

(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2006-275865  
(P2006-275865A)

(43) 公開日 平成18年10月12日(2006.10.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 5/02 (2006.01)</b>	GO 1 N 5/02 A	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 593	
<b>GO 1 N 33/545 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/545 Z	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2005-97303 (P2005-97303)	(71) 出願人	000001960 シチズン時計株式会社 東京都西東京市田無町六丁目1番12号
(22) 出願日	平成17年3月30日 (2005.3.30)	(72) 発明者	福島 瑞恵 東京都西東京市田無町六丁目1番12号 シチズン時計株式会社内

(54) 【発明の名称】 QCMセンサーを用いた定量方法

(57) 【要約】

【課題】 QCMセンサーを免疫センサーとして用いる場合、得られる周波数変化は抗原-抗体反応等による生体反応、あるいは吸着反応により電極表面に付着した測定対象物質の質量に比例する。しかし試料溶液中の測定対象物質の分子量が小さい場合、あるいは存在濃度が極めて低い場合、その周波数変化は非常に小さくなり、定量が極めて困難になるという問題があった。抗原-抗体反応により電極上に担持された抗体と抗原が結合した後に、更に抗体を吸着させたラテックス粒子を加え周波数変化を増幅させる方法が提案されているが、未だ十分でない。

【解決手段】 第一のラテックス粒子を加え周波数を増幅させると共に、架橋性化合物と第二のラテックス粒子を添加しラテックス同士の間での結合と凝集を発生させることにより周波数変化を増幅させる。

【選択図】 無し

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

溶液中の測定対象物質を定量する QCM センサーを用いた定量方法であって、電極表面に前記測定対象物質の特定部位と特異的に反応する基質 A が固定化されており、質量増感微粒子 a 表面に基質 B と基質 C とが固定化されており、前記基質 B は前記測定対象物質の部位のうち基質 A と反応する部位とは異なる部位と特異的に反応する物質であり、前記基質 C は前記測定対象物質、前記基質 A、前記基質 B とは反応性を示さない物質であり、前記測定対象物質が前記基質 A と前記基質 B と反応することによって、前記電極と前記質量増感微粒子 a との間に前記測定対象物質を挟みこむ工程と、表面に前記基質 C を有する質量増感微粒子 b と、前記基質 C と特異的に反応する基質 D を 1 分子中に少なくとも 2 分子以上有する架橋性化合物 E とを添加する工程とを有する QCM センサーを用いた定量方法。

10

## 【請求項 2】

前記測定対象物質を挟みこむ工程と、前記質量増感微粒子 b および前記架橋性化合物 E を添加する工程との間に未反応の前記質量増感微粒子 a を除去するための洗浄工程を有することを特徴とする請求項 1 に記載の QCM センサーを用いた定量方法。

## 【請求項 3】

前記質量増感微粒子 a または前記質量増感微粒子 b がラテックス粒子、または金コロイド粒子であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の QCM センサーを用いた定量方法。

20

## 【請求項 4】

前記基質 C がアビジン誘導体であることを特徴とする請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の QCM センサーを用いた定量方法。

## 【請求項 5】

前記架橋性化合物 E がポリエチレンオキシド鎖を介して基質 D を有する水溶性化合物であることを特徴とする請求項 1 から請求項 4 のいずれか一項に記載の QCM センサーを用いた定量方法。

## 【請求項 6】

前記基質 D がビオチン誘導体であることを特徴とする請求項 1 から請求項 5 のいずれか一項に記載の QCM センサーを用いた定量方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、QCM センサーを用いた定量方法に関し、特に溶液試料に含まれる測定対象物質を認識、定量するセンサーにおいて、微量な測定対象物質の定量を行うための増感方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

水晶振動子を利用したセンサーで、水晶電極表面上に特定の測定対象物質を認識し特異的反應を生じる機能性膜を設け、試料溶液中に存在する測定対象物質が機能膜と反応し、水晶電極表面に吸着した際の質量変化を周波数変化として捉え、測定対象物質濃度を測定する QCM センサーが開発されている。

40

## 【0003】

たとえば、電極上に特定のにおい分子を吸着する脂質膜等を形成し、におい分子の吸着に伴い周波数変化を生じる QCM においセンサーが存在する。

## 【0004】

また、電極上に特定の抗原と反応する抗体を担持し、抗原 - 抗体反応により生体試料中の抗体を定量する QCM 免疫センサーが存在する。

## 【0005】

50

QCMセンサーを免疫センサーとして用いる場合、得られる周波数変化は抗原 - 抗体反応等による生体反応、あるいは吸着反応により電極表面に付着した測定対象物質の質量に比例する。しかし試料溶液中の測定対象物質の分子量が小さい場合、あるいは存在濃度が極めて低い場合、得られる周波数変化は非常に小さくなり、定量が極めて困難になる。

【0006】

その場合、水晶振動子側の工夫として、微量な周波数変化を検出するために、個々の水晶振動子自身の経時的周波数変化や、周波数の温度依存性をキャンセルする目的で、一つの水晶振動子上に複数の電極を設け、そのうちの一つをリファレンス電極とし個々の水晶振動子自身の経時的周波数変化や、周波数の温度依存性をキャンセルする方法がある。

【0007】

一方、反応系側の工夫として、抗原 - 抗体反応により電極上に担持された抗体と抗原が結合した後に、更に抗体を吸着させたラテックス粒子を加え、更なる抗原 - 抗体反応により結合したラテックス粒子の質量により周波数変化を増幅させる方法が提案されている（例えば、特許文献1参照）。

【0008】

上記の特許文献1によれば、分子量約15万のヒトIgGを検出する際、抗体を吸着したラテックス粒子を用いた場合は、用いない場合と比較して約2倍の増感効果が認められている。

【0009】

また、溶液中の低分子化合物を高感度に測定する方法として、同様にラテックスビーズを用いて分子量が数百の低分子化合物を検出し、ラテックスビーズを用いた場合は、用いない場合と比較して約1000倍の増感効果が認められている（例えば、特許文献2参照）。

【0010】

【特許文献1】特開昭63 - 11835号公報(請求項1)

【0011】

【特許文献2】特開2002 - 71540号公報(請求項1)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上記特許文献の機能化ラテックス粒子による質量増感方法はQCMセンサーにとって非常に効果的な手法である。

【0013】

電極表面に反応し吸着している測定対象物質とラテックスビーズが1:1で反応すると仮定し、単純に増感効率を推定すると直径250nmラテックス粒子を用いた場合、例えば特許文献2の様な分子量数百の低分子化合物を検出する場合の増感効果は約 $10^7 \sim 10^8$ 倍、特許文献1の様な分子量数万から数十万の生体物質を検出する場合の増感効果は約 $10^5 \sim 10^6$ 倍となる。

【0014】

しかしながら、実際の反応では、ラテックス粒子径が大きくなるほど粒子の占有面積が広くなることから、電極上の測定対象物質とラテックス粒子が1:1で反応することは無く、また電極上の測定対象物質に対して反応性を有する基質についても、単独で溶液中に分散している場合とラテックス表面に固定化されている場合とでは、電極上の測定対象物質との反応効率も同等ではないことから上記推定増感効果は得られず、特許文献1に記載されている実施例のように2倍程度、あるいは特許文献2に記載されている実施例のように1000倍程度の増感効果となる。

【0015】

本発明は、従来ラテックス粒子を用いた方法に加え、更なる増感効果が得られるQCMセンサーを用いた定量方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【0016】

本発明のQCMセンサーを用いた定量方法は、溶液中の測定対象物質を定量するQCMセンサーを用いた定量方法であって、電極表面に測定対象物質の特定部位と特異的に反応する基質Aが固定化されており、質量増感微粒子a表面に基質Bと基質Cとが固定化されており、基質Bは測定対象物質の部位のうち基質Aと反応する部位とは異なる部位と特異的に反応する物質であり、基質Cは測定対象物質、基質A、基質Bとは反応性を示さない物質であり、測定対象物質が基質Aと基質Bと反応することによって、電極と質量増感微粒子aとの間に測定対象物質を挟みこむ工程と、表面に基質Cを有する質量増感微粒子bと基質Cと特異的に反応する基質Dを1分子中に少なくとも2分子以上有する架橋性化合物Eを添加する工程とを有することを特徴とするものである。

10

## 【0017】

QCMセンサーチップの電極は、化学的に安定な電極材料であれば用いることが可能であり、金、白金、パラジウム等を用いることができ、これらの電極は水晶基板上に、メッキ、蒸着、スパッタ法などにより直接、あるいはチタン、クロムなどの密着層を介して設ける事が可能である。

## 【0018】

測定対象物質の特定部位と特異的に反応する基質Aを固定化する方法は特に限定されず、例えば電極として金電極を用いた場合は基質Aに存在するチオール基との反応により直接固定化する方法、あるいは電極上に自己組織化膜を形成し、それらの自己組織化膜を介して基質Aに存在するカルボキシル基やアミノ基を作用させ固定化する方法等を用いること

20

## 【0019】

基質Aとしては、測定対象物質を抗原とする抗体を用いることが可能であり、例えば測定対象物質がhCG、LH等の糖蛋白ホルモンの場合はそれぞれ抗hCG抗体、抗LH抗体などを用いることができ、更に例えば測定対象物質がA型、B型インフルエンザウイルスの場合はそれぞれ抗A型インフルエンザウイルス抗体、抗B型インフルエンザウイルス抗体を用いることができる。

## 【0020】

更に、免疫測定などで用いられるサンドイッチ法を本発明に当てはめた場合、電極上に固定化された一次抗体が基質Aに、測定対象物質はその抗体に対する抗原に、質量増感微粒子a表面への基質Bは抗原に対する二次抗体となる。

30

## 【0021】

測定対象物質を挟み込む工程は、先ず測定対象物質と質量増感微粒子aとをあらかじめ反応させた後に電極上の基質Aに作用させる場合と、測定対象物質をあらかじめ基質Aと反応させた後に質量増感微粒子aを作用させる場合と、測定対象物質、基質A並びに質量増感微粒子aを共存させる場合が考えられるが、本発明においてはどの方法を用いても構わない。

## 【0022】

本発明のQCMセンサーを用いた定量方法は、測定対象物質を挟みこむ工程と、質量増感微粒子b、並びに架橋性化合物Eを添加する工程との間に未反応の質量増感微粒子を除去するための洗浄工程を有することが好ましい。

40

## 【0023】

更に、本発明のQCMセンサーを用いた定量方法において質量増感微粒子はラテックス粒子、あるいは金コロイド粒子であることが好ましい。

## 【0024】

質量増感微粒子の粒径は溶液中で沈降、凝集しない粒径のものであれば用いることが可能であり、金コロイドの場合は5nm~200nm、好ましくは20nm~80nm粒径を、ラテックス粒子の場合は100nm~1000nm、好ましくは100nm~300nm粒径のものを用いることができる。

## 【0025】

50

質量増感微粒子 a 表面への基質 B、および基質 C、および質量増感微粒子 b 表面への基質 C の固定化方法は特に限定されず、質量増感微粒子としてラテックス粒子を用いる場合、例えば表面をカルボキシル基で修飾したラテックス粒子に対して、EDC (1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド<sup>\*</sup>, 塩酸塩) や EDC と NHS (N - ヒドロキシスクシンイミド) の混合液を作用させカルボキシル基を活性化させた後に、基質 B と基質 C の混合液を作用させ、粒子表面の活性化カルボキシル基と基質 B と基質 C のアミノ基を反応させることにより固定化する方法等を用いることができる。

【0026】

更に、本発明の QCM センサーを用いた定量方法において基質 C がアビジン誘導体であることが好ましい。

10

【0027】

アビジンはビオチンと特異的に反応する分子量 68,000 の塩基性糖タンパク質であり、1 分子当たり 4 分子のビオチンと結合し、その複合体はきわめて安定なことから種々の生体物質の分析や生化学分析に利用されている。アビジン誘導体として分子中に糖鎖を含まない分子量約 60,000 のストレプトアビジンもアビジンと同様に用いることができる。

【0028】

また、本発明の QCM センサーを用いた定量方法において架橋性化合物 E がポリエチレンオキシド鎖を介して基質 D を有する水溶性化合物であることが好ましい。

【0029】

20

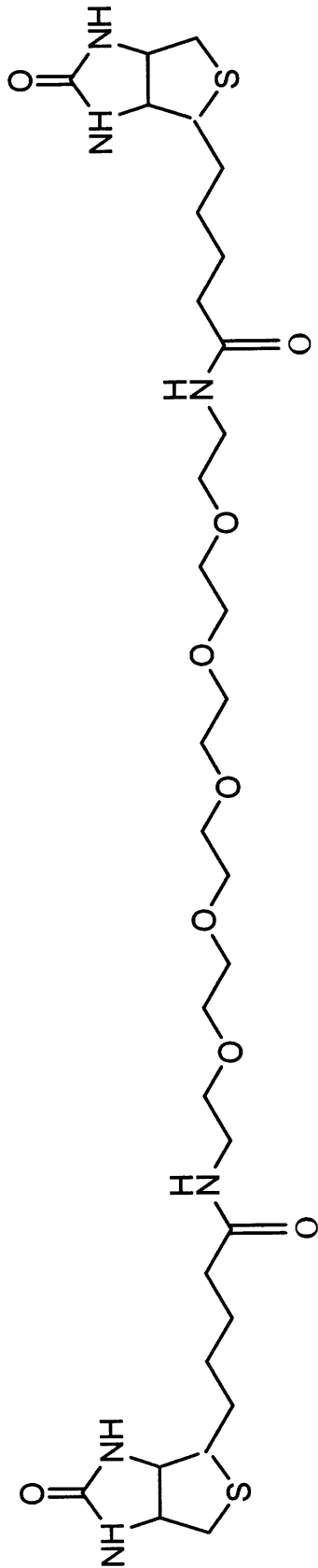
ポリエチレンオキシド鎖の長さはエチレンオキシドの重合度 n により決定される。例えば 1 分子中に 2 分子のビオチン誘導体を有する架橋性化合物 E の場合、n が 3 ~ 10 であることが好ましい。n が 3 未満であると架橋性化合物 E の水への溶解性が低下してしまう。また 10 より大きい場合は、アビジン-ビオチン結合を介した質量増感微粒子間の結合長が長くなり、本発明の増感効果が低減化されてしまう。

【0030】

1 分子中に 2 分子のビオチン誘導体を有する架橋性化合物 E として化 1 で示される化合物を用いることができる。

【0031】

【化 1】



10

20

30

40

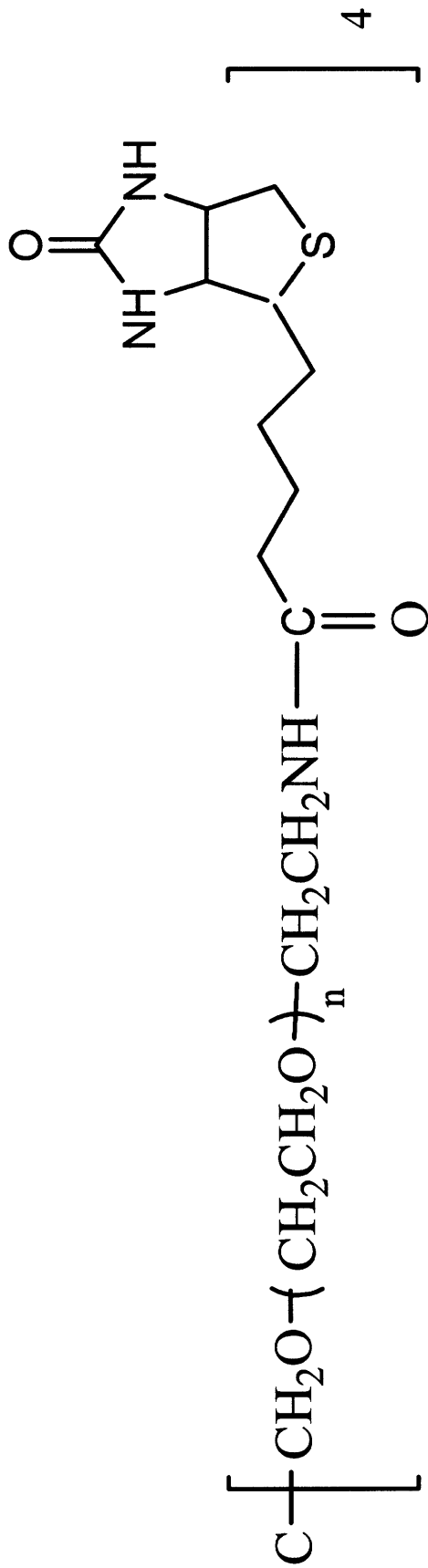
【 0 0 3 2 】

50

また、1分子中に4分子のビオチン誘導体を有する架橋性化合物Eとして化2で示される化合物を用いることができる。

【0033】

【化 2】



10

20

30

40

【 0 0 3 4 】

50

更に、本発明のQCMセンサーを用いた定量方法において基質Dがビオチン誘導体であることが好ましい。

【0035】

ここで述べるビオチン誘導体とはポリエチレンオキシド鎖とビオチン分子を結合させることにより誘導されるものであり、例えば両末端にアミノ基を有する重合度nが5のポリエチレンオキシドとN-スクシンイミド基を有するビオチンを反応させることにより、上記化1に示す架橋性化合物Eを得ることができる。

【0036】

(作用)

本発明のQCMセンサーを用いた定量方法によると、従来の質量増感微粒子による増感効果に加えて、架橋性化合物中を作用させることによる質量増感微粒子a同士の3次元の架橋反応による増感効果と、質量増感微粒子b同士、あるいは質量増感微粒子aとbとの凝集による増感効果により、更なる増感効果が発現するものと考えられる。

【発明の効果】

【0037】

本発明によれば、従来の質量増感微粒子を用いたQCM測定方法では困難であった低濃度物質の生体物質の定量、例えば高感度測定が必要なウイルス性感染症の迅速検査、炎症マーカーの定量等が可能となる。

【0038】

また本発明によれば、数百から数千の低分子量物質の定量、例えば種々の疾病に関連する生体代謝物質1, 5AEやクレアチニン、あるいはダイオキシン、PCBなどの大気汚染物質の定量等が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

以下、本発明のQCMセンサーを用いた定量方法について、基質Aとして抗マウスIgG(Fc)抗体を、測定対象物質としてマウスIgGを、基質Bとして抗マウスIgG(H+L)抗体を用いた実施例を示し、更に詳しく説明する。

【0040】

(実施例1)

金電極を設けた38MHz水晶振動子をピランハ溶液(濃硫酸:35%過酸化水素水=3:1)で洗浄後、100μg/mL濃度の抗マウスIgG(Fc)抗体のPBS溶液(pH:7.2)を電極部分に乗せ、湿潤箱中で1時間室温放置しその後、PBS溶液で洗浄することで、電極上に抗マウスIgG(Fc)抗体を固定化した。

【0041】

次に、抗マウスIgG(Fc)抗体固定化センサーチップ電極の電極部分に1μg/mL濃度のマウスIgGのPBS溶液(pH:7.2)を電極部分に乗せ、湿潤箱中で10分間放置後、PBS溶液で洗浄することで抗マウスIgG(Fc)抗体とマウスIgGを反応させた。

【0042】

次に、マウスIgGを反応させた抗マウスIgG(Fc)抗体固定化センサーチップ電極を、25℃に保ったPBS溶液入りのガラス製反応容器中に浸漬した。水晶振動子は水中において水の粘度や浸漬前後の温度によって周波数が変動する。これらの要因に起因する周波数のドリフトが無くなり安定した時点での周波数を、初期の周波数(1)とした。

【0043】

次に反応容器中に抗マウスIgG(H+L)抗体とアビジンを固定化した平均粒径200nmのラテックスビーズを抗体濃度が200ng/mLとなるように添加して、測定対象物質であるマウスIgGが基質Aである抗マウスIgG(Fc)抗体と基質Bである抗マウスIgG(H+L)抗体と反応することによって、電極と質量増感微粒子aであるラテックスビーズとの間に測定対象物質であるマウスIgGを挟み込んだ。添加後10分後の周波数(2)と初期の周波数(1)の差は-482Hzであった。

10

20

30

40

50

## 【0044】

10分反応後、センサーチップを引き上げPBS溶液にて電極表面を洗浄後、PBS溶液を入れたガラス製反応容器中に浸漬し、周波数(3)を記録したところ、先ほどの周波数(2)とほとんど変化がないことを確認した。

## 【0045】

次に、反応容器中に化1で示される2官能ビオチン化合物をビオチン分子濃度換算で200ng/mLとなるように添加し、引き続きアビジンを固定化した平均粒径200nmのラテックスビーズをアビジン濃度が200ng/mLとなるように添加した。10分後の周波数(4)と周波数(3)の差は-1126Hzであった。

## 【0046】

10

## (比較例1)

実施例1と同様に、マウスIgGを反応させた抗マウスIgG(Fc)抗体固定化センサーチップ電極を、PBS溶液を入れたガラス製反応容器中に浸漬し、初期の周波数(1)を記録した。次に反応容器中に抗マウスIgG(H+L)抗体を抗体濃度が200ng/mLとなるように添加した。10分後の周波数(2)と初期の周波数(1)の差は-163Hzであった。

## 【0047】

## (比較例2)

化1で示される2官能ビオチン化合物をビオチンに変えた他は実施例1と同様の操作を行ったところ、周波数(4)と周波数(3)の差、すなわちビオチンとアビジン固定化ラテックスビーズ添加前と添加後の周波数変化は観察されなかった。

20

## 【0048】

以上、比較例1の周波数(2)と初期の周波数(1)の差と、実施例1の周波数(2)と初期の周波数(1)の差とを比較することにより、質量増感微粒子aに相当する抗マウスIgG(H+L)抗体とアビジン固定化ラテックスビーズを用いることで質量増感が可能であることが判った。すなわち、従来特許文献1に相当する増感効果は約3倍であった。

## 【0049】

更に、実施例1において、マウスIgGと反応して電極上に存在する質量増感微粒子aに相当する抗マウスIgG(H+L)抗体とアビジン固定化ラテックスビーズに対して、架橋性化合物に相当する2官能ビオチン化合物と質量増感微粒子bに相当するアビジン固定化ラテックスビーズを作用させることにより生じる周波数(4)と周波数(3)の差は、周波数(2)と初期の周波数(1)の差の3倍以上となり、増感効果の無い比較例1の抗マウスIgG(H+L)抗体のみを作用させる場合と比較して約10倍の増感効果が現れることが判る。

30

## 【0050】

また、比較例2と実施例1の結果より、1分子中に複数のビオチン分子を有する化合物、すなわち架橋性化合物の添加が、質量増感に非常に効果的に作用することが判る。

## 【0051】

上記実施例は、本発明を説明する一つの事例に過ぎず、本発明のQCMセンサーを用いた定量方法は、測定対象物質の種類や測定対象物質に特異的に反応する基質の選択、質量増感微粒子の粒径等の選択により更なる質量増感が可能となる。

40

专利名称(译)	qcm传感器的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006275865A</a>	公开(公告)日	2006-10-12
申请号	JP2005097303	申请日	2005-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	西铁城控股株式会社		
申请(专利权)人(译)	西铁城钟表有限公司		
[标]发明人	福岛瑞惠		
发明人	福岛 瑞惠		
IPC分类号	G01N5/02 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/53		
FI分类号	G01N5/02.A G01N33/543.593 G01N33/545.Z G01N33/553 G01N33/53.U		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

正比于附连到由抗体反应等，或通过吸附反应的电极表面上的活体反应的分析物的质量 - 使用QCM传感器作为免疫传感器，所述频率变化而导致的抗原的情况。但是，如果在样品溶液中的分析物的分子量小，或者如果有密度非常低，频率变化变得非常小，定量则存在变得非常困难的问题。抗原 - 抗体支撑和结合由抗体反应在电极上的抗原后，已经建议的进一步放大的频率变化加胶乳颗粒的方法吸附抗体，尚未充分。A一起扩增加入第一胶乳颗粒的频率，来放大通过表达增加的交联化合物和第二Ratekkusu颗粒之间的胶乳的结合和聚集的频率变化。背景技术无

