(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年3月19日(19.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/054300 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/536* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/031837

(22) 国際出願日： 2019年8月13日(13.08.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-169583 2018年9月11日(11.09.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ Fukuoka (JP). ウシオ電機株式会社 (**USHIO DENKI KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1008150 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 石松 亮一 (**ISHIMATSU Ryoichi**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 森田 金市 (**MORITA Kinichi**); 〒1008150 東京都千代田区丸の内１丁目６番５号 ウシオ電機株式会社内 Tokyo (JP).

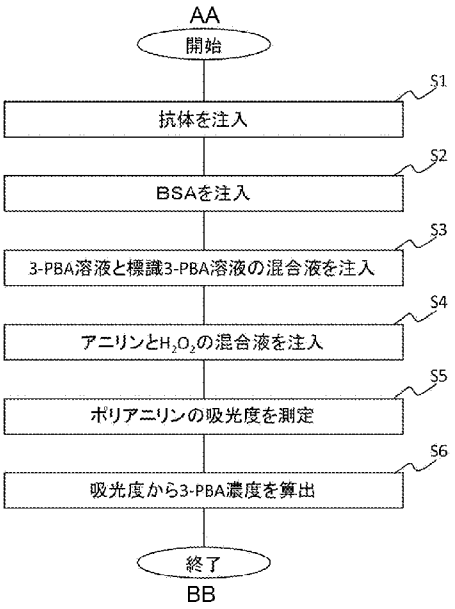
(74) 代理人: 羽立 幸司 (**HADATE Koji**); 〒8140001 福岡県福岡市早良区百道浜三丁目８番３３号 福岡システムＬＳＩ総合開発センター 知的財産綜合事務所ＮＥＸＰＡＴ内 Fukuoka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) **Title:** METHOD AND APPARATUS FOR DETERMINING QUANTITY OF ENDOCRINE DISRUPTOR AND LIKE

(54) 発明の名称： 内分泌攪乱物質等の定量方法及び定量装置

[図1]



AA... START
S1... INJECT ANTIBODY
S2... INJECT BSA
S3... INJECT MIXTURE OF 3-PBA SOLUTION AND MARKER 3-PBA SOLUTION
S4... INJECT MIXTURE OF ANILIN AND H_2O_2
S5... MEASURE ABSORBANCE OF POLYANILIN
S6... CALCULATE 3-PBA CONCENTRATION FROM ABSORBANCE
BB... END

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a quantity determination method and the like that can be performed in a field in which an environmental sample subject such as an endocrine disruptor is collected. A first aspect of the present invention pertains to a quantity determination method that determines the quantity of a target ingredient contained in a sample solution by using an antigen-antibody reaction, the method comprising: an antigen-antibody reaction step in which an enzyme marker antigen or an enzyme marker antibody which is marked with an enzyme is added

WO 2020/054300 A1

[続葉有]

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, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

to a reacting portion that contains an antibody corresponding to the enzyme marker antigen or an antigen corresponding to the enzyme marker antibody, and an antigen-antibody reaction is performed; a polymerization reaction step in which a monomer having a polymerization reaction promoted by the enzyme is added to the reacting portion, and a polymerization reaction for producing a polymer from the monomer is performed; an absorbance measurement step in which the absorbance of the polymer produced through the polymerization reaction step is measured; and a quantity determination step in which the quantity of the target ingredient is determined from the absorbance obtained through the absorbance measurement step.

(57) 要約:本発明は、内分泌攪乱物質等のような環境試料検体を採取した現場で実施できる定量方法等を提供することを目的とする。 本発明の第1の観点は、抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量方法であって、酵素で標識されている酵素標識抗原又は酵素標識抗体を、前記酵素標識抗原に対応する抗体又は前記酵素標識抗体に対応する抗原が入っている反応部に加え、抗原抗体反応をさせる抗原抗体反応工程と、前記酵素により重合反応が促進されるモノマーを前記反応部に加え、前記モノマーからポリマーを生成する重合反応をさせる重合反応工程と、前記重合反応工程で生成された前記ポリマーの吸光度を測定する吸光度測定工程と、前記吸光度測定工程で得られた吸光度から、前記対象成分を定量する定量工程とを含む定量方法である。

明　細　書

発明の名称 ： 内分泌攪乱物質等の定量方法及び定量装置

技術分野

[0001] 本発明は、内分泌攪乱物質等の定量方法及び定量装置に関するものである。

背景技術

[0002] 内分泌攪乱物質（所謂、環境ホルモン）による環境汚染が注目されている。内分泌攪乱物質は、土壌、河川、海洋などの環境に排出された農薬等の化学物質が前記環境に生息する微生物により代謝毒性化したものである。近年、環境中における農薬等の化学物質や当該化学物質に由来する内分泌攪乱物質（以下、「内分泌攪乱物質等」とする。）の測定・分析に対する要請が高まってきた。

[0003] 内分泌攪乱物質等の定量方法としては、従来より、ガスクロマトグラフ質量分析（例えば、高分解能ガスクロマトグラフ分析：HRGC／MS，高分解能質量分析HRGC／HRMS）法や、液体クロマトグラフ（例えば、高速液体クロマトグラフ：HPLC）法、ＥＬＩＳＡ等の光学測定が用いられてきた（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表２０１８－５１２０７１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、従来の内分泌攪乱物質等の定量方法は、測定精度や感度は高いものの、比較的大型の装置を必要とするため、基本的には研究所等の分析拠点にて実施されることを前提としていて、内分泌攪乱物質等の採取現場において実施することは困難であった。

[0006] 本発明は係る事情によりなされたものであって、内分泌攪乱物質等のよう

な環境試料検体を採取した現場で実施できる定量方法等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

[0007] 本発明の第１の観点は、抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量方法であって、酵素で標識されている酵素標識抗原又は酵素標識抗体を、前記酵素標識抗原に対応する抗体又は前記酵素標識抗体に対応する抗原が入っている反応部に加え、抗原抗体反応をさせる抗原抗体反応工程と、前記酵素により重合反応が促進されるモノマーを前記反応部に加え、前記モノマーからポリマーを生成する重合反応をさせる重合反応工程と、前記重合反応工程で生成された前記ポリマーの吸光度を測定する吸光度測定工程と、前記吸光度測定工程で得られた吸光度から、前記対象成分を定量する定量工程とを含む。

[0008] 本発明の第２の観点は、第１の観点の定量方法であって、前記モノマーがアニリンであり、前記ポリマーがポリアニリンである。

[0009] 本発明の第３の観点は、第１又は第２の観点の定量方法であって、前記抗原抗体反応工程において、前記抗体が入っている前記反応部に、前記酵素標識抗原とともに、酵素で標識していない前記試料溶液を加える。

[0010] 本発明の第４の観点は、抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量装置であって、前記抗原抗体反応の反応場とする反応部と、前記試料溶液を保持するための第１容器と、酵素で標識されていて、かつ、前記抗原抗体反応の抗原又は抗体である酵素標識物を含む酵素標識物溶液を保持するための第２容器と、前記酵素により促進される重合反応の基質溶液を保持するための第３容器と、前記第１容器内の前記試料溶液を前記反応部に導く第１流路と、前記第２容器内の前記酵素標識物溶液を前記反応部に導く第２流路と、前記第３容器内の前記基質溶液を前記反応部に導く第３流路と、前記反応部内の溶液を外部に導く第４流路と、前記重合反応により生成される重合体が吸収する波長を含む光を発する光源部と、光を検出する光検出部と、前記光源部が発する光を前記第４流路の一部である測定部に導

光する第１導光路と、前記測定部からの光を前記光検出部に導光する第２導光路と、前記第１導光路及び前記第２導光路の周囲を包囲する、光を吸収する吸光部とを備える。

[0011] 本発明の第５の観点は、第４の観点の定量装置であって、前記吸光部が、光を吸収する顔料を含有する顔料含有シリコーン部材からなる。

[0012] 本発明の第６の観点は、第４又は第５の観点の定量装置であって、前記第１導光路、前記第２導光路、及び、前記吸光部は、屈折率が同一のシリコーン樹脂を素材とする。

[0013] 本発明の第７の観点は、第４から第６のいずれかの観点の定量装置であって、前記第１流路と、前記第２流路とは、前記反応部よりも上流で合流している。

[0014] 本発明の第８の観点は、第４から第７のいずれかの観点の定量装置であって、前記抗原抗体反応に用いる抗体溶液を保持するための第４容器と、前記第４容器内の前記抗体溶液を前記反応部に導く第４流路とを備え、前記酵素標識物は、酵素標識された抗原である酵素標識抗原である。

発明の効果

[0015] 本発明の各観点によれば、内分泌攪乱物質等の採取現場において吸光度を測定し、内分泌攪乱物質等を定量することが可能になる。

[0016] また、本発明の各観点によれば、酵素により触媒される反応が重合反応であるため、蛍光基質や発色基質を用いる従来のＥＬＩＳＡに比べて、光や熱による影響を受けにくく、屋外での測定に適した定量方法等を提供することが可能になる。また、重合反応の反応時間は短いため、短時間で内分泌攪乱物質等を定量することが可能になる。

[0017] 本発明の第２の観点によれば、反応時間が短いアニリンのラジカル重合反応を利用しているため、短時間で定量することが可能になる。また、アニリンは、従来のＥＬＩＳＡで用いる蛍光基質に比べ、光や熱に対して安定であるため、本発明の定量方法は屋外測定に適している。さらに、アニリンは安価であるため、従来のＥＬＩＳＡのような高価な蛍光試薬は不要である。

[0018] 本発明の第３の観点によれば、ＥＬＩＳＡの競合法を用いることにより、少ない工程で定量できるため、測定者の作業負担が軽減され、また、定量にかかる時間が短縮され、オンサイト分析に適した定量方法を提供することが可能になる。例えば、ＥＬＩＳＡのサンドイッチ法では、抗体を基板に吸着させた後に、抗原を加えて１回目の抗原抗体反応をさせ、さらにそこに標識抗体を加えて２回目の抗原抗体反応をさせる。一方、競合法では、実施例に示す通り、抗原抗体反応は１回のみである。

[0019] 本発明の第４の観点によれば、内分泌攪乱物質等の採取現場において吸光度を測定し、内分泌攪乱物質等を定量できる定量装置を提供することが可能になる。また、迷光は吸光部で吸収されるため、精度良く定量することが可能になる。

[0020] 本発明の第５の観点によれば、吸光部に入射した迷光は、顔料により吸収される。そのため、第１導光路及び第２導光路を構成する透明樹脂に戻ることはほとんどない。さらに、吸光部から外部へ迷光が漏れることもない。そのため、迷光の複雑な多重反射がほとんど発生しない。

[0021] 本発明の第６の観点によれば、第１導光路及び第２導光路を構成する透明樹脂と、吸光部を構成する顔料含有樹脂との樹脂の材質を同じにすることにより、両樹脂が接触する界面において光の反射や散乱を抑制することが可能になる。

[0022] 本発明の第７の観点によれば、第１容器内の試料溶液と第２容器内の酵素標識物溶液を混合してから、反応部に導くことが可能になる。

[0023] 本発明の第８の観点によれば、抗体を反応部内の基板に吸着させた後に、定量対象である抗原と酵素標識抗原を競合的に抗体に反応させることが容易になる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]本発明の内分泌攪乱物質等の定量方法のフロー図である。

[図2]本発明の内分泌攪乱物質等の定量装置の構成の一例である。

[図3]アニリンの吸光度スペクトルと重合反応後の吸収スペクトルを示す図で

ある。

[図4]アニリンの重合反応をさせた場合の吸光度の時間変化を示す図である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、図面を参照して、本発明の実施例について述べる。なお、本発明の実施の形態は、以下の実施例に限定されるものではない。

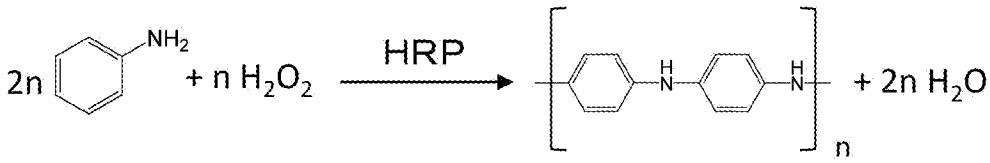
実施例 1

[0026] 図１に、本発明の内分泌攪乱物質等の定量方法のフロー図を示す。本実施例では、定量対象をジフェニルエーテル系除草剤の代謝物質の一種である３－フェノキシ安息香酸（3-phenoxybenzoic acid：３－ＰＢＡ）とした。また、酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Horse Radish Peroxidase：ＨＲＰ）を用いた。なお、末端にＣＯＯＨ基又はNH_2基を有する化学物質であれば、ＨＲＰにより標識可能である。また、各溶液の溶媒には、リン酸緩衝液（Phosphate buffer）を用いた。

[0027] まず、３－ＰＢＡと特異的に結合する抗３－ＰＢＡ抗体を反応セル（請求項記載の「反応部」の一例）に注入し、反応セル内の基板に吸着させる（Ｓ１）。次に、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を反応セルに注入する（Ｓ２）。ＢＳＡは、次のステップで注入する標識抗原が基板に非特異的に吸着することを抑制するためのブロッキング剤である。続いて、定量対象の３－ＰＢＡ溶液（請求項記載の「試料溶液」の一例）と、標識３－ＰＢＡ溶液（請求項記載の「酵素標識物」及び「酵素標識抗原」の一例）との混合液を反応セルに注入する（Ｓ３、請求項記載の「抗原抗体反応工程」の一例）。ここで、標識３－ＰＢＡ溶液は、抗原である３－ＰＢＡをＨＲＰで予め標識した標識３－ＰＢＡを含む溶液であって、標識３－ＰＢＡの濃度は既知である。３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液の混合液が注入されると、標識されていない３－ＰＢＡと標識３－ＰＢＡが競合的に基板上の抗体により補足され、抗原抗体反応が起こる。そして、洗浄後、アニリンと過酸化水素（H_2O_2）を反応セルに注入する（Ｓ４、請求項記載の「重合反応工程」の一例）。すると、基板上の抗体に補足された標識３－ＰＢＡのＨＲＰにより、下記の化

学反応が触媒され、アニリンからポリアニリンが生成される重合反応が起こる。重合反応の後、ポリアニリンの吸光度を測定する（Ｓ５、請求項記載の「吸光度測定工程」の一例）。最後に、得られた吸光度に基づいて、３－ＰＢＡの濃度を算出する（Ｓ６、請求項記載の「定量工程」の一例）。

[0028] [化1]



[0029] このように、本定量方法は、アニリンのラジカル重合反応を利用しているため、定量にかかる時間を従来のＥＬＩＳＡに比べて大幅に短縮できる。従来のＥＬＩＳＡの酵素反応にかかる時間は数分であるのに対し、本定量方法の重合反応にかかる時間は数秒である。また、アニリンは、従来のＥＬＩＳＡで用いていた蛍光基質や発色基質に比べて、光や熱に対してはるかに安定であるため、オンサイト分析に適している。さらに、従来のＥＬＩＳＡで用いていた基質に比べ、アニリンは安価である。つまり、本定量方法によれば、迅速、安全かつ安価に、内分泌攪乱物質等のオンサイト分析を行うことが可能になる。

[0030] 図２に、本発明の定量方法を実施するための定量装置１の構成例を示す。定量装置１は、流れ分析法（例えば、Flow Injection Analysis）による分析を可能としたものである。

[0031] 定量装置１は、定量対象である３－ＰＢＡ溶液を保持するための抗原用容器３（請求項記載の「第１容器」の一例）と、標識３－ＰＢＡ溶液を保持するための標識抗原用容器５（請求項記載の「第２容器」の一例）と、抗体溶液を保持するための抗体用容器７（請求項記載の「第４容器」の一例）と、ＢＳＡなどのブロッキング剤を保持するためのブロッキング剤用容器９と、過酸化水素水（H_2O_2）を保持するためのH_2O_2用容器１１と、アニリン含有溶液を保持するためのアニリン用容器１３（請求項記載の「第３容器」の一例）と、ランニングバッファを保持するためのランニングバッファ用容器

１５と、抗原抗体反応の反応場となる反応セル１７（請求項記載の「反応部」の一例）と、各容器から反応セル１７に溶液を導く導入流路１９と、導入流路１９中の溶液を流すためのポンプＰ１－Ｐ７と、導入流路１９に設けた開閉制御可能な三方バルブＶ１－Ｖ７と、反応セル１７から外部に溶液を導く光学測定用流路２１（請求項記載の「第４流路」の一例）と、ポリアニリンの吸光度を測定する吸光度測定部２３とを有する。なお上記した三方バルブの開閉制御は、流体の流れ方向の切り替え制御、流体の流れのＯｎ・Ｏｆｆ制御を含むものとする。

[0032] 各容器（抗原用容器３、標識抗原用容器５、抗体用容器７、ブロッキング剤用容器９、H_2O_2用容器１１、アニリン用容器１３、ランニングバッファ用容器１５）は、導入流路１９（19_1、19_2、19_3、19_4、19_5、19_6、19_7）を通じてポンプＰ１－Ｐ７に接続され、ポンプＰ１－Ｐ７の駆動により各容器内の溶液が導入流路１９内を流れ、反応セル１７に入る。ポンプＰ１－Ｐ６の下流側には、開閉制御可能な三方バルブＶ１－Ｖ６が設けられている。後述する合流点Ｃ３と反応セル１７の間の導入流路19_{10}には、バルブＶ７が設けられ、もう一方が廃液入れ２５に接続している。なお、図２においては、理解を容易にするため、各バルブ個別に示されているが、各バルブを集約して１つの構造体を成すバルブ制御機構であってもよい。

[0033] 抗原用容器３より３－ＰＢＡ溶液が流れる導入流路19_1（請求項記載の「第１流路」の一例）と、標識抗原用容器５より標識３－ＰＢＡ溶液が流れる導入流路19_2（請求項記載の「第２流路」の一例）とは、合流部Ｃ１で合流する。すなわち、ポンプＰ１及びＰ２が動作し、バルブＶ１が図面横方向のみ開状態のときに流れる３－ＰＢＡ溶液と、バルブＶ２が図面横方向のみ開状態のときに流れる標識３－ＰＢＡ溶液とが合流部Ｃ１に流れ込むと、当該合流部Ｃ１の下流側の導入流路19_8には、３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液の混合液が流れる。

[0034] この混合液が流れる導入流路19_8は、第１混合コイル部２７の上流と接続される。３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液の混合液は、第１混合コイル

部２７を流れることにより十分に混合される。第１混合コイル部２７を設けることにより、短い流路で３－ＰＢＡ溶液と標識３－ＰＢＡ溶液を混合できるため、コンパクトな定量装置１を提供することが可能になる。

[0035] 第１混合コイル部２７の下流側の導入流路１９$_8$は、合流点Ｃ３において、ポンプＰ３が動作し、バルブＶ３が図面横方向のみ開状態のとき抗体用容器７より抗体溶液が流れる導入流路１９$_3$と、ポンプＰ４が動作し、バルブＶ４が図面横方向のみ開状態のときブロッキング剤用容器９よりＢＳＡが流れる導入流路１９$_4$と、後で説明するように、H_2O_2及びアニリン溶液の混合液が流れる導入流路１９$_9$と合流する。そして、合流部Ｃ３の下流側の導入流路１９$_{10}$は、反応セル１７に連結される。

[0036] H_2O_2用容器１１よりH_2O_2が流れる導入流路１９$_5$と、アニリン溶液用容器１３よりアニリン含有溶液が流れる導入流路１９$_6$（請求項記載の「第３流路」の一例）は、合流部Ｃ２で合流する。すなわち、ポンプＰ５及びＰ６が動作し、バルブＶ５が図面横方向のみ開状態のときに流れるH_2O_2と、バルブＶ６が図面横方向のみ開状態のときに流れるアニリン溶液とが合流部Ｃ３に流れ込むと、当該合流部Ｃ２の下流側の導入流路１９$_9$には、H_2O_2及びアニリン溶液の混合液が流れる。

[0037] 合流部Ｃ２の下流側の導入流路１９$_9$には、第２混合コイル部２９が設けられ、第２混合コイル部２９の下流側は、合流点Ｃ３に合流する。すなわち、合流部Ｃ２を通過したH_2O_2及びアニリン溶液の混合液は、第２混合コイル部２９を流れることにより十分に混合される。

[0038] 反応セル１７内には、抗体定着部が設けられている。抗体定着部としては、例えば、プラスチック基板（例えば、ＰＤＭＳ基板）が用いられる。

[0039] 反応セル１７の下流側の光学測定用流路２１は、光透過性材料からなる。この光学測定用流路２１の周囲には、ポリアニリンの吸光度を測定するための吸光度測定部２３が設けられる。吸光度測定部２３は、吸光度測定用の光を放出する光源３１（請求項記載の「光源部」の一例）と、光源３１から放出される光を光学測定用流路２１に導光する投光用導光路３３（請求項記載

の「第１導光路」の一例）、光学測定用流路２１内のポリアニリン含有溶液を通過した光を導光する受光用導光路３５（請求項記載の「第２導光路」の一例）、受光用導光路３５により導光される光を受光する受光センサ３７（請求項記載の「光検出部」の一例）を含む。

[0040] ここで、投光用導光路３３及び受光用導光路３５には、外光等のノイズ光（迷光）が侵入しうる。この外光の影響を抑制するために、光源３１、投光用導光路３３、受光用導光路３５及び受光センサ３７は、光吸収性材料（例えば、カーボンブラック等の顔料を含有するシリコーン樹脂）からなる遮光部材３９（請求項記載の「吸光部」の一例）により包囲される。

[0041] 投光用導光路３３又は受光用導光路３５に侵入するノイズ光のうち、投光用導光路３３、受光用導光路３５の光軸と同方向に進む成分は非常に少なく、大部分は、投光用導光路３３と遮光部材３９との界面、受光用導光路３５と遮光部材３９との界面から遮光部材３９へ入射する。このとき、遮光部材３９へ入射したノイズ光は、遮光部材３９が含有する光吸収部材により吸収される。したがって、光学測定の測定結果に対するノイズ光（迷光）の影響を効果的に低減することが可能である。

[0042] 投光用導光路３３及び受光用導光路３５は、遮光部材３９に設けられた空洞部として構成されるが、上記投光用導光路３３は、光源３１から放出される光に対して透明な樹脂（例えば、シリコーン樹脂）により構成することもできる。同様に、受光用導光路３５は、ポリアニリンから放出される光に対して透明な樹脂（例えば、シリコーン樹脂）により構成することもできる。

[0043] ここで、投光用導光路３３、受光用導光路３５を構成する透明な樹脂と、遮光部材３９を構成する顔料を含有する樹脂との材質を同じにすると、前記両樹脂の屈折率が同じであるので、当該両樹脂の界面での反射および散乱が抑制される。すなわち、この場合、投光用導光路３３、受光用導光路３５が空洞である場合と同様に、遮光部材３９へ入射した迷光は遮光部材３９が含有する上記顔料により吸収されるが、さらに、投光用導光路３３、受光用導光路３５と遮光部材３９との界面での反射および散乱が抑制されるので、遮

光部材３９へ入射した迷光は投光用導光路３３、受光用導光路３５にはほとんど戻らない。よって、迷光の複雑な多重反射がほとんど発生しない。

[0044] なお、バルブＶ１－Ｖ７（バルブ制御機構）、ポンプＰ１－Ｐ７、光源、受光センサへの給電は図示を省略した給電手段により行われる。同様に、バルブＶ１－Ｖ７（バルブ制御機構）の開閉制御、ポンプＰ１－Ｐ７、光源、受光センサの制御は、図示を省略した制御部により行われる。

[0045] 本定量装置１における３－ＰＢＡの定量は以下のように行われる。まず、ポンプＰ３を動作させ、バルブＶ３を図面横方向のみ開状態として、抗体用容器７より抗体溶液が、合流点Ｃ３を通過して、反応セル１７内に導入される。反応セル１７内に導入された抗体溶液中の抗体は、プラスチック基板上に吸着される（Ｓ１）。

[0046] 上記基板上に抗体が吸着された後、ポンプＰ３の動作を停止し、バルブＶ３を閉状態とする。その後、ポンプＰ４を動作させ、バルブＶ４を図面横方向のみ開状態として、ブロッキング剤用容器９よりＢＳＡが、合流点Ｃ３を通過して、反応セル１７内に導入される（Ｓ２）。反応セル１７内にＢＳＡを導入するのは、後に反応セル１７内に導入される標識３－ＰＢＡが、抗体に認識されずに基板上に非特異的に吸着するのを抑制するためである。

[0047] 反応セル１７内にＢＳＡを導入後、ポンプＰ４の動作を停止し、バルブＶ４を閉状態とする。その後、ポンプＰ１及びＰ２を動作させ、バルブＶ１及びＶ２を図面横方向のみ開状態として、抗原用容器３からの３－ＰＢＡ溶液と標識抗原用容器５からの標識３－ＰＢＡ溶液との混合液が、第１混合コイル部２７により十分混合されて合流部Ｃ３を通過後、反応セル１７内に導入される。導入された上記混合液は、基板上に吸着されて固定化された抗体に捕捉される（Ｓ３）。

[0048] 抗原抗体反応を起こした後、ポンプＰ１及びＰ２の動作を停止し、バルブＶ１及びＶ２を閉状態とする。次に、ポンプＰ５及びＰ６を動作させ、バルブＶ５及びＶ６を開状態として、H_2O_2容器１１からのH_2O_2とアニリン溶液用容器１３からのアニリン含有溶液との混合液が、第２混合コイル部２９

により十分混合されて合流部Ｃ３を通過後、反応セル１７内に導入される。すると、反応セル１７にて、ポリアニリンが生成され（Ｓ４）、反応セル１７の下流側の光学測定用流路２１には、ポリアニリン含有溶液が流れる。

[0049] そして、反応セル１７の下流側の光学測定用流路２１の周囲に設けられた吸光度測定部２３において、ポリアニリンの吸光度が測定され（Ｓ５）、その吸光度に基づいて３－ＰＢＡの濃度が算出される（Ｓ６）。なお、導入流路１９及び反応セル１７は、各工程の間に適宜ランニングバッファを流すことにより洗浄される。例えば、アニリン溶液が流れる導出流路19_6、19_9、19_{10}の一部については次のように洗浄する。ポンプＰ７を動作させ、バルブＶ６のアニリン用容器１３に接続している栓のみを閉状態とし、他の二つの栓を開状態とすると、ランニングバッファ用容器１５よりランニングバッファが、合流点Ｃ２、第２混合コイル２９及び合流点３を通過するよう導かれ、バルブＶ７の下方の被廃液入れに流れる。

[0050] 以上のように、本発明の定量装置１によれば、流れ分析法による分析を可能としたので、流れ系において、競合的な抗原抗体反応やポリアニリン生成を行うことが可能となり、分析において迅速性・簡便性・省試料（試薬）化を実現できる。また、吸光度測定部２３において、投光用導光路３３及び受光用導光路３５を遮光部材３９で包囲した構造としたので、ノイズ光の抑制を容易に実施することができ、従来のようにノイズ光対策のための大がかりな構造を必要としない。結果的に本発明の定量装置１は、小型化・携帯化が可能となり、かつ、屋外の測定環境に比較的安定で、迅速な測定を実現することができる。

[0051] 図３に、（ａ）１ｍＭのアニリン溶液の吸収スペクトルと、（ｂ）バッチ系で０．１から１００ｐｐｍのＨＲＰと、１ｍＭのH_2O_2と、１０ｍＭのアニリンを反応させ場合の吸光度スペクトルを示す。（ａ）では紫外部に吸収ピークがあるのに対し、重合反応後の（ｂ）では可視光領域にブロードな吸収がみられる。また、（ｂ）では、ＨＲＰ濃度の増加に伴い、吸光度が大きくなっている。このように、モノマーとポリマーの吸収スペクトルが大きく

異なるため、重合反応後の吸光度からポリマーの濃度及び目的成分の濃度を精度よく算出することができる。

[0052] 図４は、バッチ系でＨＲＰとH_2O_2とアニリンを反応させた場合の４１０ｎｍ吸光度の時間変化を示す図である。吸光度は数十秒でほぼ一定に達している。つまり、アニリンの重合反応では、比較的短時間で安定したデータを得られるといえる。

[0053] なお、定量する対象成分は、土壌に含まれる内分泌攪乱物質に限るものではなく、河川、海洋などの環境に存在するものであってもよい。

[0054] また、上記実施例においては、抗体用容器から反応セルに抗体溶液を流し、反応セル内の基板に抗体を吸着させたが、予め抗体を吸着させた基板を反応セル内に設置してもよい。

[0055] また、実施例の定量装置ではランニングバッファ用容器は１つであるが、反応セル内のｐＨを酵素反応と抗原抗体反応のそれぞれの最適ｐＨに調整するために、複数のランニングバッファ用容器を備えてもよい。

[0056] なお、測定波長は、ポリアニリンの吸光度を適切に測定できる波長であればよく、４００ｎｍ－４３０ｎｍであれば好ましく、４０５ｎｍ－４１０ｎｍであればさらに好ましい。

[0057] また、上記実施例では、ＥＬＩＳＡの競合法を用いた例を示したが、直説法、間接法、又は、サンドイッチ法を用いてもよい。例えば、ＥＬＩＳＡのサンドイッチ法では、抗体を基板に吸着させた後に、抗原を加えて１回目の抗原抗体反応をさせ、さらにそこに標識抗体を加えて２回目の抗原抗体反応をさせる。一方、競合法では、実施例に示す通り、抗原抗体反応は１回のみである。そのため、ＥＬＩＳＡの競合法を用いることにより、少ない工程で定量できるため、測定者の作業負担が軽減され、また、定量にかかる時間が短縮され、オンサイト分析に適した定量方法を提供することが可能になる。

符号の説明

[0058] １・・・定量装置、３・・・抗原用容器、５・・・標識抗原用容器、７・・・抗体用容器、９・・・ブロッキング剤用容器、１１・・・H_2O_2用容器、

１３・・・アニリン用容器、１５・・・ランニングバッファ用容器、１７・・・反応セル、１９・・・導入流路、Ｐ１－Ｐ７・・・ポンプ、Ｖ１－Ｖ７・・・三方バルブ、２１・・・光学測定用流路、２３・・・吸光度測定部、２５・・・廃液入れ、２７・・・第１混合コイル部、２９・・・第２混合コイル部、３１・・・光源、３３・・・投光用導光路、３５・・・受光用導光路、３７・・・受光センサ、３９・・・遮光部材

請求の範囲

[請求項1] 抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量方法であって、

酵素で標識されている酵素標識抗原又は酵素標識抗体を、前記酵素標識抗原に対応する抗体又は前記酵素標識抗体に対応する抗原が入っている反応部に加え、抗原抗体反応をさせる抗原抗体反応工程と、

前記酵素により重合反応が促進されるモノマーを前記反応部に加え、前記モノマーからポリマーを生成する重合反応をさせる重合反応工程と、

前記重合反応工程で生成された前記ポリマーの吸光度を測定する吸光度測定工程と、

前記吸光度測定工程で得られた吸光度から、前記対象成分を定量する定量工程とを含む、定量方法。

[請求項2] 前記モノマーがアニリンであり、前記ポリマーがポリアニリンである、請求項１記載の定量方法。

[請求項3] 前記抗原抗体反応工程において、前記抗体が入っている前記反応部に、前記酵素標識抗原とともに、酵素で標識していない前記試料溶液を加える、請求項１又は２記載の定量方法。

[請求項4] 抗原抗体反応を利用して試料溶液に含まれる対象成分を定量する定量装置であって、

前記抗原抗体反応の反応場とする反応部と、

前記試料溶液を保持するための第１容器と、

酵素で標識されていて、かつ、前記抗原抗体反応の抗原又は抗体である酵素標識物を含む酵素標識物溶液を保持するための第２容器と、

前記酵素により促進される重合反応の基質溶液を保持するための第３容器と、

前記第１容器内の前記試料溶液を前記反応部に導く第１流路と、

前記第２容器内の前記酵素標識物溶液を前記反応部に導く第２流路

と、

前記第３容器内の前記基質溶液を前記反応部に導く第３流路と、

前記反応部内の溶液を外部に導く第４流路と、

前記重合反応により生成される重合体が吸収する波長を含む光を発する光源部と、

光を検出する光検出部と、

前記光源部が発する光を前記第４流路の一部である測定部に導光する第１導光路と、

前記測定部からの光を前記光検出部に導光する第２導光路と、

前記第１導光路及び前記第２導光路の周囲を包囲する、光を吸収する吸光部とを備える、定量装置。

[請求項5] 前記吸光部が、光を吸収する顔料を含有する顔料含有シリコーン部材からなる、請求項４記載の定量装置。

[請求項6] 前記第１導光路、前記第２導光路、及び、前記吸光部は、屈折率が同一のシリコーン樹脂を素材とする、請求項４又は５記載の定量装置。

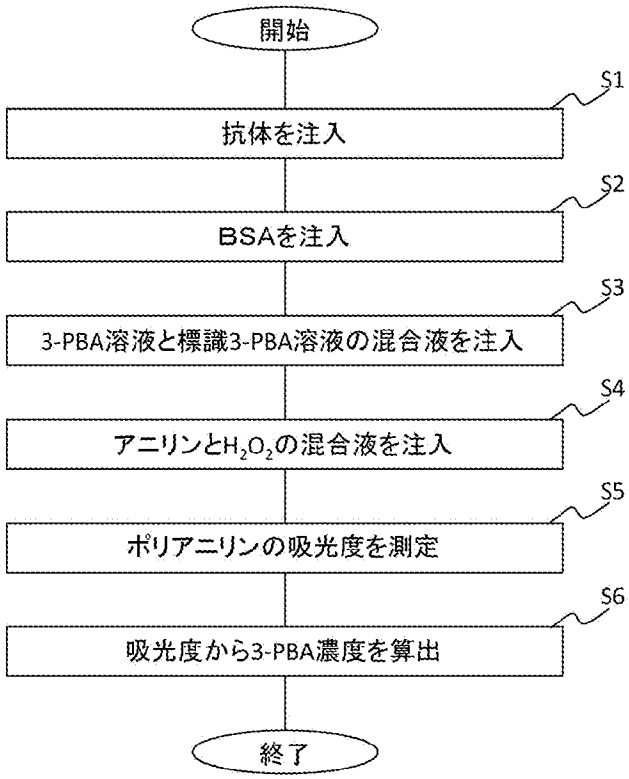
[請求項7] 前記第１流路と、前記第２流路とは、前記反応部よりも上流で合流している、請求項４から６のいずれかに記載の定量装置。

[請求項8] 前記抗原抗体反応に用いる抗体溶液を保持するための第４容器と、

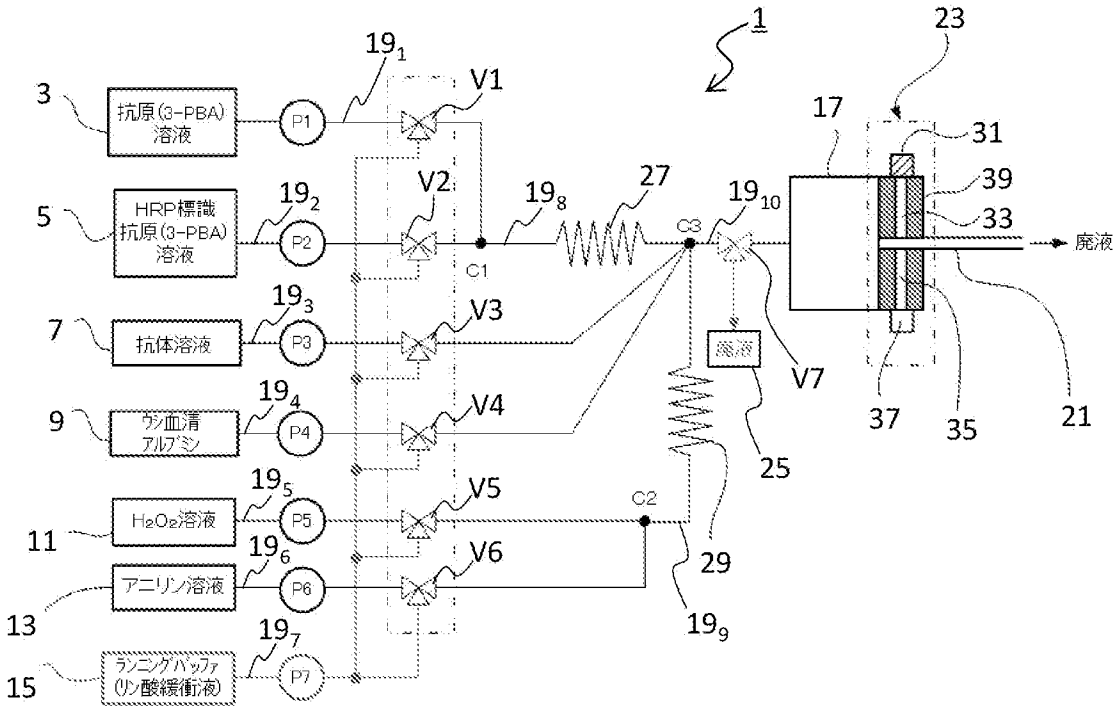
前記第４容器内の前記抗体溶液を前記反応部に導く第４流路とを備え、

前記酵素標識物は、酵素標識された抗原である酵素標識抗原である、請求項４から７のいずれかに記載の定量装置。

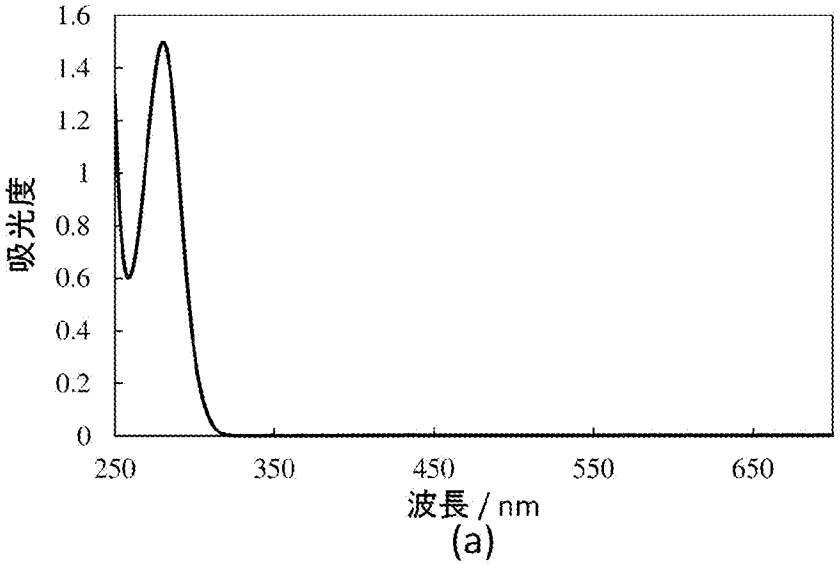
[図1]


開始
S1
抗体を注入
S2
BSAを注入
S3
3-PBA溶液と標識3-PBA溶液の混合液を注入
S4
アニリンとH2O2の混合液を注入
S5
ポリアニリンの吸光度を測定
S6
吸光度から3-PBA濃度を算出
終了

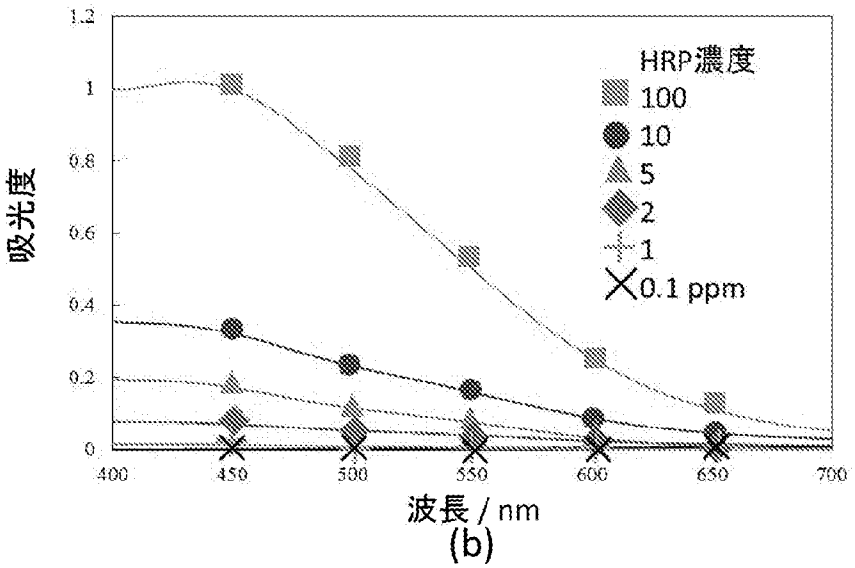
[図2]


1
23
19₁
V1
3
抗原(3-PBA)溶液
P1
17
31
V2
19₂
19₈
27
19₁₀
39
5
HRP標識抗原(3-PBA)溶液
P2
C1
C3
33
廃液
19₃
V3
7
抗体溶液
P3
V7
19₄
V4
9
ウシ血清アルブミン
P4
37
35
21
25
19₅
V5
C2
H2O2溶液
P5
11
19₆
V6
29
アニリン溶液
P6
13
19₇
19₉
15
ランニングバッファ(リン酸緩衝液)
P7

[図3]

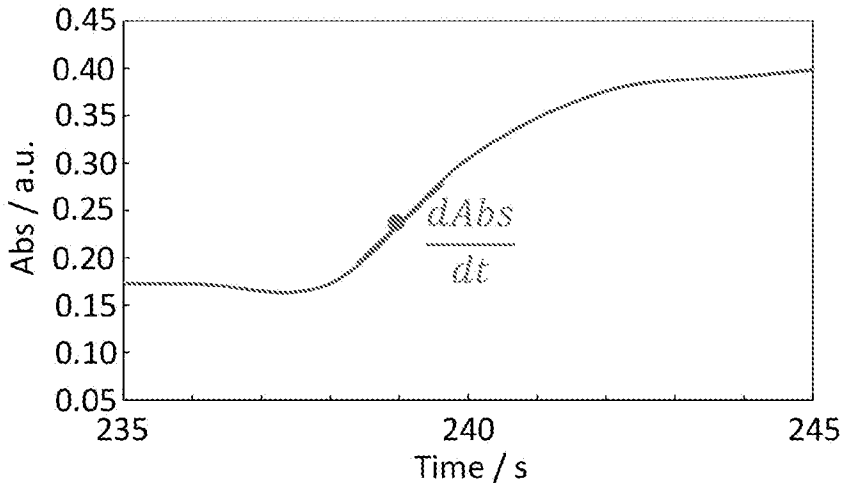

1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
吸光度
250
350
450
550
650
波長 / nm

(a)


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
吸光度
400
450
500
550
600
650
700
波長 / nm
HRP濃度
100
10
5
2
1
0.1 ppm

(b)

[図4]


0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
Abs / a.u.
235
240
245
Time / s
dAbs/dt

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/031837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. G01N33/543(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. G01N33/543, 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

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	清水慎一他，ジフェニルエーテル系除草剤の代謝物の定量分析を目的としたポリアニリン生成に基づくフロー吸光 ELISA 法の開発，日本分析化学会第67年会講演要旨集，日本分析化学会，29 August 2018, pp. 193, J1005, non-official translation (SHIMIZU, Shinichi et al., "Development of flow absorption ELISA method based on polyaniline formation for the purpose of quantitative analysis of metabolites of diphenyl ether herbicides", Lecture abstracts of the 67th annual meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry, The Japan Society for Analytical Chemistry)	1-3 4-8
Y	JP 2004-069395 A (NEC CORP.) 04 March 2004, paragraphs [0032]-[0072], fig. 1 & US 2005/0175273 A1, paragraphs [0081]-[0110], fig. 3-4, 17-21 & WO 2004/013616 A1 & CN 1675536 A	4-8

☒ 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	Date of mailing of the international search report
08 November 2019 (08.11.2019)	19 November 2019 (19.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/031837

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/060269 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 30 April 2015, entire text, all drawings & US 2016/0305889 A1, entire text, all drawings & JP 6516679 B2	1-8
A	JP 2010-111751 A (ASAHI KASEI FIBERS CORP.) 20 May 2010, entire text, all drawings (Family: none)	1-8
A	JP 2004-500456 A (DONALDSON COMPANY, INC.) 08 January 2004, entire text, all drawings & WO 2001/049773 A1, entire text, all drawings & EP 1268608 A1	1-8
A	JP 2002-522748 A (TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION LTD.) 23 July 2002, entire text, all drawings & US 2003/0203394 A1, entire text, all drawings & WO 1999/057550 A1 & EP 1075656 A1	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３１８３７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/543(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/543, 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	清水慎一 他，ジフェニルエーテル系除草剤の代謝物の定量分析を目的としたポリアニリン生成に基づくフロー吸光 ELISA 法の開発，日本分析化学会第 67 年会講演要旨集，日本分析化学会，2018.08.29，pp.193，J1005	1-3 4-8
Y	JP 2004-069395 A（日本電気株式会社）2004.03.04，[0032]-[0072]，図 1 & US 2005/0175273 A1，[0081]-[0110]，FIG.3-4,17-21 & WO 2004/013616 A1 & CN 1675536 A	4-8

☑　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の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	国際調査報告の発送日
０８．１１．２０１９	１９．１１．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　２Ｊ　５７０４
西浦　昌哉
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

C（続き）．　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
A	WO 2015/060269 A1 (国立大学法人大阪大学) 2015.04.30, 全文, 全図 & US 2016/0305889 A1, 全文, 全図 & JP 6516679 B2	1-8
A	JP 2010-111751 A (旭化成せんい株式会社) 2010.05.20, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2004-500456 A (ドナルドソン　カンパニー, インコーポレイティド) 2004.01.08, 全文, 全図 & WO 2001/049773 A1, 全文, 全図 & EP 1268608 A1	1-8
A	JP 2002-522748 A (テクニオン　リサーチ　アンド　ディベロップメント　ファウンデーション　リミテッド) 2002.07.23, 全文, 全図 & US 2003/0203394 A1, 全文, 全図 & WO 1999/057550 A1 & EP 1075656 A1	1-8