の抗原を対象とした免疫測定を行うことが可能となる。

40

【0019】

上述した抗体を固定するための動作が非常に簡便であることも、本実施の形態の治具1を用いる大きな特徴である。調製された溶液を容器4に定量注入して、容器4を収納部5の孔部5aに挿入し、収納部5に懸垂部3を重ねるだけで、特別な技術は必要とせず、個人差なく簡単に抗体の固定やブロック処理が行える。

【0020】

一般に、本実施の形態で用いるような小さいプローブ2を、細く容量の小さい容器4に納める場合に、プローブ2を容器4の内壁に接触させてしまう虞れがあるばかりか、それらの作業を大量に手作業で行うことは負担も大きい。しかし、本実施の形態の治具1を用い

50

れば、プローブ2を孔部3aに挿通し、鍔部2aによって位置決めが正確になされるので、プローブ2を容器4の内壁に接触させることなく、容器4の中心線に合わせて浸漬させることができる。

【0021】

また本実施の形態の治具1は小型化が可能で、市販の密閉箱内に納めることができるため、固定やブロック処理に長時間を要する際にも、乾燥による液面の低下に対して比較的寛容であり、オーバーフロー装置を取り付ける必要もない。

【0022】

このようにして抗体を固定し、ブロック処理を行ったプローブ2をセンサとして用いる一例として、図3に示すように励起光の導入と蛍光の収集を併せて行う免疫測定装置により、免疫測定を行うことができる。即ち、レーザー光源11からの光束をビームスプリッタ12で反射させてプローブ2のレンズ2bに向けて照射し、プローブ2からの反射光をビームスプリッタ12を透過させて検出器13により測定する。

10

【0023】

プローブ2上では、抗原抗体反応により抗体と抗原が結合し、更に抗原は蛍光色素で標識された抗体と結合する。ここに、レーザー光源11からのレーザー光を導入すると、蛍光色素が励起されて蛍光を得るので、この蛍光を検出器13により測定する。

【0024】

以下に、浸漬させるプローブ2の長さにより抗体の固定長を変える場合に、免疫測定における信号応答の変化を実験例を説明する。

20

【0025】

[実験例1] 米国特許6136611号公報に記載のものと同様の形状に、ポリスチレン樹脂で成形したファイバ長40mmのプローブ2を懸垂した懸垂部3を、リン酸緩衝液(pH7.4)で調製した濃度100μg/mlのストレプトアビジン溶液を満たした内容量400μlの容器4を納めた収納部5に降下し、アビジンの付着長40mmとなるようにプローブ2を浸漬し、37において30分保持した後に、4で16時間保持しストレプトアビジンの付着を行った。

【0026】

所定時間経過の後に懸垂部3を引き上げ、ビオチン結合された濃度5μg/mlの抗Salmonella Typhimurium(サルモネラ)精製抗体(ウサギ)を満たした内容量400μlの容器4を納めた別の収納部5に降下させ、固定長40mmとなるように浸漬し、4で16時間保持し抗体を固定した。

30

【0027】

更に、所定時間経過後に懸垂部3を引き上げ、リン酸緩衝液(pH7.4)で調製した濃度1%のウシ血清アルブミン溶液を満たした内容量400μlの容器を納めた別の容器4を納めた更に別の収納部5に降下させ、ブロック長40mmとなるようにプローブ2を浸漬し、室温で1時間保持しブロックを行った。

【0028】

図3に示す免疫測定装置において免疫測定を行い、プローブ2に抗体が固定されていることを確認するために、アマシャムバイオサイエンス社製 蛍光色素Cy5 bisfunctional reactive dyeにより標識された濃度5μg/mlの抗ウサギ抗体を反応させ、レーザー光源11から出射したレーザー光により蛍光色素を励起させて検出器13により電気信号を得た。

40

【0029】

[実験例2] 実験例1と同様にして、固定長20mmとなるようにストレプトアビジンを介してビオチン結合された抗Salmonella Typhimurium(サルモネラ)抗体を固定し、ブロック長40mmとなるようにブロックを行ったものを作製し、蛍光色素により標識された濃度5μg/mlの抗ウサギ抗体を反応させ、レーザー光により蛍光色素を励起させ検出器13から電気信号を得た。

【0030】

50

【実験例 3】 実験例 1 の工程において抗体の固定を行わず、ブロック長 40 mm となるようにブロックのみを行ったものを作製し、蛍光色素により標識された濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ウサギ抗体を反応させ、レーザー光により蛍光色素を励起させ検出器 13 により電気信号を得た。

【0031】

図 4 は実験例 1 ~ 3 において得られた検出器 13 の電気信号について、蛍光色素により標識された抗ウサギ抗体を反応させる前のレーザー光導入時の電気信号を初期値として、初期値からの増加分をプロットしたグラフ図である。固定長 0 mm は実験例 3 の抗体の固定を行わなかったものである。抗体の固定長の範囲において、定量性のある信号の応答が得られた。

10

【0032】

【実験例 4】 この実験例 4 には、本実施の形態の治具 1 を用いて 1 度に複数個のプローブ 2 を作製したときの免疫測定における安定性を評価した例である。実験例 1 と同様にし、ストレプトアビジンを付着させた 64 本のプローブ 2 に固定長 40 mm となるように、ピオチン結合された Kirkgaard & Perry Lab 社製抗 *Escherichia coli* O157:H7 (大腸菌) 抗体を固定し、更にウシ血清アルブミン溶液によりブロック処理を行った。このとき、13 cm 角に 64 個の容器 4 を納めた高さ 5 cm の治具 1 を密閉箱に納めた。

【0033】

この方法により作製したプローブ 28 本を用いて、図 3 の免疫測定装置により免疫測定を行った。菌数 4×10^3 CFU/ml の *Escherichia coli* O157:H7 (大腸菌 O157) 抗原を反応させ、更にアマシャムバイオサイエンス社製蛍光色素 Cy5 bisfunctional reactive dye により標識された濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 *Escherichia coli* O157:H7 (大腸菌 O157) 抗体を反応させ、レーザー光により蛍光色素を励起させて検出器 13 から電気信号を得た。抗原及び標識された抗体を反応させる前のレーザー光導入時の電気信号を初期値として、抗原抗体反応による初期値からの増加分は全て 20 ~ 30 pA であった。

20

【0034】

本実施の形態のように、容器 4 が異なる複数の収納部 5 を交換してプローブ 2 を所定長だけ浸漬するには、ストッパ 7 は懸垂部 3 に取り付けただけの方がよいが、溶液の種類ごとに浸漬長を変えるような場合には、ストッパ 7 は収納部 5 に固定してもよい。

30

【0035】

【発明の効果】

以上説明したように本発明に係る免疫測定用プローブの浸漬治具及び処理方法は、高度な技術を必要とせず、個人差がなく簡便に抗体の固定やブロック処理を安定して行うことができる。また、プローブを懸垂する懸垂部を容器を納める収納部に降下させてプローブを溶液に浸漬させる際に、ストッパにより所望の位置まで浸漬させることにより、位置を様々に変えて複数種の抗体の固定・ブロック処理を行えるため、1 個のプローブで複数種の抗体を固定する、つまり 1 個のセンサを用いるのみで複数の抗原を対象とした免疫測定を行うことが可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 治具の構成図である。

【図 2】 抗体を固定する場合の断面図である。

【図 3】 測定装置の光学系の構成図である。

【図 4】 実験例により得られる蛍光の信号強度の増加分のグラフ図である。

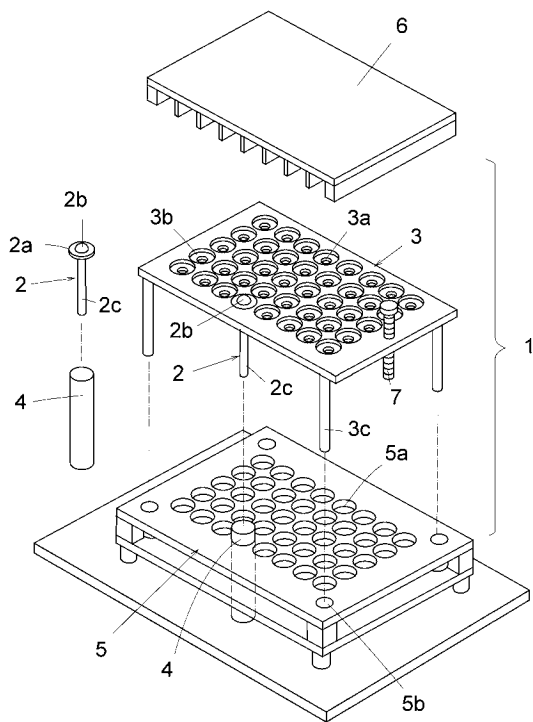
【符号の説明】

- 1 治具
- 2 免疫測定用プローブ
- 3 懸垂部
- 4 容器

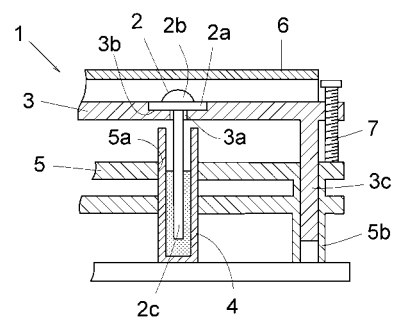
50

- 5 収納部
- 6 蓋部
- 7 ストップバ
- 1 1 光源
- 1 2 ビームスプリッタ
- 1 3 検出器

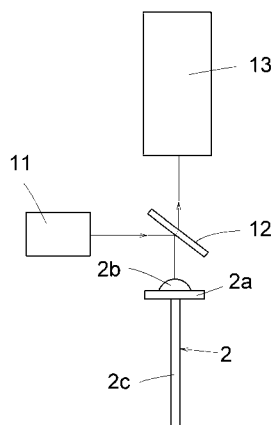
【図 1】



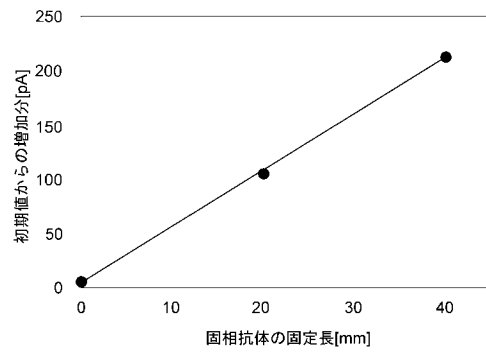
【図 2】



【図 3】



【図 4】



专利名称(译)	用于免疫测定探针和处理方法的浸入式夹具		
公开(公告)号	JP2004333316A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2003130043	申请日	2003-05-08
[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	G01N33/53 G01N1/00 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N1/00.101.H G01N33/53.U G01N33/531.Z G01N33/543.501.J		
F-TERM分类号	2G052/AA28 2G052/AB18 2G052/AD29 2G052/AD49 2G052/DA02 2G052/DA33 2G052/GA11 2G052/JA04 2G052/JA05		
代理人(译)	日比谷幸彦		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：通过改变将要浸入溶液中的免疫测定探针的各种长度来进行多种类型的抗体的固定/阻断处理，而无需高级技术。 解决方案：夹具1由用于悬挂棒状探头2的悬挂部件3，用于存储注射有抗体溶液的圆柱形容器4的存储部件5和用于保护探头2的盖部件6组成。 悬架3设置有用于使探针2悬吊的孔3a和台阶3b，并且探针2的位置通过凸缘2a固定。 在悬架部3的四个角设有圆柱体3c，通过将悬架部3插入设置在收纳部5中的引导件5b，能够将悬架部3准确地下降到收纳部5。 塞子7向下附接到悬挂部分3，使得期望长度的探针2可以浸入容器4中的溶液中。 [选择图]图2

