

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5879189号
(P5879189)

(45) 発行日 平成28年3月8日(2016.3.8)

(24) 登録日 平成28年2月5日(2016.2.5)

(51) Int.Cl.	F 1	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 0 1 F
GO 1 N 35/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 27/74 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
請求項の数 3 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-100548 (P2012-100548)	(73) 特許権者	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(22) 出願日	平成24年4月26日(2012.4.26)	(74) 代理人	100100310 弁理士 井上 学
(65) 公開番号	特開2013-228280 (P2013-228280A)	(74) 代理人	100098660 弁理士 戸田 裕二
(43) 公開日	平成25年11月7日(2013.11.7)	(74) 代理人	100091720 弁理士 岩崎 重美
審査請求日	平成27年1月9日(2015.1.9)	(72) 発明者	溝口 崇子 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
		(72) 発明者	川畑 龍三 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 交流磁場を用いた磁気的免疫検査方法及び検査装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被測定物質を含むことが想定される溶液と、前記被測定物質に特異的に結合する第1の結合体が固定化された規定量の磁気粒子とを所定の試料容器内で混合する第1の過程と、
前記試料容器内で前記被測定物質と結合した磁気粒子が凝集、沈殿するのを促進する第2の過程と、

前記試料容器内の溶液を励磁し、該溶液の上清に残存する未結合の磁気粒子からの磁気信号を計測する第3の過程を有し、

得られた磁気信号の強度から前記被測定物質を検出もしくは定量を行い、

前記第2の過程では、前記試料容器の下部に分離用磁場を印加することを特徴とする磁気的免疫検査方法。

10

【請求項 2】

被測定物質を含むことが想定される溶液と、前記被測定物質に特異的に結合する第1の結合体が固定化された規定量の磁気粒子とを所定の試料容器内で混合する第1の過程と、
前記試料容器内で前記被測定物質と結合した磁気粒子が凝集、沈殿するのを促進する第2の過程と、

前記試料容器内の溶液を励磁し、該溶液の上清に残存する未結合の磁気粒子からの磁気信号を計測する第3の過程を有し、

得られた磁気信号の強度から前記被測定物質を検出もしくは定量を行い、

前記第2の過程は、前記試料容器に遠心力をかける過程であることを特徴とする磁気的

20

免疫検査方法。

【請求項3】

被測定物質を含むことが想定される溶液と、前記被測定物質に特異的に結合する結合体が固定化された磁気粒子との混合溶液を保持する試料容器を搬送する試料台と、

前記試料容器中で前記被測定物質と結合した磁気粒子が凝集、沈殿するのを促進する分離促進手段と、

前記試料台による搬送により前記分離促進手段を通過した試料容器に励磁用磁場を印加する励磁手段と、

前記励磁用磁場が印加された状態で該試料容器の上清部分からの磁気信号を計測する磁気センサとを備え、

前記分離促進手段は前記試料容器の下部に分離用磁場を印加する手段であることを特徴とする磁氣的免疫検査装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、磁気センサを用いて液体中に含まれる磁性粒子量を測定する技術のうち、特に抗原、抗体、腫瘍マーカー、細胞成分などのタンパクや、微量なホルモン物質などを測定する免疫測定技術に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、アレルギーや感染症、腫瘍マーカーおよび甲状腺ホルモンなどの検査項目に用いられているのは抗原抗体反応を原理とする免疫学的測定法が主である。免疫学的測定法には放射性同位元素を使用するRIA (Radio Immuno Assay)、酵素を使用するEIA (Enzyme Immuno Assay)、および酵素と化学発光基質を組み合わせたCLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immuno Assay) など様々な高感度測定方法がある。一方、これらの高感度な免疫学的測定法に対して、扱いの容易さから免疫比濁測定が多用されている。免疫比濁測定は1~数種類の抗体を用い、それらの抗体で抗原をサンドイッチにする抗原抗体反応と、その反応によって生成した複合体を沈降させた後に、上清中の溶液の濁度や透過度の変化を指標として被測定物質を検出する手法である。これらの光学的手法は溶液の濁度や発色、微量な蛍光・発光物質の変化を測定することで、被測定物質の検出を行うものであるが、反応工程の途中で生じる未結合のマーカーを洗浄する工程 (B/F分離) が必要なために作業工程が煩雑化する。また反応溶液に混濁や着色がある場合には、検出精度が低下することが課題であった。

【0003】

この課題を解決するひとつとして、磁氣的計測技術が挙げられる。磁氣的計測とは、磁気センサを用いて、被測定物質に結合した磁性粒子を検出する方法である。この方法には磁性粒子の測定原理の違いにより、磁化率測定、残留磁気測定などが報告されている (非特許文献1、2、3)。また、被測定物質に結合しなかった余剰の磁性粒子の量を磁気信号として測定する交流磁化測定方法に関しては非特許文献4に示される。ELISAなどの免疫検査では、被測定物質に結合しなかった余剰の標識物質などを洗浄除去する工程が必要であるが、この非特許文献4に示された手法は洗浄工程が不要なために迅速な測定が可能である。また磁気センサの冷却や磁気遮蔽を必要としないため、装置構成の簡易化が可能であるなどの利点がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2001-33455号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】K. Enpuku et al.: Jpn. J. Appl. Phys. 38、p.L1102 (1999)

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Y. R. Chemla et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97、 p.14268 (2000)

【非特許文献3】R. Koetitz et al.: IEEE Trans. Appl. Supercond. 7、 p.3678 (1997)

【非特許文献4】R. Kawabata et al.: IEEE Sensors Conference (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

交流磁化測定の方法は以下の2段階に分けられる。第一に被測定物質に結合するマーカー(抗原、抗体、リガンド等)を固定化した磁性粒子を用いて、被測定物質と混合させる。第二に、磁性粒子と被測定物質の混合溶液に交流磁場を励磁し、磁性粒子から発する磁気信号を測定することで、被測定物質の定量が可能となる。通常、第二段階では、被測定物質と未結合の磁性粒子から発する信号のみが、ブラウン緩和時間が短く、励磁磁場に追従できることから検出が可能である。一方、被測定物質と結合した磁性粒子はブラウン緩和時間が長いから、信号は検出されない。

10

【0007】

磁性粒子としては、酸化鉄系のフェライト粒子を主に用いることができ、更に磁化率を高めるためにはコバルトやニッケルなどを含んだ粒子も用いることができる。より望ましい粒子の特性としては、数10~200nmの粒径で、残留磁気特性の強い粒子が挙げられる。これは磁性体の持つ磁気モーメントが磁性粒子のブラウン緩和由来となるため、励磁した交流磁場に、磁気モーメントが効率良く追従でき、高い磁気信号を示すからである。しかしながら、残留磁気の高い磁性粒子は分散性が悪く、凝集しやすい傾向を持つことから、取扱いが難しい。一方、超常磁性の強い磁性粒子は分散性が良く、取扱いも容易であるが、粒径が小さい場合にはニール緩和由来の磁気モーメントをもつことが多い。このようなニール緩和由来の磁気モーメントを有する磁性粒子では、励磁した交流磁場に追従しない粒子においても、高い磁気信号を発する。このため、未結合の磁性粒子から発する磁気信号成分だけでなく、結合した磁性粒子から発する磁気信号成分も検出してしまい、測定精度が著しく低下する。

20

【0008】

このように、分散性の点で優れる超常磁性の特性を持つ磁性粒子を用いた場合には、被測定物質と結合した磁性粒子からも信号が検出され、ブラウン緩和時間の差を利用した交流磁化測定法の検出精度が低下する問題が生じる。したがって、本発明の目的は、交流磁化測定を用いた磁気的免疫検査において、被測定物質と結合した磁性粒子からの磁気信号の混入を抑制し、もって用いる磁性粒子の制限を緩和してしかも測定精度を高く保てる磁気的免疫検査方法及び検査装置を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の代表的な実施例にしたがう免疫検査方法は、被測定物質と結合した磁性粒子を沈殿させ、上清に残存した未結合の磁性粒子を測定することで、使用する磁性粒子の制約を広げ、しかも精度の高い交流磁化測定を可能とする。より具体的には、本発明の磁気的免疫検査法では、試料溶液と、被測定物質に特異的に結合する抗体、抗原またはリガンドを固定化した既知量の磁性粒子とを非磁性の試料容器にて混合し、試料容器中で結合反応させる。次に、被測定物質を介して互いに結合した磁性粒子を沈殿させ、試料容器を交流磁場下に設置して試料溶液を励磁し、前記試料溶液中に未結合のまま浮遊している磁性粒子から発する磁気信号成分を検出して、試料溶液中に存在していた被測定物質を同定もしくは定量する。

40

【0010】

詳細には、上記の目的試料溶液に対する励磁、磁気信号計測を行うのに先立ち、試料溶液に添加するのと同量の磁性粒子を含み、被測定物質を全く含まない対照試料(control sample)に対して励磁、磁気信号計測を行う。被測定物質の有無以外の条件を等しくするた

50

め、目的試料溶液の励磁と磁気信号計測に用いるのと同じ励磁用コイル、磁気センサを用い、試料容器の種類、溶液の量、磁気センサとの位置関係等も目的試料溶液の励磁及び磁気信号計測の時と同じにする。そうして得た対照試料からの磁気信号強度を B_0 とし、引き続き行う目的試料溶液の励磁と磁気信号計測で得た磁気信号強度を B とすると、磁気信号強度の変化率 $= \{ 1 - B / B_0 \} \times 100[\%]$ から試料溶液中の被測定物質の量が決定できる。

【0011】

さらに詳細を述べると、被測定物質との特異的な結合のために用いる抗体やリガンドの種類、その抗体やリガンドの製造ロットの違い等により生じる結合効率の変動と、それによる検出感度の変動を克服するために、検量線法(calibration curve method)を適用する。すなわち、使用する抗体やリガンドの種類毎に、またその製造ロット毎に、あるいは更にその他の測定条件を変更する毎に、検量線を取得し、上述の、目的試料溶液の計測で得た磁気信号強度 B と B_0 とから求めた変化率 に対応する被測定物質の含有量を、その検量線から読み出すことにより、計測した試料溶液に含有していた被測定物質の量を決定する。

【0012】

ここで用いる検量線は、次のようにして取得する。まず、計測対象である試料中の想定される被測定物質の量の範囲をカバーする複数の標準量の被測定物質を溶液種にそれぞれ含有し、それぞれ上述の既知量の磁性粒子を添加した複数種類の標準試料を準備する。磁性粒子のみ含み被測定物質を含まない上述と同様な対照試料と、これら複数の標準試料のそれぞれを、上述の試料溶液の励磁、沈殿、磁気信号計測のプロセスと同じプロセスに順次供する。対照試料の磁気計測で得た磁気信号強度 B_0 と、各標準試料の磁気信号計測で得た磁気信号強度 B_n ($n = 1, 2, 3 \dots$) との変化率 $n = \{ 1 - B_n / B_0 \} \times 100[\%]$ ($n = 1, 2, 3 \dots$) をそれぞれ求める。被測定物質の含有量を横軸とする2次元面に上記のように求めた変化率 n ($n = 1, 2, 3 \dots$) の値をプロットし、プロットされた点をつなげて、或いは更に線の平滑化の処理をして検量線を得る。

【0013】

本発明の磁氣的免疫検査方法で採用する交流磁化計測の要点は、被測定物質と結合済みの磁性粒子からの磁気信号の混入を抑制し、未結合で溶液中に残存している磁性粒子の量を示す磁気信号成分を正確に検出する点である。凝集、沈殿による分離を促進する意味で、分離用磁場(交流磁場または直流磁場)を印加するのが有効である。また、免疫検査装置としては、沈殿した凝集体からの磁気信号の影響を避けて上清の部分の磁気信号を検出が容易なように、縦長チューブ状の反応容器を採用する、局所的な感度を有する磁気センサを採用する、試料容器と磁気センサとの相互位置を自在に調整する機構を備える等の工夫が有効である。

【0014】

更には、試料溶液と、被測定物質に特異的に結合する抗体、抗原またはリガンドを固定化した磁性粒子に加えて、前記被測定物質に結合する第2の抗体、抗原またはリガンドを固定化したビーズ担体を溶液の中に入れ、被測定物質を挟んだサンドイッチ反応により磁性粒子とビーズ担体とを試料溶液中で結合させる構成も、本発明の概念に含まれる。このビーズ担体は、溶液中で一旦は分散して懸濁状態となり、且つ磁性粒子との結合により凝集して速やかに沈殿するように材質等を選ぶべきである。担体の大きさ、材料の比重や親水性などの要素がこれらの性質に影響する。代表的にはポリスチレンビーズがこの担体として適切である。

【0015】

また別の変形として、内面の一部を、被測定物質を特異的に結合する抗原または抗体を固定化した面とした反応容器を用いるという変形も可能である。この場合には、試料溶液中の磁性粒子は被測定物質を介して試料容器の壁面に凝集する反応が起きる。よって、反応後の試料溶液の磁気信号を交流磁場下で検出することで溶液に残存する磁性粒子の量が計測され、これを基に試料溶液中に存在していた被測定物質の同定もしくは定量ができる

10

20

30

40

50

。この変形においても、壁面に結合して被着した磁性粒子からの磁気信号の混入を避けるとの観点から、被測定物質を特異的に結合する抗原または抗体を固定化した面を反応容器の底部付近などの局所に限定し、ここを避けて磁気計測することが有効である。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、超常磁性の高い特性を持つ磁性粒子を用いた場合でも、洗浄工程を入れずに、被測定物質と結合した磁性粒子からの信号成分の混入を低減することができるため、精度の高い交流磁化測定法を実現することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の実施例の免疫検査装置の構成を示すブロック図である。

【図2】実施例の試料容器内の反応を示す模式図である。

【図3】結合済みの磁気粒子の分離手段を変形した免疫検査装置の主要部を示すブロック図である。

【図4】実施例で実施される免疫検査方法の手順を示すフローチャートである。

【図5】実施例にて試料容器が配列され順次計測される様子を示す概念図である。

【図6】実施例にて取得された検量線の例を示す特性図である。

【図7】分離メカニズムの変形例を示す概念図である。

【図8】分離メカニズムの別の変形例を示す概念図である。

【図9】実施例の効果を実証する実験の結果を示す特性図である。

【図10】実施例の効果を実証する実験（沈殿計測）の結果を示す特性図である。

【図11】実施例の効果を実証する実験（上清計測）の結果を示す特性図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

<実施例1>

本発明の第1の実施例で使用する免疫検査装置は図1に示すような装置構成を有する。主な構成は以下のとおりである。

【0019】

磁性粒子を励磁するための励磁用コイル10はコの字型のコアに巻かれており、交流信号発生器21により駆動される。検査試料は、円盤型の試料台13の円周上に設置された試料容器12に入れられる。試料台13は、DCモータ14によって回転移動する。モータドライバ28はDCモータ14を駆動し、その回転を制御する。配列する試料容器を12は、この試料台13の回転により、まず分離用磁場を印加するコイル17の位置に設置され、次に励磁コイル10のコアのギャップ内に設置される。

【0020】

励磁用コイル10のコアのギャップ内には磁気抵抗効果素子（MRセンサ）15を備え、同じギャップ内に試料容器12が配置されると容器内の磁性粒子が励磁用コイル10から発する交流磁気により磁化されて、その磁性粒子からの磁気信号が検出される。詳細には、MRセンサ15の素子出力はMRセンサアンプ23で増幅され、ロックインアンプ25で同期検波される。同期検波のための参照信号は振幅位相調整器22で制御された交流信号発生器21から与えられる。同期検波により得た出力信号はフィルタ回路25、AD変換器26を経てデータ収集器27に格納される。これにより、極小値と極大値を持つ分散型波形が得られる。この分散型波形における極大値と極小値の差（ピーク間強度）を磁性粒子から発生した磁気信号強度とする。

【0021】

試料容器12で起きる反応について、図2をも参照して詳細に説明する。検査対象の試料溶液に、ビーズ担体と磁性粒子とを添加して測定用の試料溶液を作成する。定量または同定の対象である被測定物質1は、例えば抗原である。磁性粒子4にはその抗原と特異的に結合する第1の抗体41が固定されている。また、ビーズ担体3の表面には被測定物質1と特異的に結合する第2の抗体43が固定されている。ここで、添加する磁性粒子4の量は、

10

20

30

40

50

試料溶液中で被測定物質 1 と結合する第 1 の抗体41の量に換算して、被測定物質の想定した最大量に相当する、もしくは更に過剰な規定の量である。またビーズ担体 3 の量は、試料溶液中の磁性粒子4の全てを、被測定物質を介して結合するのに十分な量である。つまり、添加するビーズ担体 3 の量は、固定された第 2 の抗体43の量に換算して、磁性粒子4の添加量（ただし、こちら固定された第 1 の抗体41の量）に相当する量、もしくは更に過剰な量である。

【 0 0 2 2 】

この試料溶液をかくはんして十分な時間をおくと、図 2 に示す状態となる。被測定物質である抗原 1 は磁性粒子4に固定された第 1 の抗体41、およびビーズ担体3に固定された抗体43と結合する。これにより、磁性粒子とビーズ担体の結合体が生じる。この結合体は互いに凝集し容器12の底部に沈殿する。一方、試料溶液中には、抗原と結合しない磁性粒子が残存する。このように、試料溶液には磁性粒子とビーズ担体の結合体、および未結合の磁性粒子が混在している状態である。

10

【 0 0 2 3 】

このとき、未結合の磁性粒子は試料溶液中でランダムに移動かつ回転運動しており、磁性粒子の磁化は時間とともに指数関数的に減衰する。この現象はブラウン緩和と呼ばれ、磁性粒子の体積に比例し、その緩和時間は、 $\tau = 3 V / kBT$ で表される（ η は検査溶液の粘度、 V は磁性粒子の体積、 kB はボルツマン定数、 T は温度）。また、体積 V は磁性粒子の直径 d によって、 $V = (\pi/6)d^3$ で表される。ここで、直径0.1ミクロンの磁性粒子と直径3.2ミクロンのポリスチレン担体の結合体の直径が $3.3 \mu\text{m}$ とした場合、緩和時間 τ は14秒である。一方、直径0.1ミクロンの磁性粒子では、緩和時間 τ は0.4ミリ秒となり、結合体の緩和時間の約1/3000と非常に小さい。この結合体と磁性粒子のブラウン緩和時間の差を利用することで、同じ試料溶液中に結合体と未結合の磁性粒子が混在した状態において、未結合の磁性粒子からの磁気信号成分を抽出することが可能である。また被測定物質を含まず、目的試料と同様に規定の量の磁性粒子を添加した対照試料の測定結果を用いれば、その対照試料からの磁気信号出力を基準とした目的試料からの磁気信号出力の変化率により、結合済みの磁性粒子の量、すなわち目的試料に含まれていた被測定物質の量が算出できる。しかしながら、磁性粒子が強い超常磁性の特性を持つ場合には、結合体に含まれる磁性粒子のニール緩和由来の磁気信号が発生する。そのため、前述の変化率が実際よりも低値で検出されることがある。そこで本実施例の免疫検査装置は、被測定物質と結合済みの磁性粒子からの磁気信号の混入を抑制して負測定物質の定量に誤差が発生しないようにする構成をとる。

20

30

【 0 0 2 4 】

図 1 を参照して実施例の免疫検査装置の詳細な動作の説明を続ける。試料溶液にビーズ担体と磁性粒子とを添加してかくはんした試料容器12を試料台13に置き、試料台13の回転により分離用の交流磁場を発生する分離用コイル17の位置に進める。この分離用磁場は、溶液中に分散したビーズ担体3の凝集、沈殿を促進する働きを果たす。その磁場強度は1 ~ 5 m T 程度が適切である。必要以上の強度の磁場を印加すると、抗原と結合しないで溶液中に残存する磁性粒子までも凝集させるといった弊害が生じる可能性がある。なお分離用コイル17からの交流磁場に代えて、直流磁場を印加するように装置構成を变形してもよい。図 3 はその变形した免疫検査装置の主要部を示す。図 1 の装置の分離用コイル17に代えて、永久磁石 1 8 が位置調整用ステージ36のアームに付けられている。これにより、試料容器12は底部から直流磁場を受ける。

40

【 0 0 2 5 】

試料容器12は分離用コイル17の位置で凝集沈殿のための磁場を受けた後に、励磁用コイル10の位置に進められ、上記したようにMRセンサ15により、未結合で溶液中に浮遊する磁性粒子の磁気信号を検出する。具体的には、位置調整用ステージ35、36により励磁用コイル10とMRセンサ15が試料容器12の内部の上清38に対応する高さ配置されるように予め調整しておく。これにより、試料容器12の底部に沈殿しているビーズ担体と磁性粒子の結合体39からの磁気信号成分の混入を抑制する。この結合済みの磁性粒子からの磁気信

50

号成分の抑制の必要性、またそのための変形構成については、後に詳述する。次に、本実施例の免疫検査装置を使用した代表的な磁氣的免疫検査方法の手順を説明する。

【0026】

実施例の磁氣的免疫検査方法では、被測定物質との特異的な結合のために用いる抗体やリガンドの種類、その抗体やリガンドの製造ロットの違い等により生じる結合効率の変動、あるいは種々条件の変化による検出感度の変動を克服するために、検量線(calibration curve method)を適用する。

【0027】

図4のフローチャートを参照する。本実施例の磁氣的免疫検査方法は、第1段階61で対照試料の計測、第2段階62で複数の標準試料の計測、第3段階63で検量線の決定及び記録、第4段階64で目的試料の計測という手順で進められる。この第1段階から第3段階までは、使用する抗体やリガンドの種類およびその製造ロット毎に、あるいは更にその他の測定条件を変更する毎に行われる。対象試料とは、磁性粒子を規定量添加した、しかも試料容器内で溶液の量を規定値に調整した試料である。また、第2段階62で計測する複数の標準試料とは、想定される被測定物質の量の範囲をカバーする複数の標準量の被測定物質をそれぞれ含有し、上述の規定量の磁性粒子をそれぞれ添加し、それぞれ試料容器内の量を所定の量に調整した試料である。

【0028】

図5は上記の調整した試料容器が試料台13に配置され、試料が分離のプロセス、励磁および磁気計測のプロセスに順次供される様子を示す。実際には円盤型の試料台13により円周に沿って移動するが、図5では便宜的に上から下へ移動するように示している。図5(a)は、配列する試料のうちの先頭の対照試料CSは計測領域100、つまりコイル10からの励起用の磁場が印加される領域に移送されており、ここで磁気計測が行われる。配列の後方には標準試料RS-1、RS-2、RS-3、RS-4、・・・と順に並んでおり、そのうち標準試料RS-2とRS-3は分離領域170、つまりコイル17からの分離用磁場が印加されている領域にある。計測が終わると全体を1コマ移動させ、図5(b)の状態とする。つまり標準試料RS-1が計測領域に進み、磁気計測を受ける。以降、試料台13を1コマずつ移動させ、順次計測を進めることにより、第1段階61の対照試料の計測、及び第2段階62の複数の標準試料の計測を行う。この計測を1回で完了する場合には、対照試料CSおよび標準試料が計測領域100を1回通過した後に試料台から撤去しても良い。また複数の信号の加算平均処理を行ってS/N比を向上させることを目的として、対照試料CSおよび標準試料を載せた試料台13を5～10回以上回転させ、計測領域100を複数回通過して計測することも有効である。

【0029】

次に第3段階63では、対照試料CSの磁気計測で得た磁気信号強度 B_0 とし、各標準試料RS-n($n=1, 2, 3, \dots$)の磁気信号計測で得た磁気信号強度を B_n ($n=1, 2, 3, \dots$)とし、 B_n の値の B_0 から順次(数1)により変化率 n ($n=1, 2, 3, \dots$)を求める。

【0030】

$$n = \{ 1 - B_n / B_0 \} \times 100[\%] \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad \dots \dots (数1)$$
さらに被測定物質の含有量を横軸とする2次元面上記のように求めた変化率 n ($n=1, 2, 3, \dots$)の値をプロットし、プロットされた点をつなげて、或いは更に線の平滑化の処理をして検量線を得る。得られた検量線の例を図5に示す。

【0031】

次に第4段階64では目的試料を準備して計測する。検査の対照である試料それぞれに上記の規定量の磁気粒子を添加し、上記と同じ規定量に調整した目的試料を準備し、試料台13に並べる。複数部位からの試料、あるいは複数の被検体からの試料など、複数の目的試料を並べて順次計測が可能である。図4(c)は目的試料OS-1、OS-1、OS-3、OS-4が並べられ、先頭のOS-1が計測領域に到達して計測されている様子を示す。各目的試料の計測で得た磁気信号強度を B とし、先に第1段階で取得した対照試料の磁気信号強度 B_0

10

20

30

40

50

に対するBの値の変化率 を(数2)から求める。

【0032】

$$= \{1 - B/B_0\} \times 100 [\%] \cdots \cdots (\text{数}2)$$

この変化率 の値と、先に決定した検量線とから目的試料の試料溶液中に存在した被測定物質の量を決定する。以上で第4段階を終了する。

【0033】

なお上記の手順の説明では、第4段階での(数2)による変化率の算出に第1段階で取得していた対照試料の磁気計測信号強度 B_0 を用いた。しかし、検量線を求めるための第1～第2段階と、第4段階とで計測の環境条件等に変化が生じる場合には、第4段階での目的試料の計測に先だて、改めて対照試料を調整して計測を実行し、磁気計測信号 B_0 の値を取得するのが良い。すなわち、図5(c)に破線で示す通り、一連の目的試料OS-1、OS-1、OS-3、OS-4の配列の前方に対照試料CSを並べ、(数2)の変化率算出に用いる磁気計測信号 B_0 の値を、一連の目的試料の計測時に計測する。この場合でも、検量線そのものは、環境条件の変化による検出感度の変化に関わらず、第1～第2段階の計測から得た検量線そのまま用いることができる。

<変形例>

上記の実施例では、被測定物質が抗原であり、磁気粒子及びビーズ担体に固定されて抗原と特異的に結合する結合体は抗体であった。被測定物質が抗体であり、磁気粒子及びビーズ担体に固定されている結合体が抗原であっても良い。また他の特異的、選択的結合を利用して磁性粒子とビーズ担体との結合反応をさせるようにも変形可能である。代表的には、被測定物質に含まれる受容体にそれぞれ結合するリガンドを結合体として磁性粒子及びビーズ担体に固定する構成も採用できる。また被測定物質がビオチンである、あるいは被測定物に標識としてビオチンを結合させたものである場合、磁気粒子およびビーズ担体にはアビジンもしくはストレプトアビジンを結合体として固定したものを採用できる。

【0034】

また、実施例では溶液中の被測定物質を挟んだサンドイッチ反応で磁性粒子とビーズ担体を結合させる反応を用いて反応済みの磁性粒子と未反応の磁性粒子とを分離した。ビーズ担体を用いる分離メカニズムのとは別の分離メカニズムを本発明に利用することも可能である。

【0035】

図6は、磁性ビーズ同志を被測定物質により凝集させて沈殿させる変形例の反応を示す概念図である。試料容器内の試料溶液に、被測定物質1と特異的に結合する抗体等41を結合した磁性粒子4を添加する。この点は上記実施例と同様である。ビーズ担体は使用せず、被測定物質1を介して磁性粒子同志を結合させて凝集させる。凝集した磁性粒子は溶液中に未結合のまま浮遊する磁気粒子に比べてブラウン運動時間が長くなるため、励磁用の交流磁場への追従が弱まる。したがって十分に凝集させると、未結合のまま浮遊する磁性粒子に比較して磁気信号強度の減少が生じる。さらに励磁用の交流磁場の印加に先立ち、分離用磁場を印加して結合済みの磁気粒子の沈殿を促進し、また励磁用コイル、及び磁気センサによる計測の位置を沈殿物から離れた試料容器上部とするという図1に示した免疫測定装置と全く同様な手法を取る。これにより、結合済みの磁性粒子からの磁気信号の混入が抑制され、試料溶液に含まれていた被測定物質の量の有効な計測が可能となる。

【0036】

以上の実施例ならびに変形例で実施される交流磁化測定では、反応済み磁性粒子と未反応の磁性粒子が試料容器内に分散、混合している状態から分離促進の過程を経て、その試料容器のまま励磁用の交流磁場を印加のもとで磁気計測にかけられる点に特徴がある。この分離促進の過程は、実施例のように磁場印加によるものに限らない。代表的には遠心力を利用した分離過程、つまり遠心分離が適用できる。図1の装置の試料台13のように試料容器を円周状に配列して保持するものであれば、試料容器の配列の高さがコイルの位置からはずれ、さらに試料台が必要な回転速度で回転し、そのとき試料容器の下部が外方向に振られるような構造に装置を変更すればよい。これにより、遠心力による結合済み磁気粒

10

20

30

40

50

子の分離促進が達成できる。

【 0 0 3 7 】

図 7 はさらに別の分離メカニズムを利用する変形例を示す。被測定物質 1 と特異的に結合する抗体等 41 を結合した磁性粒子 4 を添加する点は図 2 に示す実施例 1 や図 6 に示す変形例と同様である。この変形例では内部壁面の一部、例えば底面 83 に被測定物質と特異的に結合する第 2 の抗体 43 が固定化されている試料容器 82 を用いる。波測定物質である抗原を介して磁性粒子 4 は壁面の第 2 の抗体に結合するので、ビーズ担体に結合したと同様にブラウン緩和時間が長くなり、励起用の交流磁場に追従せず、ここからの磁気信号強度は低下する。被測定物質である抗原の量に応じた結合を行わせるには十分なかくはんと反応時間が必要である。ここでも、実施例の装置で用いた分離用磁場と同様な磁場の印加も、

10

あるいは上記した遠心力を利用した分離過程も、結合反応による壁面への固定化を促進する点で効果がある。

< 実施例における効果の実証 >

上述の実施例の装置構成による計測の効果を実証するため以下の試料を用いて計測を実施した。磁性粒子には、細胞分離用として市販されている MagCelllect ストレプトアビジン標識磁気微粒子 (R&D systems 社) を用いた。また被測定物質はビオチン分子とした。被測定物質とビーズ担体を溶液に添加するのに代えて、ポリスチレンビーズにビオチンを予め固定化したビオチンビーズを使用した (粒径 $3.3\ \mu\text{m}$ 、SpheroTech 社)。これらの試料をリン酸緩衝液にて希釈し、ビオチンビーズを最終濃度 $1.1\text{e}6 \sim 6.7\text{e}7$ 個/mL になるよう希釈した。次に上記の 2 試料を混和し、37 で 1 時間、結合反応させた (ビーズ試料)。また被測定物質の数が 0 個に相当する未結合の磁性粒子単体の試料も同様に希釈して対照試料とした。反応終了後に、ビーズ試料と対照試料をそれぞれ試料容器 12 に入れ、実施例の免疫検査装置にてそれぞれ磁気計測を行った。その計測の際に MR センサ 15 の位置がそれぞれ容器上部 (上清計測)、および容器下部 (沈殿計測) となるように印知調整ステージ 35 による 2 通りの設定で行ない計測を行った。励磁用の交流磁場の強度は 1mT 以下とし、周波数は 10 ~ 1000Hz とした。前述の (数 1) により、各ビーズ試料の磁気信号出力の、対照試料の磁気信号出力からの変化率 n ($n = 1, 2, 3 \dots$) を算出した。その算出結果を、ビオチンビーズのビーズ数を水平軸とする 2 次元平面にプロットすると、図 9 に示す結果が得られた。白色のプロット点は容器下部にセンサを配置した計測結果を示す。ビーズ数が多い領域で対照試料 (ビオチンビーズが 0 個) の磁気信号強度からの磁気信号

20

30

【 0 0 3 8 】

図 1 0 および図 1 1 は更に反応の経時変化をも反映した実証実験の結果を示す。図 1 0 に黒色の丸で示すプロット点は図 9 の容器下部にセンサを配置した計測結果 (磁気信号強度の変化率) そのものであり、一方白色の丸で示すプロット点は、同じく容器下部にセンサを配置し、反応時間を 3 0 分に短縮した各ビーズ試料の計測から算出した磁気信号強度の変化率である。もし結合済み磁性粒子からの磁気信号混入がなければ、結合の反応が進行するにつれて対照試料の磁気信号出力からの変化率が上昇するはずだが、図 1 0 の結果は逆の経時変化を示す。

40

【 0 0 3 9 】

図 1 1 では黒色のプロット点が図 9 の容器上部にセンサを配置した計測結果そのもの、白色のプロット点が同じく容器上部にセンサを配置し、反応時間を 3 0 分に短縮した各ビ

50

ーズ試料の計測から算出した変化率である。図 1 1 では、反応が進行するにつれて対照試料の磁気信号出力からの変化率が上昇するという経時的な進行がそのまま表れている。図 1 0、図 1 1 の結果を見比べると、試料容器上部に磁気計測範囲を限定し、また容器試料内で結合物の沈下を促進してから磁気計測を実行するという上記実施例の構成及び計測手順が、結合体からの磁気信号の混入を排除し、分散状態の磁性粒子からの信号成分のみを反映した被測定物質との結合によって減少した磁性粒子の量を正確に示す計測ができ、もって被測定物質の正確な検出、定量を実現するのに効を奏することが分かる。

【産業上の利用可能性】

【0040】

本発明により、交流磁化計測を行う免疫測定において試料準備の手間の短縮、検出の現実性の確保、および定量の精度上が図れるので、免疫検査技術の分野に本発明が広く利用されることが期待できる。

10

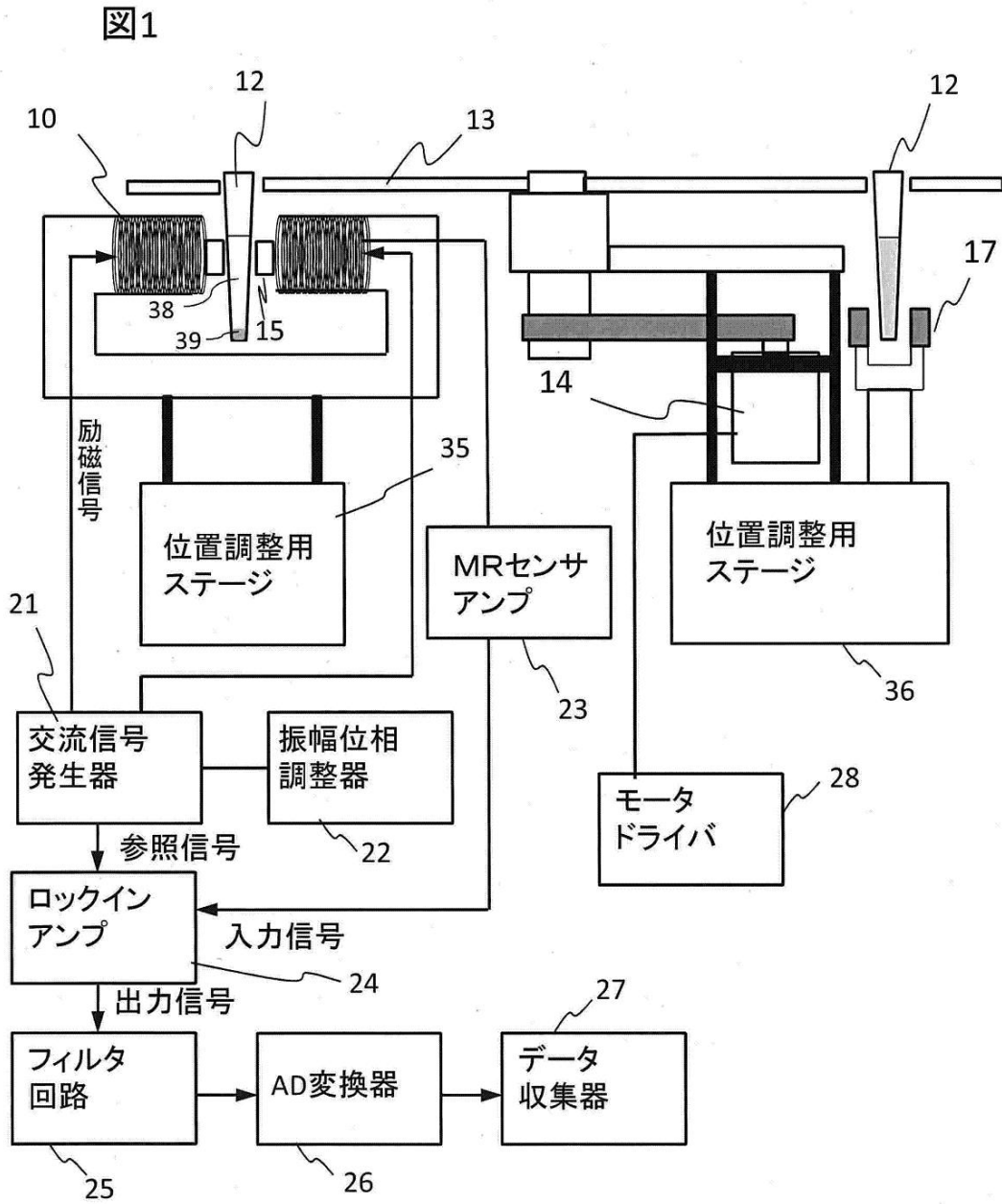
【符号の説明】

【0041】

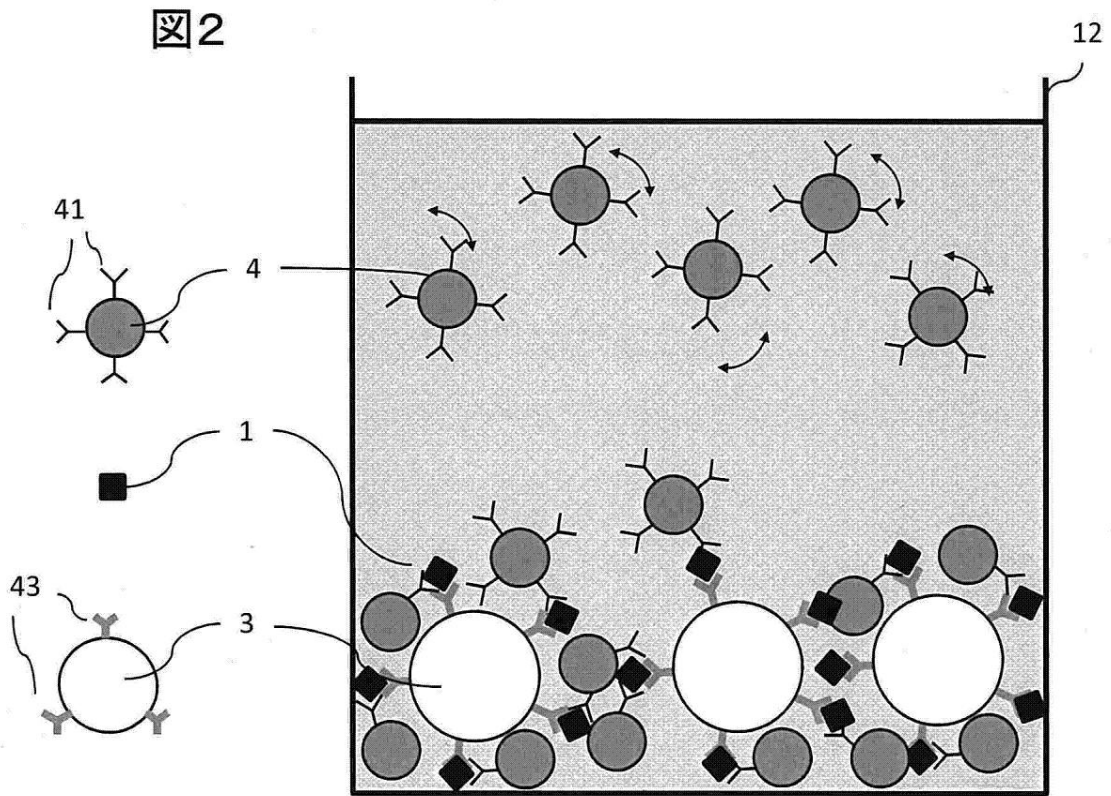
- 1 : 被測定物質
- 3 : ビーズ担体
- 4 : 磁性粒子
- 10 : 励磁コイル
- 12 : 試料容器
- 13 : 試料台
- 14 : DC モーター
- 17 : 分離用コイル
- 41、43 : 抗体

20

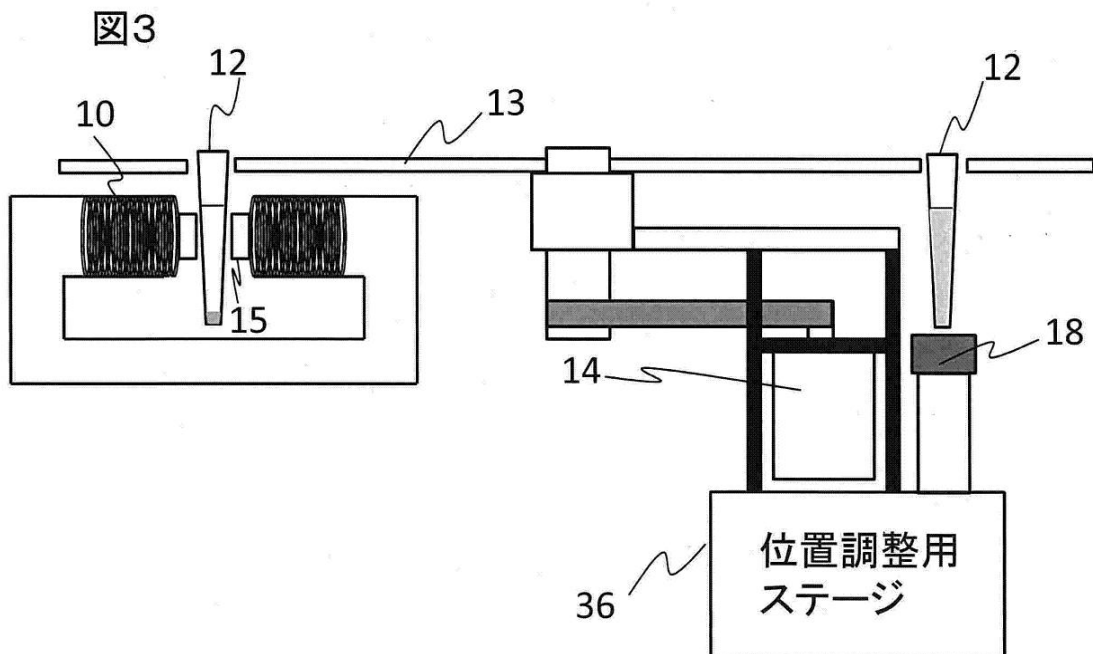
【図1】



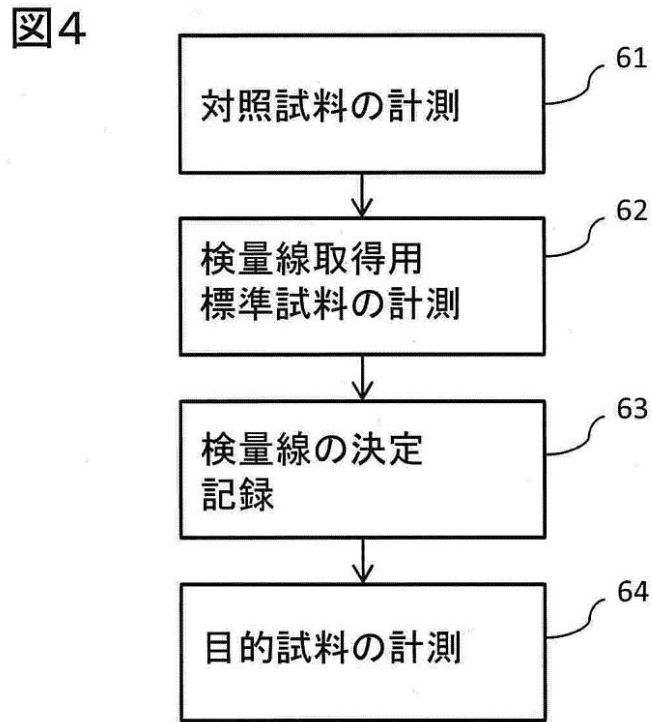
【図2】



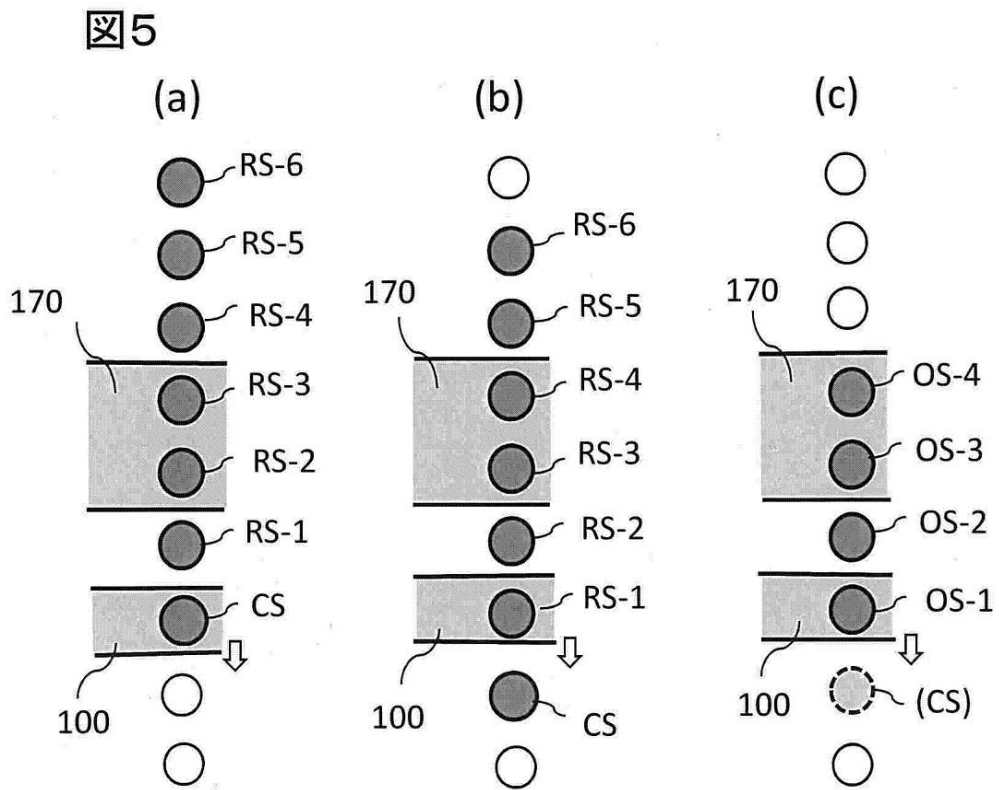
【図3】



【 図 4 】

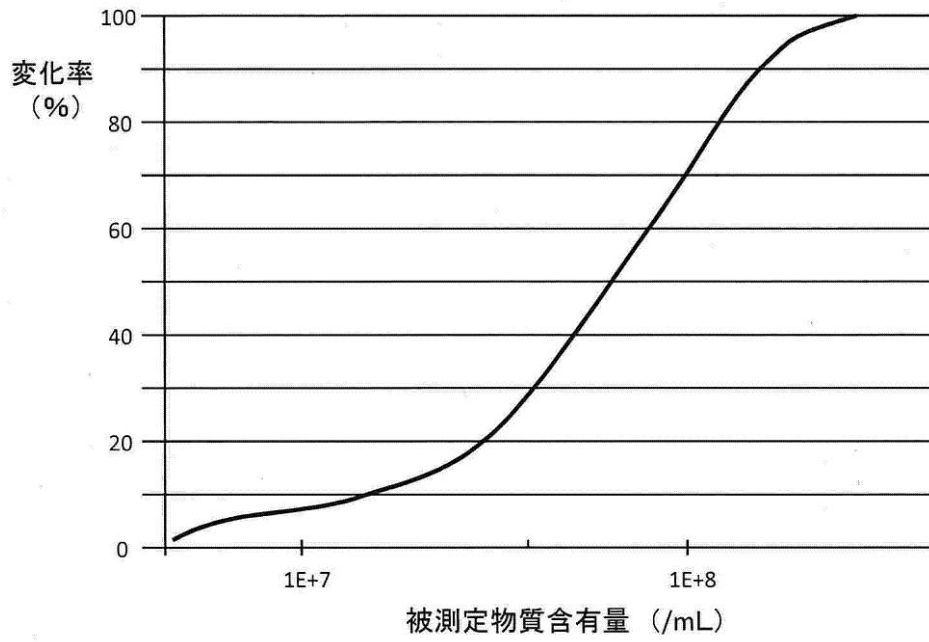


【 図 5 】

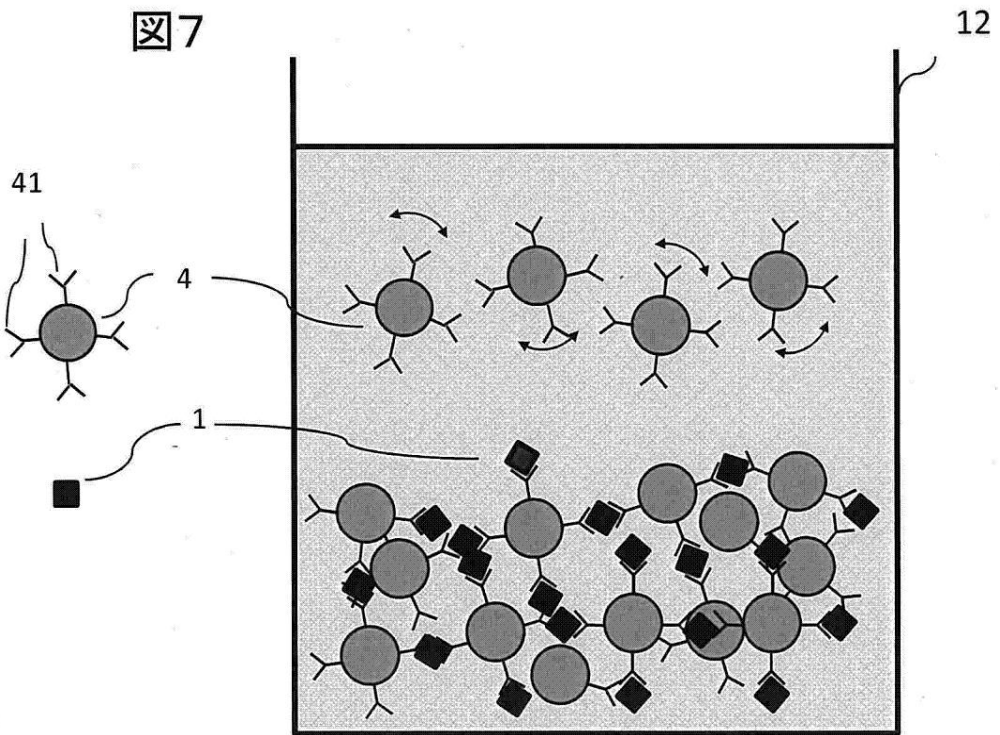


【図6】

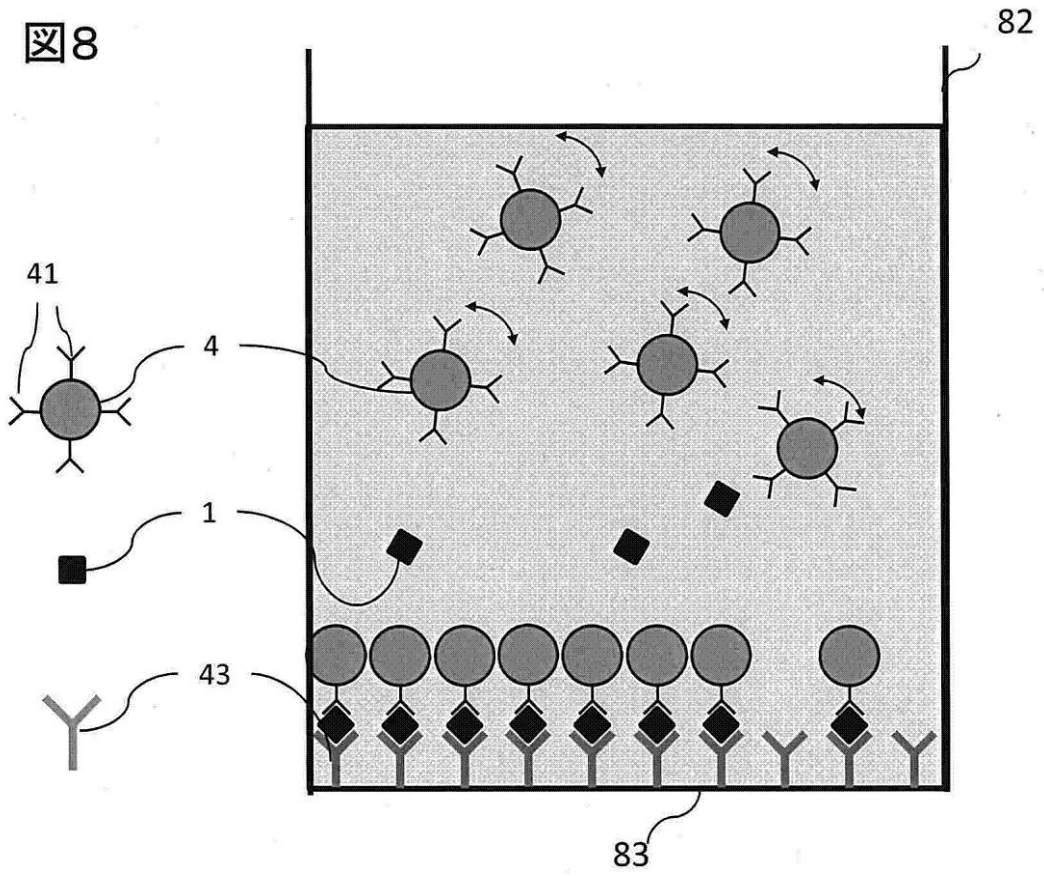
図6



【図7】

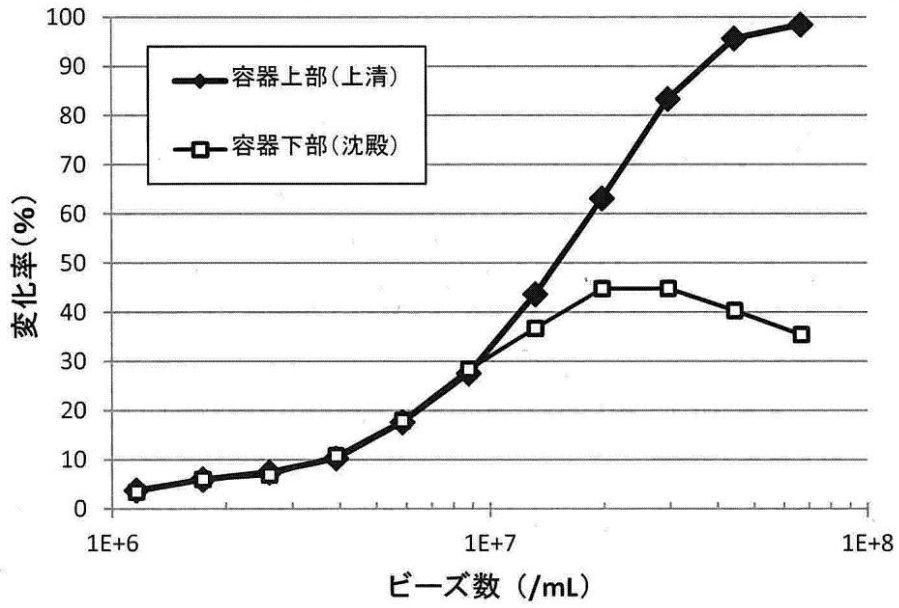


【 図 8 】



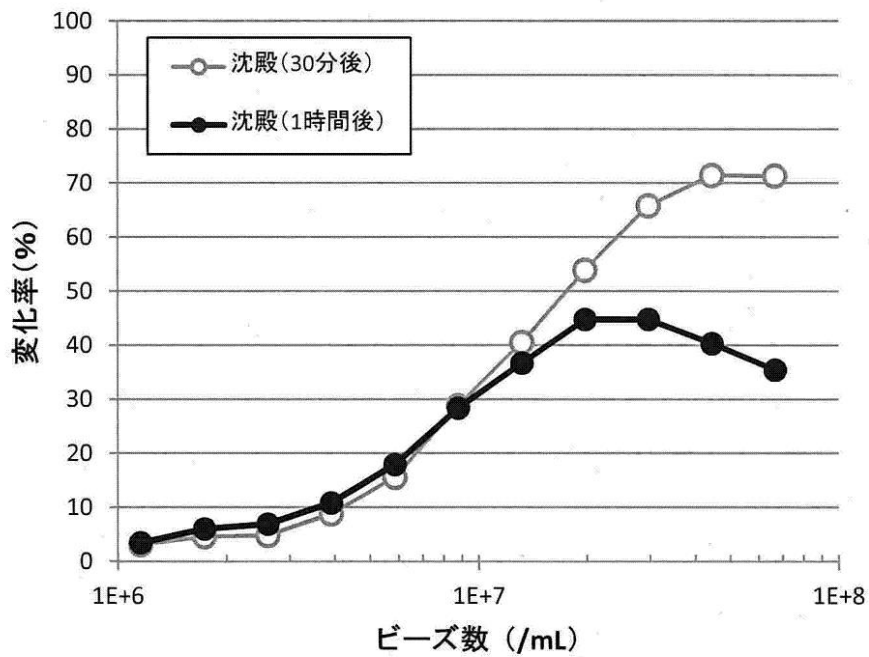
【図9】

図9



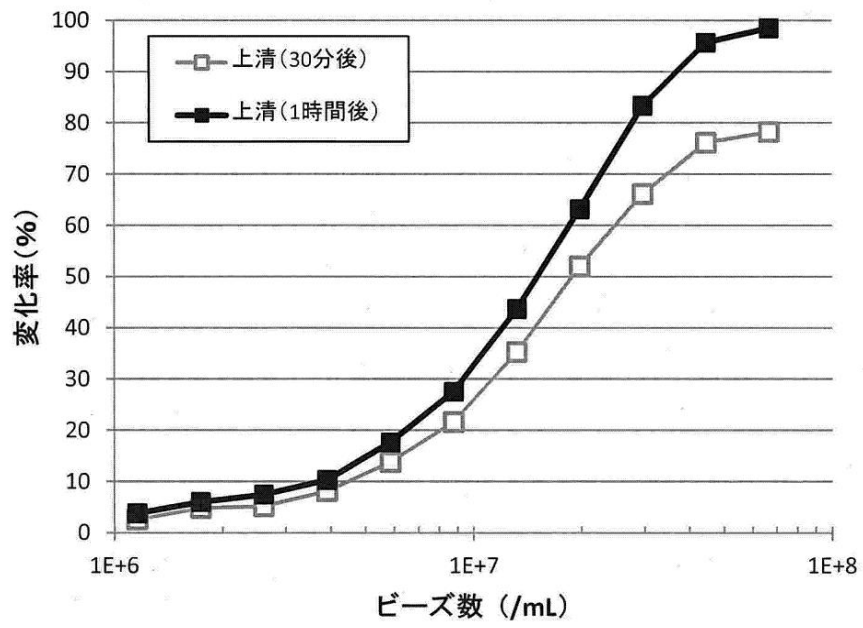
【図10】

図10



【図11】

図11



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/543 5 0 1 D
G 0 1 N 35/02 G
G 0 1 N 27/74

(72)発明者 神鳥 明彦
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 国際公開第2012/011477(WO, A1)
特表平07-504986(JP, A)
国際公開第2009/084596(WO, A1)
特開2009-168636(JP, A)
特表平09-504094(JP, A)
米国特許第06294342(US, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	磁交替磁场的磁免疫测定方法和测试装置		
公开(公告)号	JP5879189B2	公开(公告)日	2016-03-08
申请号	JP2012100548	申请日	2012-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所		
申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所		
[标]发明人	溝口崇子 川畑龍三 神鳥明彦		
发明人	溝口 崇子 川畑 龍三 神鳥 明彦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N33/53 G01N35/02 G01N27/74		
CPC分类号	G01N27/72 G01N33/54333		
FI分类号	G01N33/543.541.A G01N33/553 G01N33/543.501.F G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/543.501.D G01N35/02.G G01N27/74		
F-TERM分类号	2G053/AA04 2G053/AB01 2G053/BA05 2G053/BA08 2G053/BB02 2G053/BB10 2G053/BB11 2G053/BC02 2G053/BC14 2G053/CA06 2G053/CB16 2G053/CB22 2G053/CC03 2G053/DA07 2G058/CD04 2G058/EA16 2G058/GD02		
代理人(译)	井上 学 戸田裕二		
其他公开文献	JP2013228280A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在使用AC磁化率测量的磁性免疫测定中，防止来自非耦合磁性粒子的信号与来自与待测物体耦合的磁性粒子的所需测量信号混合。其中包括检查目标样品和磁性颗粒的混合溶液的样品容器由样品载体承载，使得与待测物体偶联的磁性颗粒的沉淀通过来自的磁场分散在溶液中。促进了离解线圈。接下来，将样品容器运送到磁化线圈，并且通过MR传感器特别地测量来自容器中的上清液中的未耦合磁性颗粒的磁信号，以高精度地执行AC磁化率测量。

(21) 出願番号	特願2012-100548 (P2012-100548)	(73) 特許権者	000005108 株式会社日立製作所
(22) 出願日	平成24年4月26日 (2012. 4. 26)		東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(65) 公開番号	特開2013-228280 (P2013-228280A)	(74) 代理人	100100310 弁理士 井上 学
(43) 公開日	平成25年11月7日 (2013. 11. 7)	(74) 代理人	100098660 弁理士 戸田 裕二
審査請求日	平成27年1月9日 (2015. 1. 9)	(74) 代理人	100091720 弁理士 岩崎 重美
		(72) 発明者	溝口 崇子 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
		(72) 発明者	川畑 龍三 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内