

(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2006-337264

(P2006-337264A)

(43) 公開日 平成18年12月14日(2006.12.14)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

Q

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2005-164394 (P2005-164394)	(71) 出願人	000005049
(22) 出願日	平成17年6月3日(2005.6.3)		シャープ株式会社
			大阪府大阪市阿倍野区長池町22番22号
		(74) 代理人	100101823
			弁理士 大前 要
		(74) 代理人	100117293
			弁理士 板東 義文
		(72) 発明者	伴 和夫
			大阪府大阪市阿倍野区長池町22番22号
			シャープ株式会社内
		(72) 発明者	橋口 和夫
			大阪府大阪市阿倍野区長池町22番22号
			シャープ株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫反応を利用したアレルギー検出方法及びアレルギー検出装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 高感度で再現性の高いアレルギーの検出方法を提供する。

【解決手段】 アレルギー物質を含むキャリア液を、認識物質が保持された反応部に導入し、反応させて、認識物質-アレルギー物質複合体を生じさせる複合体生成ステップと、反応部内に洗浄液を流して、未反応のアレルギー物質を洗い流す第1洗浄ステップと、標識物質付き認識物質を含むキャリア液を反応部に導入し、標識物質反応ステップと、反応部内に洗浄液を再度流して、未反応の標識物質付き認識物質を洗い流す第2洗浄ステップと、基質物質を含むキャリア液を反応部に導入し、反応させて、検出物質生成ステップと、検出物質を含むキャリア液を、検出部に送液する送液ステップと、検出ステップと、を有する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アレルゲン物質を含むキャリア液を、前記アレルゲン物質と特異的に反応する認識物質が流去しない状態で保持された反応部に導入し、前記アレルゲン物質と前記認識物質とを反応させて、認識物質－アレルゲン物質複合体を生じさせる複合体生成ステップと、

前記反応部内に洗浄液を流して、未反応のアレルゲン物質を前記反応部から洗い流す第 1 洗浄ステップと、

標識物質付き認識物質を含むキャリア液を前記反応部に導入し、前記標識物質付き認識物質と前記認識物質－アレルゲン複合体とを反応させる標識物質反応ステップと、

前記反応部内に洗浄液を再度流して、未反応の標識物質付き認識物質を前記反応部から洗い流す第 2 洗浄ステップと、

基質物質を含むキャリア液を前記反応部に導入し、前記基質物質と前記標識物質付き認識物質中の標識物質とを反応させて、前記アレルゲン物質の量を検出するための検出物質を生じさせる検出物質生成ステップと、

前記検出物質を含むキャリア液を、前記第 1 及び第 2 洗浄ステップで前記反応部から排出する洗浄液を送る経路と異なる経路を通じて、検出部に送液する送液ステップと、

前記検出部において、前記検出物質の量を検出する検出ステップと、

を有することを特徴とする免疫反応を利用したアレルゲン検出方法。

【請求項 2】

アレルゲン物質と、アレルゲン物質と特異的に反応する標識物質付き認識物質と、を含むキャリア液を、あらかじめ単離された標準アレルゲンが流去しない状態で保持された反応部に導入し、前記標識物質付き認識物質に対して前記アレルゲン物質と前記標準アレルゲンを競合的に反応させて、標識物質付き認識物質－アレルゲン物質複合体と標識物質付き認識物質－標準アレルゲン複合体とを生じさせる複合体生成ステップと、

前記反応部内に洗浄液を流して、未反応のアレルゲン物質と標識物質付き認識物質とを前記反応部から洗い流す洗浄ステップと、

基質物質を含むキャリア液を前記反応部に導入し、前記基質物質と前記標識物質付き認識物質中の標識物質とを反応させて、前記アレルゲン物質の量を検出するための検出物質を生じさせる検出物質生成ステップと、

前記検出物質を含むキャリア液を、前記洗浄ステップにより前記反応部から排出された洗浄液を送る経路と異なる経路を通じて、検出部に送液する送液ステップと、

前記検出部において、前記検出物質の量を検出する検出ステップと、

を有することを特徴とする免疫反応を用いたアレルゲン検出方法。

【請求項 3】

キャリア液を装置内部に導入する導入部と、

前記導入部に連通され、アレルゲン物質と特異的に反応する認識物質が流去しない状態で保持された反応部と、

前記反応部の下流側に設けられた第 1 の経路を介して前記反応部に連通する検出部と、

前記反応部の下流側であり且つ前記第 1 の経路とは別ルートである第 2 の経路を介して前記反応部と連通する、キャリア液を装置外部に排出する排出部と、

を備えることを特徴とする免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

【請求項 4】

前記第 1 の経路と前記第 2 の経路のそれぞれが、前記反応部に直結されていることを特徴とする請求項 3 に記載の免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

【請求項 5】

前記第 1 の経路と前記第 2 の経路は、前記反応部に直結された第 3 の経路の下流側末端に接続された分岐路であり、

前記第 3 の経路長が、前記第 1 の経路長よりも短いことを特徴とする請求項 3 に記載の免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

【請求項 6】

前記第１の経路長が１ｍｍ以上１００ｍｍ以下であることを特徴とする請求項５に記載の免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

【請求項７】

前記第１の経路と、前記第２の経路とが、それぞれキャリア液の流れを遮断または通過させる開閉手段を有することを特徴とする請求項３ないし６のいずれかに記載の免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

【請求項８】

前記第１の経路に、キャリア液を攪拌する攪拌手段が設けられていることを特徴とする請求項３ないし７のいずれかに記載の免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

【請求項９】

前記第１の経路に、キャリア液を拡散する拡散手段が設けられていることを特徴とする請求項３ないし８のいずれかに記載の免疫反応を用いたアレルゲン検出装置。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、免疫反応を利用してアレルゲンタンパク質等のアレルギー発症原因物質を検出する方法及びそのような装置に関する。

【背景技術】

20

【０００２】

大気中の花粉、ダニ、カビなどの浮遊微小物質は、アレルギー症を発症させる原因物質であり、人体に大きな影響を与えるが、接触するアレルゲン総量とアレルギー症の発症程度との間には正の相関関係があることが知られている。このことからして、アレルギー症の発症を抑制するには、アレルギー発症原因物質（アレルゲン）との接触回数を少なくするとともに、アレルゲン量の多い物質との接触を避けることが重要となる。

【０００３】

このためには、先ず生活環境下に存在する種々な物質のアレルゲン量を正確に知る必要があり、それゆえアレルゲン量を迅速かつ正確に測定できる手段が求められている。また、アレルゲンは、微量であっても人体に大きな影響を及ぼすので、微量のアレルゲンを高感度に検出する手段が求められている。

30

【０００４】

このような背景にあって、近年、アレルゲンと、アレルゲンを特異的に吸着する抗体と、の免疫反応を利用するアレルゲン測定技術が提案されている（例えば、特許文献１参照。）。

【０００５】

【特許文献１】特開２００１－１５３８３８号公報（要約、特許請求の範囲）

【０００６】

特許文献１で提案されている技術を、図１４に基づいて説明する。図１４において、３０２はアレルゲン含有液（被検液）の導入部であり、基質物質を電極活性物質に変化させる酵素を有する標識抗体が、所定量保持されている。３０３は分配部であり、アレルゲンと同一の標準アレルゲンが固定化されている。３０４は吸収部、３０５は検出部、３０６は対極、３０７は作用極、３０８は、対極、作用極から引き出された導電体に接続された接点であり、検出部３０５の対極３０６と作用極３０７と接点３０８は、配線により電気的に接続されている。

40

【０００７】

この装置を用いた検出方法を説明する。アレルゲンを含む被検液を、導入部３０２に添加する。アレルゲンと標識抗体とを含む被検液は、分配部３０３に送られ、標識抗体は、分配部において固定化された標準アレルゲンと被検液中のアレルゲンと競合的に反応し、アレルゲンと標準アレルゲンの量に比例して分配される。被検液中のアレルゲンと結合し

50

た標識抗体と、標識抗体と結合していない被検液中のアレルゲンは、その後の洗浄により分配部303から吸収部304に送られる。

【0008】

この後、基質物質を導入部302から添加すると、分配部303に固定化された標準アレルゲンと結合している標識抗体に含まれる酵素と、基質物質とが反応して、前記標識抗体の量に対応した電極活性物質（電圧を印加することにより、電極で酸化還元反応を起こす物質）が生成する。この後、前記電極活性物質を検出部305まで移動させ、検出部305の対向電極306と作用電極307とに所定の電圧を付加すると、電極活性物質の酸化還元反応が生じる。この酸化還元電流を測定することにより、被検液中のアレルゲンの量を求めることができる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかし、上記特許文献1に記載されたアレルゲン測定技術では、導入ステップ、分配ステップ、洗浄ステップにおいて、被検液中に含まれるアレルゲンと結合した標識抗体や未反応の標識抗体が、非特異的吸着（免疫反応以外の非意図的な結合）により、検出部305の電極が形成されていない部分表面、電極306,307表面等に吸着するという問題がある。

【0010】

非特異的吸着による標識抗体に含まれる酵素もまた、基質物質と反応して電極活性物質が生じ、この非特異的吸着に由来する電極活性物質が検出部において電流（この電流をバックグラウンド電流という。この電流は検出対象に由来しないものである）を生じさせる。非特異的吸着の程度には再現性がないため、検出部で検出された電流値からバックグラウンド電流値を差し引く方法で検出対象に由来する電流値を求めると、検出の再現性が大きく低下する。また、被検液中に含まれるアレルゲン濃度が微量である場合には、バックグラウンド電流値の変動の影響を大きく受けるので、精度の高い検出が困難となる。

20

【0011】

この問題を解決するため、特許文献1は、液が流れる経路や反応部に、非特異的吸着が起こりにくい材料（例えば、ガラス繊維）を用いることや、その表面に非特異的吸着防止膜（例えば、ブロッキング処理膜）を形成することを提案しているが、非特異的吸着を100%防止できる材料は、いまだ発見されていない。

30

【0012】

また、分配部303から検出部305への間での非特異的吸着を防ぐために、その間の距離を短くする構成を採用することもできるが、酵素と基質との反応で生成した電極活性物質の濃度が、分配部303では均一ではなく、検出部までの距離を短くした場合には、この経路において電極活性物質の濃度が均一とならないため、測定のバラツキが大きくなり、検出精度を高めることができない。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記問題を解決するために、アレルゲン検出方法に係る第1の態様の本発明は、次の構成を採用する。

40

アレルゲン物質を含むキャリア液を、前記アレルゲン物質と特異的に反応する認識物質が流去しない状態で保持された反応部に導入し、前記アレルゲン物質と前記認識物質とを反応させて、認識物質－アレルゲン物質複合体を生じさせる複合体生成ステップと、前記反応部内に洗浄液を流して、未反応のアレルゲン物質を前記反応部から洗い流す第1洗浄ステップと、標識物質付き認識物質を含むキャリア液を前記反応部に導入し、前記標識物質付き認識物質と前記認識物質－アレルゲン複合体とを反応させる標識物質反応ステップと、前記反応部内に洗浄液を再度流して、未反応の標識物質付き認識物質を前記反応部から洗い流す第2洗浄ステップと、基質物質を含むキャリア液を前記反応部に導入し、前記基質物質と前記標識物質付き認識物質中の標識物質とを反応させて、前記アレルゲン物質

50

の量を検出するための検出物質を生じさせる検出物質生成ステップと、前記検出物質を含むキャリア液を、前記第1及び第2洗浄ステップで前記反応部から排出する洗浄液を送る経路と異なる経路を通じて、検出部に送液する送液ステップと、前記検出部において、前記検出物質の量を検出する検出ステップと、を有する。

【0014】

また、アレルゲン検出方法に係る第2の態様の本発明は、次の構成を採用する。

アレルゲン物質と、アレルゲン物質と特異的に反応する標識物質付き認識物質と、を含むキャリア液を、あらかじめ単離された標準アレルゲンが流去しない状態で保持された反応部に導入し、前記標識物質付き認識物質に対して前記アレルゲン物質と前記標準アレルゲンを競合的に反応させて、標識物質付き認識物質－アレルゲン物質複合体と標識物質付き認識物質－標準アレルゲン複合体とを生じさせる複合体生成ステップと、前記反応部内に洗浄液を流して、未反応のアレルゲン物質と標識物質付き認識物質とを前記反応部から洗い流す洗浄ステップと、基質物質を含むキャリア液を前記反応部に導入し、前記基質物質と前記標識物質付き認識物質中の標識物質とを反応させて、前記アレルゲン物質の量を検出するための検出物質を生じさせる検出物質生成ステップと、前記検出物質を含むキャリア液を、前記洗浄ステップにより前記反応部から排出された洗浄液を送る経路と異なる経路を通じて、検出部に送液する送液ステップと、前記検出部において、前記検出物質の量を検出する検出ステップと、を有する。

10

【0015】

上記第1の態様及び第2の態様の検出方法では、洗浄液を送る経路と、検出液を送る経路とが異なるため、検出部や検出部と反応部を繋ぐ経路で、標識物質付き認識物質の非特異的吸着が起こらない。よって、再現性のないバックグラウンド電流の上昇を効果的に防止でき、再現性がよく、高感度のアレルゲンを検出できる。

20

【0016】

ここで、上記複合体生成ステップ、上記標識物質反応ステップ、上記検出物質生成ステップは、それぞれキャリア液の流れを止めた状態で行ってもよく、キャリア液を流しながら行ってもよい。キャリア液を流しながら上記各ステップを行う場合には、非特異的吸着を防止するために、上記複合体生成ステップと、上記標識物質反応ステップとは、洗浄液が流れる経路からキャリア液が流れるようにして行うことが好ましく、上記検出物質生成ステップは、送液ステップと同じ経路から流れるようにして行うことが好ましい。

30

【0017】

上記課題を解決するための検出装置に係る本発明は、キャリア液を装置内部に導入する導入部と、前記導入部に連通され、アレルゲン物質と特異的に反応する認識物質が流去しない状態で保持された反応部と、前記反応部の下流側に設けられた第1の経路を介して前記反応部に連通する検出部と、前記反応部の下流側であり且つ前記第1の経路とは別ルートである第2の経路を介して前記反応部と連通する、キャリア液を装置外部に排出する排出部と、を備えることを特徴とする免疫反応を用いた検出装置である。

【0018】

上記構成の検出装置を用いると、上記本発明に係る検出方法を、簡便に実施することができる。

40

【0019】

上記構成において、前記第1の経路と前記第2の経路のそれぞれが、前記反応部に直結されている構成とすることができる。

【0020】

上記構成において、前記第1の経路と前記第2の経路は、前記反応部に直結された第3の経路の下流側末端に接続された分岐路であり、前記第3の経路長が、前記第1の経路長よりも短い構成とすることができる。

【0021】

上記構成では、反応部の下流側に第3の経路を直結し、この第3の経路の下流側末端を2つに分岐させて、その各々を第1の経路、第2の経路とし、かつ前記第3の経路長を前

50

記第1の経路長よりも短いとしたが、この構造であると、経路を短くすることができるので、装置の小型化を図ることができる。なお、第3の経路には、洗浄液と、検出物質を含む液とが流れるので、第3の経路長を、前記第1の経路長よりも短くすることが好ましい。

【0022】

上記構成において、前記第1の経路長が1mm以上100mm以下である、とすることができる。

【0023】

上記構成において、前記第1の経路と、前記第2の経路とが、それぞれキャリア液の流れを遮断または通過させる開閉手段を有する、とすることができる。

10

【0024】

上記構成において、前記第1の経路に、キャリア液を攪拌する攪拌手段が設けられている、とすることができる。

【0025】

上記構成において、前記第1の経路に、キャリア液を拡散する拡散手段が設けられていることを特徴とする、とすることができる。

【発明の効果】

【0026】

本発明によると、アレルゲン物質を高感度に且つ再現性よく検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0027】

〔実施の形態1〕

以下に、本発明の実施の形態を、図面を参照して詳細に説明する。なお、本明細書中で用いるアレルゲン物質（アレルゲン）とは、免疫反応を利用した検出方法を用いて測定が可能な物質すべてを意味し、タンパク質や、農薬等の化学物質を含んだものを意味する。

【0028】

図1に示すように、本発明のアレルゲン検出装置は、測定対象であるアレルゲンを含む被検液、キャリア液を導入する導入部2と、免疫反応や酵素反応を生じさせる反応部3と、検出部4と、検出部を介さずに反応部と連通したキャリア液を排出する排出穴5と、検出部の下流側に設けられた第2の排出穴6と、上記各部を繋ぐ流路71，流路72（第2の経路），流路73（第1の経路），流路74と、が基板1上に形成された構成である。

30

【0029】

ここで、基板1としては、光硬化性樹脂等のプラスチック材料や、ガラス等を用いることができ、厚みは0.1mm～5mm程度であることが好ましい。また、導入部2、排出穴（排出部）5，6は、直径が10μm以上であり、深さが1μmから1mmであることが好ましい。また、反応部3は、円柱形状の穴、半球状の形状、直方体形状の穴とすることができ、また、流路の一部を用いる構成としてもよい。この反応部の大きさは10μm以上であることが好ましく、深さは1μmから1mmであることが好ましい。

【0030】

また、反応部3には、アレルゲン（検出対象物質）と特異的に反応する抗体（認識物質）が、反応部から流去しない状態で設けられている。抗体は、反応部の表面に直接固定されていてもよいが、アレルゲンと抗体との反応表面積を大きくするために、抗体をビーズなどの不溶性担体に固定化してもよい。抗体を不溶性担体に固定化する場合は、反応部3から抗体付きビーズが流去しないように、流路72及び流路73への接続口の幅または深さを不溶性担体の大きさよりも小さくした構成、又はこのような流路を複数設けた構成を採用できる。また、不溶性担体として磁性粒子を用いて、基板1の外に別途設けた磁石からの磁力により、反応部3から流去しないような構成としてもよい。

40

【0031】

また、流路71，72，73，74は、幅0.1μmから1mmであり、深さは0.1μmから1mmであることが好ましい。流路の断面形状は、矩形、台形形状とすることが

50

でき、また流路の底は円の一部のように丸くなってもよい。また、不純物が外部から装置各部に侵入することを防止するために、蓋（図示せず）を設けてもよい。この蓋は、光硬化性樹脂等のプラスチック材料、ガラス、シリコン、金属からなる薄板状の部材、またはこれらを組み合わせたものを用いることができる。

【0032】

なお、本明細書で用いる抗体とは、アレルゲン等の検出対象物質と特異的に反応して固定するものを意味し、例えば、モノクローマ抗体、ポリクローラ抗体やインプリンティングポリマー、アプタマー材料等、人工抗体材料を含んだものを意味する。

【0033】

また、キャリア液、洗浄液としては、アレルゲン、認識物質、標識物質、検出物質等を失活させないものであることが好ましく、例えば緩衝液を用いることができる。 10

【0034】

以下では、検出部として、図13に示すように、蓋8の表面若しくは基板1表面に、電極9が形成された構成を用いた場合を例として説明する。形成される電極9は、対抗電極と作用電極の2つから構成されてもよく、対抗電極と作用電極と参照電極との3極からなる構成としてもよい。また、作用電極は、いわゆる櫛型電極でもよい。

【0035】

本発明のアレルゲン検出装置は、図1に示すように、免疫反応や酵素反応を生じさせる反応部3に、流路72と流路73が繋がっており、流路72は排出穴5に繋がっており、流路73は検出部4に繋がっており、検出部4は流路74を介して第2の排出穴6と繋がっている構成である。 20

【0036】

また、図2に示すように、流路72及び流路73に、キャリア液の流れを遮断または通過させるバルブ（開閉手段）10、11を、それぞれ設けてもよい。この構成を採用すると、液を洗浄液が流路73に浸入すること、及び検出物質を含む液が流路72に浸入することを完全に防止できる。

【0037】

また、図1に示すように、開閉手段を設けない場合には、流路72のみに液を流すステップにおいて、第2の排出穴6に圧力を印加することにより、流路73に液が浸入しないようにしてもよい。また、流路73のみに液を流すステップにおいては、流路72に液が浸入しないようにするために、排出穴5に圧力を印加すればよい。 30

【0038】

また、反応部と検出部とを繋ぐ流路73（第1の経路）は、この流路において検出物質を含む液の濃度を均一とするため、長く形成されていることが好ましい。この長さは、反応部3で生じた電極活性物質が検出部で均一の濃度になる程度の長さであることが好ましく、反応部の大きさ、アレルゲンの量などにより最適化されるべきものであるが、0.1mmから100mmが好ましい。ここで、装置の小型化のために、流路73を図12に示すようにジグザク状に折りたたまれた流路12としてもよい。

【0039】

また、例えば図11に示すように、流路73に柱状構造体13を有する攪拌手段15を設けてもよい。流路中に柱状構造体13を設ける方法によると、液の流れが乱されることによる攪拌効果が得られ、かつ柱状構造体13は短い流路長で足りるので、この方法によると装置を小型化できる。 40

【0040】

検出部4が流路73の幅に対して大きい場合は、図10に示すような、流れ方向を多様に変化させる拡散部14を設けるのがよい。拡散部14を設けると、自然な状態で電極活性物質が液中に均一に拡散されるので、検出の再現性が向上する。

【0041】

次に、図1に示した装置（反応部3と流路72，73との接続口に、図11に示すビーズを堰き止めるための手段を設けたもの）を用いた本発明のアレルゲン検出方法について 50

、図 5 を参照して説明する。

【0042】

（方法 1：サンドイッチ法）

まず、サンドイッチ法と呼ばれる方法を用いた検出方法について説明する。以下においては、キャリア液、洗浄液ともに緩衝液を用いた例により説明する。

【0043】

（準備ステップ）

まず、図 5 に示す検出装置の導入穴 2 と、ポンプ 23 を備えた緩衝液タンク 21 とを配管により接続する。また、排出穴 5 と廃液タンク 20、及び第 2 の廃液穴 6 と第 2 の廃液タンク 22 とを、それぞれバルブ 10、バルブ 11 をそれぞれ備えた配管により接続する。この状態で、緩衝液タンクからポンプを用いて反応部 3、検出部 4 及び各流路 71、72、73、74 を緩衝液で満たす。この後、導入穴 2 から緩衝液を注入して、装置内をアレルギー等を含まない緩衝液（洗浄液）で洗浄する。次に、予めアレルギーに対して特異的に反応する抗体を固定化した所定量のビーズを緩衝液と共に導入穴 2 から注入する。

10

【0044】

（複合体生成ステップ）

導入穴 2 から入れた緩衝液が流路 71 を通り、反応部 3 から流路 72 を介して排出穴 5 から出るように設定し、アレルギーを含む緩衝液（キャリア液）を導入穴から導入して、反応部に移動させる。この液中のアレルギーは、反応部 3 に設けられた抗体により固定されるが、その一部は固定されずに流路 72（第 2 の経路）に移動し、排出穴 5 を通って装置外へ出て行く。ここにおいて、流路 72 にアレルギーが非特異的吸着をするおそれがあるが、この流路は検出部に繋がっていないため、検出時にバックグラウンド電流が大きくなるという問題は生じない。

20

【0045】

（第 1 洗浄ステップ）

この後、アレルギーを含まない緩衝液（洗浄液）を、反応部 3 に流し、排出穴 5 から排出して、未反応のアレルギーを反応部 3、流路 71、流路 72（第 2 の経路）から洗い流す。

【0046】

（標識物質反応ステップ）

次に、酵素を標識物質として付けた抗体材料を含む緩衝液を導入穴 2 から注入し、反応部に固定化された抗体に捕獲されているアレルギーと反応させて、固定化抗体－アレルギー－標識付抗体材料からなる複合体を生成させる。

30

【0047】

（第 2 洗浄ステップ）

この後、標識付抗体材料を含む緩衝液に代えて、アレルギー等を含まない緩衝液（洗浄液）を反応部 3 に流し、排出穴 5 から排出して、未反応の抗体材料を反応部 3、流路 71、流路 72（第 2 の経路）から洗い流す。

【0048】

次に、導入穴 2 から入れた液が流路 71 を通り、反応部 3 から流路 73（第 1 の経路）を介して検出部 4 に入り、流路 74 を通って排出穴 6 から出るように設定する。

40

【0049】

（検出物質生成ステップ）

次に、標識として用いた酵素と反応して、電極活性物質に変化する基質を含む緩衝液（キャリア液）を、導入穴 2 から注入し、反応部に形成された固定化抗体－アレルギー－標識付抗体複合体と反応させる。これにより、複合体の量に対応した電極活性物質が生じる。

【0050】

（送液ステップ）

この電極活性物質を含む緩衝液（キャリア液）を、反応部 3 から流路 73（第 1 の経路

50

）を通じて検出部４に送液する。

【００５１】

（検出ステップ）

検出部４において、作用電極、対抗電極に所定の電圧を印加することにより、電極表面で酸化還元反応が起こり、電流が生じる。この電流を測定することで、アレルゲンの量が測定できる。標識として用いる酵素及び基質としては、公知のものが使用できる。

【００５２】

本発明では、基質を含む緩衝液（キャリア液）は、非特異的吸着で付着した標識付抗体が存在する流路７２を流れないため、検出部４には複合体の量に対応した電極活性物質のみが移動することになり、非特異的吸着で装置表面に吸着した標識付抗体などにより生じた電極活性物質の影響（バックグラウンドの上昇）がなくなり、再現性のよい検出を行うことができる。

10

【００５３】

本発明の方法において、反応部３における、アレルゲンと固定化抗体の反応、標識付抗体と固定化抗体－アレルゲン複合体との反応、標識酵素による基質を電極活性物質に変える酵素反応を液の流れを所定の時間だけ止めて行わせてもよい。液を止める時間は、用いる材料に左右されるが、好ましくは数マイクロ秒から数十分に設定する。これにより、反応の再現性がよくなり、本発明の効果と相乗的に再現性を向上できる。

【００５４】

上記では、標識となる酵素として基質材料を電極活性物質に変えるものを用いた場合を例にして説明したが、本発明はこれに限定されるものではない。

20

【００５５】

（方法２：競合法）

以下に、いわゆる競合法を用いた例を、図５を用いて説明する。なお、この例およびそれ以降の例においても、上述と同様に緩衝液をキャリア液、洗浄液として用いている。

【００５６】

（準備ステップ）

まず、図５に示す検出装置の導入穴２と、ポンプを備えた緩衝液タンク２１とを配管により接続する。また、排出穴５と廃液タンク２０、及び第２の廃液穴６と第２の廃液タンク２２とを、バルブ１０またはバルブ１１を備えた配管によりそれぞれ接続する。この状態で、緩衝液タンクからポンプを用いて反応部３、検出部４及び各流路７１，７２，７３，７４を緩衝液で満たす。この後、導入穴２から緩衝液を注入して、装置内を緩衝液で洗浄する。次に、標準アレルゲン（検出対象となるアレルゲンと同一である）を固定化した所定量のビーズを緩衝液と共に導入穴２から注入する。

30

【００５７】

（複合体生成ステップ）

導入穴２から入れた緩衝液が流路７１を通り、反応部３から流路７２（第２の経路）を介して排出穴５から出るように設定し、アレルゲンと酵素付き抗体とを含む緩衝液を導入穴２から導入して、反応部３に移動させる。この液中のアレルゲンと、反応部３に固定された標準アレルゲンとは、この液に含まれる酵素付き抗体と競合的に反応し、アレルゲンと標準アレルゲンの割合に応じて分配される。また、その一部は固定されずに流路７２に移動し、排出穴５を通過して装置外へ出て行く。ここにおいて、流路７２（第２の経路）にアレルゲンや酵素付き抗体が非特異的吸着をするおそれがあるが、この流路は検出部に繋がっていないため、検出時にバックグラウンドが大きくなるという問題は生じない。

40

【００５８】

（洗浄ステップ）

この後、アレルゲン及び抗体を含まない洗浄用緩衝液を、反応部３に流し、排出穴５から排出して、未反応のアレルゲン及び抗体を反応部３、流路７１，流路７２（第２の経路）から洗い流す。

【００５９】

50

次に、導入穴 2 から入れた液が流路 7 1 を通り、反応部 3 から流路 7 3（第 1 の経路）を介して検出部 4 に入り、流路 7 4 を通って排出穴 6 から出るように設定する。

【0060】

（検出物質生成ステップ）

次に、標識として用いた酵素と反応して、電極活性物質に変化する基質材料を含む緩衝液を、導入穴 2 から注入し、反応部に形成された標準アレルゲン－標識付抗体複合体と反応させる。これにより、複合体の量に対応した電極活性物質が生じる。

【0061】

（送液ステップ）

この電極活性物質を含む緩衝液を、反応部 3 から流路 7 3（第 1 の経路）を通じて検出部 4 に送液する。 10

【0062】

（検出ステップ）

検出部 4 において、作用電極、対抗電極に所定の電圧を印加することにより、電極表面で酸化還元反応が起こり、電流が生じる。この電流を測定することで、アレルゲンの量が測定できる。標識として用いる酵素及び基質としては、公知のものが使用できる。

【0063】

競合法を用いた場合においても、本発明の装置と検出方法を採用すると、サンドイッチ法を用いた場合と同様の理由により、従来問題となっていた、酵素付抗体の非特異的吸着により生じる検出バックグラウンドの上昇を防止でき、再現性の高い検出を行うことができる。 20

【0064】

〔実施の形態 2〕

本実施の形態に係るアレルゲン検出装置を、図 3 に示す。この検出装置は、基板 1 0 0 上に反応部 1 0 3 と流路 1 7 2（第 3 の経路）とを繋ぎ、流路 1 7 2 を少なくとも 2 つの流路 1 7 3（第 1 の経路）と流路 1 7 5（第 2 の経路）に分岐させて形成した構成であり、その他の構成は上記実施の形態 1 と同様である。流路 1 7 3（第 1 の経路）は検出部 1 0 4 と繋がっており、検出部 1 0 4 は流路 1 7 4 を介して排出穴 1 0 6 と繋がっており、流路 1 7 5（第 2 の経路）は排出穴 1 0 5 と繋がった構成である。本構成では、流路 1 7 2（第 3 の経路）はできるだけ短い長さに形成した方が好ましく、流路 1 7 3（第 1 の経路）の長さよりも短いことが好ましい。また、この流路 1 7 2 は、非特異的吸着が起こりにくい材料や、これによる膜を表面に形成したものをを用いることが好ましい。また、流路 1 7 3（第 1 の経路）の長さは、上記実施の形態 1 と同様に 0.1 mm から 100 mm であることが好ましい。 30

【0065】

また、上記実施の形態 1 と同様に、攪拌部や拡散部を設けてもよい。また、反応部に抗体を固定化する方法は、上記実施の形態 1 と同様にすることができる。また、図 2 や図 4 に示すように、バルブ 1 1 0, 1 1 1 を設けてもよい。

【0066】

〔実施の形態 3〕

実施の形態 3 は、標識酵素として、非発光基質材料を発光物質に変えるものを用いたものである。この方法においても、図 1 ～ 4 のいずれかに示した検出装置と同様のものを用いることができる。ここにおいて、検出部には、電極は形成されず、その代わりに発光物質の量を検出するための熱レンズ顕微鏡、吸光度測定器等が形成されている。標識に用いる酵素材料及び基質材料は、公知のものをを用いることができる。以下では、図 5 を用いて、この方法を説明する。

【0067】

ここでは、サンドイッチ法について説明するが、非発光性の基質材料と反応して発光物質を生じさせる酵素を用いたこと、検出物質生成ステップ、検出ステップ以外は上記方法 1 と同様であるので、説明を省略する。 40

【0068】

(検出物質生成ステップ)

標識として用いた酵素と反応して、発光物質に変化する基質材料を含む緩衝液を、導入穴2から注入し、反応部に形成された固定化抗体－アレルゲン－標識付抗体材料複合体と反応させる。これにより、複合体の量に対応した発光物質が生じる。

【0069】

(送液ステップ)

この発光物質を含む緩衝液を、反応部3から流路73を通じて検出部4に送液する。

【0070】

(検出ステップ)

検出部4において、発光性物質の量を熱レンズ顕微鏡で測定することにより、アレルゲンの量が測定できる。

【0071】

上記方法においても、発光強度のバックグラウンドの上昇の問題が生じないため、再現性よく、高感度に検出できる。

【0072】

本発明の方法において、反応部3における、アレルゲンと固定化抗体の反応、標識付抗体と固定化抗体－アレルゲン複合体との反応、標識酵素による基質材料を発光性物質に変える酵素反応を液の流れを所定の時間だけ止めて行わせてもよい。液を止める時間は、用いる材料に大きく左右されるが、数マイクロ秒から数十分に設定される。これにより、反応の再現性がよくなり、本発明の効果と相乗的に再現性向上に繋がる。

【0073】

(実施例)

実施例を用いて、本発明を更に説明する。以下では、検出対象物質として、スギ花粉のアレルゲンであるCry j-1を用い、検出物質として電極活性物質を用い、サンドイッチ法を採用した例を示すが、本発明はこれに限定されるものではないことはもちろんのことである。

【0074】

図6に示すような、ガラス基板200上に、導入穴202、排出穴205、206、反応部303、検出部204及びそれらを連結する流路271、272、273、274、275を形成した構成のマイクロチップを作製した。ここで、流路273が第1の経路に該当し、流路275が第2の経路に該当し、流路272が第3の経路に該当するものである。

【0075】

具体的には、イソプロピルアルコールで超音波洗浄した52mm角のガラス基板上に、フォトリソグラフィ法によりレジストパターンを形成し、その後、フッ化水素及びフッ化アンモニウム水溶液によるウェットエッチングにより、導入穴202、排出穴205、206、反応部203、検出部204及びそれらを連結する流路271、272、273、274、275を形成した。流路271、272、273、274、275は、幅0.3mm、深さ0.05mmであり、導入穴202、排出穴205は直径3mmの円で、深さ0.05mmである。

【0076】

流路271と272の間には、図7に示すように、ビーズの粒径よりも狭く形成した(幅0.015mm)流路からなる堰き止め部218を設けており、抗体を固定化したビーズが反応部から流去することを防止している。検出部204は、幅2mm、長さ5mm、深さ0.05mmであり、図8に示すように、蓋216表面の検出部に対応する位置に別途形成した、図9に示すような櫛型作用電極220、対抗電極221、参照電極222からなる電極223が、液に接触するように配置されている。この電極は、公知の方法により形成した。各電極は、蓋表面に形成した取出し端子217と配線208で電氣的に接続されている。流路273と検出部204との間には、図10に示す構造の拡散部209を

10

20

30

40

50

設けて、電極全体に液が接触するようにしている。

【0077】

また、従来の方法により、抗Cry j-1モノクローマ抗体を固定化したポリスチレンビーズを含んだ緩衝液を、導入穴202からポンプ213を用いて装置内へ注入し、堰き止め部218から導入穴方向へ約1cmの長さのビーズを充填して、反応部203とした。

【0078】

次に、本実施例の検出方法を説明する。

(準備ステップ)

pH7.4に調整したリン酸緩衝液(キャリア液)を、液溜め211からポンプ213を用いて、導入穴202から装置内に注入した。この時、バルブ214, 215は開放状態にしておき、装置内すべてに緩衝液が満たされるように設定した。 10

【0079】

0.2%のカゼイン含有緩衝液を約1時間、バルブ214, 215を開放状態にしたまま装置内すべてに流し続けて、流路271, 272, 273, 274, 275、反応部203、検出部204表面及びポンプとの接続チューブ内に、非特異的吸着を防止するためのブロッキング膜を形成した。

【0080】

(複合体生成ステップ)

バルブ215を閉じて、バルブ214を開放にしたまま、検出対象物質としてスギ花粉アレルギーであるCry j-1を0.3µg/mlの濃度で含有したリン酸緩衝液を約1µL/minの流速で流して、Cry j-1と、ビーズに固定化した抗Cry j-1モノクローマ抗体とを反応させ、抗Cry j-1モノクローマ抗体-Cry j-1複合体を生成させた。 20

【0081】

(第1洗浄ステップ)

洗浄液としてのリン酸緩衝液を、30µL/minの流速で流して、反応部の洗浄を行った。

【0082】

(標識物質反応ステップ)

酵素アルカリホスファターゼ(ALP)を標識としてつけた抗Cry j-1モノクローマ抗体を3µg/mlの濃度で含有したリン酸緩衝液を、導入穴202からポンプ213を用いて約1µL/minの流速で流して、反応部203で抗Cry j-1モノクローマ抗体-Cry j-1複合体と反応させて、抗Cry j-1モノクローマ抗体-Cry j-1-標識付抗Cry j-1モノクローマ抗体複合体を形成した。 30

【0083】

(第2洗浄ステップ)

洗浄液としてのリン酸緩衝液を、30µL/minの流速で流して、反応部の洗浄を行った。

【0084】

(検出物質生成ステップ)

次に、バルブ214を閉じて、バルブ215を開放にして、基質材料としてのパラアミノフェニルフォスフェート(PAPP)を、200µMの濃度に調整したリン酸緩衝液を反応部3まで移動させて、5分程度液を止めて放置し、検出物質である電極活性物質を生成させた。 40

【0085】

(送液ステップ)

この後、1µL/minの流速で流して、検出部204に電極活性物質を含むリン酸緩衝液を送益した。

【0086】

(検出ステップ)

検出部 204 の櫛型作用電極のジェネレーター電極に 500 mV、コレクター電極に -300 mV の電圧を印加し、その際の電流値を測定した。ここで、電流が流れ始めてから 3 分後の電流値を測定値とした。

【0087】

同様の工程を 5 回行い、それらの電流測定値を比較したところ、平均値に対し $\pm 5\%$ 以内のバラツキであった。

【0088】

(比較例)

実施例と同じ装置を用いて、以下のような方法で電流値の測定を行った。従来の装置と同じ（洗浄ステップの経路と送液ステップの経路とを同一）にするため、バルブ 214 を閉じて、215 を開放状態にして、導入穴 202、流路 271、反応部 303、流路 272、273、検出部 204、流路 274、排出穴 205 の経路のみを用いて（流路 275、排出穴 205 を用いないで）検出を行った。具体的には、以下のとおりである。

【0089】

(準備ステップ)

pH7.4 に調整したリン酸緩衝液を液溜め 211 からポンプ 213 を用いて、導入穴 202 から装置内に注入した。

【0090】

0.2% のカゼイン含有緩衝液を約 1 時間装置内すべてに流し続けて、導入穴 202、流路 271、反応部 303、流路 272、273、検出部 204、流路 274、排出穴 205 の表面及びポンプとの接続チューブ内にブロッキング膜を形成した。

【0091】

(複合体生成ステップ)

次に、検出対象物質としてスギ花粉アレルゲンである Cry j-1 を $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含有したリン酸緩衝液を約 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速で流して、ビーズに固定化した、抗 Cry j-1 モノクローマ抗体と反応させ、抗 Cry j-1 モノクローマ抗体-Cry j-1 複合体を生成させた。

【0092】

(第 1 洗浄ステップ)

洗浄液としてのリン酸緩衝液を、 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速で流して、反応部の洗浄を行った。

【0093】

(標識物質反応ステップ)

酵素アルカリホスファターゼ (ALP) を標識としてつけた抗 Cry j-1 モノクローマ抗体を $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含有したリン酸緩衝液を導入穴 202 からポンプ 213 を用いて約 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速で流して、反応部 303 で抗 Cry j-1 モノクローマ抗体-Cry j-1 複合体と反応させて、抗 Cry j-1 モノクローマ抗体-Cry j-1-標識付抗 Cry j-1 モノクローマ抗体複合体を形成した。

【0094】

(第 2 洗浄ステップ)

洗浄液としてのリン酸緩衝液を、 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速で流して、反応部の洗浄を行った。

【0095】

(検出ブッシツ生成ステップ)

次に、パラアミノフェニルフォスフェート (PAPP) を基質材料として 200 mM の濃度に調整したリン酸緩衝液を反応部 3 まで移動させて 5 分程度液を止めて放置し、検出物質を生じさせた。

【0096】

(送液ステップ)

10

20

30

40

50

この後、 $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ の流速で流して、検出部204に電極活性物質を含むリン酸緩衝液を送益した。

【0097】

(検出ステップ)

検出部204で電流値を測定した。実施例と同様に、電流が流れ始めてから3分後の電流値を測定値とした。

【0098】

同様の工程を5回行い、それらの電流測定値を比較したところ、平均値に対し $\pm 30\%$ と、実施例よりもはるかにバラツキが大きかった。

【0099】

実施例と比較例から、本発明によると、測定値のバラツキが小さく、再現性の高い検出を行うことができることがわかる。これは、本発明に係る装置、方法を採用することにより、非特異的吸着の検出に対する悪影響が解消され、再現性のないバックグラウンドの上昇という問題を防止できることによるものと考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0100】

上述したように、本発明によると、アレルゲンタンパク質の量を再現性よく測定できるアレルゲンの検出装置及び検出方法を提供でき、また、本発明はアレルゲンだけでなく、タンパク質や農薬等の化学物質の検出にも応用ができることから、その産業上の意義は大きい。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】図1は、実施の形態1に係るアレルゲン検出装置の概略図である。

【図2】図2は、図1のアレルゲン検出装置にバルブを設けた例を示す概略図である。

【図3】図3は、アレルゲン検出装置の変形例を示す概略図である。

【図4】図4は、図3のアレルゲン検出装置にバルブを設けた例を示す概略図である。

【図5】図5は、実施の形態1のアレルゲン検出方法の説明のための概略図である。

【図6】図6は、実施例に用いたアレルゲン検出装置の概略図である。

【図7】図7は、実施例に用いたアレルゲン検出装置のビーズ堰き止め部の概略図である。

【図8】図8は、実施例に用いたアレルゲン検出装置の電極部の概略部分断面図である。

【図9】図9は、実施例に用いたアレルゲン検出装置の電極の概略図である。

【図10】図10は、従来技術に係るの拡散部の概略図である。

【図11】図11は、従来技術に係る攪拌部の概略図である。

【図12】図12は、従来技術に係るジグザク状流路の概略図である。

【図13】図13は、従来技術に係る電極部の概略部分断面図である。

【図14】図14は、特許文献1のアレルゲン検出装置の概略図である。

【符号の説明】

【0102】

1、100、200 基板

2、102、202 導入穴

3、103、203 反応部

4、104、204、305 検出部

5、6、105、106、205、206 排出穴

8、216 蓋

9、223、306、307 電極

10、11、110、111、214、215 バルブ

12、15 攪拌部

13 柱状構造体

14、209 拡散部

10

20

30

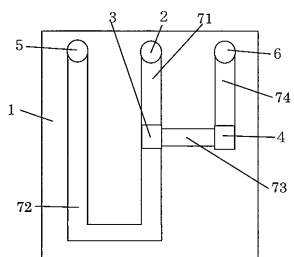
40

50

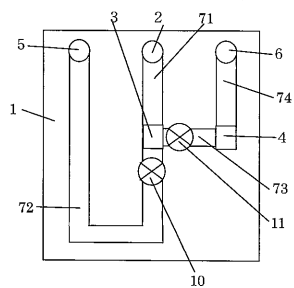
20、21、22、210、211、212 液溜めタンク
 23、213 ポンプ
 71、72、73、74、171、172、173、174、175、271、272、
 273、274、275 流路（経路）
 208 配線
 217、308 端子
 218 ビーズ堰き止め部
 220 作用電極
 221 対抗電極
 222 参照電極
 302 導入部
 303 分配部
 304 吸収部

10

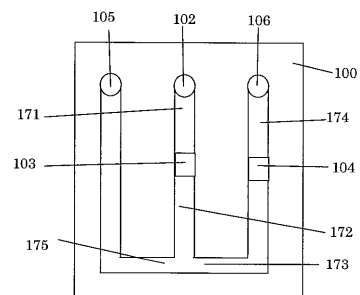
【図 1】



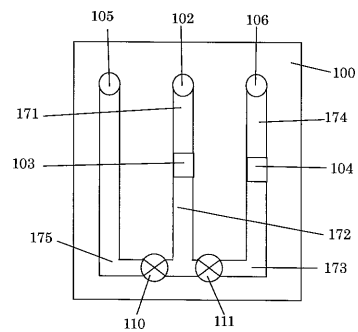
【図 2】



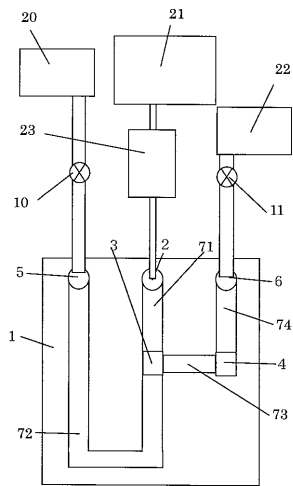
【図 3】



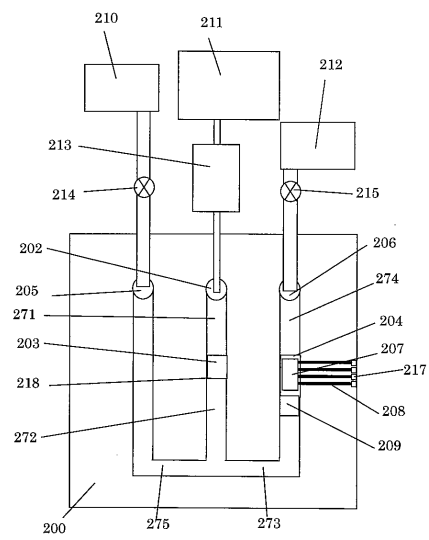
【図 4】



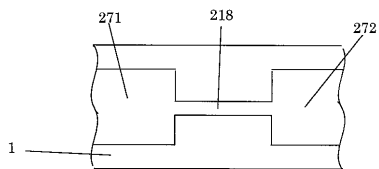
【図 5】



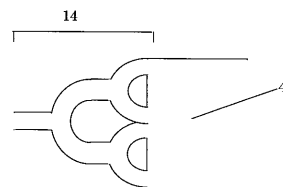
【図 6】



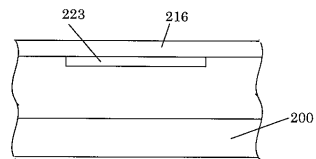
【図 7】



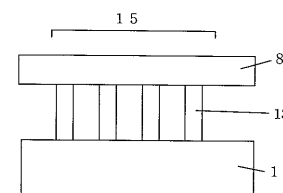
【図 10】



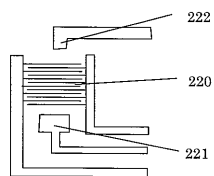
【図 8】



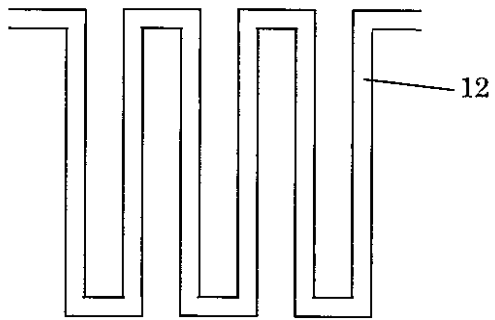
【図 11】



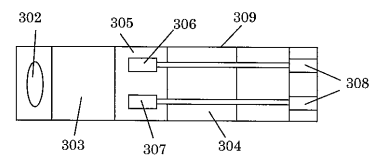
【図 9】



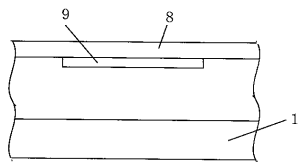
【図 1 2】



【図 1 4】



【図 1 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 有村 龍人
大阪府大阪市阿倍野区長池町２番２号 シャープ株式会社内
- (72)発明者 北川 俊明
大阪府大阪市阿倍野区長池町２番２号 シャープ株式会社内

专利名称(译)	使用免疫反应检测过敏原的方法和检测过敏原的装置		
公开(公告)号	JP2006337264A	公开(公告)日	2006-12-14
申请号	JP2005164394	申请日	2005-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	夏普株式会社		
申请(专利权)人(译)	夏普公司		
[标]发明人	伴和夫 橋口和夫 有村龍人 北川俊明		
发明人	伴 和夫 橋口 和夫 有村 龍人 北川 俊明		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.Q		
代理人(译)	大前 要 坂东喜文		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测过敏原的高灵敏度和高可重复性的方法。
 解决方案：将包含过敏原物质的载液引入反应部分，在其中保留识别物质并进行反应，以生成识别物质-过敏原物质复合物的复合物，并使清洗液流入该反应部分。然后，将洗去未反应的过敏原物质的第一洗涤步骤和含有识别物质的带有标记物质的载液引入到反应部分中，然后将洗涤液再次流入标记物质反应步骤和反应部分以及未反应的标记物中。用物质洗去识别物质的第二洗涤步骤，将包含底物的载液引入反应部分并使之反应，并将检测物质产生步骤和包含检测物的载液送至检测单元。它具有液体步骤和检测步骤。 [选择图]无

【 图 1 】

