

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6120518号
(P6120518)

(45) 発行日 平成29年4月26日 (2017. 4. 26)

(24) 登録日 平成29年4月7日 (2017. 4. 7)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 F

GO 1 N 33/543 5 4 1 A

請求項の数 10 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2012-225553 (P2012-225553)	(73) 特許権者	596175810
(22) 出願日	平成24年10月10日 (2012. 10. 10)		公益財団法人かずさDNA研究所
(65) 公開番号	特開2014-77704 (P2014-77704A)		千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
(43) 公開日	平成26年5月1日 (2014. 5. 1)	(74) 代理人	100100181
審査請求日	平成27年9月14日 (2015. 9. 14)		弁理士 阿部 正博
前置審査		(72) 発明者	小原 収
			千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目6番地7
			公益財団法人かずさDNA研究所内
		(72) 発明者	野中 謙
			千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目6番地7
			公益財団法人かずさDNA研究所内
		審査官	海野 佳子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 簡易測定器具

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水系液体から成るそれぞれが独立した少なくとも2つの反応領域、該水系液体に不溶性又は難溶性であって 20 ± 15 下で $10 \sim 100 \text{ kPa}$ の貯蔵粘弾性 E' 及び $40 \sim 50$ のゾル-ゲル転移点を有するゲル状物質から成る境界領域、これら各領域を保持する容器、並びに、反応性物質が表面に固定化されてなる磁性粒子を含む、使い捨て型の被検物質の ELISA 用簡易測定器具であって、該反応領域は該境界領域によって互いに隔てられた閉鎖系であって、外部の磁場印加手段によって、各反応領域及び各境界領域の独立性並びに該磁性粒子の機能を維持したまま、該磁性粒子のみを或る反応領域から別の反応領域へそれらを隔てるゲル状態にある境界領域を通過して移動させ、前記被検物質が抗原であり、且つ、前記反応性物質が抗体であって、該反応領域の一つが発色反応によって抗原の測定を行うためのものである、ことを特徴とする前記簡易測定器具。

【請求項 2】

夫々が独立している複数の境界領域を含む、請求項 1 記載の簡易測定器具。

【請求項 3】

反応領域の容量が $10 \sim 100 \mu\text{l}$ である、請求項 1 又は 2 記載の簡易測定器具。

【請求項 4】

磁性粒子に移動方向における、境界領域の距離が $2 \sim 20 \text{ mm}$ であり、反応領域の距離が $10 \sim 80 \text{ mm}$ である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

【請求項 5】

容器が直径 1 . 5 ~ 2 . 4 mm、長さ 7 5 ~ 1 2 5 mm の円筒形のキャピラリーである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

【請求項 6】

少なくとも 2 つの反応領域が互いに異なる組成を有する水系液体から成る、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

【請求項 7】

磁性粒子が 1 0 ~ 2 0 0 μ g の範囲で含まれている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

【請求項 8】

容器、反応性物質が表面に固定化されてなる磁性粒子、水系液体、ゲル化物質の材料、ゲル化剤、及び、封止手段を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の簡易測定器具を製造するためのキット。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の簡易測定器具を用いる E L I S A による抗原の測定方法であって、

(a) 該簡易測定器具のいずれか一端に位置する反応領域 (第一の反応領域) に試料を添加し、抗体が表面に固定化されて成る磁性粒子が含まれている該一端に位置する反応領域において最初 (第一) の反応処理工程を実施し、

(b) 外部の磁場印加手段を用いて該磁性粒子をゲル状態にある境界領域を通過させて隣接する (第二の) 反応領域まで移動させ、該隣接する反応領域で次の (第二の) 反応処理工程を実施し、

(c) (b) の操作を 1 回以上実施し、

(d) 反応領域の一つに於ける反応処理工程として発色反応を実施した後、該反応領域から次の反応領域に該磁性粒子を移動させることによって該発色反応を停止させ、該発色反応の結果を測定する、ことを含む前記測定方法。

【請求項 1 0】

発色反応の結果を定性的又は半定量的に測定することを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、外部の磁場印加手段によって、独立している各反応領域及び各境界領域の独立性並びに磁性粒子の機能を維持したまま、或る反応領域から別の反応領域へそれらを隔てる境界領域を通過して該磁性粒子は移動させることによって、各反応領域において反応処理工程を閉鎖系で実施することが可能であるような簡易測定器具等に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

医療、診断及び検査、健康の促進、保健及び安全対策、並びに、環境保全等の様々な目的のもとに、医療現場又は日常生活において、様々な環境又は生体から分離取得される各種の試料 (検体) 中に含まれる各種の化学物質、タンパク質、糖、糖タンパク質及び核酸等の生体由来物質、並びに、微生物、細菌及びウイルス等の様々な生物を定量的又は定性的に測定する必要がある。

【0 0 0 3】

特に、例えば、電力等のエネルギー供給、物的施設・設備、人的パワー又は資源等が不十分であるような劣悪な環境、又は、例えば、伝染病又はバイオテロ等の発生が疑われるような緊急の事態においては、できるだけ簡便又は安価な手段方法で迅速に上記の測定を行うことが求められる。

【0 0 0 4】

一方、特許文献1には、液滴操作マイクロデバイス及び該デバイス内での磁性体粒子を含む水系液体から成る液滴の操作方法に関する発明が開示されている。該文献には、この操作方法では、磁性体粒子と共に液滴を搬送するものであり、核酸抽出、精製及び遺伝子増幅に用いられる旨記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2011-232260号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

従って、本発明の目的は、特に、上記のような劣悪な環境、又は、緊急の事態においても所望の目的を達するために、簡便又は安価な手段方法で迅速に上記の各種測定を行うことが出来る簡易測定器具を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意、研究の結果、以下の各態様に示されるような、簡易測定器具等を開発し、本発明を完成した。

【0008】

本発明は、より具体的には以下の態様を提供するものである。

20

〔態様1〕

水系液体から成るそれぞれが独立した少なくとも2つの反応領域、及び、該水性液体に不溶性又は難溶性であるゲル状物質から成る境界領域、及び、これら各領域を保持する容器、並びに、反応性物質が表面に固定化されて成る磁性粒子を含む、被検物質の簡易測定器具であって、該反応領域は該境界領域によって互いに隔てられており、外部の磁場印加手段によって、各反応領域及び各境界領域の独立性並びに該磁性粒子の機能を維持したまま、実質的に該磁性粒子のみを或る反応領域から別の反応領域へそれらを隔てる境界領域を通過して移動させることが可能である、前記簡易測定器具。

〔態様2〕

夫々が独立している複数の境界領域を含む、態様1記載の簡易測定器具。

30

〔態様3〕

反応領域の容量が10～100μlである、態様1又は2記載の簡易測定器具。

〔態様4〕

磁性粒子に移動方向における、境界領域の距離が2～20mmであり、反応領域の距離が10～80mmである、態様1～3のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

〔態様5〕

容器が直径1.5～2.4mm、長さ75～125mmの円筒形のキャピラリーである、態様1～4のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

〔態様6〕

少なくとも2つの反応領域が互いに異なる組成を有する水系液体から成る、態様1～5のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

40

〔態様7〕

磁性粒子に固定される反応性物質が、抗体、受容体、抗原又はリガンドから選択される、態様1～6のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

〔態様8〕

磁性粒子が10～200μgの範囲で含まれている、態様1～7のいずれか一項に記載の簡易測定器具。

〔態様9〕

容器、反応物質が表面に固定化されてなる磁性粒子、水系液体、ゲル化物質の材料、ゲル化剤、及び、封止手段、態様1～8のいずれか一項に記載の簡易測定器具を製造するため

50

のキット。

【態様 10】

態様 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の簡易測定器具を用いる被検物質の測定方法であって、
(a) 該簡易測定器具のいずれか一端に位置する反応領域（第一の反応領域）に試料を添加し、反応性物質が表面に固定化されて成る磁性粒子が含まれている該一端に位置する反応領域において最初（第一）の反応処理工程を実施し、
(b) 外部の磁場印加手段を用いて該磁性粒子を境界領域を通過させて隣接する（第二の）反応領域まで移動させ、該隣接する反応領域で次の（第二の）反応処理工程を実施し、
(c) (b) の操作を 1 回以上実施し（必要に応じて、(b) の操作を繰り返す）、
(d) 最後の反応処理工程が終了した後、いずれかの反応領域における反応処理工程の結果を測定する、ことを含む前記測定方法。

10

【態様 11】

少なくとも一つの反応領域で抗原抗体反応を行う態様 10 記載の測定方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明の簡易測定器具は操作が極めて簡単であり、様々な劣悪な環境下においても外部の磁場印加手段を用いることによって、各種の測定を迅速に定量、半定量及び定性的に実施することが可能である。更に、本発明の簡易測定器具を用いて被検物質を測定する際に、外部から試薬及び反応液等を添加したり、又は外部に反応液等を排出又は移動等させずに全ての反応処理工程を閉鎖系（密閉状態）で行うことが可能であるので、病原菌又は病原ウイルス等の危険物質の測定を安全に行うことが出来る。

20

【0010】

又、本発明の簡易測定器具は、小型・軽量及び／又は使い捨て型とすること可能であり、その為に、持ち運びが容易であり、更に、特別な測定装置等がなくても測定できるので、屋外等の現場でも安全かつ容易に使用することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】本発明の簡易測定器具を模したキャピラリーの写真である。スケール（数字は cm）を下に示す。左から右へ順に cha-seal（Hemato-Seal Tube Sealing compound：白色）、PBST 溶液（PBST、0.02% Tween 20 含有リン酸緩衝食塩水：薄青色）、ゲル（茶色）、PBST 溶液（薄青色）である。尚、溶液とゲルに色素を入れ、可視化している。

30

【図 2】ビーズに固定化する AP（アルカリフォスファターゼ）conjugate Goat anti-mouse IgG 量的変化の確認の結果を示す。

【図 3】AP（アルカリフォスファターゼ）conjugate Goat anti-mouse IgG 固定化ビーズのゲル通過による影響の確認の結果を示す。

【図 4】本発明の簡易測定器具の一具体例であるキャピラリーの写真である。スケール（数字は cm）を下に示す。左から右へ順に封止手段である cha-seal（Hemato-Seal Tube Sealing compound：白色）、PBST 溶液（透明で中間に赤帯が印されている領域、黒いのはビーズ：反応領域 1）、ゲル（透明：境界領域 1）、PNPP（p-Nitrophenyl Phosphate）溶液（反応後で黄色に発色し、中間に黒線が印されている領域：反応領域 2）、ゲル（透明で中間に赤帯が印されている：境界領域 2）、PBST 溶液（透明な領域：反応領域 3）を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、水系液体から成るそれぞれが独立した少なくとも 2 つの反応領域、及び、該水性液体に不溶性又は難溶性であるゲル状物質から成る境界領域、及び、これら各領域を保持する容器、並びに、反応性物質が表面に固定化されてなる磁性粒子、を含む簡易測定器具であって、該反応領域は該境界領域によって互いに隔てられており、外部の磁場印加手段によって、各反応領域及び各境界領域の独立性並びに該磁性粒子の機能を維持したまま、実質的に該磁性粒子のみを或る反応領域から境界領域を介して隣接する別の反応領域

50

へ該境界領域を通過して移動させることが可能である、前記簡易測定器具に係る。

【0013】

反応領域及び境界領域：

本発明の簡易測定器具は、水系液体から成る少なくとも2つの反応領域及び、該水系液体に不溶性又は難溶性であるゲル状物質から成る境界領域を含んでおり、各反応領域は該境界領域によって互いに隔てられている。従って、最も簡単な簡易測定器具の場合には、[反応領域1] - [境界領域1] - [反応領域2]の順に各領域が含まれている。更に、簡易測定器具が夫々が独立している複数の境界領域を含む場合には、例えば、[反応領域1] - [境界領域1] - [反応領域2] - [境界領域2] - [反応領域3]のような構成を有する。かかる構成を有する本発明の簡易測定器具のイメージを図4に示す。尚、後述するように、測定に際して、容器のいずれか一端に位置する反応領域（第一の反応領域）を構成する水系液体の少なくとも一部と試料を外部で予め混合させ、これを第一の反応領域に添加することもあるので、このような場合には、本発明の簡易測定器具の該第一の反応領域には、これを構成する水系液体の一部しか含まれていない場合もある。

10

【0014】

各反応領域の容量は、本発明の簡易測定器具を用いて実施される各反応処理工程の種類等に応じて当業者が適宜選択することが出来、互いに異なっても良い。経済性及び操作性等を考慮すると、例えば、10～100 μ lの範囲とすることが可能である。

【0015】

又、各境界領域の厚み（磁性粒子の移動方向における距離）は、外部の磁場印加手段によって、磁性粒子が隣接する一方の反応領域から反対側に隣接する別の反応領域へ該境界領域を通過して移動する際に、該境界領域の独立性が維持される（境界領域の構造が保持される）限り、特に制限はない。水系液体及びゲル状物質の種類、並びに、操作性等を考慮して、例えば、2～20mmの厚みとすることが可能であり、互いに異なっても良い。

20

【0016】

上記の各領域は適当な容器内に保持されており、それぞれが独立性を有している。その結果、本発明の簡易測定器具各反応領域での反応処理工程は閉鎖系で実施することが可能となる。

【0017】

容器：

外部の磁場印加手段によって、各反応領域及び各境界領域を保持又は画し、更に、これら領域の独立性並びに磁性粒子の機能を維持したまま、実質的に該磁性粒子のみを或る反応領域から別の反応領域へそれらを隔てる境界領域を通過して移動させることが可能である限り、容器の大きさ、形状及び材質に特に制約はない。

30

【0018】

このような容器の材質としては、水系液体からなる反応領域の所望の反応後の吸光度、蛍光、化学発光、生物発光、屈折率の変化等の測定を行う場合に、光学的な検出等ができるようにするために光透過性を有するものであることが好ましい。

【0019】

更に、外部の磁場印加手段によって磁性粒子のみを或る反応領域から別の反応領域へそれらを隔てる境界領域を通過して移動させるために、容器の内面は平滑面であることが好ましく、例えば、表面粗さが、 $Ra = 0.1\mu m$ 以下であることが好ましい。

40

【0020】

以上の条件、並びに、耐熱性、液滴移動時に求められる撥水性、接着性、加工性及び安価性等を考慮すると、容器の材質としては、強度、操作性、経済性等を考慮すると、例えば、ガラス、並びに、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、及びテフロン（登録商標）等の樹脂類が好適である。

【0021】

更に、容器の形状としては、細長い円筒形のキャピラリー、又は、各反応領域及び各境界

50

領域が形成される流路を内部に有する平板型のチップ等が好適である。このようなキャピラリーは、例えば、直径 1.5 ~ 2.4 mm、長さ 75 ~ 125 mm とし、マイクロデバイス又はマイクロチップとして使用することが出来る。又、例えば、ガラス製のキャピラリーの場合に、ガラスの厚みは、通常、0.3 ~ 0.7 mm 程度である。従って、このような細長い円筒形のキャピラリーを使用する場合には、通常、水系液体から成る各反応領域の厚み（磁性粒子の移動方向における距離）は 10 ~ 80 mm である。

【0022】

尚、容器の両端の少なくとも一方は当業者に公知の任意の適当な封止手段によって塞がれている。このような封止手段は、例えば、特別材料を使用せずに、単に、容器自身的一端を封鎖したもので良い。更に、試料又はそれを含む水系液体を添加する、容器のいずれか一端に位置する第一の反応領域も封止手段で塞ぐ場合には、これに用いる封止手段は開閉（取り外し）自在である必要がある。このような封止手段としては、例えば、適当な材料（例えば、樹脂製）から成る詰物を用いて、これを適宜開口部に詰めたり、はずしたりすることができる。或いは、試料又はそれを含む水系液体を添加する第一の反応領域の側の容器の端は、本発明の簡易測定器具を用いて被検物質を測定する際に封止手段によって特に塞がれていなくとも良い。

【0023】

水系液体：

水系液体は、反応領域における様々な反応の場を提供するものであり、該反応の単なる媒体として機能する他に、該反応に関与するか若しくはその成分である各種の化合物を成分として含むことが出来る。例えば、磁性粒子表面に固定化されている反応性物質と反応する物質、この反応によって磁性粒子表面に結合された物質と更に反応する物質、当業者に公知の各種の緩衝剤、界面活性剤、塩類、及びその他の各種補助剤、反応試薬、蛍光物質、並びに、アルコール等の有機溶剤等を例示することができる。又、該水系液体は、水、水溶液及び水懸濁液等の任意の態様で提供され得る。

【0024】

該水系液体の種類及び組成（pH、成分濃度等）は、本発明の簡易測定器具を使用する環境及び目的等、並びに、本発明の簡易測定器具を用いて実施される各反応処理工程の種類等に応じて、当業者が適宜選択することが出来る。又、各反応領域を構成する水系液体の種類及び組成は互いに同じであっても異なってもよい。

【0025】

ゲル状物質：

本発明の簡易測定器具において、2つの反応領域を互いに隔てている境界領域は、水性液体に不溶性又は難溶性であるゲル状物質から構成される。即ち、ゲル状物質とは、水系液体から成る反応領域における反応処理工程の実施時であるか否かを問わずに、水系液体に化学的な影響を及ぼさない化学的に不活性な物質を意味する。本発明におけるゲル状物質は、容器への充填前においてゾル状態であることが好ましい。通常、非水溶性又は水難溶性である液体物質にゲル化剤を添加して容器へ充填した後に、ゲル-ゾル転移点以下に温度を下げることによって、容易にゲル化させることが出来る。

【0026】

こうして調製されたゲル状物質から成る境界領域は、各反応領域及び各境界領域の独立性並びに該磁性粒子の機能を維持したまま、実質的に該磁性粒子のみを或る反応領域から別の反応領域へ該境界領域を通過して移動させることが可能であるような物性を有している必要がある。例えば、動的粘弾性のうち貯蔵粘弾性 E' が好ましくは常温（20 ± 15）°C 下で 10 ~ 100 kPa、より好ましくは 20 ~ 50 kPa である。

【0027】

従って、非水溶性又は水難溶性である液体物質としては、25 °C における水に対する溶解度が概ね 100 ppm 以下であり、常温（20 ± 15）°C において液体状であるような油性物質、例えば、当業者に公知の各種の液体油脂、エステル油、炭化水素油、及びシリコン油からなる群から 1 種又は 2 種以上が組み合わされて用いられうる。

【 0 0 2 8 】

例えば、液体油脂としては各種植物油等、炭化水素油としては、ミネラルオイル及び流動パラフィン等、更に、シリコン油としては、ジメチルポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサンその他のフェニル基含有シリコン油、メチルヒドロジェンポリシロキサン等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

ゲル化剤としては、ヒドロキシ脂肪酸、デキストリン脂肪酸エステル、及びグリセリン脂肪酸エステル等からなる群から選ばれる当業者に公知の任意の油ゲル化剤が1種又は2種以上組み合わせられて用いられうる。

【 0 0 3 0 】

ヒドロキシ脂肪酸としては、例えば、ヒドロキシステアリン酸（12 - ヒドロキシステアリン酸、和光純薬社製）、ジヒドロキシステアリン酸、リシノレイン酸が好ましい。

【 0 0 3 1 】

デキストリン脂肪酸エステルとしては、例えば、ミリスチン酸デキストリン（商品名「レオパールM K L」、千葉製粉株式会社製）、パルミチン酸デキストリン（商品名「レオパールK L」、「レオパールT L」、いずれも千葉製粉株式会社製）、（パルミチン酸 / 2 - エチルヘキサン酸）デキストリン（商品名「レオパールT T」、千葉製粉株式会社製）等が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

又、グリセリン脂肪酸エステルとしては、ベヘン酸グリセリル、オクタステアリン酸グリセリル、エイコ酸グリセリル等が挙げられ、これらを1種以上組み合わせて使用してもよい。具体的には、20 %ベヘン酸グリセリル、20 %オクタステアリン酸グリセリル及び60 %硬化パーム油を含む商品名「T A I S E T 2 6」（太陽化学株式会社製）、50 %ベヘン酸グリセリル及び50 %オクタステアリン酸グリセリルを含む商品名「T A I S E T 5 0」（太陽化学株式会社製）等を挙げることができる。

【 0 0 3 3 】

非水溶性又は難水溶性である液体物質中に添加されるゲル化剤の含有量は、種類等に応じて当業者が適宜決めることが出来、例えば、該液体物質の全重量の0 . 1 ~ 0 . 5 重量 %、0 . 5 ~ 2 重量 %、或いは1 ~ 5 重量 %とすることができる。

【 0 0 3 4 】

ゲル化は当業者に公知の任意の方法で実施することが出来る。例えば、非水溶性又は難水溶性である液体物質を加熱し、加熱された当該液体物質にゲル化剤を添加し、ゲル化剤を完全に溶解させた後、冷却することができる。加熱温度としては、用いる液体物質及びゲル化剤の物性を考慮して適宜決定すればよい。例えば、60 ~ 80 程度とすることが好ましい場合がある。ゲル化剤の溶解は、穏やかに混和しながら行うと良い。冷却はゆっくり行うことが好ましい。上記ゲル化の方法の好ましい態様が適用される一態様として、例えば上述のT A I S E T 2 6（太陽化学株式会社製）を用いる態様が挙げられる。

【 0 0 3 5 】

尚、ゾル - ゲル転移点は、オイルの種類、ゲル化剤の種類、及びゲル化剤の添加量等の条件によって変動しうる。従って、当該各条件は、所望のゾル - ゲル転移点を達成できるよう、当業者によって適宜選択される。ゾル - ゲル転移点は、例えば、40 ~ 50 となるように設定することができる。

【 0 0 3 6 】

磁性粒子：

このような磁性粒子は、磁気に応答する粒子であれば特に限定されず、例えば、マグネタイト、 γ -酸化鉄、マンガン亜鉛フェライト等の磁性体を有する粒子が挙げられる。磁性粒子の表面は、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基等の親水性基により被覆されていることが好ましい。

【 0 0 3 7 】

表面に親水性基を有する磁性粒子の大きさとしては、平均粒径が0 . 1 μm ~ 500 μm

10

20

30

40

50

程度でありうる。平均粒径が小さいと、磁性粒子は液滴中に分散した状態で存在しやすくなり好ましくない。

【0038】

本発明で用いる磁性粒子はその表面に反応性物質が固定化されており、外部の磁場印加手段によって実質的に該磁性粒子のみが各反応領域に移動し、そこで様々な反応処理工程に供せられる。尚、本発明で使用する磁性粒子の量は、測定対象となる被検物質及び各反応領域における反応処理工程の種類、各反応領域の容量等の各種条件にもよるが、例えば、測定器具が、上記に示したような、各反応領域の容量を有する細長い円筒形のキャピラリーである場合には、通常、10～200 μg の範囲が好適である。

【0039】

即ち、磁性粒子の表面には、抗体（例えば、標識抗体）、受容体、抗原及びリガンド等の当業者に公知の適当な化学構造を有する反応性物質が、例えば、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、アピジン、ピオチン、ジゴキシゲニン、プロテインA、プロテインG、等の当業者に公知の任意の結合手段を介して、又は、直接に、共有結合、静電気力、ファンデルワールス力等により固定化されている。測定対象となる被検物質は反応処理工程によって該反応性物と直接又は間接的に結合し、最終的には磁性粒子の表面に選択的に吸着又は固定させることができる。

【0040】

尚、磁性粒子は、予め本発明の簡易測定器具のいずれか一端に位置する反応領域に予め含まれていても良いし、簡易測定器具本体とは別に、単独に又は該反応領域に添加される水系液体に含有される形態で独立していても良い。又、本発明の簡易測定器具を作製するためのキットとして提供される場合には、容器やその他の材料とともに、該キットに含めることができる。

【0041】

反応処理工程

本発明の測定方法は、

（a）該簡易測定器具のいずれか一端に位置する反応領域（第一の反応領域）に試料を添加し、反応性物質が表面に固定化されて成る磁性粒子が含まれている該一端に位置する反応領域において最初（第一）の反応処理工程を実施し、

（b）外部の磁場印加手段を用いて該磁性粒子を境界領域を通過させて隣接する（第二の）反応領域まで移動させ、該隣接する反応領域で次の（第二の）反応処理工程を実施し、

（c）（b）の操作を1回以上実施し（必要に応じて、（b）の操作を繰り返す）、

（d）最後の反応処理工程が終了した後、いずれかの反応領域における反応処理工程の結果を測定する、ことを含む。即ち、[反応領域1] - [境界領域1] - [反応領域2] - [境界領域2] - [反応領域3] のような構成を有する本発明の簡易測定器具を使用する場合には、（b）の操作が2回実施され、[反応領域1] 又は [反応領域3] における最後の反応処理工程が終了した後に、反応様式及び種類等に応じて、いずれかの反応領域における反応処理工程の結果を測定する。

【0042】

尚、試料は第一の反応領域を構成する水系液体の少なくとも一部（反応性物質が表面に固定化されてなる磁性粒子が含まれていても良い）と外部で前処理した後に該第一の反応領域に添加するか、又は、該磁性粒子を含む第一の反応領域に直接添加することができる。又、各反応領域における反応時間及び磁性粒子の保持時間及び移動速度等は各反応の種類、簡易測定器具を用いる環境（温度、湿度等）等に応じて当業者が適宜設定することができる。又、例えば、本発明の簡易測定器具をローター等の適当な装置に装着し、各反応領域内において磁性粒子を適当な時間水系液体中に拡散させて反応処理工程を行なうことも出来る。

【0043】

各反応領域で実施される反応としては、当業者に公知の任意の各種反応、例えば、結合反応、分解反応、発色反応、呈色反応、酸化還元反応等の化学反応、並びに、核酸、タンパ

10

20

30

40

50

ク質、脂質、糖等の生体物質の合成系、触媒系、代謝系及び抗原抗体反応のような免疫系生化学反応等を挙げることができる。更に、化合物の化学的变化を伴わない処理工程として、例えば、前記反応に先立って行われる前処理、分取（分離）処理、溶解処理、混合処理、希釈処理、攪拌処理、洗浄処理、及び、温度調節（加熱及び冷却）処理等の各種の処理を挙げることができる。尚、少なくとも2つの反応領域で実施される反応処理工程は、同種のもので、又は、互いに異なるもので構わない。

【0044】

従って、本発明の簡易測定器具を用いることによって、一連の工程からなる従来公知の任意の測定方法（アッセイ系）全てを閉鎖系で連続的に実施することが可能となる。例えば、ELISA法を実施する場合には、外部の磁場印加手段によって、実質的に磁性粒子のみを独立している各反応領域を隔てる境界領域を通過させて、順次各反応領域に移動させることによって、例えば、第一の反応領域で磁性粒子表面に固体化されている第一次抗体と試料中の被検抗原（被検物質）との間の抗原反応を行わせ、第二の反応領域で洗浄処理し、第三の反応領域で酵素標識第二次抗体と被検抗原との抗原反応を行わせ、更に、第四の反応領域で再度洗浄処理し、最後に第五の反応領域において磁性粒子表面に固体化された第二次抗体に結合している酵素と該反応領域の水系液体に含まれる発色物質との間で発色反応を一定時間行わせ、更に、必要に応じて、第六の反応領域に磁性粒子を移動させて最後の反応処理工程（例えば、混合）を行った後に、第五の反応領域における反応結果を定量的に測定することが可能となる。この結果、従来の方法では、発色試薬では一定時間で発色を止めるために水酸化ナトリウム等の反応停止試薬を新たに加える必要があるが、この本発明の簡易測定器具を使用する反応系では磁性粒子を移動することで反応を止めるので、閉鎖系において簡便に反応結果がえることが可能である。

【0045】

外部の磁場印加手段としては当業者に公知の任意の手段を使用することが出来る。例えば、所謂、携帯可能な磁石、又は、適当な磁場発生装置等を上げることができる。磁場印加手段によって本発明の簡易測定器具内で磁性粒子を移動させるには、例えば、携帯可能な磁石を手動等によって動かすか、又は、本発明の簡易測定器具を上記の磁場発生装置内で移動させる等の適当な方法で実施することができる。但し、既に記載したように、外部の磁場印加手段によって、磁性粒子が隣接する一方の反応領域から反対側に隣接する別の反応領域へ該境界領域を通過して移動させる際には、該境界領域の独立性が維持される（境界領域の構造が保持される）必要がある。

【0046】

尚、試料としては、様々な環境中又は生体内から適当な方法で分離取得され、或いは生体に由来し、目的に応じて、適宜、処理又は加工された、被検物質を含む可能性のある任意の物質（組成物）である。

【0047】

本発明の簡易測定器具を使用した測定方法の最後の反応処理工程が終了した後、いずれかの反応領域における反応処理工程の結果を、例えば、分光光度計のような当業者に公知の任意の適当な外部の定装置又は手段を用いて測定することによって、試料に含まれている被検物質を定性的、半定量的、又は定量的に測定することができる。定性的反応の場合には、目視による測定も可能である。

【0048】

本発明は、以上の簡易測定器具を作製するためのキットにもかかる。該キットは、容器、反応物質が表面に固定化されてなる磁性粒子、当該キットに含まれる容器や水系液体、ゲル化物質の材料、ゲル化剤、及び、封止手段、並びに、適宜、磁場印加手段、試料と水系液体との前処理（例えば、混合）用器具等を含む。また、本発明のキットにおいては、当該液体物質とゲル化剤とが既に混合及びゲル化された状態で提供されてもよいし、ゲル化前の当該液体物質とゲル化剤とが別個の要素として提供されても良い。

【実施例】

【0049】

以下、実施例に則して本発明を説明するが、これらの実施例は本発明の具体的態様を例示するものであって、本発明の技術的範囲はこれらによって何れ制限されることはない。尚、本明細書において使用されている略記の内容は以下の通りである。

BSA：牛血清アルブミン；

PBS：リン酸緩衝食塩水；

PBST溶液：0.02% Tween 20含有リン酸緩衝食塩水；及び

AP conjugate Goat anti-mouse IgG：アルカリフォスファターゼ結合ヤギ由来抗マウスIgG抗体

【0050】

[参考例1]

12-HSAゲル充填キャピラリー作製

12-HSAゲル溶液はシリコンオイルKF-56（信越シリコン社製）1mlに12-ヒドロキシステアリン酸（和光純薬社製）0.005gを加え80℃でインキュベート（ゲルは用事調整をし、充填するまで80℃でインキュベートし続ける）。リングキャップ管（200 μl）に5%BSA/PBS（5%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝食塩水）溶液を充填し1時間浸し、その後、溶液を抜き取り蒸留水で洗浄後、窒素でリングキャップ管内を乾燥させた。リングキャップの片方の末端をcha-seal（Hemato-Seal Tube Sealing compound）で開口部を塞ぎ、もう片方から試薬を充填した。

【0051】

充填順序はPBST溶液を80 μl充填、続いて80℃にインキュベートしてある12-HSA（0.5% w/v）溶液20 μl充填、最後にPBST溶液を80 μlで充填した。充填は垂直に立てた状態で行い、充填は空気をかまないようにした。ゲルを充填した後は15分間をおいてから、最後のPBST溶液を加えた。このようにして作製したゲル充填キャピラリー（本発明の簡易測定器具）の模式的な図を示す（図1）。溶媒およびゲルは無色で見難いため、色付けした（溶媒が薄青色、ゲルが茶色）。右端はcha-sealで塞ぎ、左端は解放している。

【0052】

[参考例2]

TAISET26ゲル充填キャピラリー作製

TAISET26ゲル溶液はシリコンオイルKF-56（信越シリコン社製）1mlにTAISET26（和光純薬社製）0.012gを加え70℃でインキュベート（ゲルは用事調製をし、充填するまで80℃でインキュベートし続ける）。リングキャップに5%BSA/PBS溶液を充填し1時間浸し、その後、溶液を抜き取り蒸留水で洗浄後、窒素でリングキャップ管内を乾燥させた。リングキャップの片方の末端をcha-sealで開口部を塞ぎもう片方から試薬を充填した。

【0053】

充填順序はPBST溶液を80 μl、続いて70℃にインキュベートしてあるTAISET26（1.2% w/v）溶液を20 μl充填、最後にPBST溶液を80 μlで充填した。充填は垂直に立てた状態で行い、充填は空気をかまないようにする。ゲルを充填した後は15分間をおいてから、最後のPBST溶液を加えた。

【0054】

[比較例1]

PBST充填キャピラリー作製

リングキャップに5%BSA/PBS溶液を充填し1時間浸しておいた。その後溶液を抜き取り蒸留水で洗浄後、窒素でリングキャップ管内を乾燥させた。リングキャップの片方の末端をcha-sealで開口部を塞ぎもう片方からPBST溶液を180 μl充填した。充填は垂直に立てた状態で行い、充填は空気をかまないように留意した。

【0055】

[参考例3]

AP（アルカリフォスファターゼ）conjugate Goat anti-mouse IgG固定化ビーズ（磁性粒子）の作製（量的変化の確認用）

プロテインGコーティング磁性ビーズ（DYNAL社製）をボルテックスし懸濁後3 μlずつ各チ

10

20

30

40

50

ューブに分注し、100 μ lのPBST溶液を加えボルテックスした後に遠心(1000rpm, 5 秒)、マグネティックスタンド (life technologies社製) にチューブを立て5分静置後磁性ビーズを吸い込まないように留意して溶液を抜き取った。この工程を2回繰り返した後、198 μ lのPBST溶液を加えた。続いて、下記のように(a~f) 10倍希釈で濃度を変えたAP (アルカリファスファターゼ) conjugate Anti-Mouse IgG (Promega社製) 2 μ lを各チューブに加えて2秒間混合し、ローテーター上で室温、15分間攪拌した後に遠心(1000rpm、5秒間)し、マグネティックスタンドにチューブを立て磁性体ビーズを捕捉後(5分間)、磁性ビーズを含まないように溶液を抜き取った。このビーズ洗浄プロトコールは以下の参考例で共通なため、以下では磁性ビーズ洗浄作業と呼ぶ。

【0056】

10

200 μ lのPBST溶液を加え、再度磁性ビーズ洗浄作業を行った。

【0057】

AP conjugate Anti-Mouse IgG希釈濃度 (IgG最終濃度)

- a) 1000ng/ μ l (final conc. 10000pg/ μ l)
- b) 100ng/ μ l (final conc. 1000pg/ μ l)
- c) 10ng/ μ l (final conc. 100pg/ μ l)
- d) 1ng/ μ l (final conc. 10pg/ μ l)
- e) 0.1ng/ μ l (final conc. 1pg/ μ l)
- f) 0.01ng/ μ l (final conc. 0.1pg/ μ l)

【0058】

20

[参考例4]

ビーズに固定化するAP conjugate Goat anti-mouse IgG量的変化の確認

参考例3で作製した各AP conjugate Goat anti-mouse IgG固定化ビーズに100 μ l PNPP発色試薬(Thermo社製)を加えボルテックス後、チューブミキサー(TOMY社)上で室温で15分間アルカリフォスファターゼ反応を行った。続いて反応停止剤(2N水酸化ナトリウム水溶液)を50 μ l加えてよく混合した後、軽く遠心(1000rpm, 5秒)し、マグネティックスタンドにチューブを立て5分静置後反応溶液を50 μ l抜き取りBioSpec-nano(島津製作所製)で吸光度測定した(波長405nm)。

【0059】

AP conjugate Goat anti-mouse IgGの定量分析の結果(図2)は、PNPP発色試薬を用いた場合、a, b(1ng/ μ l以上の反応系)で観測の上限(飽和)値に達しており、e, f(1pg/ μ l以下の反応系)で観測限界値以下となっていた。これにより、濃度変化が確認できる範囲は1pg/ μ lから1ng/ μ lの範囲であることを確認した。この結果より、ゲル通過によるビーズ固定化抗体の影響の実験に用いるAP conjugate Goat anti-mouse IgGの濃度は、濃度変化が定量できる濃度(50pg/ μ l)で行うことにした。

30

【0060】

[参考例5]

AP conjugate Goat anti-mouse IgG固定化ビーズの作製(検討用)

プロテインGコーティングビーズ(DYNAL)をボルテックスし懸濁後3 μ lずつチューブに分注し、100 μ lのPBST溶液を加えて混合した後に磁性ビーズ洗浄作業を行った。

40

【0061】

この洗浄作業を2回行った後、198 μ lのPBST(tween20 0.02%)溶液を加え、続いて0.05ng/ μ lのAP conjugate Anti-Mouse IgG (Promega社製) 2 μ lを加えた。その後、ローテーター上で室温で15分間混合した後に、磁性ビーズ洗浄作業を行った。回収された磁性ビーズに、200 μ lのPBST溶液を加え混合した後、磁性ビーズ洗浄作業を行った。

【0062】

このビーズ洗浄作業を2回繰り返した後、20 μ lのPBST溶液を加えた。尚、2回目の洗浄時にゲル先導用の磁気ビーズ(Roche社製)を各チューブに3 μ l分加えて一緒に洗浄した。

【0063】

[参考例6]

50

AP conjugate Goat anti-mouse IgG固定化ビーズのゲル通過による影響の確認

参考例 5 で作製したGoat anti- mouse IgG AP固定抗体ビーズ溶液を参考例 1 及び 2、並びに比較例 1 で調製した磁性ビーズを各キャピラリーに全量添加した。

【 0 0 6 4 】

比較例 1 のキャピラリーはコントロールとして使用した。ビーズ添加後磁石でキャピラリー管内を上下（左右）にビーズを3往復させ、開口部に100 μ lのPBST溶液が入っているチューブを配置し、そこに、ビーズを排出させた。

【 0 0 6 5 】

参考例 1 の12-HSAゲル充填キャピラリーも同様に、ビーズ添加後磁石でキャピラリー管内を上下（左右）にビーズを3往復（ゲルの中を6回通過したことになる）させた後、開口部に100 μ lのPBST溶液が入っているチューブを配置し、そこにビーズを排出させた。

10

【 0 0 6 6 】

参考例 2 のTAISET26ゲル充填キャピラリーを用いてビーズアプライ後磁石でキャピラリー管内を上下（左右）にビーズを3往復（ゲルの中を6回通過したことになる）させた後、開口部に100 μ lのPBST溶液が入っているチューブを配置し、そこにビーズを排出させた。

【 0 0 6 7 】

それぞれの排出されたビーズに磁気ビーズ洗浄作業を行った後、100 μ l PNPP発色試薬(Thermo社)を加えボルテックス後、チューブミキサー上で室温で15分間参考例 4 に記載するアルカリフォスファターゼ反応を行った。続いて反応停止剤（2N水酸化ナトリウム水溶液）を50 μ l加えて、混合後に遠心(1000rpm, 5秒)し、マグネティックスタンドにチューブを立て、5分静置後反応溶液を50 μ l抜き取りBioSpec nano（島津製作所製）で吸光度測定した（波長405nm）。

20

【 0 0 6 8 】

以上の3つのサンプル測定した結果、コントロールのキャピラリーを通したビーズの吸光度測定値とゲルを通過させて測定したビーズの値がほぼ同等の数値（参考例 1：7.135、参考例 2：7.031、比較例 1：7.129）を示していることが確認できた（図3）。すなわち、ゲルを通したことによるプロテインGのAP conjugate Goat anti-mouse IgGの保持能力に影響がなく、さらにゲルを通したことによる測定の影響もないことが確認できた。

【 実施例 1 】**【 0 0 6 9 】**

30

キャピラリーの中で反応が完結する系の構築

以上の結果に基づき、本発明の簡易測定器具の一例を以下の通り作製した。即ち、参考例 2 と同様にBSAブロッキングしたリングキャップ（200 μ l）の片方の末端をcha-sealで開口部を塞ぎもう片方から試薬を充填した。

【 0 0 7 0 】

充填順序はPBST溶液を80 μ l [反応領域 1]、続いて70 にインキュベートしてあるTAISET26 (1.2% w/v) 溶液を15 μ l 充填 [境界領域 1]、PNPP発色試薬 40 μ l 充填し [反応領域 2]、再度70 にインキュベートしてあるTAISET26 (1.2% w/v) 溶液を15 μ l 充填 [境界領域 2]、最後にPBST溶液を80 μ lで充填した [反応領域 3]。充填は垂直に立てた状態で行い、充填は空気をかまないようにした。ゲルを充填した後は15分間をおいてから、最後のPBST溶液を加えキャピラリーを作成した。

40

【 0 0 7 1 】

こうして作製した本発明の簡易測定器具であるキャピラリーに参考例 5 で作製したGoat anti- mouse IgG AP固定抗体ビーズ溶液を反応領域 3 に全量アプライした。

【 0 0 7 2 】

キャピラリー内でアプライしたビーズを磁石で集めPBST溶液 [反応領域 3] から上記のゲル化物質から成る境界領域 2 を通過させてPNPP発色試薬溶液相 [反応領域 2] にビーズを移動させ、磁石をいったん外しキャピラリーをローターに装着し15分間ビーズが溶液内で拡散するように回転させた後、再度磁石でビーズを集めて上記のゲル化物質から成る境界領域 1 を通過させて次溶液相のPBST溶液 [反応領域 1] へ移動させ、最後に、反応領

50

域 2 におけるPNPP発色試薬溶液が透明から黄色に発色していることを確認し、ビーズにAP conjugate Goat anti-mouse IgGが存在し、反応していることが確認できた（図 4）。

【 0 0 7 3 】

従来の発色試薬では一定時間で発色を止めるために水酸化ナトリウム等の反応停止試薬を新たに加える必要があるが、この反応系ではビーズを移動することで反応を止めているので、ビーズを動かすだけで簡便に反応結果が確認できる。目視による確認のため、発色度合いを数値で確認することは難しいが、検出限界以下か以上の有る・無し（濃い・薄い）による判定が可能ということが確認できた。

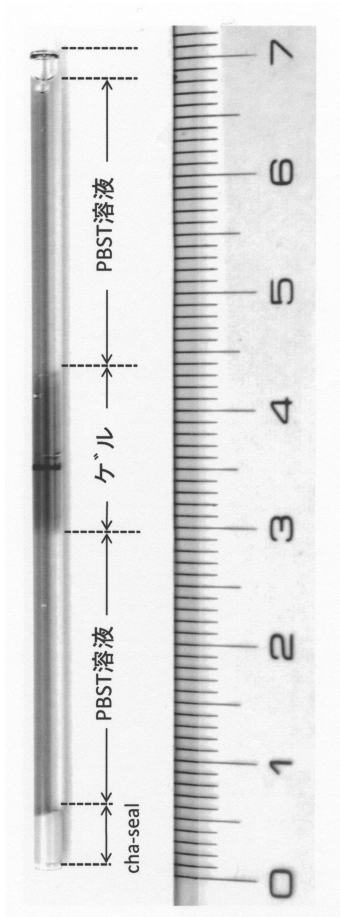
【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 4 】

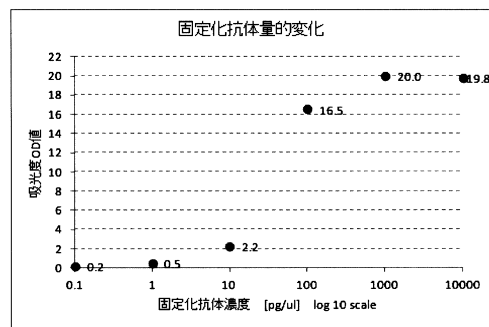
本発明の簡易測定器具は小型・軽量及び／又は使い捨て型とすることが可能であり、特別な測定装置等がない環境、例えば、屋外または開発途上国等の現場でも安全かつ容易に各種の測定又は診断等を安全且つ迅速に実施することが出来るので、公衆衛生の向上、環境問題の解決等に大いに役立つことが期待される。

10

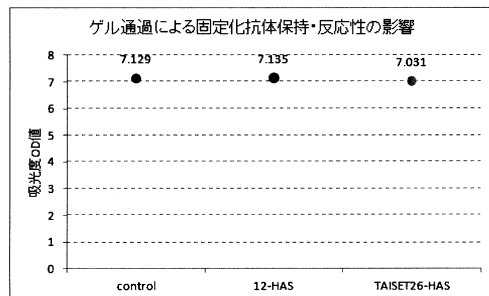
【 図 1 】



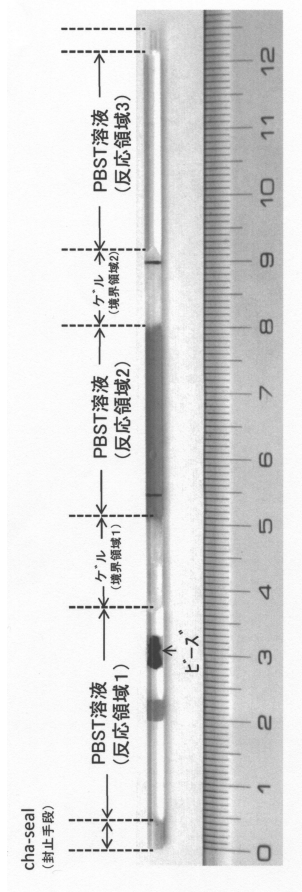
【 図 2 】



【 図 3 】



【図 4】



フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2012/086243(WO,A1)
米国特許出願公開第2008/0160630(US,A1)
特開2011-232260(JP,A)
特開2011-257413(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)