

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02020/085104

発行日 令和3年9月16日(2021.9.16)

(43) 国際公開日 令和2年4月30日(2020.4.30)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 T	2 G O 4 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

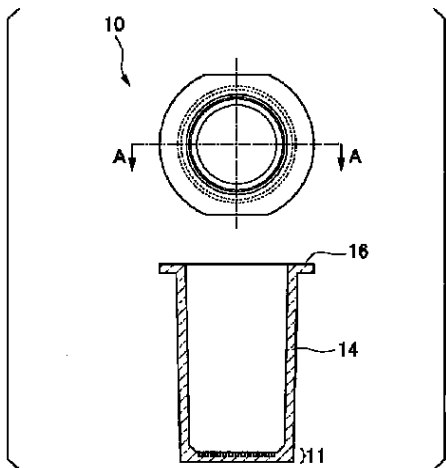
出願番号 特願2020-553129 (P2020-553129)	(71) 出願人 000003193 凸版印刷株式会社 東京都台東区台東 1 丁目 5 番 1 号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2019/040028	
(22) 国際出願日 令和1年10月10日 (2019.10.10)	
(31) 優先権主張番号 特願2018-199985 (P2018-199985)	(74) 代理人 100149548 弁理士 松沼 泰史
(32) 優先日 平成30年10月24日 (2018.10.24)	(74) 代理人 100139686 弁理士 鈴木 史朗
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(74) 代理人 100169764 弁理士 清水 雄一郎
	(74) 代理人 100147267 弁理士 大槻 真紀子
	(72) 発明者 塩谷 俊人 東京都台東区台東 1 丁目 5 番 1 号 凸版印刷株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定用カップ及びその製造方法、並びに免疫測定方法

(57) 【要約】

この蛍光免疫測定用カップは、蛍光標識となるビーズを用い、抗原抗体反応を利用する免疫系の分析において使用される蛍光免疫測定用カップであって、底面部と、前記底面部と接続している側面部とを有し、前記底面部は、前記ビーズが1個ずつ収納される複数の孔形状部を有し、前記孔形状部間の領域の上面は、平面形状である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛍光標識となるビーズを用い、抗原抗体反応を利用する免疫系の分析において使用される蛍光免疫測定用カップであって、

底面部と、

前記底面部と接続している側面部とを有し、

前記底面部は、前記ビーズが 1 個ずつ収納される複数の孔形状部を有し、

前記孔形状部間の領域の上面は、平面形状である蛍光免疫測定用カップ。

【請求項 2】

前記底面部と前記側面部とが一体に形成されている、請求項 1 に記載の蛍光免疫測定用カップ。 10

【請求項 3】

前記側面部の内面は、前記蛍光免疫測定用カップを前記底面部に対して垂直に切断したときの断面において曲線状の部分を含み、

前記側面部の内径は、前記底面部へ近づくほど小さくなり、

前記側面部の前記内面は、前記底面部の上面と、前記断面においてスプライン曲線で連結している、請求項 1 又は 2 に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【請求項 4】

前記側面部の内面は疎水性である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。 20

【請求項 5】

前記底面部の上面と前記孔形状部の側面部は、前記蛍光免疫測定用カップを前記底面部に対して垂直に切断したときの断面においてスプライン曲線で連結している、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【請求項 6】

前記孔形状部の内面が親水性処理されている、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【請求項 7】

さらに、前記側面部の内面から突出している補強リブを有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。 30

【請求項 8】

さらに、前記側面部の外面を覆っている第 1 の遮光部を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【請求項 9】

さらに、第 2 の遮光部を有し、

前記第 2 の遮光部は、前記底面部の前記孔形状部が形成されている面とは反対の面上であり、前記側面部と重複し、且つ前記孔形状部と重複しない領域に位置している、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップの製造方法であって、 40

第 1 の金型に前記孔形状部を形成するためのモールドを取り付けることと、

前記第 1 の金型と第 2 の金型を合体させ、前記第 1 の金型と前記第 2 の金型に囲まれる空間に樹脂を射出して成形すること、
を含む蛍光免疫測定用カップの製造方法。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップを用いた蛍光免疫測定方法であって、

複数の前記孔形状部に前記ビーズを 1 個ずつ収納することと、

複数の前記孔形状部に検出対象物質である検体を含む液体と、試薬と、を流入することと、

前記蛍光免疫測定用カップに封止材を流入し、複数の前記孔形状部の上部を封止することと、

前記孔形状部から出射する蛍光を測定することと、を含む、蛍光免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体の抗原抗体反応を利用して各種生体分子やガン細胞などの検査を行う免疫系の分析において使用される免疫測定用カップ及びその製造方法、並びに免疫測定方法に関する。

本願は、2018年10月24日に、日本に出願された特願2018-199985号 10
に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

抗原は、病原性のウイルスや細菌、花粉、卵及び小麦などの生体に免疫応答を引き起こす物質である。抗体は、体内に入った抗原を体外へ排除するために作られる免疫グロブリンというタンパク質の総称である。例えば、ワクチンは、無毒化した病原性細菌やウイルスを投与することで、体内で病原体に対する抗体の産生を促し、感染症に対する免疫を獲得する。

【0003】

病原菌やガン細胞の検出、DNAの遺伝子解析又は環境有害物質等の測定などの、いわゆる生体計測の分野において、免疫反応を用いて測定すべき生体物質（例えば抗原）と、これと選択的に結合する検査用物質（例えば抗体）との結合を測定することで、前記抗原等の種類と量との計測がなされている。 20

【0004】

公知の免疫系の検査法としては、下記の非特許文献1に記載されるように、測定すべき検体が含む抗原を捕捉する抗体を直接又は間接的に蛍光色素、アイソトープその他の標識物質（以下、マーカーと記す）で標識化し、捕捉後（抗原抗体反応後）のマーカーからの蛍光量や放射線量を計測し、診断に供する方法が一般的に採用されている。

【0005】

抗原等の測定に用いるマーカーとしては、厳密な管理を要求されるラジオアイソトープよりも、使い勝手の良い蛍光マーカー等が一般的に使用されている。蛍光マーカー等を用いる光学的手法では、蛍光マーカーが付加された抗体を抗原に結合させて、そのマーカーからの発光を測定することで抗原の測定及び分析を行なう。その代表的な方法として、エンザイムイムノアッセイ（例えば、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA）法では、抗原と結合した抗体に付加した蛍光マーカーが試薬中の酵素と反応することで生じる蛍光を利用する。 30

【0006】

生体分子の観察を容易にし、測定対象の生体分子を識別するために、個々の生体分子には蛍光マーカーとともに、金コロイド又は微小粒子等が付加される。微小粒子としては、例えばポリスチレンビーズが使用される。生体分子に蛍光マーカーや微小粒子を付加することで、光学顕微鏡の分解能では見ることが難しい大きさの分子を可視化することができる。以下、蛍光マーカーと微小粒子を合わせて蛍光ビーズ又は単にビーズと記す。 40

【0007】

上記のような、免疫測定に抗原抗体反応を利用する分析では、測定すべき検体を含む血液などの液体（以下、血液で代表する）、蛍光標識となる蛍光ビーズ、発光（発色）反応を促進する試薬などを入れるために、試験管タイプの容器が用いられている（例えば、特許文献1、2参照）。

【0008】

図10Aは、従来の免疫測定用カップ50の上面図、及び正面からの断面図である。図10Bは、前記免疫測定用カップ50に複数の蛍光ビーズ62を滴下する様態を示す模式 50

断面図である。

【0009】

従来の免疫測定用カップ50を用いても、ガン細胞など細胞のレベルでの検出や大型のタンパク質など分子量の大きいもの（例えば分子量が60kDa以上）は検出できる。一方で、図10Bから推測できるように、滴下用治具先端部61から従来の免疫測定用カップ50に複数の蛍光ビーズ62を滴下すると、蛍光ビーズ62の配列が不均一となる。そのため、蛍光ビーズ62が血液と試薬の混ざった液体中で分散するため蛍光が散乱して減光してしまう。よって、小さい分子量のタンパク質、例えば5～60kDa程度であるサイトカインなどを正確に測定し分析することは難しい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特許第4095176号公報

【特許文献2】特許第4522434号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】シンプル免疫学、195～201ページ、株式会社南江堂（2001年）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本開示は、上記の課題を解決するためになされたもので、その目的とするところは、サイトカインなど小さな分子量のタンパク質などをばらつきがなく高い精度で測定し分析することができる免疫測定用カップ及びその製造方法、並びに免疫測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、以下の態様を包含する。

〔1〕 蛍光標識となるビーズを用い、抗原抗体反応を利用する免疫系の分析において使用される蛍光免疫測定用カップであって、

底面部と

前記底面部と接続している側面部とを有し、

前記底面部は、前記ビーズが1個ずつ収納される複数の孔形状部を有し、

前記孔形状部間の領域の上面は、平面形状である蛍光免疫測定用カップ。

〔2〕 前記底面部と前記側面部とが一体に形成されている、〔1〕に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔3〕 前記側面部の内面は、前記蛍光免疫測定用カップを前記底面部に対して垂直に切断したときの断面において曲線状の部分を含み、

前記側面部の内径は、前記底面部へ近づくほど小さくなり、

前記側面部の前記内面は、前記底面部の上面と、前記断面においてスプライン曲線で連結している、〔1〕又は〔2〕に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔4〕 前記側面部の内面は疎水性である、〔1〕～〔3〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔5〕 前記底面部の上面と前記孔形状部の側面部は、前記蛍光免疫測定用カップを前記底面部に対して垂直に切断したときの断面においてスプライン曲線で連結している、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔6〕 前記孔形状部の内面が親水性処理されている、〔1〕～〔5〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔7〕 さらに、前記側面部の内面から突出している補強リブを有する、〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

10

20

30

40

50

〔８〕さらに、前記側面部の外面を覆っている第１の遮光部を有する、〔１〕～〔７〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔９〕さらに、第２の遮光部を有し、

前記第２の遮光部は、前記底面部の前記孔形状部が形成されている面とは反対の面上であり、前記側面部と重複し、且つ前記孔形状部と重複しない領域に位置している、〔１〕～〔８〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔１０〕〔１〕～〔９〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップの製造方法であって、

第１の金型に前記孔形状部を形成するためのモールドを取り付けることと、

前記第１の金型と第２の金型を合体させ、前記第１の金型と前記第２の金型に囲まれる空間に樹脂を射出して成形すること、
を含む蛍光免疫測定用カップの製造方法。

〔１１〕〔１〕～〔９〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップを用いた蛍光免疫測定方法であって、

複数の前記孔形状部に前記ビーズを１個ずつ収納することと、

複数の前記孔形状部に検出対象物質である検体を含む液体と、試薬と、を流入することと、

前記蛍光免疫測定用カップに封止材を流入し、複数の前記孔形状部の上部を封止することと、

前記孔形状部から出射する蛍光を測定することと、を含む、蛍光免疫測定方法。

【００１４】

別の側面として、本発明は以下の態様を包含する。

〔１２〕蛍光標識となるビーズ（蛍光ビーズ）を用いた、抗原抗体反応を利用する免疫系の分析において使用される蛍光免疫測定用カップであって、

底面部と側面部を含む全体が一体で形成され、

前記底面部の上面は断面視で直線状の平面形状であり、

前記平面形状部分に前記蛍光ビーズが１個ずつ収納される複数の孔形状部が配列して形成されている、蛍光免疫測定用カップ。

【００１５】

〔１３〕前記側面部の内面は断面視で曲線状の部分を含み、前記側面部の内径は前記底面部へ近づくほど小さくなり、

かつ前記底面部の上面と、断面視で、スプライン曲線で連結している、〔１２〕に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【００１６】

〔１４〕前記側面部の内面は疎水性である、〔１２〕又は〔１３〕に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【００１７】

〔１５〕前記底面部の上面と前記孔形状部の側面部はスプライン曲線で連結している、

〔１２〕～〔１４〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ

【００１８】

〔１６〕前記孔形状部の内面が親水性処理されている、〔１２〕～〔１５〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【００１９】

〔１７〕〔１２〕～〔１６〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップの製造方法であって、

第１の金型に前記孔形状部を形成するためのモールドを取り付け、

前記第１の金型と第２の金型を合体させ、それらの空間に樹脂を射出して成形する、蛍光免疫測定用カップの製造方法。

【００２０】

〔１８〕〔１２〕～〔１６〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップを用いた蛍

10

20

30

40

50

光免疫測定方法であって、

複数の前記孔形状部に前記蛍光ビーズを１個ずつ収納する過程と、

複数の前記孔形状部に検出対象物質である検体を含む液体と、試薬と、を流入する過程と、

前記蛍光免疫測定用カップに封止材を流入し、複数の前記孔形状部の上部を封止する過程と、

前記孔形状部から出射する蛍光を測定する過程と、を含む、蛍光免疫測定方法。

【発明の効果】

【００２１】

本開示によれば、サイトカインなどの小さな分子量のタンパク質などをばらつきがなく高い精度で測定し分析することができる免疫測定用カップ及びその製造方法、並びに免疫測定方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１Ａ】本発明の一態様における免疫測定用カップの上面図、及び免疫測定用カップのＡ－Ａ断面における断面図である。

【図１Ｂ】本発明の一態様における免疫測定用カップの底面部の断面を斜めから撮影した拡大顕微鏡写真である。

【図１Ｃ】本発明の一態様における免疫測定用カップの孔形状部の図１ＡのＡ－Ａ断面に沿った概略断面図である。

【図１Ｄ】本発明の他の態様における免疫測定用カップの概略断面図である。

【図２】本発明の一態様における免疫測定用カップに複数の蛍光ビーズを滴下する様態を示す模式断面図である。

【図３】本発明の一態様における免疫測定用カップの図１ＡのＡ－Ａ断面における詳細な形状と、底面部の孔形状部にビーズが入り込む様態を示す模式断面図である。

【図４】図３に示す模式断面図における免疫測定用カップの内面の形状（孔形状部を除く）を説明するための模式図である。

【図５】本発明の一態様における免疫測定用カップの底面部の詳細な形状と、底面部の孔形状部にビーズ、血液及び試薬を閉じ込め封止した様態、及び蛍光を測定する様態を例示する図１ＡにおけるＡ－Ａ断面に沿った模式断面図である。

【図６Ａ】本発明の一態様における免疫測定用カップの製造方法の一工程を例示する模式断面図である。

【図６Ｂ】本発明の一態様における免疫測定用カップの製造方法の一工程を例示する模式断面図である。

【図６Ｃ】本発明の一態様における免疫測定用カップの製造方法の一工程を例示する模式断面図である。

【図６Ｄ】本発明の一態様における免疫測定用カップの製造方法の一工程を例示する模式断面図である。

【図７Ａ】本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの概略断面図である。

【図７Ｂ】本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの概略断面図である。

【図７Ｃ】本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの底面図である。

【図８Ａ】本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの遮光部について説明するための顕微鏡写真である。

【図８Ｂ】本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの遮光部について説明するための顕微鏡写真である。

【図９Ａ】本発明のさらに他の態様における試料台の上面図である。

【図９Ｂ】本発明のさらに他の態様におけるアダプタの概略断面図である。

【図１０Ａ】従来の免疫測定用カップの上面図、及び免疫測定用カップのＡ－Ａ断面における断面図である。

【図１０Ｂ】従来の免疫測定用カップに複数の蛍光ビーズを滴下する様態を示す模式断面

10

20

30

40

50

図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明の実施形態に係る免疫測定用カップ及びその製造方法、並びに免疫測定方法について図面を用いて説明する。同一の構成要素については便宜上の理由がない限り同一の符号を付ける。各図面において、見易さのため構成要素の厚さや比率は誇張されることがあり、構成要素の数も減らして図示していることがある。また、本発明は以下の実施形態そのままに限定されるものではなく、主旨を逸脱しない限りにおいて、適宜の組み合わせ、変形によって具体化できる。

【0024】

10

〔第一実施形態〕

本発明の一態様における免疫測定用カップについて説明する。図1Aは本発明の一態様における免疫測定用カップの上面図、及び免疫測定用カップのA-A断面における断面図である。図1Bは、本発明の一態様における免疫測定用カップの底面部の断面を斜めから撮影した拡大顕微鏡写真である。本実施形態における免疫測定用カップは、蛍光標識となるビーズを用い、抗原抗体反応を利用する免疫系の分析において使用される蛍光免疫測定用カップであって、底面部と、前記底面部と接続している側面部とを有し、前記底面部は、前記蛍光ビーズが1個ずつ収納される複数の孔形状部を有し、前記孔形状部間の領域の上面は、平面形状である。

【0025】

20

本実施形態における免疫測定用カップ10は、底面部11と側面部14とを有する。前記側面部14は、前記底面部11と一体に形成されていてもよい。底面部11には、前記平面形状部分に蛍光ビーズが1個ずつ収納される孔形状部12が複数配列して形成されている。孔形状部12間の領域の上面15は、平面形状である。免疫測定用カップ10は、側面部14の上端に把持部16を有していてもよい。なお蛍光ビーズは、以降、単にビーズと記載される場合がある。

【0026】

免疫測定用カップ10は、概略円形の底面部11と、概略円筒形状の側面部14とを含む。底面部11の形状は特に限定されず、真円、楕円形、矩形、正方形及び多角形等であってもよい。側面部14の形状は特に限定されず、底面部11の形状に接続する筒状であればよい。例えば、側面部14は、円筒状及び角筒状であってもよい。

30

【0027】

把持部16は、側面部14の上端部から底面部11と略平行となるよう突出している。免疫測定用カップ10が把持部16を有することで、ロボット等の自動ハンドリング装置を用いた場合においても免疫測定用カップ10の取り扱い性が向上する。また、免疫測定時に免疫測定用カップ10を測定システムにおけるアダプタに収容する際、把持部16がストッパーとなる。そのため、測定箇所である孔形状部12と測定システムにおける測定装置との距離を最適化することができる。

【0028】

底面部11の面積は特に限定されないが、例えば $10 \sim 30 \text{ mm}^2$ である。免疫測定用カップ10の底面部11から側面部14の上端までの距離（免疫測定用カップ10の高さ）は特に限定されないが、例えば $10 \sim 15 \text{ mm}$ である。

40

【0029】

底面部11の最も厚い部分の厚さは、 $0.2 \text{ mm} \sim 0.6 \text{ mm}$ であることが好ましく、 $0.2 \text{ mm} \sim 0.3 \text{ mm}$ であることがより好ましい。底面部11の最も厚い部分が 0.6 mm 以下であると、免疫測定用カップ10の材料の自家蛍光による蛍光感度の低下が生じ難い。底面部11の最も厚い部分が 0.2 mm 以上であると、免疫測定用カップ10の機械的強度が保たれる。

【0030】

側面部14の厚さは、底面部11と同程度の厚さであることが好ましく、例えば、 $0.$

50

2 mm～0.6 mmであることが好ましく、0.2 mm～0.3 mmであることがより好ましい。また、図1Cに示すように側面部14の内面が一部厚い部分、即ち補強リブ25を有していてもよい。補強リブ25は、側面部14の内面から突出した形状である。補強リブ25は、側面部14の内周に沿って環状に形成されていてもよい。補強リブ25の数は、特に限定されず、例えば1～4個設けられていてもよく、2～3個設けられることが好ましい。補強リブ25の厚さ、即ち補強リブ25における側面部外面から側面部内面までの寸法は、側面部14の補強リブ25以外の部分より厚ければよく、例えば0.1 mm～0.2 mmである。

【0031】

免疫測定用カップ10が補強リブ25を有していると、側面部14が上述のように薄い場合であっても、機械的強度を高めることができる。例えば、ロボット等の自動ハンドリング装置を用いて免疫測定を行う場合であっても、免疫測定用カップ10が潰れにくい。

【0032】

底面部11を上面から見たときの孔形状部12の平面形状は、円形でも多角形でもよいが、その最短の径の長さはビーズの最大径の1.1倍～1.9倍であることが好ましく、1.2～1.8倍であることがより好ましく、1.3～1.7倍であることがさらに好ましい。孔形状部12の最短の径がビーズの最大径の1.1倍～1.9倍であると、1つの孔形状部12にビーズが2個入らず、必ず1個収納できる。

【0033】

免疫測定において、本実施形態における免疫測定用カップ10と組み合わせて用いられるビーズの形状は、球形であってもよい。ビーズの最大径は、一般的に2 μm～5 μmである。

【0034】

ビーズの最大径に鑑みて、孔形状部12の最短の径は、2.2 μm～9.5 μmであってもよく、2.4 μm～9.0 μmであることが好ましく、2.6 μm～8.5 μmであることがより好ましい。例えば、ビーズが3 μmである場合、孔形状部12の最短の径は、3.3 μm～5.7 μmであることが好ましく、3.6 μm～5.4 μmであることがより好ましく、3.9 μm～5.1 μmであることが更に好ましい。

【0035】

孔形状部12は、開口部の径より底面の径の方が小さいテーパ形状であることが好ましい。図1Dは、本発明の一態様における免疫測定用カップの孔形状部の図1AのA-A断面に沿った概略断面図である。孔形状部12の底面17の径を R_1 で示す。孔形状部12の開口部の径を R_2 で示す。孔形状部12の開口部の径 R_2 は、孔形状部12の間の上面15と同一平面上における孔形状部12の開口部周縁の最小径と規定する。孔形状部12は、 $R_1 < R_2$ であるテーパ形状を有していることが好ましい。孔形状部12がこのようなテーパ形状を有していると、ビーズが孔形状部12に収まりやすい。

【0036】

孔形状部12がテーパ形状を有している場合、 R_1 はビーズの最大径の1.1倍～1.5倍であることが好ましく、1.2～1.4倍であることがより好ましい。 R_2 は、ビーズの最大径の1.6倍～1.9倍であることが好ましく、1.7～1.8倍であることがより好ましい。 R_1 がビーズの最大径の1.1倍～1.5倍であると、孔形状部12に入ったビーズが孔形状部12から飛び出しにくい。 R_2 がビーズの最大径の1.6倍～1.9倍であると、1つのビーズが1つの孔形状部12に収まりやすい。

【0037】

孔形状部12がテーパ形状を有している場合、 R_1 は、2.2 μm～7.5 μmであることが好ましく、2.4 μm～7.0 μmであることがより好ましい。 R_2 は、3.2 μm～9.5 μmであることが好ましく、6.8 μm～9.0 μmであることがより好ましい。 R_1 がビーズの最大径の2.2 μm～7.5 μmであると、孔形状部12に入ったビーズが孔形状部12から飛び出しにくい。 R_2 がビーズの最大径の3.2 μm～9.5 μmであると、1つのビーズが1つの孔形状部12に収まりやすい。

【0038】

一例として、ビーズの径が $3\mu\text{m}$ であるとき、 R_1 は、 $3.3\mu\text{m}\sim 4.5\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $3.6\mu\text{m}\sim 4.2\mu\text{m}$ であることがより好ましい。 R_2 は、 $4.8\mu\text{m}\sim 5.7\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $5.1\mu\text{m}\sim 5.4\mu\text{m}$ であることがより好ましい。

【0039】

孔形状部12の深さ、即ち孔形状部12の間の上面15から底面17までの寸法は、ビーズの最大径の 1.1 倍 ~ 1.5 倍であることが好ましく、 $1.1\sim 1.3$ 倍であることがより好ましい。孔形状部12の深さがビーズの最大径の 1.1 倍 ~ 1.5 倍であると、1つの孔形状部12に1つのビーズが収まりやすい。

10

【0040】

孔形状部12の深さは、 $2.2\mu\text{m}\sim 7.5\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $2.2\mu\text{m}\sim 6.5\mu\text{m}$ であることがより好ましい。孔形状部12の深さが $2.2\mu\text{m}\sim 7.5\mu\text{m}$ であると、1つの孔形状部12に1つのビーズが収まりやすい。一例として、ビーズの最大径が $3\mu\text{m}$ であるとき、孔形状部12の深さは、 $3.3\mu\text{m}\sim 4.5\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $3.3\mu\text{m}\sim 3.9\mu\text{m}$ であることがより好ましい。

【0041】

底面部11が有する孔形状部12の数は、例えば18万個 ~ 27 万個であり、 20 万個 ~ 25 万個であることがより好ましい。孔形状部12の数が18万個以上であると、免疫測定用カップ10から蛍光が十分に得られ、測定精度を向上することができる。孔形状部12の数が27万個以下であると、隣り合う孔形状部12間の距離が近くなりすぎず、免疫測定用カップ10の生産性が向上する。

20

【0042】

孔形状部12は、底面部11に規則性を持って配置している。孔形状部12の配置は、隣り合う孔形状部12の中心同士を結ぶ三角形が正三角形となる最密充填配置であることが好ましい。このとき、隣り合う孔形状部12の中心間距離は、 $6\mu\text{m}\sim 12\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $7\mu\text{m}\sim 11\mu\text{m}$ であることがより好ましい。隣り合う孔形状部12の距離が $3\mu\text{m}\sim 7\mu\text{m}$ であると、免疫測定に十分な数のビーズを免疫測定用カップ10の底面部11に収容することができ、且つ免疫測定用カップ10の製造時の歩留まり低下を防ぐことができる。

30

【0043】

図2は、本発明の一態様における免疫測定用カップに複数の蛍光ビーズを滴下する様態を示す模式断面図である。滴下用治具先端部21からビーズ22を1個ずつ配列して孔形状部12に入れ込み、後述のように免疫測定を行う場合、従来の免疫測定用カップを用いる場合のように、ビーズが血液と試薬の混ざった液体中で分散し、ビーズから発せられる蛍光が散乱し、減光してしまうことがない。

【0044】

直線状等、規則的に配列した孔形状部12に1個ずつ配列して入れ込まれたビーズからの蛍光は、後述のように、例えば集光レンズを通して測定システムにより測定される。従って、本実施形態における免疫測定用カップを用いれば、サイトカインなどの小さな分子量のタンパク質などをばらつきがなく高い精度で測定し分析することができる。

40

【0045】

図3は、本発明の一態様における免疫測定用カップ10の図1AのA-A断面における詳細な形状と、底面部11の孔形状部12にビーズ22が入り込む様態を示す模式断面図である。免疫測定用カップ10は、底面部11と側面部14とが貼り合わせられることなく、全体が一体で形成されていることが好ましい。ここで、「底面部と側面部が一体に形成されている」とは、射出成形等により底面部と側面部とが継ぎ目なく連続的に形成されていることを意味し、底面部と側面部とがそれぞれ独立に形成され、接着剤等によりこれらを貼り合わせる場合とは区別される。底面部と側面部とがそれぞれ独立に形成され、接着剤等によりこれらを貼り合わせる場合、底面部と側面部との貼り合わせの精度を高める

50

ことが要求されるのに対し、底面部 1 1 と側面部 1 4 が一体に形成されている場合、貼り合わせの工程を有しておらず、免疫測定用カップ 1 0 の歩留まりが向上する。また、底面部と側面部とがそれぞれ独立に形成され、接着剤等によりこれらを貼り合わせる場合、接着剤には免疫測定に用いられる試薬及び試料等に影響を及ぼさない材料であることが要求されるのに対し、底面部 1 1 と側面部 1 4 が一体に形成されている場合、接着剤について考慮する必要がない。なお、本発明の一態様における免疫測定用カップ 1 0 は、本発明の趣旨を逸脱しない限り、底面部と側面部とが独立して形成され、これらが接着剤等で貼り合わされていてもよい。

【0046】

免疫測定用カップ 1 0 の材料としては、後述の製造工程のように射出成形が可能な高分子化合物及び樹脂が好ましい。免疫測定用カップ 1 0 の材料が疎水性であると、試薬や血液などがカップの側壁などに残らず孔形状部まで入り易い。また、免疫測定の際には、蛍光を検出することから、光透過率が高く、自家蛍光の少ない材料が好ましい。さらに、免疫測定用カップ 1 0 は、医療機器のため使い捨てとなる等の理由から、安価な材料であることが好ましい。上述の高分子化合物及び樹脂としては、脂肪族環状ポリオレフィン（COP）、ポリメタクリル酸メチル樹脂（PMMA）、ポリスチレン（PS）が挙げられる。光透過率が高く、自家蛍光が低く、疎水性であり、安価であることから、免疫測定用カップ 1 0 の材料は、COP（脂肪族環状ポリオレフィン）が好ましい。

【0047】

免疫測定用カップ 1 0 は、その内径、即ち、側面部 1 4 の内径が底面部 1 1 へ近づくほど小さくなる（すなわち定点 2 と定点 7 との距離 > 定点 3 と定点 6 との距離）すり鉢状（テーパー形状）となっている。

【0048】

図 4 は、図 3 に示す模式断面図における免疫測定用カップ 1 0 の内面の形状（孔形状部を除く）を説明するための模式図である。図 4 において、便宜上、底面部 1 1 は孔形状部 1 2 の間の領域の上面 1 5 が連続していると仮定して記載されている。前記免疫測定用カップ 1 0 の側面部 1 4 の内面 S（定点 1 ～ 4、及び定点 5 ～ 8）は蛍光免疫測定用カップ 1 0 を底面部 1 1 に対して垂直に切断したときの断面において曲線状の部分を含み、かつ底面部の上面（定点 4 ～ 5）の直線部と、前記断面においてスプライン曲線で連結していることが好ましい。より具体的に言えば、図 3 の楕円 A 部、B 部で示す定点 8 ～ 7 間の部分、定点 6 ～ 5 間の部分、（及び定点 1 ～ 2 間の部分、定点 3 ～ 4 間の部分）は略円弧状であり、定点 7 ～ 6 間の部分（及び定点 2 ～ 3 間の部分）は略直線状となるようなスプライン曲線で底面部 1 1 の上面（定点 4 ～ 5 間の部分）の直線部と連結していることが好ましい。

【0049】

楕円 A 部の略円弧状の曲線は、ビーズ、血液及び試薬を入れ易くする。また、側面部 1 4 の楕円 A 部が湾曲して折れ曲がることによりツバ（把持部 1 6）を形成し、免疫測定用カップ 1 0 を持ち易くさせる効果がある。また、楕円 B 部の略円弧状の曲線は、後述のように、ビーズ、血液及び試薬を流れ易くする。楕円 B 部が円弧状でなく角部を有している場合、角部にビーズが集まることがある。これにより、孔形状部 1 2 にビーズが入らなかったり、角部における蛍光強度が強くなり、蛍光強度のばらつきが生じることで測定対象物の検出感度が低下したりする。一方で、楕円部 B が略円弧状の曲線であることで、ビーズが孔形状部 1 2 に入りやすくなり、蛍光強度のばらつきを抑えることができる。

【0050】

免疫測定用カップ 1 0 の裏面側から蛍光を見るためには底面部をなるべく薄くすることが好ましい。言い換えれば、ビーズから発せられる蛍光を、底面部 1 1 の孔形状部 1 2 が形成されている面とは反対の面側から観察するため、底面部 1 1 はなるべく薄いことが好ましい。しかしながら、免疫測定用カップ 1 0 を射出成形により製造する場合においては、免疫測定用カップ 1 0 を射出成形後、免疫測定用カップ 1 0 を構成する高分子化合物又は樹脂の冷却を全体として均一に行うことが好ましい。よって、底面部 1 1 と側面部 1 4

の厚さは、ほぼ同一であることが好ましい。従って、側面部 1 4 の強度を維持するためにも、底面部 1 1 に形成する孔形状部 1 2 は、底面部が直線状である部分（即ち、底面部 1 1 の上面が平面である部分）に限ることは好ましい。言い換えれば、孔形状部 1 2 は、底面部 1 1 における側面部 1 4 と接続する曲面以外の部分に形成されることが好ましい。

【0051】

図 5 は、本発明の一態様における免疫測定用カップの底面部の詳細な形状と、底面部の孔形状部にビーズ、血液及び試薬を閉じ込め封止した様態、及び蛍光を測定する様態を例示する模式断面図である。図 5 に示す模式断面図において、底面部 1 1 の上面 1 5 と孔形状部 1 2 の側面部は、スプライン曲線で連結していることが好ましい。具体的には、孔形状部 1 2 の側面部は、図 5 の楕円 C 部で示すように、定点 9 ～ 1 0 間の部分は略円弧状であり、定点 1 0 ～ 1 1 間の部分は略直線状となるようにスプライン曲線で連結していることが好ましい。これにより、通常球状であるビーズは、孔形状部 1 2 の中へ 1 個ずつ入り込まれ易くなる。なお上述の通り、測定すべき検体を含む血液などの液体は、単に血液と記載することがある。

10

【0052】

図 4 及び図 5 で示したように、本発明の一態様における免疫測定用カップ 1 0 はすり鉢状（テーパー形状）であるとともに、ビーズ、血液及び試薬の投入部（図 4 の楕円 A 部）、底面部 1 1 への移動部（図 4 の楕円 B 部）、及び孔形状部 1 2 への入口部（図 5 の楕円 C 部、孔形状部 1 2 の開口部ともいう）が略円弧状で、その他部分は略直線状であり、それらはスプライン曲線で連結していることが好ましい。さらに免疫測定用カップ 1 0 の材料が疎水性であると、側面部 1 4 の内面が疎水性となり、液体である血液及び試薬は、注入時の跳ねなどによりカップの側壁などに残ることなく滑らかに流れ、孔形状部 1 2 の中へ流れ込む。従って、高価な試薬や血液を無駄にせず有効に利用することができる。

20

【0053】

図 5 の楕円 D 部で示すように、孔形状部 1 2 の側面部と、孔形状部 1 2 の底面部とがつくる角は直線状であることが好ましい。言い換えれば、孔形状部 1 2 の底面部に垂直な面で切断したときの断面において、孔形状部 1 2 の側面部と、孔形状部 1 2 の底面部とがつくる角は、丸みを帯びず、角部を有していることが好ましい。これにより孔形状部 1 2 の中へ入り込んだビーズが、その勢いのまま孔形状部 1 2 から飛び出てしまうことを防止することができる。

30

【0054】

また、図 5 の符号 1 3 で示すように、孔形状部 1 2 の側面部の少なくとも直線部分と、孔形状部 1 2 の底面部、即ち孔形状部 1 2 の内面は、親水性となるよう処理されていることが好ましい。孔形状部 1 2 の内面は、親水性の材料でコーティングされていることが好ましい。これにより、血液と試薬などの液体が、孔形状部 1 2 に収まり易い構造となる。親水性の材料でコーティングする方法としては、ステンシルマスク等のマスクにより孔形状部 1 2 以外の部分を覆い、マスクを通して、親水性スプレー等を孔形状部 1 2 の内面に塗布することが好ましい。

【0055】

以下に、本実施形態の一態様における免疫測定用カップを用いた免疫測定方法について簡単に説明する。図 5 には、本発明の一態様における免疫測定用カップの底面部の孔形状部 1 2 にビーズ 2 2、血液及び試薬 2 3 を閉じ込め、蛍光 3 1 を集光レンズ 3 2 を通して測定システム 3 3 により測定する様態も例示している。

40

【0056】

ビーズ 2 2 とは、測定すべき検体を付着させるための微粒子である。具体的なビーズ 2 2 として、金コロイド及びポリスチレンビーズ等が挙げられる。ビーズ 2 2 はその表面に、測定すべき検体に含まれる測定対象物質（つまり検出対象物質）を補足するための抗体（補足抗体）を吸着することができる。

【0057】

測定すべき検体として、がん細胞などの細胞又は血液等が挙げられる。測定すべき検体

50

に含まれる測定対象物質として、分子量が60kDa以上の分子量の大きいタンパク質及び分子量が5～60kDa程度の分子量の小さいタンパク質（つまりサイトカイン）等が挙げられる。本発明の一態様における免疫測定用カップ10を用いると、特に5～60kDa程度の分子量の小さいタンパク質であっても高感度に検出が可能である。なお以降の説明では、測定すべき検体を、一例として血液と称する。

【0058】

試薬とは、一般的に免疫測定法で用いられる試薬であり、例えばELISAの場合、測定対象物質と特異的に結合する抗体（一次抗体）、一次抗体と特異的に反応する酵素標識済み抗体（二次抗体）及び前記酵素の基質等が挙げられる。一次抗体に酵素が標識されている場合は、二次抗体を必要としない場合がある。本実施形態では、酵素の基質は、蛍光試薬であることが好ましい。

10

【0059】

測定を行うためには、まず、ビーズ22を免疫測定用カップ10に投入してビーズ22を孔形状部12に配置する。ビーズ22は、予め補足抗体を吸着させておいてもよいし、ビーズ22を孔形状部12に配置した後、補足抗体を吸着させてもよい。その後血液及び試薬23を免疫測定用カップ10に注入する。

【0060】

孔形状部12に入らず、余分となったビーズ22を、血液及び試薬23の流入後に、余分の血液及び試薬とともに除去する。余分のビーズ、血液及び試薬を除去する方法として、封止剤である封止用オイルを流し込み、免疫測定用カップ10を傾けて行うことが好ましい。すなわち、免疫測定用カップ10に封止用オイルを流入し傾けると、親水性にコーティングされた孔形状部12内のビーズ22は固着して孔形状部12から脱出しないが、それ以外のビーズ、余分の血液及び試薬は免疫測定用カップ10を傾けることによって除去される。

20

【0061】

前記のようにして、図5の符号24で示すように、孔形状部12に閉じ込めたビーズ22、血液及び試薬23を封止部24（封止用オイル）で封止し保持する。これにより、封止部24が複数の孔形状部12を個別に封止し、孔形状部12は独立した反応空間となる。封止部24の材料としては、フッ素系オイルとシリコン系オイルとのいずれか一方、又はその混合物等が好ましい。

30

【0062】

本実施形態の一態様における免疫測定用カップ10よれば、孔形状部12と封止部24とで囲まれる独立した反応空間を複数形成することができる。そのため、血液と試薬が反応することにより生じる蛍光31は、免疫測定用カップ10に含まれる他のビーズ22に干渉されることがない。

【0063】

また、本実施形態の一態様における免疫測定用カップ10によれば、血液及び試薬23の量は、全ての孔形状部12と封止部24で囲まれる反応空間を十分に満たすことのできる程度であればよい。孔形状部12は、上述の通り微小な空間であることから、従来の免疫測定用カップを用いる場合と比較して、血液及び試薬23の量が少なく済む。つまり、本実施形態の一態様における免疫測定用カップ10を用いると、血液及び試料23の量は少ないにもかかわらず、血液と試薬が反応することにより生じる蛍光31の強度が強い。

40

【0064】

孔形状部12から出射する蛍光31を、免疫測定用カップの裏面側（つまり、底面部11の孔形状部12が形成されている面とは反対の面側）から、測定システム33を用いて測定することができる。測定システム33としては、例えば倒立型の光学顕微鏡や蛍光顕微鏡を用いることができる。

【0065】

本発明の一態様における免疫測定用カップ10を用いると、血液と試薬が反応すること

50

により生じる蛍光 31 の強度に基づいて、観察の目的となる生体分子の数を特定することもできる。また通常、光学顕微鏡の分解能は数百 nm という可視光の波長程度である。本発明の一態様における免疫測定方法においては、測定対象物である生体分子は蛍光色素を使って標識されており、本発明の一態様における免疫測定用カップ 10 を用いることで、蛍光検出感度を向上することが可能である。そのため、測定対象物がサイトカインのように低分子の物質であっても観察可能となる。

【0066】

あるいは、測定システム 33 としてデジタル顕微鏡やデジタルカメラと演算装置とを備えた通信機器を用いて蛍光 31 を測定及び分析することも可能である。蛍光 31 の光路には必要に応じて、波長選択用のフィルタを挿入してもよい。このようにして、生体分子の機能や活性状態に係る情報を得ることができる。

10

【0067】

以下に本実施形態の一態様における免疫測定用カップの製造方法について簡単に説明する。図 6A～6D は、それぞれ本発明の一態様における免疫測定用カップの製造工程を例示する模式断面図である。まず、図 6A に示すように、免疫測定用カップの底面部の孔形状部を形成するためのモールド 45 を作製する。作製方法は、公知の熱インプリント用モールドを作製する方法でよい。一例として、図 6A はニッケル電鍍によりニッケルモールドを作製する例を示している。まず、シリコンウェハ 41 に、レジストコート 42 を塗布する。レジストコート 42 を露光及び現像してレジストコート 42 のパターニングを行う。次に、レジストコート表面及びレジストコート 42 が除去されて露出した部分のシリコンウェハ 41 上に導電層 43 を形成する。これを母型としてニッケル電位を行い、モールド 45 を得る。モールド 45 は、免疫測定用カップの孔形状部に対応する凸部を複数有している。

20

【0068】

次に、図 6B に示すように、前記モールド 45 を、第 1 の金型 46 に組み合わせる。モールド 45 と第 1 の金型 46 とを組み合わせる方法は、特に限定されないが、射出成形装置内でモールド 45 と第 1 の金型 46 とを固定してもよいし、接着剤等に取り付けてもよい。その後、図 6C に示すように前記第 1 の金型 46 と第 2 の金型 47 を合体させる。これにより生じる金型 46 と第 2 の金型 47 とで囲まれる空間に、公知の射出成形法に従い、樹脂注入口 48 から樹脂 49 を注入して成形する。そして冷却工程を経て、最後に第 1 の金型 46 と第 2 の金型 47 を離型して図 6D に示すように本発明の一態様における免疫測定用カップ 10 が作製される。

30

【0069】

以上の免疫測定用カップの製造方法によれば、底面部 11 と側面部 14 とが一体に形成されている免疫測定用カップ 10 を作製することができる。

【0070】

〔第二実施形態〕

本発明の他の態様における免疫測定用カップについて図 7A～図 7C を用いて説明する。図 7A は、本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの概略断面図である。免疫測定用カップ 100 は、底面部 11 と、側面部 14 と、遮光部 18 とを含む。底面部 11 は、側面部 14 と接続している。遮光部 18 は、側面部 14 の外面を覆っている。具体的には、遮光部 18 は、側面部 14 の外面に接して、側面部 14 全体を覆うように設けられている。

40

【0071】

免疫測定用カップ 100 の底面部 11 及び側面部 14 は、第一実施形態にて説明されている底面部 11 及び側面部 14 と同じであるため、その詳細な説明は省略する。免疫測定用カップ 100 は、把持部 16 を有していてもよい。把持部 16 は、第一実施形態にて説明されている把持部 16 と同じであるため、その詳細な説明は省略する。

【0072】

免疫測定用カップを用いて免疫測定を行う際、上述の通り免疫測定用カップの底面の裏

50

面側で蛍光が検出される。免疫測定用カップの側面部が透光性の材料であるため、側面部から外部の光が入り、測定対象物に由来する蛍光と共に検出されてしまう場合がある。測定対象物に由来する蛍光に加えて外光が検出されることにより、検出感度が低下することがある。

【0073】

免疫測定用カップ100の遮光部18は、側面部14の外面を覆っている。これにより、外部からの光が免疫測定用カップ100に進入するのを防ぐことができる。つまり、免疫測定用カップ100の孔形状部12から発する蛍光の検出感度が向上する。遮光部18は、側面部14の外面全体を覆っていることが好ましいが、必ずしも全体を覆っている必要は無く、例えば、側面部14の全体に対し、側面部14の50%程度を覆っていればよい。遮光部18が側面部14の全体を覆っていない場合は、遮光部18は底面部11に近い領域に設けられていることが好ましい。

10

【0074】

遮光部18は、遮光性テープであってもよく、遮光性インクを塗布して得られる遮光層であってもよい。遮光性テープとしては、黒色の遮光テープであることが好ましく、例えばリンテック社製 簡易遮光用片面粘着テープ PTシリーズ等が挙げられる。側面部14の全体を覆うように遮光性テープを貼付することで、遮光部18を形成することができる。遮光性インクとしては、例えば熱硬化性樹脂とカーボンブラックを含むインクが挙げられる。側面部14の全体に遮光性インクを塗布し、その後加熱等により硬化させることで遮光部18を形成することができる。

20

【0075】

遮光部18の光透過率は、50%以下であることが好ましく、40%以下であることが更に好ましい。遮光部18の光透過率の下限は特に限定されず、0%であってもよい。

【0076】

遮光部18の光透過率は、例えば顕微分光光度計（例えば、日本分光社製、製品名：MSV-500）を使用して、免疫測定用カップの遮光部18を設けている部分の可視光域内（波長：360～830nm）における光透過率を測定することで得られる。

【0077】

図7B及び図7Cは、それぞれ本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの概略断面図及び底面図である。免疫測定用カップ101は、底面部11と、側面部14と、遮光部19とを含む。底面部11は、側面部14と接続している。遮光部19は、底面部11の孔形状部12が形成されている面とは逆の面の一部に接して設けられている。遮光部19は、底面部11の孔形状部12が形成されている面とは反対の面上であり、側面部14と重複し、且つ孔形状部12と重複しない領域に位置している。例えば図7Cに示すように、遮光部19は、免疫測定用カップ101の裏面から見たとき、側面部14及び底面部11における側面部14と接続する曲面部分と重複し、且つ孔形状部12と重複しないように設けられている。遮光部19は、底面部11の外周縁と孔形状部12が形成される領域の外周縁とに囲まれた領域に設けられている。

30

【0078】

例えば、図7Cに示すように免疫測定用カップ101の底面が円形であり、孔形状部12が形成されている領域も円形であれば、遮光部19は環状である。

40

【0079】

免疫測定用カップを用いて免疫測定を行う際、上述の通り免疫測定用カップの底面の裏面側で蛍光が検出される。免疫測定用カップの側面部が透光性の材料であるため、側面部に外光が入射し、外光の一部が側面部で導波して底面部に到達し、測定対象物質に由来する蛍光と共に検出されてしまう場合がある。測定対象物に由来する蛍光に加えて外光が検出されることにより、検出感度が低下することがある。

【0080】

免疫測定用カップ101は、遮光部19を有しているため、側面部14で導波して底面部11に到達する外光を遮断することができる。よって、免疫測定用カップ101の孔形

50

状部 12 から発する蛍光の検出感度が向上する。

【0081】

図 8 A 及び図 8 B は、それぞれ本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップの遮光部について説明するための顕微鏡写真である。図 8 A は、免疫測定用カップの底面部に遮光部 19 を部分的に設けたときの明視野における顕微鏡写真である。図 8 B は、免疫測定用カップの底面部に遮光部 19 を部分的に設けたときの蛍光観測条件における顕微鏡写真である。ここでは、孔形状部の最短の径が $4.5 \mu\text{m}$ であり、便宜的にポリスチレンビーズ（最大径 $3 \mu\text{m}$ ）に蛍光色素である GFP を結合させた試料を使用した。撮影条件は、以下の通りである。

< 明視野における撮影条件 >

装置：蛍光顕微鏡、対物レンズ 10 倍

撮影箇所：免疫測定用カップの孔形状部を含めた底面部

< 蛍光観測における撮影条件 >

装置：蛍光顕微鏡、対物レンズ 10 倍

励起光源：蛍光励起用 470 nm LED

測定波長及び露光時間：GFP（励起波長 470 nm、蛍光波長 527 nm）露光時間 2 秒

撮影箇所：免疫測定用カップの孔形状部を含めた底面部

【0082】

図 8 A に示す免疫測定用カップは、遮光部 19 が設けられた部分と、遮光部 19 が設けられておらず、側面部 14 が露出している部分とを含んでいることがわかる。図 8 B の画像から、遮光部 19 が設けられておらず、側面部 14 が露出している部分では、外部からの光が側面部 14 を導波して底面部まで達しているため、側面部 14 が白く光ってしまっていることがわかる。一方で、蛍光測定条件において遮光部 19 が設けられた部分では、側面部 14 で導波して底面部 11 に到達する外光が遮断されていることがわかる。また、外光が遮断されることにより、バックグラウンド値が低減され、シグナルノイズ比を高めることが出来ていることがわかる。これにより、底面部 11 に白い略円形の部分が観察されており、蛍光色素 1 分子の蛍光を捉えられていることが見て取れる。そのため、少ない試料の反応でも、高い精度で測定し分析できることがわかる。

【0083】

遮光部 19 の材料として、遮光部 18 と同じ材料が挙げられる。また、遮光部 19 の形成方法は、遮光部 18 と同じ形成方法が挙げられる。よってその詳細な説明は省略する。

【0084】

遮光部 19 の光透過率は、50% 以下であることが好ましく、40% 以下であることが更に好ましい。遮光部 19 の光透過率の下限は特に限定されず、0% であってもよい。遮光部 19 の光透過率は、遮光部 18 の光透過率と同じ方法で測定することができる。

【0085】

なお、免疫測定用カップ 101 の底面部 11 及び側面部 14 は、第一実施形態にて説明されている底面部 11 及び側面部 14 と同じであるため、その詳細な説明は省略する。免疫測定用カップ 101 は、把持部 16 を有していてもよい。把持部 16 は、第一実施形態にて説明されている把持部 16 と同じであるため、その詳細な説明は省略する。

【0086】

本発明の更に他の態様における免疫測定用カップは、遮光部 18 及び 19 の双方を有していてもよい。

【0087】

〔第三実施形態〕

本実施形態では、本発明のさらに他の態様における免疫測定用カップとともに用いる遮光部材について図 9 A 及び図 9 B を参照して説明する。図 9 A は、本実施形態の更に他の態様における試料台の上面図である。図 9 B は、本発明のさらに他の態様におけるアダプタの概略断面図である。

10

20

30

40

50

【0088】

第二実施形態にて説明したように、免疫測定用カップの側面部が透光性の材料であると、側面部から外部の光が入り、測定対象物質に由来する蛍光と共に検出されてしまう場合がある。測定対象物質に由来する蛍光に加えて外光が検出されることにより、検出感度が低下することがある。このように検出感度が低下するのを防止するため、本発明の一態様における免疫測定用カップ10と組み合わせて本実施形態の試料台20を用いることができる。

【0089】

免疫測定の際には、試料台20に本実施形態の一態様における免疫測定用カップ10を載置する。このとき、免疫測定用カップ10の孔形状部12が形成されている領域と、遮光部61とが重複せず、且つ孔形状部12が形成されている領域以外が遮光部61と重複するように、免疫測定用カップ10を試料台20上に載置する。そして、試料台20の免疫測定用カップ10が載置された面とは反対の面から測定システムを用いて蛍光を検出する。

10

【0090】

試料台20は、基材60と、基材60上に設けられた遮光部61とを含む。遮光部61は、免疫測定用カップ10の孔形状部12が形成されている領域と重複せず、且つ孔形状部12が形成されている領域以外が重複する形状であれば特に限定されない。例えば、免疫測定用カップ10のように、底面が円形であり、孔形状部12が形成されている領域も円形であれば、図9Aに示すように、遮光部61は環状であってもよい。

20

【0091】

基材60は、光透過性を有する材質であれば特に限定されないが、例えばガラス、石英等が挙げられる。遮光部61の材料として、遮光部18と同じ材料が挙げられる。また、遮光部61の形成方法は、遮光部18と同じ形成方法が挙げられる。よってその詳細な説明は省略する。

【0092】

本実施形態の試料台20を免疫測定用カップ10と組み合わせて免疫測定を行うと、側面部14で導波して底面部11に到達する外光を遮光部61により遮断することができる。よって、免疫測定用カップ10の孔形状部12から発する蛍光の検出感度が向上する。

【0093】

免疫測定用カップ10に入る外光を遮断するもう一つの方法として、図9Bに示すアダプタを用いることもできる。免疫測定時、本実施形態のアダプタ70によって免疫測定用カップ10を保持し、底面部11の孔形状部12が形成されている面と反対の面から測定システムで蛍光を検出する。

30

【0094】

アダプタ70は、免疫測定用カップ10の側面部14及び底面部11の一部を覆うように構成されている。アダプタ70は、底面11部のうち側面部14と接続する曲面部分と重複し、孔形状部12が形成される領域とは重複しないよう構成されている。

【0095】

アダプタ70は、遮光性を有し、免疫測定用カップ10を保持できる材質で形成されていればよく、その材質は特に限定されないが、例えば外光反射を抑えることができるアルマイト処理したアルミニウムが好適である。

40

【0096】

このようなアダプタ70を用いることで、外部からの光が免疫測定用カップ10に進入するのを防ぐことができる。また、側面部14で導波して底面部11に到達する外光を遮断することができる。よって、測定対象物質に由来する蛍光の検出感度が向上する。

【0097】

本発明の別の側面として、以下の態様が挙げられる。

〔19〕 蛍光標識となるビーズを用い、抗原抗体反応を利用する免疫系の分析において使用される蛍光免疫測定用カップであって、底面部と、前記底面部と接続している側面部

50

とを有し、前記底面部は、前記ビーズが1個ずつ収納される複数の孔形状部を有し、前記孔形状部は、開口部の径より底面の径の方が小さいテーパ形状である、蛍光免疫測定用カップ。

〔20〕前記孔形状部の前記底面の径は、 $2.2\mu\text{m} \sim 7.5\mu\text{m}$ であり、前記孔形状部の前記開口部の径は、 $3.2\mu\text{m} \sim 9.5\mu\text{m}$ である、〔19〕に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔21〕前記孔形状部の前記底面の径は、 $3.3\mu\text{m} \sim 4.5\mu\text{m}$ であり、前記孔形状部の前記開口部の径は、 $4.8\mu\text{m} \sim 5.7\mu\text{m}$ である、〔19〕に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔22〕前記孔形状部の深さは、 $2.2\mu\text{m} \sim 7.5\mu\text{m}$ である、〔19〕～〔21〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。 10

〔23〕前記孔形状部の深さは、 $3.3\mu\text{m} \sim 4.5\mu\text{m}$ である、〔19〕～〔21〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔24〕隣り合う前記孔形状部の中心間距離は、 $6\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$ である、〔19〕～〔23〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔25〕前記底面部と前記側面部とが一体に形成されている、〔19〕～〔24〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔26〕前記側面部の内面は、断面視で曲線状の部分を含み、前記側面部の内径は、前記底面部へ近づくほど小さくなり、前記側面部は、前記底面部の上面と、断面視で、スプライン曲線で連結している、〔19〕～〔25〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。 20

〔27〕前記側面部の内面は疎水性である、〔19〕～〔26〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔28〕前記底面部の上面と前記孔形状部の側面部は、前記蛍光免疫測定用カップを前記底面部に対して垂直に切断したときのスプライン曲線で連結している、〔19〕～〔27〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔29〕前記孔形状部の内面が親水性処理されている、〔19〕～〔28〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔30〕さらに、前記側面部の内面から突出している補強リブを有する、〔19〕～〔29〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。 30

〔31〕さらに、前記側面部の外面を覆う第1の遮光部を有する、〔19〕～〔30〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

〔32〕さらに、第2の遮光部を有し、

前記第2の遮光部は、前記底面部の前記孔形状部が形成されている面とは反対の面上であり、前記側面部と重複し、且つ前記孔形状部と重複しない領域に位置している、〔19〕～〔31〕のいずれか一項に記載の蛍光免疫測定用カップ。

【産業上の利用可能性】

【0098】

本発明の一態様における免疫測定用カップを用いて、サイトカインなどの低分子量の物質などの状態を分析することにより、関節リウマチや過剰な免疫反応状態、核酸医薬の効き目なども把握でき、医療診断の分野で飛躍的な応用展開が期待できる。 40

【符号の説明】

【0099】

10、100、101・・・本開示の免疫測定用カップ

50・・・従来の免疫測定用カップ

11、51・・・底面部

12・・・孔形状部

13・・・親水性処理部

14・・・側面部

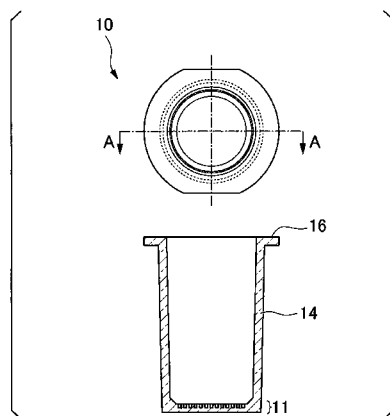
15・・・底面部の上面 50

- 16 把持部
- 17 底面
- 18、19、61 遮光部
- 20 試料台
- 21、61 滴下用治具先端部
- 22、62 蛍光ビーズ
- 23 血液及び試薬
- 24 封止部
- 25 補強リブ
- 31 蛍光
- 32 集光レンズ
- 33 測定システム
- 41 シリコンウェハー
- 42 レジストパターン
- 43 導電層
- 44 ニッケル電鍍部
- 45 モールド
- 46 第1の金型
- 47 第2の金型
- 48 樹脂注入口
- 49 樹脂
- 60 基材
- 70 アダプタ

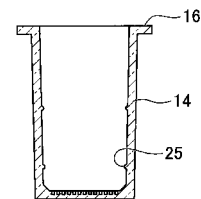
10

20

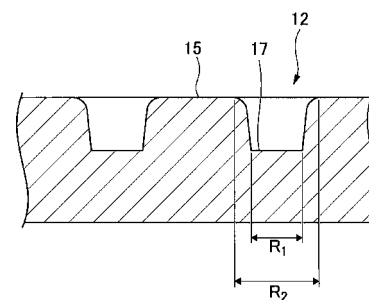
【図1A】



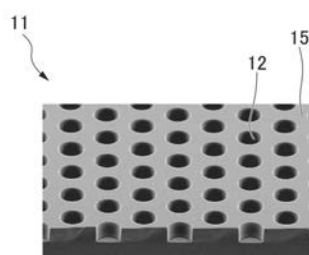
【図1C】



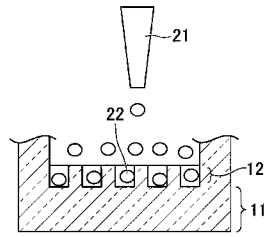
【図1D】



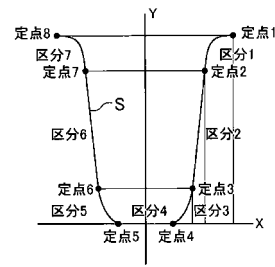
【図1B】



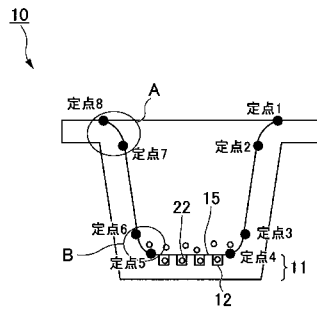
【図 2】



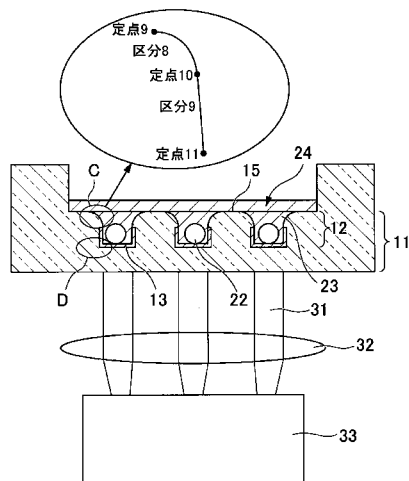
【図 4】



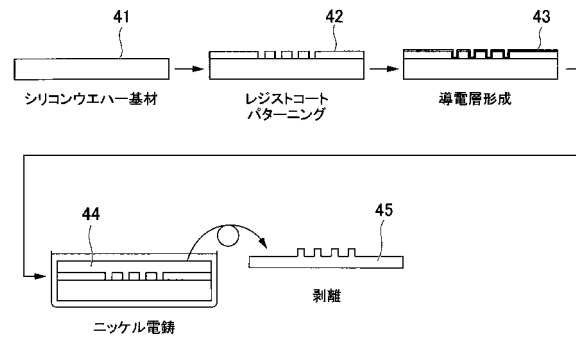
【図 3】



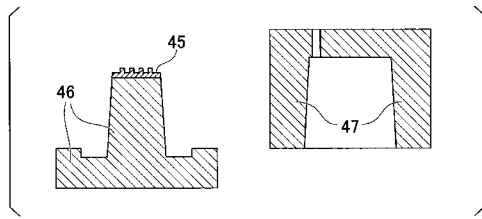
【図 5】



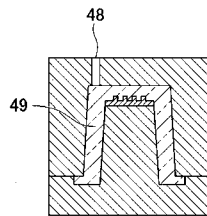
【図 6 A】



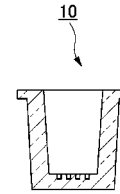
【図 6 B】



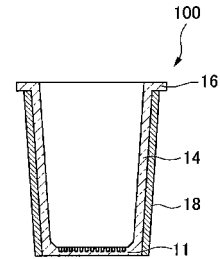
【図 6 C】



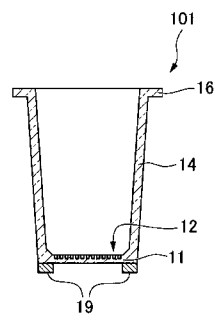
【図 6 D】



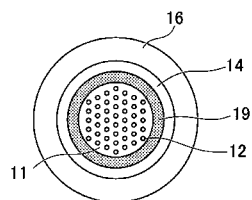
【図 7 A】



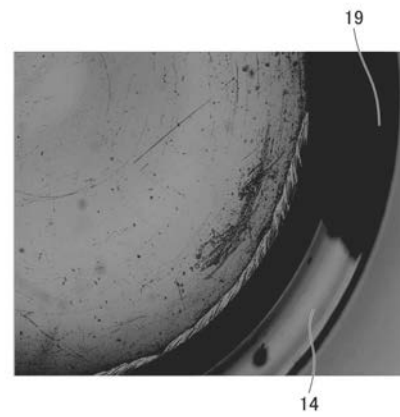
【図 7 B】



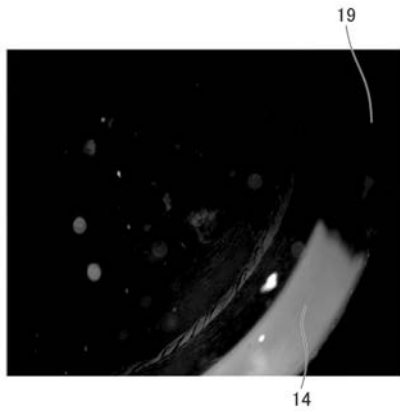
【図 7 C】



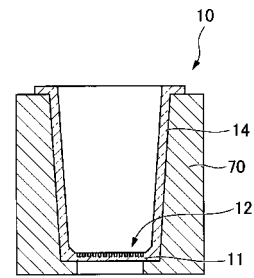
【図 8 A】



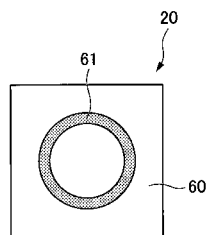
【図 8 B】



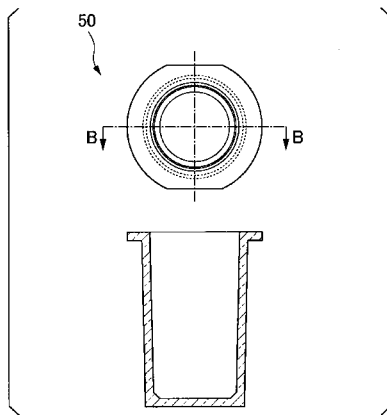
【図 9 B】



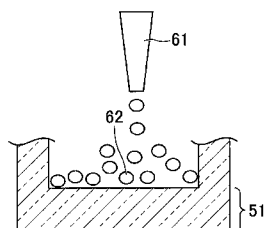
【図 9 A】



【図 10 A】



【図 10 B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2019/040028									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. G01N33/53(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i, G01N21/78(2006.01) i, G01N33/536(2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. G01N33/53, G01N21/64, G01N21/78, G01N33/536 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>US 2002/0187515 A1 (ILLUMINA, INC.) 12 December 2002, claims, paragraphs [0016]-[0019], [0026], [0040], [0059]-[0072], [0075], [0076], [0114]-[0117], fig. 1A & JP 2002-533727 A, claims, paragraphs [0007], [0008], [0015], [0024], [0034]-[0044], [0047], [0048], [0125]-[0127] & WO 2000/039587 A1 & EP 2083271 A2</td> <td>1-2, 4, 8 5-6, 10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2012-157267 A (HITACHI MAXELL, LTD.) 23 August 2012, paragraphs [0039], [0040], [0052]-[0054], [0075]-[0077], [0085]-[0090], fig. 5, 6, 11, 12 (Family: none)</td> <td>5, 10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X Y	US 2002/0187515 A1 (ILLUMINA, INC.) 12 December 2002, claims, paragraphs [0016]-[0019], [0026], [0040], [0059]-[0072], [0075], [0076], [0114]-[0117], fig. 1A & JP 2002-533727 A, claims, paragraphs [0007], [0008], [0015], [0024], [0034]-[0044], [0047], [0048], [0125]-[0127] & WO 2000/039587 A1 & EP 2083271 A2	1-2, 4, 8 5-6, 10	Y	JP 2012-157267 A (HITACHI MAXELL, LTD.) 23 August 2012, paragraphs [0039], [0040], [0052]-[0054], [0075]-[0077], [0085]-[0090], fig. 5, 6, 11, 12 (Family: none)	5, 10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X Y	US 2002/0187515 A1 (ILLUMINA, INC.) 12 December 2002, claims, paragraphs [0016]-[0019], [0026], [0040], [0059]-[0072], [0075], [0076], [0114]-[0117], fig. 1A & JP 2002-533727 A, claims, paragraphs [0007], [0008], [0015], [0024], [0034]-[0044], [0047], [0048], [0125]-[0127] & WO 2000/039587 A1 & EP 2083271 A2	1-2, 4, 8 5-6, 10									
Y	JP 2012-157267 A (HITACHI MAXELL, LTD.) 23 August 2012, paragraphs [0039], [0040], [0052]-[0054], [0075]-[0077], [0085]-[0090], fig. 5, 6, 11, 12 (Family: none)	5, 10									
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 20.11.2019		Date of mailing of the international search report 10.12.2019									
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/040028

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-023822 A (FURUKAWA ELECTRIC ADVANCED ENGINEERING CO., LTD.) 05 February 2015, paragraphs [0013]-[0017], [0037]-[0039] (Family: none)	6
A	WO 2012/121310 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 13 September 2012, entire text & US 2013/0345088 A1, entire text & EP 2685266 A1 & CN 103415774 A	1-11
A	US 2014/0323330 A1 (BERGO, V. B.) 30 October 2014, entire text & WO 2014/176435 A2, entire text	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 4 0 0 2 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. G01N33/53(2006, 01)i, G01N21/64(2006, 01)i, G01N21/78(2006, 01)i, G01N33/536(2006, 01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. G01N33/53, G01N21/64, G01N21/78, G01N33/536			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	US 2002/0187515 A1 (ILLUMINA, INC.) 2002.12.12, 特許請求の範囲、段落[0016]-[0019], [0026], [0040], [0059]-[0072], [0075]-[0076], [0114]-[0117], 図 1A & JP 2002-533727 A, 特許請求の範囲、段落[0007]-[0008], [0015], [0024], [0034]-[0044], [0047]-[0048], [0125]-[0127] & WO 2000/039587 A1 & EP 2083271 A2	1-2, 4, 8 5-6, 10	
Y	JP 2012-157267 A (日立マクセル株式会社) 2012.08.23, 段落[0039]-[0040], [0052]-[0054], [0075]-[0077], [0085]-[0090], 図	5, 10	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 20.11.2019		国際調査報告の発送日 10.12.2019	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 黒田 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 4 0 0 2 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	5, 6, 11, 12 参照 (ファミリーなし)	
Y	JP 2015-023822 A (株式会社古河電工アドバンストエンジニアリング) 2015.02.05, 段落[0013]-[0017], [0037]-[0039] (ファミリーなし)	6
A	WO 2012/121310 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2012.09.13, 全文 & US 2013/0345088 A1 全文 & EP 2685266 A1 & CN 103415774 A	1-11
A	US 2014/0323330 A1 (BERGO, V.B.) 2014.10.30, 全文 & WO 2014/176435 A2, 全文	1-11

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 佐藤 弘

東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内

Fターム(参考) 2G043 AA01 AA03 DA02 EA01

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。