

(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2017-173025

(P2017-173025A)

(43) 公開日 平成29年9月28日 (2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	4 G O 7 8
BO 1 F 7/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
BO 1 F 7/18 (2006.01)	GO 1 N 33/53 T	
BO 1 F 7/16 (2006.01)	BO 1 F 7/00 A	
	BO 1 F 7/00 B	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-56826 (P2016-56826)
 (22) 出願日 平成28年3月22日 (2016.3.22)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. Tween

(71) 出願人 000231464
 株式会社アルバック
 神奈川県茅ヶ崎市萩園2500番地
 (74) 代理人 100104215
 弁理士 大森 純一
 (74) 代理人 100196575
 弁理士 高橋 満
 (74) 代理人 100117330
 弁理士 折居 章
 (74) 代理人 100160989
 弁理士 関根 正好
 (74) 代理人 100168181
 弁理士 中村 哲平
 (74) 代理人 100168745
 弁理士 金子 彩子

最終頁に続く

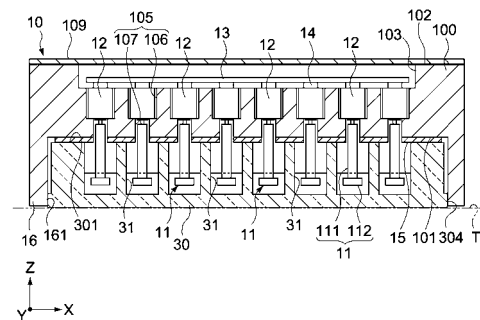
(54) 【発明の名称】 攪拌方法、分析方法及び攪拌装置

(57) 【要約】

【課題】マルチウェルプレート内の溶液に含まれる生体分子の気液界面での変性凝集を抑制することができる攪拌方法、分析方法及び攪拌装置を提供する。

【解決手段】本発明の一形態に係る攪拌装置は、免疫学的測定用の攪拌装置であって、ケーシングと、複数の攪拌棒と、駆動部とを具備する。上記ケーシングは、マルチウェルプレートの上面に対向する主面部を有する。上記複数の攪拌棒は、上記主面部から上記マルチウェルプレートの各ウェルに向かって突出し、上記各ウェルに収容された溶液の液面よりも下側に位置する攪拌具をそれぞれ有する。上記駆動部は、上記ケーシングに配置され、上記複数の攪拌棒各々をその軸まわりに回転させる。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫学的測定法における溶液の攪拌工程に使用されるマルチウェルプレートに収容された溶液の攪拌方法であって、

前記マルチウェルプレートの各ウェルに生体分子を含む溶液を添加し、

前記マルチウェルプレートの上に、前記各ウェルの内部に向かって突出する複数の攪拌棒を有する攪拌装置を載置することで、前記複数の攪拌棒の先端部に設けられた攪拌具を前記各ウェル内の溶液の液面よりも低い位置に配置し、

前記複数の攪拌棒各々をその軸まわりに回転させることで、前記各ウェル内の溶液を攪拌する

攪拌方法。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の攪拌方法であって、

前記生体分子は、タンパク質を含む

攪拌方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の攪拌方法であって、

前記攪拌具は、前記攪拌棒の軸部に対して直交する方向に突出する羽根部で構成される攪拌方法。

20

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 つに記載の攪拌方法であって、

前記複数の攪拌棒の回転数は、毎分 2 5 0 回転以上毎分 3 0 0 0 回転以下である

攪拌方法。

【請求項 5】

マルチウェルプレートを用いた分析方法であって、

前記マルチウェルプレートの各ウェルに生体分子を含む溶液を添加し、

前記マルチウェルプレートの上に、前記各ウェルの内部に向かって突出する複数の攪拌棒を有する攪拌装置を載置することで、前記複数の攪拌棒の先端部に設けられた攪拌具を前記各ウェルに収容された溶液の液面よりも下側の位置に配置し、

前記複数の攪拌棒各々をその軸まわりに回転させることで、前記各ウェルに収容された溶液を攪拌し、

30

攪拌した前記溶液を分析する

分析方法。

【請求項 6】

免疫学的測定用の攪拌装置であって、

マルチウェルプレートの上面对向する主面部を有するケーシングと、

前記主面部から前記マルチウェルプレートの各ウェルに向かって突出し、前記各ウェルに収容された溶液の液面よりも下側に位置する攪拌具をそれぞれ有する複数の攪拌棒と、

前記ケーシングに配置され、前記複数の攪拌棒各々をその軸まわりに回転させる駆動部と

40

を具備する攪拌装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、例えば ELISA 等の免疫学的測定法に適用可能な攪拌方法、分析方法及び攪拌装置に関する。

【背景技術】**【0002】**

マルチウェルプレートは、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロタイタープレート等とも称され、医学、薬学、生化学、化学等の研究分野において、実験用あ

50

るいは検査用器具として広く用いられている。マルチウェルプレートは、一般に、6、24、96、384、1536個のウェルを有し、それぞれのウェルに1マイクロリットル～数ミリリットル程度の反応溶液を入れることができる。反応後の溶液を検出するためにプレートリーダーが用いられる他、溶液の添加、ウェルの洗浄のための自動溶液添加吸引装置およびプレート自体を搬送するための搬送システムなどが各社から汎用品として市販されている。これらの背景のため、現在、マルチウェルプレートのサイズに関する規格化が行われており、American National Standards Institute (ANSI) および Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS) により、外周、ウェルの位置、プレートの厚みなどが規定されている（非特許文献1）。

【0003】

マルチウェルプレートの用途として、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) や RIA (Radio Immuno Assay) 等の免疫学的測定分野が挙げられる。これらにおいては固相支持体に直接、もしくは専用試薬を介して抗体を固定化し、標的物質を含むサンプル溶液、抗体や標識二次抗体、基質溶液を順次添加した後、発光あるいは吸収を測定することによって標的物質の定量を行う。通常、それぞれの物質溶液は、添加された後、そのまま静置される。

【0004】

しかしながら、タンパク質性の抗原、抗体、標識二次抗体等の吸着速度は溶液の攪拌速度に依存するため、静置した場合では吸着に要する時間が非常に長くなる。例えば、一般的なELISAキットで推奨されている静置時間として1時間程度から12時間まであり、したがってELISA測定の全作業時間は必然的に半日から1日程度かかってしまい、スループットが低い。

【0005】

測定を迅速に行うためには、抗原、抗体、標識二次抗体等を吸着させる際にプレートを攪拌する必要性が生じる。現在日常的に用いられている方法は、プレート全体を水平方向に延運動させて中の溶液をミキシングする方法（渦動攪拌：Orbital shaking）であり、簡易な攪拌方法として広く知られている（例えば特許文献1参照）。

【0006】

渦動攪拌では、回転運動によって生じた力によりマルチウェルプレートの壁面で溶液を押すことで溶液を回転させるが、十分な攪拌速度を得るためには円運動の径を大きくするか回転速度を上げる必要がある。例えば、96ウェルのプレートにおいて少量の液体を攪拌するのに十分な攪拌効率を得るためには、回転直径が3mmの場合で1500rpmの回転数が必要となる。このような高速で渦動攪拌させるためには装置自体の構造的な制約、騒音や振動、液の飛び跳ね、使用するモータの負荷等の問題がある。

【0007】

さらに渦動攪拌で最も問題となるのは、効果的な攪拌効率を得ようとする場合に必然的に液体が渦を巻くような形となり、気液界面が激しく揺動することになる結果、その界面の影響で液体中のタンパク質等の生体分子の変性や凝集が起こることである。タンパク質の揺動のある気液界面での変性凝集を防止することに関しては、特に抗体医薬品等の生産、保存時において、気液界面がないように液をボトルに充填すること、凝集阻害薬を添加することなどが提案されている（非特許文献2）。しかしながら、マルチウェルプレートでその測定時にウェルに入れる溶液は通常その高さの半分以下であり、気液界面をなくすることは不可能である。また、凝集阻害薬はタンパク質の固相抗体への吸着も阻害する可能性があり、使用しないことが望ましい。

【0008】

以上のように、気液界面でのタンパク質の変性凝集の問題は渦動攪拌における本質的な問題であり、回避することは難しい。ELISA測定においては、タンパク質の凝集変性が起こると、固相への非特異的な吸着が増えることによるバックグラウンドノイズの増加が起こる。また、界面で凝集が起こると溶液のタンパク質濃度が低下することによるシグナルの低下が起こることが考えられる。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2007-237174号公報

【0010】

【非特許文献1】http://www.slas.org/default/assets/File/ANSI_SLAS_4-2004_WellPositions.pdf

【非特許文献2】Aggregates in Monoclonal Antibody Manufacturing Processes, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108, No. 7, July, 2011

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

以上のような事情に鑑み、本発明の目的は、マルチウェルプレート内の溶液に含まれる生体分子の気液界面での変性凝集を抑制することができる攪拌方法、分析方法及び攪拌装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記目的を達成するため、本発明の一形態に係る攪拌方法は、免疫学的測定法における溶液の攪拌工程に使用されるマルチウェルプレートに収容された溶液の攪拌方法であって、上記マルチウェルプレートの各ウェルに測定対象物質を含む溶液を添加することを含む。

20

上記マルチウェルプレートの上に、上記各ウェルの内部に向かって突出する複数の攪拌棒を有する攪拌装置を載置することで、上記複数の攪拌棒の先端部に設けられた攪拌具が上記各ウェル内の溶液の液面よりも低い位置に配置される。

上記複数の攪拌棒各々をその軸まわりに回転させることで、上記各ウェル内の溶液が攪拌される。

【0013】

上記攪拌方法において、各攪拌棒は、先端部に設けられた攪拌具を各ウェル内の溶液の液面よりも低い位置に配置された状態で回転し、上記各ウェル内の溶液を攪拌する。これにより溶液の液面の揺動が抑制されるため、溶液中の生体分子の気液界面での凝集変性を抑制しつつ、溶液を効率よく攪拌することができる。

30

【0014】

上記生体分子は特に限定されず、典型的には、タンパク質性の抗原、抗体、標識二次抗体等を含む。

【0015】

上記複数の攪拌棒の回転数は特に限定されず、攪拌具の形態に応じて適宜設定可能であり、例えば、毎分250回転以上毎分2000回転以下である。

【0016】

上記攪拌具の構成は特に限定されず、例えば、上記攪拌棒の軸部に対して直交する方向に突出する羽根部で構成される。

40

【0017】

上記攪拌方法は、医学、薬学、生化学、化学等の研究分野に広く適用可能であり、典型的には、免疫学的測定法における溶液の攪拌工程に使用可能である。

【0018】

本発明の一形態に係る分析方法は、マルチウェルプレートを用いた分析方法であって、上記マルチウェルプレートの各ウェルに生体分子を含む溶液を添加することを含む。

上記マルチウェルプレートの上に、上記各ウェルの内部に向かって突出する複数の攪拌棒を有する攪拌装置を載置することで、上記複数の攪拌棒の先端部に設けられた攪拌具が上記各ウェルに収容された溶液の液面よりも下側の位置に配置される。

上記複数の攪拌棒各々をその軸まわりに回転させることで、上記各ウェルに収容された

50

溶液が撹拌される。

撹拌した上記溶液が分析される。

【 0 0 1 9 】

本発明の一形態に係る撹拌装置は、免疫学的測定用の撹拌装置であって、ケーシングと、複数の撹拌棒と、駆動部とを具備する。

上記ケーシングは、マルチウェルプレートの上面に対向する主面部を有する。

上記複数の撹拌棒は、上記主面部から上記マルチウェルプレートの各ウェルに向かって突出し、上記各ウェルに収容された溶液の液面よりも下側に位置する撹拌具をそれぞれ有する。

上記駆動部は、上記ケーシングに配置され、上記複数の撹拌棒各々をその軸まわりに回転させる。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

以上述べたように、本発明によれば、マルチウェルプレート内の溶液に含まれる生体分子の気液界面での変性凝集を抑制することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】本発明の一実施形態に係る撹拌方法及び分析方法に用いられる撹拌装置を示す斜視図である。

【図 2】上記撹拌装置の X 軸方向に沿った断面図である。

【図 3】撹拌装置がマルチウェルプレートに取り付けられた状態における X 軸方向に沿った断面図である。

【図 4】上記撹拌装置における撹拌棒の詳細を示す正面図及び側面図である。

【図 5】上記撹拌棒と液面との関係を説明する要部拡大図である。

【図 6】実験例に係る一実験結果を示す図である。

【図 7】上記実験例に係る他の実験結果を示す図である。

【図 8】液面通過運転時の撹拌棒と液面との関係を説明する要部拡大図である。

【図 9】上記実験例に係るさらに他の実験結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

以下、図面を参照しながら、本発明の実施形態を説明する。

【 0 0 2 3 】

図 1 は、本発明の一実施形態に係る撹拌方法及び分析方法に用いられる撹拌装置を示す斜視図、図 2 は、撹拌装置の X 軸方向に沿った断面図、図 3 は、撹拌装置がマルチウェルプレートに取り付けられた状態における X 軸方向に沿った断面図である。

【 0 0 2 4 】

なお各図において X 軸および Y 軸方向は相互に直交する水平方向を示し、Z 軸方向はこれらに直交する高さ方向を示している。

【 0 0 2 5 】

[全体構成]

本実施形態の撹拌装置 1 は、撹拌ユニット 10 と、コントローラ 20 とを備える。

【 0 0 2 6 】

撹拌ユニット 10 は、マルチウェルプレート 30 に取り付け可能に構成される。撹拌ユニット 10 は、マルチウェルプレート 30 のウェル 31 内に収容された溶液を撹拌するための複数の撹拌棒 11 を有する。複数の撹拌棒 11 は、マルチウェルプレート 30 の各ウェルに対応して配列されている。

【 0 0 2 7 】

コントローラ 20 は、撹拌ユニット 10 の駆動を制御するためのもので、典型的には、CPU (Central Processing Unit)、メモリ (ROM (Read Only Memory)、RAM (Random Access Memory)) を有するコンピュータで構成される。コントローラ 20 は、汎

10

20

30

40

50

用のコンピュータで構成されてもよいし、専用のコンピュータで構成されてもよい。

【0028】

コントローラ20は、攪拌ユニット10に電氣的に接続され、攪拌棒11を駆動するモータの回転を個別にあるいは共通に制御するように構成される。本実施形態においてコントローラ20は、攪拌ユニット10に対して配線部材21を介して電氣的に接続されるが、これに限られず、例えば無線によって攪拌ユニット10と電氣的に接続されてもよい。

【0029】

マルチウェルプレート30は、複数のウェル31がマトリクス状に形成された上面301と、長辺側の側面302と、短辺側の側面303とを有する略矩形の板状部材で構成される。マルチウェルプレート30は、典型的には、透光性を有する合成樹脂材料の射出成形体で構成される。

10

【0030】

複数のウェル31は、所定間隔でマトリクス状に配列されている。図示の例では、短辺方向(X軸方向)に整列した8個のウェル31が長辺方向(Y軸方向)に12列配列されることで、計96個のウェルが形成される。ウェル31の配列間隔は、約9mmである。なお、ウェルの数はこの例に限られず、6個、24個、384個、1536個等であってもよい。

【0031】

マルチウェルプレート30としては、典型的には市販の汎用品が用いられる。例えば、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社(Thermo Fisher Scientific K.K)製「Nunc 96マイクロウェルプレート」が適用可能である。

20

【0032】

[攪拌ユニット]

以下、攪拌ユニット10の詳細について、図2および図3を参照して説明する。

【0033】

攪拌ユニット10は、ケーシング100と、複数の攪拌棒11と、複数のモータ12と、装着部16とを有する。

【0034】

ケーシング100は、例えばアルミニウム合金等の金属材料で構成される。ケーシング100は、略矩形の板状に形成され、その一方側の面が、マルチウェルプレート30の上面301と対向する主面部101として形成される。主面部101は、マルチウェルプレート30の上面301を覆うことができる大きさに形成される。

30

【0035】

ケーシング100の主面部101とは反対側の面に相当する上面部102には、複数のモータ12を駆動する回路基板13を収容する凹部103が形成されている。凹部103は、ケーシング100の上面部102に取り付けられたカバー109によって被覆される。

【0036】

なお回路基板13は、ケーシング100の内部に設けられる場合に限られず、ケーシング100の外部に配線を引き回すことでケーシング100の外部に設けられてもよいし、コントローラ20と一体的に構成されてもよい。

40

【0037】

装着部16は、後述するようにケーシング100と一体的に設けられ、マルチウェルプレート30を収容可能に構成された空間部S1を有する。図3に示すように、装着部16は、主面部101の周縁からマルチウェルプレート30の外周に向かって垂下する周壁で構成され、その内部に空間部S1を形成する。上記周壁の高さは、ケーシング100がマルチウェルプレート30の上面301に載置された際、上記周壁の底部が作業テーブルT(図3参照)に接触しない高さに設定される。

【0038】

複数の攪拌棒11は、空間部S1に収容されたマルチウェルプレート30のすべてのウ

50

エル 3 1 に対応するようにケーシング 1 0 0 にマトリクス状に配置されている。複数の攪拌棒 1 1 は、主面部 1 0 1 からマルチウェルプレート 3 0 に向かって突出し、各ウェル 3 1 の内部に配置される。複数の攪拌棒 1 1 は、それぞれ同一の構成を有し、ケーシング 1 0 0 に配置された複数のモータ 1 2 の駆動軸にそれぞれ連結されている。

【 0 0 3 9 】

攪拌ユニット 1 0 は、使用されるマルチウェルプレートの種類（あるいはウェルの数）に応じて、攪拌棒 1 1 やモータ 1 2 の配列間隔、空間部 S 1 の形状等が最適化される。

【 0 0 4 0 】

図 2 に示すように、ケーシング 1 0 0 には凹部 1 0 3 と空間部 S 1 とを相互に連結する複数の段付き孔 1 0 5 が Z 軸方向に沿って形成されている。複数の段付き孔 1 0 5 は、凹部 1 0 3 の底面にマトリクス状に配列され、それぞれ大径部 1 0 6 と小径部 1 0 7 とを有する。

10

【 0 0 4 1 】

大径部 1 0 6 は、凹部 1 0 3 側に位置し、モータ 1 2 を収容可能な大きさに形成されている。小径部 1 0 7 は、空間部 S 1 側に位置し、攪拌棒 1 1 を収容可能な大きさに形成されている。小径部 1 0 7 は、大径部 1 0 6 と同心的に形成され、大径部 1 0 6 と小径部 1 0 7 との段部にモータ 1 2 がそれぞれ固定される。

【 0 0 4 2 】

モータ 1 2 は、攪拌棒 1 1 をその軸まわりに回転させる駆動部を構成する。モータ 1 2 の回転数は特に限定されず、攪拌棒 1 1 の先端部に設けられる攪拌具（例えば後述するパドル部 1 1 2 に相当）の形状あるいは形態、攪拌対象である溶液の種類等に応じて適宜設定可能である。本実施形態では、モータ 1 2 の回転数は、2 5 0 r p m ~ 3 0 0 0 r p m（毎分 2 5 0 ~ 3 0 0 0 回転）の範囲で設定され、回転数精度が例えば ± 2 % 以下のモータが用いられる。これにより、低速攪拌および高速攪拌のいずれにも対応することができるとともに、攪拌棒 1 1 の高精度な回転数制御を実現することが可能となる。

20

【 0 0 4 3 】

モータ 1 2 は、パルス信号で駆動されるステッピングモータで構成されるが、これに限られず、例えば、シンクロナスモータ、ブラシレス D C モータ等の回転数を高精度に制御することが可能なモータが適用可能である。モータ 1 2 の大きさも特に限定されず、例えば直径 6 mm 以下のものが用いられる。

30

【 0 0 4 4 】

各モータ 1 2 は、フレキシブル配線基板 1 4 を介して回路基板 1 3 に電氣的に接続される。回路基板 1 3 は、配線部材 2 1 を介してコントローラ 2 0 に電氣的に接続され、各モータ 1 2 の駆動は、コントローラ 2 0 により個別に制御可能に構成されている。各モータ 1 2 は、同一の回転方向に同一の回転数（回転速度）で駆動されるが、これに限られず、回転方向、回転数をモータ毎に異ならせることも可能である。また、すべてのモータ 1 2 は同時に起動されてもよいし、一部のモータ 1 2 が選択的に起動されてもよい。

【 0 0 4 5 】

モータ 1 2 の駆動時に発生する熱は、金属製のケーシング 1 0 0 を介して外部へ放熱される。これにより、マルチウェルプレート 3 0 への熱伝達を抑制し、ウェル 3 1 内の溶液の蒸発あるいは熱による変質等を抑えることができる。

40

【 0 0 4 6 】

攪拌棒 1 1 は、モータ 1 2 の駆動軸に連結される軸部 1 1 1 と、軸部 1 1 1 の先端に形成されたパドル部 1 1 2 とを有する。パドル部 1 1 2 の形状や個数は特に限定されず、軸部 1 1 1 の軸まわりの回転により所望とする溶液の攪拌機能が得られる種々の形態が採用可能である。

【 0 0 4 7 】

本実施形態において攪拌具としてのパドル部 1 1 2 は、攪拌棒 1 1 の軸部 1 1 1 に対して直交する方向に突出する羽根部で構成される。図 4 A , B は、パドル部 1 1 2 の詳細を示す正面図及び側面図である。

50

【0048】

パドル部112は、軸部111の先端から相対向する2方向へ突出し、その断面形状は、上端112aを底辺とし下端112bを頂点とする概略二等辺三角形形状に形成される。パドル部112の突出方向は上述のように相対する2方向に限られず、例えば、相互に交差あるいは直交する3以上の方向であってもよい。

【0049】

図3に示すように、攪拌棒11は、マルチウェルプレート30が空間部S1に收容された状態において、各ウェル31の内部に配置される。典型的には、各攪拌棒11は、各ウェル31の中心軸上に配置される。ウェル31の底部からの攪拌棒11の高さは特に限定されず、ウェル31の大きさや溶液の量、種類等に応じて適宜設定され、典型的には、攪拌棒11の先端がウェル31の底部に接触しない高さ（例えばウェル31の底部から0.1mm以上離れた高さ）に設定される。

10

【0050】

図5は、ウェル31内に配置された攪拌棒11の要部拡大図である。本実施形態において、各攪拌棒11のパドル部112は、各ウェル31に收容された溶液Fの液面（気液界面）FLよりも低い位置に配置される。液面FLよりも低い位置とは、パドル部112の上端112aが液面FLよりも下の位置をいい、パドル部112の全体が溶液Fの中に浸漬されている。

【0051】

液面FLからパドル部112の上端112aまでの深さは特に限定されず、パドル部112の形状、大きさ、溶液Fの粘性、攪拌棒11の回転数等に応じて適宜設定され、典型的には、攪拌棒11の回転中に溶液Fの飛沫が形成されない深さ、より好ましくは、攪拌棒11の回転中に液面FLの揺動が抑えられる深さに設定される。本実施形態では、液面FLからパドル部112の上端部112aまでの深さは、0.1mm以上とされ、好ましくは、0.5mm以上である。これにより、攪拌棒11の回転中における液面FLの揺動を効果的に抑えることができる。

20

【0052】

また、溶液Fに浸かる攪拌棒11の長さから、ウェル31に添加される溶液の容積を求めることができる。すなわち、溶液Fに浸かる攪拌棒11の長さが分かれば液面FLの高さが求まり、液面FLの高さから溶液Fがウェルに占める体積が求まり、この体積から、溶液Fに浸かる攪拌棒11の体積を差し引けば、溶液Fの容積が求まる。

30

例えば、パドル部112の下端部112bからウェル31の底部までの距離をD1（mm）、液面FLからパドル部112の上端部112aまでの距離をD2（mm）とすると、溶液Fの容積は、D1=D2=0.1の場合は54.846（ μL ）、D1=D2=0.5の場合は80.959（ μL ）、D1=0.5、D2=1の場合は96.494（ μL ）、D1=D2=1の場合は113.600（ μL ）である。

なお上記とは逆に、ウェル31に收容される溶液の容積から、溶液Fに浸かる攪拌棒11の長さを求めてもよい。

【0053】

各攪拌棒11は、ケーシング11の主面部101からの垂下長（主面部101から空間部S1への突出長）が個々に又は一括して調整することが可能に構成されてもよい。これにより、各ウェル31に收容される溶液Fの液面FLの高さに応じて各攪拌棒11を最適な高さ位置に設定することが可能となる。

40

【0054】

ウェル31に添加される溶液Fには、測定対象である生体分子を含む溶液が用いられる。生体分子としては、免疫学的測定法によって検出可能な種々の生物学的材料が含まれ、例えば、尿酸、脂肪族カルボン酸、胆汁酸、バラ-アミノ馬尿酸、馬尿酸、グルクロン酸、芳香族カルボン酸、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、ADP、ATP、尿素、尿素窒素、アミン、酵素、ウロビリノーゲン、ウロビリノ、カリクレイン、エストロゲン、エンドトキシン、エリスロポエチン、チオール、ケトン、アセチルアセトン、アルデヒド、

50

糖類、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、トロニン、クレアチニン、クレアチン、糖結合タンパク、糖結合ペプチド、色素、ホルモン、プロスタグランジン、脂質、ヒスタミン、麻薬、麻酔剤、アルコール、過酸化物質、グアニジン等が挙げられる。

【0055】

免疫学的測定法 (Immunoassay) は、抗原と抗体の結合反応を利用して抗原等を定量的に測定する方法であり、例えば、酵素結合固相免疫アッセイ (ELISA)、酵素結合アッセイ (EIA)、放射性免疫アッセイ (RIA)、蛍光結合アッセイ (FIA)、化学発光アッセイ (CLA)、電気化学発光アッセイ (ECLA)、微粒子捕捉アッセイ、間接競合イムノアッセイ、直接競合イムノアッセイ、非競合イムノアッセイ、サンドイッチイムノアッセイ、凝集アッセイ、細胞ベースアッセイ等が挙げられる。

10

【0056】

撹拌ユニット 10 は、主面部 101 に設けられたシート部材 15 をさらに備える。シート部材 15 は、収容部 104 に収容されたマルチウェルプレート 30 の上面 301 に弾性的に接触するように構成される。

【0057】

シート部材 15 の設置は、撹拌対象溶液が揮発性溶液である場合に特に効果的であり、長時間の撹拌動作による溶液の蒸発を効果的に防止することができる。シート部材 15 の構成材料は、耐熱性および耐薬品性を有し、マルチウェルプレート 30 の上面 301 に弾性的に接触し得る材料であれば特に限定されず、典型的には、シリコンゴムが挙げられる。

20

【0058】

シート部材 15 は、ケーシング 100 の主面部 101 に粘着層等を介して貼り付けられる。シート部材 15 は、主面部 101 に着脱自在に取り付けられることが好ましく、これによりシート部材 15 の交換等を容易に行うことが可能となる。

【0059】

さらに、シート部材 15 の厚みで、各撹拌棒 11 とマルチウェルプレート 30 との間の距離を調整することができる。例えば、ケーシング 100 の主面部 101 からの撹拌棒 11 の突出量 (長さ) を 14.4 mm としたとき、厚み 4 mm のシート部材 15 を用いた場合には、シート部材 15 の下面から撹拌棒 11 の先端までの長さは 10.4 mm となる。同様に、厚み 5 mm のシート部材 15 を用いた場合の撹拌棒 11 の長さは、9.4 mm となる。

30

【0060】

そして本実施形態の撹拌ユニット 10 は、マルチウェルプレート 30 に装着されることでケーシング 100 をマルチウェルプレート 30 に位置決めする装着部 16 を備える。

【0061】

装着部 16 は、ケーシング 100 に設けられ、空間部 S1 に収容されたマルチウェルプレート 30 の外周面に接触する係合面 161 を有する。図 3 に示すように、係合面 161 は、マルチウェルプレート 30 の側壁底部に形成された凸部 304 の外周面に係合可能に構成される。係合面 161 は、典型的には、平坦な面 (垂直な面) で形成されるが、これに限られず、テーパ面や曲面で形成されてもよい。

40

【0062】

装着部 16 は、マルチウェルプレート 30 の外周面に装着されることで、ケーシング 100 をマルチウェルプレート 30 に対して位置決めする。位置決め精度確保の観点から、装着部 16 は、典型的には、マルチウェルプレート 30 の 4 側面 (全周) に係合可能に形成されるが、これに限られず、係合位置は、例えばマルチウェルプレート 30 の外周面の一部、例えば 3 側面であってもよい。

【0063】

ケーシング 100 をマルチウェルプレート 30 に位置決めするための方法は、装着部 16 とマルチウェルプレート 30 の外周部との係合を利用する以外の方法であってもよい。例えば、係合面 161 に接することでマルチウェルプレート 30 を保持する板材を用意し

50

、その板材にケーシング 100 を位置決めする方法が採用されてもよい。

【0064】

[攪拌装置の動作]

次に、以上のように構成される攪拌装置 1 の典型的な動作について説明する。

【0065】

まず、マルチウェルプレート 30 の各ウェル 31 に所定量の溶液 F が添加される。溶液 F としては、攪拌が必要な種々の溶液を用いることが可能であり、測定法あるいは工程に応じて、使用される溶液が異なってもよい。

【0066】

続いて、攪拌ユニット 10 は、マルチウェルプレート 30 の上面 301 に載置され、これにより各攪拌棒 11 がマルチウェルプレート 30 の各ウェル 31 の内部に配置されるとともに、各攪拌棒 11 のパドル部 112 が溶液 F の液面 FL よりも低い位置に配置される (図 5 参照)。装着部 16 は、ケーシング 100 をマルチウェルプレート 30 の上面 301 に配置する際、空間部 S1 に収容されるマルチウェルプレート 30 の凸部 304 の外周面に係合する。これによりケーシング 100 がマルチウェルプレート 30 に位置決めされる。

10

【0067】

コントローラ 20 は、モータ 12 へ駆動パルス信号を出力し、各攪拌棒 11 を所定回転数で回転させる。これにより、各ウェル 31 の溶液 F がパドル部 112 の回転により攪拌される。典型的には、コントローラ 20 は、各攪拌棒 11 を同一の回転数で回転させるが、ウェル 31 ごとに異なる回転数で攪拌棒 11 を回転させてもよい。さらにコントローラ 20 は、各モータ 12 を同時に起動させてもよいし、各モータ 12 を所定の順序で起動させてもよい。

20

【0068】

ケーシング 100 の主面部 101 は、シート部材 15 を介してマルチウェルプレート 30 の上面 301 に密着する。これにより隣接する複数のウェル 31 の間はシート部材 15 によって遮蔽されるため、シート部材 15 によって各ウェル 31 の気密性が向上し、ウェル 31 内の溶液の蒸発が抑制される。

【0069】

本実施形態においては、装着部 16 によりマルチウェルプレート 30 に対するケーシング 100 が位置決めされるため、各攪拌棒 11 もまた各ウェル 31 の内部に高い位置精度で配置される。これにより複数の微小なウェル 31 に対して複数の攪拌棒 11 を一括的に位置決めできるため、各ウェル 31 における溶液 F の攪拌処理の均一化を図ることができる。

30

【0070】

特に、各攪拌棒 11 は、パドル部 112 が各ウェル 31 内の溶液 F の液面 FL よりも低い位置に配置された状態で回転し、各ウェル 31 内の溶液 F を攪拌する。これにより、溶液 F の液面 FL の揺動が抑制されるため、溶液 F 中のタンパク質等の生体分子の気液界面での凝集変性を抑制しつつ、溶液を効率よく攪拌することができる。

【0071】

また、各攪拌棒 11 は、それぞれ個々のモータ 12 により駆動されるため、各々の攪拌棒 11 を最適かつ適切な駆動条件で回転させることができる。また、各モータ 12 は、駆動パルスによって正確な回転数を実現できるステップモータで構成されているため、各ウェル 31 における溶液 F の攪拌精度および攪拌効率を向上させることができる。

40

【0072】

以上のように本実施形態によれば、プレート全体を水平方向に円運動させる水平渦動攪拌法と比較して、各ウェル 31 の攪拌精度および攪拌効率を大幅に向上させることができる。また本実施形態によれば、各ウェル 31 内の溶液を攪拌棒 11 で個々に攪拌することができるため、ウェル 31 の位置に依存することなく均一に攪拌することができる。したがって、ELISA等の試験方法において、試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を高精

50

度に検出あるいは定量することができる。

【 0 0 7 3 】

また本実施形態によれば、攪拌速度を高精度に制御することができるため、種々の攪拌条件に容易に対応することが可能となり、ウェルごとに異なる攪拌条件を設定することも可能となる。

【 0 0 7 4 】

[分析方法]

次に、免疫学的測定法を利用した分析方法の一例として、ELISAを例に挙げて説明する。ELISAは、マルチウェルプレートを固定化担体として抗体、抗原等を検出、定量する方法として一般的に使用されており、直接法、サンドイッチ法、阻害法等が知られている。

10

【 0 0 7 5 】

直接法では、まず測定対象物質を含む試験サンプル（溶液）をマルチウェルプレートの所定のウェルに添加し、時間をおいてプレート表面に吸着させた後、溶液を取り除き、洗浄溶液で洗浄する。次に、ブロッキング溶液をウェルに添加し、一定時間後に溶液を取り除く。次に、測定対象物質に特異的に結合する抗体を含んだ溶液をウェルに添加、攪拌し、一定時間後に溶液を取り除いて洗浄溶液にて洗浄する。その後、標識二次抗体をウェルに添加、攪拌して、一定時間後に溶液を取り除いて洗浄溶液に洗浄する。標識二次抗体には一般的に、西洋ワサビペルオキシターゼ（HRP）やアルカリフォスファターゼ（AP）が用いられる。そして、基質溶液をウェルに添加、攪拌し、発色反応を測定することで試験サンプル中の測定対象物質の濃度を定量する。

20

【 0 0 7 6 】

サンドイッチ法では、マルチウェルプレートにあらかじめ測定対象物質に対する特異的な抗体を固定化しておき、測定対象物質を含む試験サンプルを添加する。その後、エピトープを持つ抗体を測定対象物質に結合させ、さらに直接法と同様に、標識二次抗体、基質の順で結合させる。サンドイッチ法は、測定対象物質を2種類の抗体でサンドイッチすることから、直接法に比べて特異性に優れている。

【 0 0 7 7 】

阻害法では、まず測定対象物質を一定量マルチウェルプレートに吸着させ、その後、試験サンプルと抗体の混合液をウェルに添加、攪拌する。一定時間後、混合液を取り除き、洗浄溶液によって洗浄を行い、二次抗体、基質を順に添加、攪拌した後、発色反応を測定する。

30

【 0 0 7 8 】

上記各方法では、濃度既知の標準サンプルを用いて検量線を作成し、測定値と検量線を用いて測定対象物質の濃度を測定する。実際の測定においては、測定対象物の特性にしたがい、上記以外の操作も採られることが多い。基本的には、抗体やサンプルを含む溶液を順次マルチウェルプレートの固相基板上に結合させていく操作となる。

【 0 0 7 9 】

上記各方法における攪拌工程には、本実施形態の攪拌方法が適用可能である。抗体等のタンパク質等の固相基板への結合速度は、一般的には結合速度定数、溶液中の濃度、溶液の攪拌速度に依存する。溶液の攪拌が十分に行われた場合、結合速度は、結合速度定数と濃度のみの関数となるが、攪拌が不十分であるときにバルクの溶液中から表面近傍へのタンパク質の拡散が律速となり、結合速度が低下する。本実施形態によれば、上述のように攪拌効率を向上させることができるため、固相基板への抗体の結合速度の低下を抑制することができる。

40

【 0 0 8 0 】

[実験例]

以下、本発明者が行った実験例について説明する。

【 0 0 8 1 】

渦動攪拌装置として、回転直径が3mmのサーモセルミキシングブロック「MB-101」（日本ジェネティクス社製）を、マルチウェルプレートとして、クリア平板イムノ滅菌96

50

ウェルプレート (NUNC) を、プレートリーダーとして、イムノリーダー「NJ-2300」(日本インターメッド社製) をそれぞれ用い、測定対象物質の450nm吸光度を測定した。

【0082】

なお試薬として、ヒト血清アルブミン(HSA)、牛血清アルブミン(BSA)、抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体(anti-HSA antibody、MFU-304日本バイオテスト研究所)、Phosphate buffered saline (PBS, P3813 シグマアルドリッチ) を用い、二次抗体としてMouse IgG-heavy and light chain antibody HRP conjugate(A90-116P BETHYL laboratories Inc.)、OPDタブレット(OPD 34006 Thermo scientific)、 H_2O_2 、Tween20、硫酸、を用いた。

【0083】

10

100ug/mL HSA-100uL PBS溶液を100uLウェルに添加し、15時間、4 で静置した。PBSにて洗浄を行い、0.2% BSA-PBS溶液 200uLにて3時間ブロッキングを行った。各濃度に希釈したanti-HSA antibodyの0.2%BSA-PBS溶液を100uL加え、サーモセルミキシングブロックにて設定回転数で15分撹拌を行った。0.05%Tween20を含むPBS溶液にて洗浄を行い、100ng/mLの二次抗体を加え、サーモセルミキシングブロックにて設定回転数で20分撹拌を行った。0.05%Tween20を含むPBS溶液にて洗浄を行い、0.5mg/mLのOPD溶液を加え20分間静置し、プレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。断りのない限りすべてのインキュベーション時間は28 で行った。

【0084】

20

測定結果を図6に示す。横軸は検出対象(抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体(anti-HSA antibody))の濃度を、縦軸はその吸光度をそれぞれ示している。撹拌の回転数は、300rpm、600rpm及び1000rpmとした。

【0085】

渦動撹拌においては、良好な撹拌効率を得るためには回転数を上げる必要がある。300rpmにおいては、撹拌効率は非常に低く実質的に撹拌していない状態と同じである。この場合、吸着時間を十分に長くとることによって検出量を向上することは可能であるが、分析時間が非常に長いものになってしまう。

【0086】

一方、検出量向上のために撹拌速度を600rpm、1000rpmと上げることにより検出量が上がったが、図6に示すように、バックグランドも上昇し、それに伴いバックグランドのばらつきが大きくなった。これは渦動撹拌で撹拌速度を十分に高めた場合、必然的にウェルプレート内の溶液が渦を巻くようになり、気液界面面積が劇的に上昇するため抗体の変性、凝集に伴う表面への非特異的吸着が見られ、バックグランドが大きくなったと考えられる。

30

【0087】

これに対して本実施形態によれば、上述のように、各撹拌棒11のパドル部112が各ウェル31内の溶液Fの液面FLよりも低い位置に配置された状態で溶液Fを撹拌するため(図5参照)、溶液Fの液面FLの揺動が抑制される。これにより溶液中のタンパク質等の生体分子の気液界面での凝集変性に伴う表面への非特異的吸着によるバックグランドの増加を抑制することができる。

40

【0088】

図7は、本実施形態の撹拌方法(以下、パドル撹拌ともいう)を適用したときの上記検出対象の濃度と吸光度との関係を示している。なお、マルチウェルプレート、プレートリーダー、試薬、操作手順は上記渦動撹拌のときと同じとした。比較として、図8に示すように、パドル部112の上端112aが液面FLよりも上側の位置(液面FLよりも高い位置)に配置された状態で撹拌棒11を600rpmで回転させたときの検出結果(液面通過運転(600rpm))を図7に併せて示す。

【0089】

パドル撹拌においては、撹拌棒11の筒状の軸部111が気液界面に垂直に接触するが、回転による液面FLの揺動は1000rpm以下ではほとんど見られない。検出量は、図7に

50

示すように、600rpm,1000rpmと回転数を変化させた場合においてほとんど変わらず、したがってバックグラウンドのばらつきも非常に小さかった。したがってパドル攪拌によれば、渦動攪拌よりも、検出対象の検出精度を高めることができる。さらに、本実施形態によれば、液面通過運転（図8）のときよりもバックグラウンドが小さく、このことから、液面通過運転よりも気液界面における抗体の凝集変性に伴う表面への非特異的吸着が低く抑えられることが確認できる。

【0090】

図9は、パドル攪拌における検出量と攪拌棒11の回転数との関係を示している。検出対象(anti-HSA antibody)の濃度は2 ng/mLである。図9に示すように、回転数の増加に伴い検出量も増加し、特に250rpm以上2000rpm以下でほぼ安定した検出量が得られ、3000rpmでバックグラウンドの影響が出始めている。したがって、攪拌棒11の好適な回転数は250rpm以上3000rpm以下であり、より好適には、250rpm以上2000rpm以下である。回転数が250rpm未満では反応が遅く、3000rpmを超えるとバックグラウンドノイズが顕著となるからである。

【0091】

一方、ELISA法において検出下限値は、下限濃度領域の傾き（Slope）と濃度0のときのばらつき（SD）の値を用いて算出される。表1に各々の攪拌方法における検出下限値（DoL）を示す。

【0092】

【表1】

攪拌方法		Slope	SD	DoL
渦動攪拌	300rpm	0.024	0.004	0.57
渦動攪拌	600rpm	0.034	0.013	1.24
渦動攪拌	1000rpm	0.043	0.015	1.17
パドル攪拌	600rpm	0.065	0.004	0.19
パドル攪拌	1000rpm	0.060	0.003	0.18
液面通過運転	600rpm	0.059	0.008	0.44

Slope：検量線の傾き

SD：濃度0のときのばらつき

DoL：検出下限値（ng/mL）

【0093】

パドル攪拌によれば、液面の揺動が抑えられ、十分な攪拌効率を得られる。この場合においては、傾きが大きく濃度0のばらつき（SD）も小さいので検出下限値（DoL）が非常に小さくなる。渦動攪拌においては、回転数が低い場合は傾き（Slope）の値が小さく、回転数が大きくなるに従い、濃度0のばらつき（SD）も大きくなるため検出下限値（DoL）はいずれの回転数においてもパドル攪拌に比べ高いものになる。

【0094】

なお、液面通過運転の場合は、液面は激しく揺動するが、攪拌効率としてはパドル攪拌と変わらないと考えられるため、傾き（Slope）の値はパドル攪拌とほぼ同じであるが、濃度0のバックグラウンドのばらつき（SD）は大きくなるため、検出下限値（DoL）は有意に上昇してしまう。

【0095】

以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明は上述の実施形態にのみ限定されるものではなく種々変更を加え得ることは勿論である。

【0096】

例えば以上の実施形態では、ウェル数が96個のマルチウェルプレート30を用いたがこれに限られず、ウェル数の異なる他のマルチウェルプレートが用いられてもよい。この場合、マルチウェルプレートの外形状やウェルの配列ピッチに応じて、攪拌棒の配列ピッチおよび装着部の大きさ等が最適化される。

【0097】

攪拌棒11の回転数の更なる精度向上のため、コントローラ20によって各攪拌棒11の回転数がモニタリング可能に構成されてもよい。この場合、例えば、ケーシングに攪拌棒11の回転数を検出するエンコーダ等の検出部が設けられ、当該検出部の出力に基づいてコントローラ20が攪拌棒11を所定回転数に制御するように構成される。

10

【0098】

また以上の実施形態では、攪拌ユニット10として図1及び図2に示した構成例を説明したが、攪拌ユニット10の構成はこれに限られない。例えば、ケーシング100の内部にモータ12を冷却する冷却ファンが配置されてもよいし、各攪拌棒11を単一のモータで回転させるようにしてもよい。

【符号の説明】

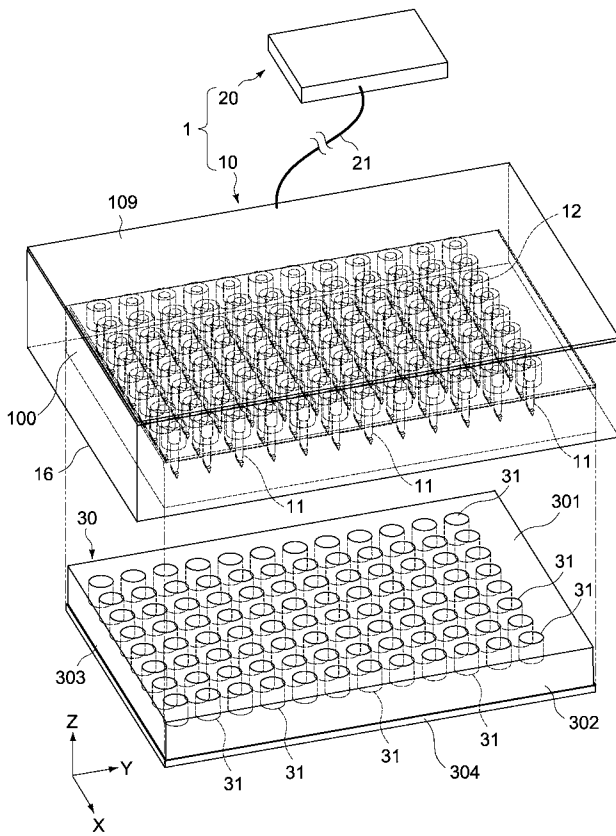
【0099】

- 1 ... 攪拌装置
- 10 ... 攪拌ユニット
- 11 ... 攪拌棒
- 12 ... モータ
- 15 ... シート部材
- 16 ... 装着部
- 20 ... コントローラ
- 30 ... マルチウェルプレート
- 31 ... ウェル
- 100 ... ケーシング
- 101 ... 主面部
- 112 ... パドル部

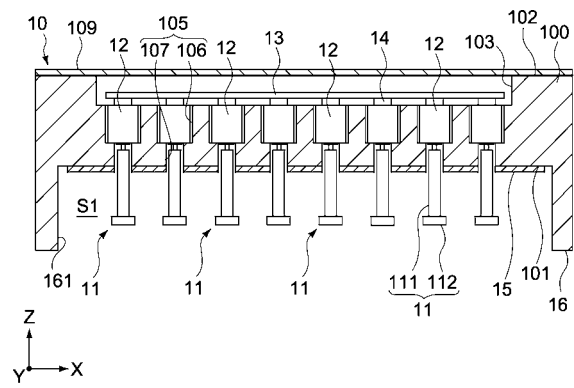
20

30

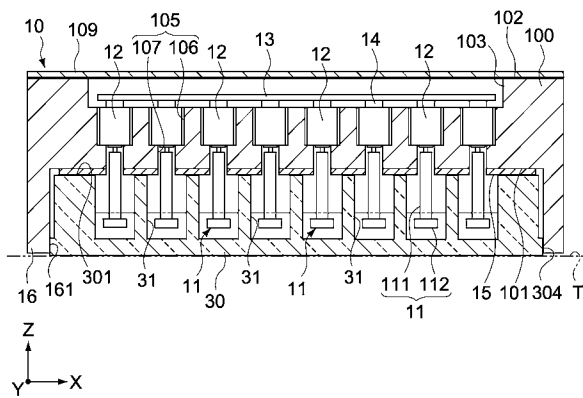
【図 1】



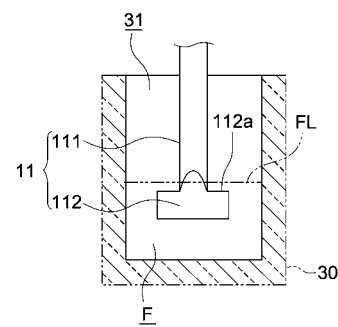
【図 2】



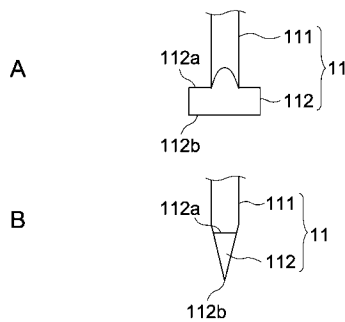
【図 3】



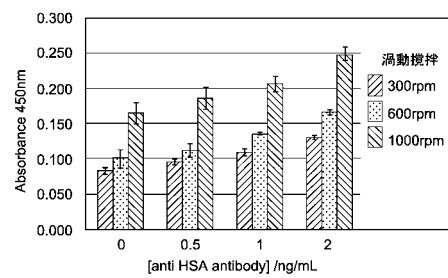
【図 5】



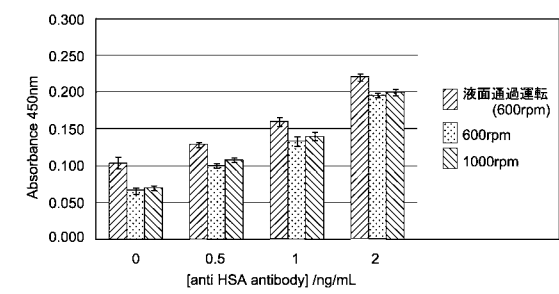
【図 4】



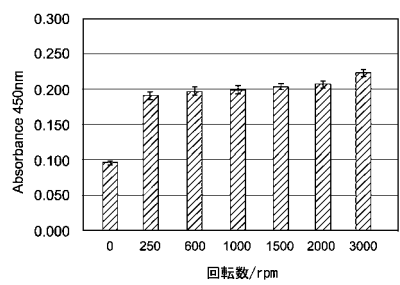
【図 6】



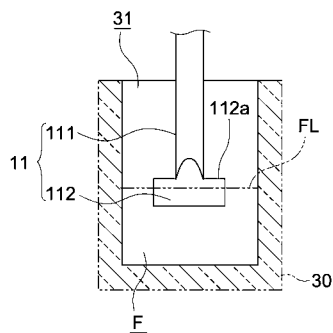
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	B 0 1 F 7/18	B
	B 0 1 F 7/16	D
	B 0 1 F 7/16	J

(74)代理人 100170346

弁理士 吉田 望

(74)代理人 100176131

弁理士 金山 慎太郎

(74)代理人 100197398

弁理士 千葉 絢子

(74)代理人 100197619

弁理士 白鹿 智久

(72)発明者 小関 智光

神奈川県茅ヶ崎市萩園 2 5 0 0 番地 株式会社アルバック内

F ターム(参考) 4G078 AA21 AB11 BA05 CA02 CA19 DA01 DB08

专利名称(译)	搅拌方法，分析方法和搅拌装置		
公开(公告)号	JP2017173025A	公开(公告)日	2017-09-28
申请号	JP2016056826	申请日	2016-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	日本真空技术株式会社		
申请(专利权)人(译)	ULVAC，Inc.的		
[标]发明人	小関智光		
发明人	小関 智光		
IPC分类号	G01N33/53 B01F7/00 B01F7/18 B01F7/16		
FI分类号	G01N33/53 G01N33/53.D G01N33/53.T B01F7/00.A B01F7/00.B B01F7/18.B B01F7/16.D B01F7/16.J		
F-TERM分类号	4G078/AA21 4G078/AB11 4G078/BA05 4G078/CA02 4G078/CA19 4G078/DA01 4G078/DB08		
代理人(译)	大森纯一 高桥充 关根 正好 中村彻平 绫子金子 吉田 望 金山晋太郎		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的课题在于提供一种搅拌方法，分析方法以及搅拌装置，其能够抑制气液界面中的多孔板内的溶液中所含的生物分子的退行性聚集。本发明的搅拌装置是一种用于免疫学测量的搅拌装置，包括壳体，多个搅拌棒和驱动部分。壳体具有与多孔板的上表面相对的主表面部分。多个搅拌棒中的每一个具有从主表面部分朝向多孔板的每个孔突出并位于每个孔中包含的溶液的液体表面下方的搅拌器。所述驱动单元被设置在壳体中，以旋转所述多个各自绕其轴线搅拌杆。

