

(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
2010年7月1日(01.07.2010)



(10) 国際公開番号
WO 2010/074083 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/071331
- (22) 国際出願日: 2009年12月22日(22.12.2009)
- (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 2008-328109 2008年12月24日(24.12.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): コニカミノルタホールディングス株式会社(KONICA MINOLTA HOLDINGS, INC.) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 日影 直樹(HIKAGE, Naoki) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内 Tokyo (JP). 彼谷 高

敏(KAYA, Takatoshi) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内 Tokyo (JP). 二宮英隆(NINOMIYA, Hidetaka) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内 Tokyo (JP).

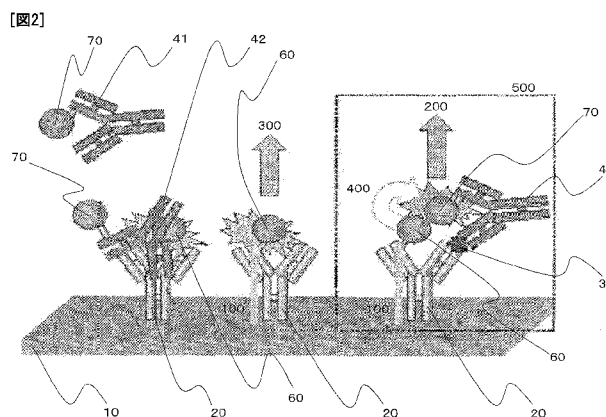
(74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 Tokyo (JP).

(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, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: IMMUNOASSAY UTILIZING SURFACE PLASMON AND FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER

(54) 発明の名称: 表面プラズモンおよび蛍光共鳴エネルギー転移を利用した免疫アッセイ



(57) Abstract: Disclosed is an immunoassay utilizing fluorescence resonance energy transfer (FRET) and surface plasmon-field enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS). Specifically disclosed is an immunoassay method for measuring the amount of an antigen in a sample using a primary antibody having, conjugated thereto, a fluorescent dye that acts as a donor molecule and a secondary antibody having, conjugated thereto, a fluorescent dye that acts as an acceptor molecule. The immunoassay comprises at least the following steps (a) and (b): (a) allowing an antigen-antibody reaction between the antigen contained in the sample and both the primary and secondary antibodies to occur and immobilizing an immunological complex comprising the antibodies and the antigen sandwiched between the antibodies on a metal thin film support; and (b) irradiating the immunological complex produced in the preceding step with a laser beam by means of SPFS and measuring the quantity of fluorescence emitted from the acceptor molecule as a result of FRET from the excited donor molecule fluorescent dye in the primary antibody. Also disclosed are a system and an assay kit for the immunoassay.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/074083 A1



(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

〔課題〕 FRET および SPFS を利用した免疫アッセイの提供。〔解決手段〕 本発明は、ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体およびアクセプター分子となる蛍光色素を結合した二次抗体を用いて検体中の抗原量を測定する免疫アッセイ方法であって、少なくとも、工程 (a) : 検体中に含まれる抗原と上記の一次抗体および二次抗体の両抗体との間で抗原抗体反応を生じさせ、両抗体により該抗原がサンドイッチされた免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させる工程、工程 (b) : 形成された前記免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法 (SPFS) によりレーザ光を照射し、該一次抗体の励起されたドナー分子蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定する工程、を含む。さらに本免疫アッセイ用のシステムおよびアッセイキットも含まれる。

明 細 書

発明の名称：

表面プラズモンおよび蛍光共鳴エネルギー転移を利用した免疫アッセイ 技術分野

[0001] 本発明は、表面プラズモンおよび蛍光共鳴エネルギー転移を利用した免疫アッセイ法、そのアッセイ用のシステムおよびキットに関する。さらに詳しくは、本発明は、表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS；Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy）の原理に基づく表面プラズモンを利用し、蛍光検出にFRET技術を適用した免疫アッセイ法などに関する。

背景技術

[0002] 表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS）とは、照射したレーザ光が金属薄膜表面で全反射減衰（ATR）する条件において、金属薄膜表面に粗密波（表面プラズモン）を発生させることによって、照射したレーザ光が有するフォトン量を数十倍～数百倍に増やし（表面プラズモンの電場増強効果）、これにより金属薄膜近傍の蛍光色素を効率良く励起させて、極微量および／または極低濃度のアナライトを検出することができる方法である。

[0003] このようなSPFSの原理に基づいたバイオセンサまたはバイオチップに関する例として、特許文献1には、金属基板表面にカルボキシメチルデキストランを用いた一次抗体固定化膜を配し、表面プラズモンにより増強された電場で、抗原に関係付けられた蛍光色素を検出する方法が開示されている。しかしながら、極微量のアナライト（例えば標的抗原）の検出においては、アッセイで抗原に関係付けられる複合体中の蛍光色素量も極微量であり、このことが蛍光発生量のボトルネックとなるため、プラズモン電場増強を用いても蛍光シグナル量が増強されず、アッセイ感度の向上は難しい。

[0004] 特許文献2では、センサ基板上でアポ酵素、ホロ酵素による反応と免疫反応とを複雑に組み合わせ、シグナルの増幅および非特異反応の低減を検討し

ている。このような測定系を成立させるために極めて精密な分子配向技術が前提となっており、免疫反応よりもアポ／ホロ酵素反応が優先的または支配的な場合には、測定系そのものが成立しない危険性が高い。

- [0005] 他方、近接して相互作用する分子を蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）現象を利用して高感度で検出するための手法が知られ、蛍光プローブとして特異的な結合ペアを形成する2つの分子を用いるFRET技術が確立されている（特許文献3、4、蛍光共鳴エネルギー転移の詳細については、非特許文献1を参照されたい）。FRETでは、励起されたフルオロフォア（ドナー）からのエネルギーが、分子間の双極子-双極子カップリングを介してもう一つのフルオロフォア（アクセプター）へと移される。これは、ドナーとアクセプターの間の距離が短く（10～100Å）、ドナーのスペクトルとアクセプターの吸収スペクトルが部分的に重複する蛍光である場合にのみ可能となる。次いで、エネルギー転移は、蛍光の変化として検出される。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特許第3294605号公報
特許文献2：特開2008-139245号公報
特許文献3：特表2006-505775号公報
特許文献4：特表2006-506634号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Szollosi, J., Damjanovich, S., Matyus, L. (1998) Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research. Communications in Clinical Cytometry, 34 : 159-179.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明者らは、従来のサンドイッチイムノアッセイ法（図1）が抱える問

題、すなわち、極微量のアナライト（例えば抗原）を検出する場合、通常のサンドイッチイムノアッセイ法を行っても免疫複合体自体も必然的に極微量となるため、しばしばその検出能力に見合う蛍光プローブ量が存在せず、よって感度的に満足するものとはならないという問題を解決すべく鋭意研究した。その結果、従来のサンドイッチイムノアッセイ法（図1）における検出方法に代えて、抗原抗体反応により形成された免疫複合体を表面プラズモン励起増強蛍光分析法（SPFS）で検出する方式を採用するとともに、FRET技術に基づく発光増強を実現することにより実質的に免疫複合体のみが発光する機構で構成する本発明のアッセイ方法（図2）を完成した。

[0009] 本発明は、免疫アッセイに必要不可欠である特異性に優れ、かつ、好ましくは免疫反応場と検出場とを独立させて、表面プラズモンおよび蛍光共鳴エネルギー転移を組み合わせることにより、高感度・高精度であるアッセイ方法、そのアッセイ用のシステムおよびキット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

[0010] 極微量の標的抗原であってもその免疫複合体の蛍光のみを特異的に増強して測定できる高感度アッセイ方法である本発明は、次の構成を有する。すなわち、

ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体およびアクセプター分子となる蛍光色素を結合した二次抗体を用いて検体中の抗原量を測定する免疫アッセイ方法であって、少なくとも、

工程（a）：検体中に含まれる抗原と上記の一次抗体および二次抗体の両抗体との間で抗原抗体反応を生じさせ、両抗体により該抗原がサンドイッチされた免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させる工程、

工程（b）：形成された前記免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法によりレーザ光を照射し、該一次抗体の励起されたドナー分子蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定する工程、
を含むことを特徴としている。

- [0011] 前記工程（a）において、検体と該二次抗体とを接触させ、次いで抗原を結合した該二次抗体を、該一次抗体を固定化した金属薄膜基板に接触させることにより、前記免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させることが望ましい。あるいは、前記工程（a）において、該一次抗体を固定化した金属薄膜基板と検体とを接触させ、次に該基板に二次抗体を適用することにより、前記免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させてもよい。または前記工程（a）において、該一次抗体および該二次抗体と検体とを接触させて、形成された免疫複合体を金属薄膜基板に接触させることにより、前記免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させてもよい。
- [0012] 前記のドナー分子およびアクセプター分子はFRETペアであることが望ましい。好ましくはAlexa Fluor 647/Cy 5.5、HiLyte Fluor 647/Cy 5.5、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）/テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）、ローフィコエリトリン（R-PE）/アロフィコシアニン（APC）のペア群から選ばれるFRETペアである。
- [0013] また前記金属薄膜基板は、透明平面基板とその一方の表面に形成した金属薄膜とを少なくとも有するプラズモン励起センサの基板である。
- [0014] 前記工程（b）において、表面プラズモン励起蛍光法によるレーザ光の照射とは、プラズモン励起センサの金属薄膜を形成していないもう一方の透明基板表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射することである。
- [0015] 本発明の別の態様は上記アッセイのためのキットであり、少なくとも、プラズモン励起センサ、その金属薄膜基板の表面上に固定化される抗体であってドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体、アクセプター分子となる蛍光色素が結合した二次抗体を含み、上記の免疫アッセイ方法において、該一次抗体、検体中の抗原、該二次抗体の間でサンドイッチ形式の抗原抗体反応を生じさせることにより免疫複合体を形成させる工程を実施するために用いられるキットである。
- [0016] 前記金属薄膜が、金、銀、アルミニウム、銅および白金からなる群から選

ばれる少なくとも1種の金属から形成されることが望ましい。

[0017] さらに前記プラズモン励起センサが上記金属薄膜および透明平面基板から構成され、さらにスペーサ層を有して、該スペーサ層が、上記金属薄膜の、透明平面基板とは接していないもう一方の表面に形成されることが好ましい。

[0018] 上記スペーサ層は、SAM (Self Assembled Monolayer; 自己組織化単分子膜) であることが望ましい。

[0019] さらに本発明には、少なくとも、
プラズモン励起センサの金属薄膜基板上に固定化される、ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体、
アクセプター分子となる蛍光色素が結合した二次抗体、
プラズモン励起センサ、表面プラズモン励起蛍光法用の光源および蛍光検出器
を含み、該一次抗体および該二次抗体の両抗体と検体中に含まれる抗原との間でサンドイッチ形式の抗原抗体反応を生じさせ、プラズモン励起センサ金属薄膜基板上に固定化された免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法によりレーザ光を照射して励起された該一次抗体の蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定することにより該抗原量を測定することを特徴とする免疫アッセイシステムも含まれる。

発明の効果

[0020] 極微量のアナライトを検出する際、従来のサンドイッチ免疫アッセイ法では蛍光シグナル量が少なく相対的にバックグラウンドノイズが増えるために、S/N比が劣化していた。また検出システムにSPFSを導入しても、表面プラズモンの電場増強（電場増強フォトン量の例）と極微量アナライトの蛍光色素量（蛍光フォトン量の例）のミスマッチが起こり、感度の限界が生じる可能性があった。

[0021] これに対して本発明の免疫アッセイ法では、プラズモン励起センサによる

検出（SPFS）においてFRET技術に基づく発光増強を実現することによって実質的に免疫複合体のみが発光する機構を設けている。さらに免疫反応場と検出場とを独立させることが望ましい。これによって励起波長と蛍光波長との差が拡大して免疫複合体から発光する蛍光シグナルが多くなり、他方、免疫反応に関与していない二次抗体などの蛍光は検出されないためにバックグラウンドノイズが減少して、高S/N比のアッセイが可能となる。具体的には本発明のアッセイにおいて、1リットル当たり 10^{-18} モル（1amol/L）～ 10^{-12} モル（1pmol/L）レベルの濃度のアナライト（例えば、標的抗原）を含む検体から、高感度かつ高精度でそのアナライトを検出できる。

[0022] FRETペアは互いに10nm以上離れると、FRETは消失して二次抗体上のアクセプターの発光は著しく減衰する。したがってドナー／アクセプターのペアが適切な距離にある場合に発現するFRETを介して、免疫複合体に由来する蛍光のみを実質的に検出することとなり、洗浄操作（B/F分離）は不要となる。

[0023] 本発明のアッセイは、免疫反応場と蛍光検出場との完全分離が可能であることから免疫反応条件および検出条件の最適化が別々にできて、散乱ノイズ、バックグラウンドノイズの影響を受けにくい。さらに、3つの感度増幅機構、すなわち免疫反応の最適化、化学的増幅および物理的増幅を有するため、極めて高感度・高精度のSPFS/FRET免疫アッセイ法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]図1は、従来のサンドイッチイムノアッセイを模式的に示した図である。蛍光色素（50）は二次抗体（40, 41, 42）のみに標識されている。この場合、励起（100）によって非特異的に結合した二次抗体（42）、遊離の二次抗体（41）の蛍光色素（50）も発光してしまうため、ノイズ（300）が増大する。このため洗浄操作が必要となる。

[図2]図2は、本発明のSPFS/FRET利用のサンドイッチイムノアッセ

イを模式的に示した図である。一次抗体(20)および二次抗体(40, 41, 42)はそれぞれ、ドナー分子となる蛍光色素(60)およびアクセプター分子となる蛍光色素(70)で標識されている。検出対象である免疫複合体(500)が形成されたときのみ、一次抗体(20)の励起(100)された蛍光色素(60)から、適切な距離で配向している二次抗体(40)の蛍光色素(70)にエネルギーが転移して蛍光を発する(FRET(400))。この蛍光を測定することにより免疫複合体(500)のみの検出(200)が可能となる。一方、遊離の二次抗体(41)および非特異結合の二次抗体(42)からは発光しない。また、ノイズ(300)となる、一次抗体(20)の蛍光色素(60)から発光された蛍光は、この場合フィルタにより分離することができる。

発明を実施するための形態

- [0025] 本明細書で、「アナライト」とはアッセイ対象とする物質、すなわち被検物質であり、主に「抗原」とされる比較的大きな分子を指すが、他方、薬物、代謝物質、各種環境ハザード物質などの低分子量の化合物(ハプテン)も標的になり得る。また「蛍光色素」とは、本発明において、所定の励起光を照射する、または電場効果を利用して励起することによって蛍光を発光する物質の総称であり、該「蛍光」は、燐光など各種の発光も含む。
- [0026] 表面プラズモン励起増強蛍光分光法または表面プラズモン励起蛍光法(Surface Plasmon - field enhanced Fluorescence Spectroscopy)をSPFSと、また蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence resonance energy transfer)をFRETと言及することもある。
- [0027] <免疫アッセイ法>
- 本発明の免疫アッセイ方法は、
- ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体およびアクセプター分子となる蛍光色素を結合した二次抗体を用いて検体中の抗原量を測定する免疫アッセイ方法であって、少なくとも、
- 工程(a): 検体中に含まれる抗原と上記の一次抗体および二次抗体の両抗体との間で抗原抗体反応を生じさせ、両抗体により該抗原がサンドイッチ

された免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させる工程、

工程（b）：形成された前記免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法によりレーザ光を照射し、該一次抗体の励起されたドナー分子蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定する工程、
を含むことを特徴としている。

[0028] 検体中の抗原、一次抗体および二次抗体との間で抗原抗体反応が生起すると、両抗体によって該抗原がサンドイッチされている特異的な免疫複合体が形成される。本アッセイの後半段階は、このように形成された免疫複合体を高感度で検出することである。すなわち、該免疫複合体が極微量であってもそのみを特異的に検出することを目的としてSPFSによりドナー分子の蛍光色素を励起させる。該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザ光を該免疫複合体に照射し、励起されたドナー分子の蛍光色素とアクセプター分子との間にFRET現象を発現させる。このFRETにより励起された二次抗体のアクセプター分子の蛍光をプラズモン励起センサにより検出し、発光された蛍光量を求める。

[0029] 抗原抗体反応

本発明の免疫アッセイ方法は、上記のとおり形成された免疫複合体をSPFS/FRETにより高感度で検出する方式をとるが、FRET発現のためにドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体およびアクセプター分子となる蛍光色素を結合した二次抗体を用いる。

[0030] 本発明のアッセイに使用される一次抗体は、検体中に含有されるアナライト（例えば標的とする抗原）を認識して結合し得る抗体である。同時にその一次抗体は、上記FRETドナー分子となる蛍光色素を結合している。さらに該一次抗体はプラズモン励起センサを構成する金属薄膜基板の表面、好ましくはスペーサ層、例えばSAM（Self Assembled Monolayer；自己組織化単分子膜）に固定化されているか、あるいは蛍光検出時に基板に固定化される（図2）。

[0031] 本発明において二次抗体は、一次抗体と同じ標的抗原に対する特異的な抗体であり、上記 FRET アクセプター分子となる蛍光色素を結合している。二次抗体は同じ標的抗原のエピトープ（ただし、上記一次抗体とは異なるエピトープ）を認識して結合する。このように同一抗原の異なる部位に一次抗体と二次抗体がそれぞれ特異的に結合してサンドイッチ型免疫複合体を形成させ、このものをプラズモン励起センサを構成する金属薄膜基板の表面に固定化することが、本免疫アッセイの前半の工程である。二次抗体が、標的抗原ではなく一次抗体に非特異的に結合することもあるが、この場合 FRET が発現しないようにする必要がある。

[0032] 本発明において、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、遺伝子組換えにより得られる抗体、および抗体断片を包含する。例えば抗 α フェトプロテイン (AFP) モノクローナル抗体（（株）日本医学臨床検査研究所などから入手可能）、抗ガン胎児性抗原 (CEA) モノクローナル抗体、抗 CA 19-9 モノクローナル抗体、抗 PSA モノクローナル抗体などが挙げられる。

[0033] 二次抗体は、プラズモン励起センサに固定化される一次抗体がポリクローナル抗体である場合、二次抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。該一次抗体がモノクローナル抗体である場合、二次抗体は、該一次抗体が認識しないエピトープを認識するモノクローナル抗体であるか、またはポリクローナル抗体であることが望ましい。例えば、プラズモン励起センサに固定化される一次抗体が、AFP モノクローナル抗体である場合、それと結合する二次抗体としては、検体中に含有される AFP に競合する抗原を認識し結合することができるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を必要とする。

[0034] 好適な例として、各 1 対の H 鎖及び L 鎖からなる免疫グロブリン（抗体）、その Fab（抗原結合性フラグメント）、またはこれらに準ずる、有効なエピトープ親和性を示すタンパク質フラグメントを挙げることができる。

[0035] なお、アナライトが抗原の異なるエピトープとして認識されることが困難

な低分子量の物質（ハプテンなど）である場合、抗体に代わってその断片である Fab、scFvなどを結合パートナーとして用いることが望ましい。そのような非競合的免疫アッセイ法の詳細は、特許文献4に開示されている。

[0036] 「検体」は、生体試料、環境試料などを本アッセイに必要とされる前処理したものをいう。試料としては、例えば、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液、唾液、便、体腔液（髄液、腹水、胸水等）などが挙げられ、所望する溶媒、緩衝液などによって適宜希釈して用いてもよい。これらの試料のうち、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液および唾液が好ましい。これらは1種単独でも、2種併用してもよい。

[0037] 上記検体中に含有される抗原は、二次抗体および上記基板表面に固定化された（または固定化される）一次抗体により特異的に認識され（または、認識し）結合し得る分子または分子断片である。このような「分子」または「分子断片」としては、例えば、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）など、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）、タンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む。）、糖質（オリゴ糖、多糖類、糖鎖など）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などが挙げられ、具体的には、AFP（ α フェトプロテイン）といったがん胎児性抗原や腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモンなどであってもよく、特に限定されない。

[0038] 本発明の免疫アッセイ方法における抗原抗体反応は、まず上記検体と抗体とを接触させて抗原抗体反応を生起せしめる。この場合、反応物をインキュベートする場合の条件として、温度は、通常4～50℃、好ましくは10～40℃、時間としては、通常0.5～180分間、好ましくは5～60分間である。なお検体が多数の場合、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールも同時に実施する場合には、マルチウエルプレート上で行うのが好都合である。

[0039] ・免疫複合体の形成

形成された免疫複合体をプラズモン励起センサ金属薄膜基板上に固定化させる工程（a）において、抗原抗体反応を生起せしめるためには次に述べる3通りの態様がある。まず、予め免疫複合体を生成させておく2つの態様として、

前記工程（a）において、検体と該二次抗体とを接触させ、次いで抗原を結合した該二次抗体を、該一次抗体を固定化した（プラズモン励起センサの）金属薄膜基板に接触させることにより、前記免疫複合体を（プラズモン励起センサの）金属薄膜基板上に固定化させる方式と、

前記工程（a）において、該一次抗体および該二次抗体と検体とを接触させて、形成された免疫複合体を（プラズモン励起センサの）金属薄膜基板に接触させることにより、前記免疫複合体を（プラズモン励起センサの）金属薄膜基板上に固定化させる方式である。この二番目の方式では形成された免疫複合体は、該一次抗体と（プラズモン励起センサの）金属薄膜基板上またはスペーサ層上にある結合パートナーとの間に起こる何らかの相互作用によって固定化される。その相互作用とは、例えば金-S結合、ビオチン（ストレプト）アビジン、該一次抗体に対する抗体であってもよい。

[0040] 上記の「接触」とは、プラズモン励起センサの一次抗体が固定化されている面が適用もしくは送液された液体（反応液）中に浸漬されている状態であり、具体的には、この該液体中に含まれる免疫複合体をこのプラズモン励起センサの金属薄膜基板またはスペーサ層と接触させることをいう。その具体的な方法は、下記「プラズモン励起センサ」の項で詳しく述べる。工程（b）では、上記反応液とプラズモン励起センサとの「接触」は、例えば流路中に循環する送液に形成された免疫複合体が含まれ、プラズモン励起センサの一次抗体が固定化されている片面のみが該送液中に浸漬されている状態において、プラズモン励起センサと工程（a）の反応液とを接触させる態様が好ましい。これはプラズモン励起センサを流路に固定させてその一次抗体が固定化されている面が流路の一部となるように構成することにより容易に実現

される。

[0041] 一番目の方式は、上記一次抗体を安定的に基板表面に固定化する必要がある場合に採用されるべきである。二番目の方式は、二次抗体と免疫複合体を形成している一次抗体を基板表面が容易に結合させ得る性状にあるか、後記のスペーサを設置してそのような状態にある場合には採用できる。一次抗体、二次抗体および抗原が、溶液中でそれぞれ遊離状態にあつて抗原抗体反応を起こすため、立体障害などの妨害はないという特徴がある。

[0042] またこれら両方式では、免疫反応場と形成された免疫複合体の検出場がそれぞれ独立しているという特徴がある。したがってB/F（結合／遊離）分離を目的とする洗浄操作が不要になる利点がある。それは蛍光のバックグラウンドノイズの減少に大いに貢献する。

[0043] 残るもう一つの方式は、従来のサンドイッチイムノアッセイの方式に類似しており、この場合、上記の一次抗体は固相抗体であつて、

該一次抗体を固定化した金属薄膜基板と検体とを接触させ、次に該基板に二次抗体を適用することにより、前記免疫複合体をプラズモン励起センサの金属薄膜基板上に固定化させる方式である。上記アクセプター分子の蛍光色素を結合させた二次抗体は、検体を接触させた上記プラズモン励起センサ金属薄膜基板に適用される。「該一次抗体を固定化した金属薄膜基板と検体とを接触させ、次に該基板に二次抗体を適用する」場合の「接触」は、上記した通りであり、「適用」とは、該基板に二次抗体を含む液を送液などによって接触させることである。

[0044] 検体液を上記基板（またはスペーサ層）に適用し、該基板を洗浄用緩衝液で洗浄してから、二次抗体溶液を、所定量、一次抗体が固定化されている該基板表面に添加して、一定時間、インキュベートすることが望ましい。検体中に含まれる抗原を結合した一次抗体と二次抗体の両抗体との間で抗原抗体反応が生じる。洗浄操作は、一次抗体を有する基板表面に検体を適用した後に該表面を洗浄する操作である。したがってその洗浄操作は、二次抗体の適用前および／または後に含まれることが好ましい。使用される洗浄液として

は、T w e e n 2 0、T r i t o n X 1 0 0などの界面活性剤を、同じ溶媒または緩衝液に溶解させ、好ましくは0. 0 0 0 0 1～1重量%含有するものが望ましい。

[0045] この態様は、上記一次抗体を安定的に基板表面に固定化する必要があり、さらに先に一次抗体と抗原とを結合させる方が好ましい場合に採用されるべきである。

[0046] 一次抗体がその表面に固定化された基板と検体とを接触させる条件として、温度は、通常4～50℃、好ましくは10～40℃、時間としては、通常0. 5～180分間、好ましくは5～60分間である。

[0047] 形成された免疫複合体をプラズモン励起センサ金属薄膜基板上に固定化させる工程（a）において、その免疫複合体は、該金属薄膜基板の金属薄膜表面上に固定化される。後記のようにスペーサ層が設置されている場合には、そのスペーサ層表面に固定化されてもよい。上記プラズモン励起センサは金属薄膜および透明平面基板から構成されているが、さらにスペーサ層を、上記金属薄膜の、透明平面基板とは接していないもう一方の表面に形成されることもある。

[0048] 所望の蛍光色素を一次抗体または二次抗体に結合させること、ならびに該一次抗体を基板上に固定化するためには種々の従来技術を利用すればよい。基板表面への一次抗体の固定化方法としては、基板表面にある末端官能基に応じた最適な架橋方法を選択することができる。また、基板表面の性状によっては、その表面に直接物理的に吸着させる方法も有効な手段として挙げられる。

[0049] 抗体への蛍光色素の標識は、従来から使用されているタンパク質の蛍光標識方法（例えば特開平6－109732号公報を参照のこと）を用いるが、蛍光色素分子と適当な架橋剤、例えば、シランカップリング剤などを反応させ、さらにこれを活性化させた抗体分子に結合させればよい。架橋剤の例としては、N－サクシンイミジル 3－（2－ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）やその誘導体、m－マレイミドベンゾイル－N－ヒドロキシス

ルホサクシンイミドエステルやその誘導体などが挙げられる。

[0050] 具体的には蛍光色素が有するカルボキシル基を、水溶性カルボジイミド（WSC）（例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）など）とN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）とにより活性エステル化し、次いで活性エステル化したカルボキシル基と抗体タンパク質が有するアミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて脱水反応させ固定化させる方法；イソチオシアネートおよびアミノ基をそれぞれ有する抗体タンパク質および蛍光色素を反応させ固定化する方法；スルホニルハライドおよびアミノ基をそれぞれ有する抗体および蛍光色素を反応させ固定化する方法；ヨードアセトアミドおよびチオール基をそれぞれ有する抗体および蛍光色素を反応させ固定化する方法などが挙げられる。

[0051] 例えば一次抗体および二次抗体として免疫グロブリンを用い、そのFc領域に対する結合能力を有する部位と標識の蛍光色素とを同時に有する上記の架橋物質を利用して、所望の蛍光色素を一次抗体または二次抗体に結合させればよい。

[0052] FRET

蛍光共鳴エネルギー転移（Fluorescence resonance energy transfer）現象とは、近接して相互作用する分子（ドナー及びアクセプター分子）を検出する系において、色素（「ドナー」と称される。）が光源により励起された後に、そのエネルギーを別の色素（「アクセプター」と呼ばれる。）に転移する。エネルギー転移は、ドナー色素の放出スペクトルは、アクセプターの励起スペクトルと著しく重複する。2つの色素の著しく近接した並列は、一般的には、100オングストローム（Å）よりも近く、好ましくは50オングストロームよりも近く、さらに好ましくは10オングストロームよりも近い（1オングストロームは0.1ナノメートルに等しい。）。ドナー／アクセプターペア間のエネルギー転移に不可欠である。FRETは、通常、ともに蛍光色素であるドナー色素およびアクセプター色素間の相互作用に基づく。

- [0053] FRETとして共鳴エネルギー転移を達成するためには、ドナー色素分子は光を吸収して、それを励起された電子の共鳴を通じて、第2の色素分子であるアクセプターに転移しなければならない。エネルギー転移を実行するために、ドナーの蛍光発光の波長は、アクセプターの励起波長よりも低くなければならず、すなわち、そのプロセスは、エネルギー的に「下り坂」でなければならない。
- [0054] ドナー分子、アクセプター分子として用いられる適切な蛍光色素の例は、フルオレセインラベルであり、たとえば、5-(および6)-カルボキシフルオレセイン(carboxyfluorescein)、5-または6-カルボキシフルオレセイン、6-(フルオレセイン)-5-(および6)-カルボキサミド(carboxamide)ヘキサン酸(hexanoic acid)およびフルオレセインイソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate)、Alexa Fluor色素、シアニン色素、たとえばCy2、Cy3、Cy5、Cy7、任意に置換されたクマリン(coumarin)、R-フィコエリトリン(R-phycoerythrin)、アロフィコエリトリン(allophycoerythrin)、テキサスレッド(Texas Red)およびプリンストンレッド(Princeton Red)、ならびにR-フィコエリトリンおよびたとえばCy5またはテキサスレッドの複合体である。さらにランタニド系錯体、例えばテルビウム、ユーロビウムなどのキレート蛍光物質であってもよい。
- [0055] 前記のドナー分子およびアクセプター分子はFRETペアであることが望ましい。本発明におけるFRETペアとしていずれのFRETペアを用いてもよい。好ましいFRETペア(ドナー分子/アクセプター分子)として、例えばAlexa Fluor 647/Cy5.5、HiLyte Fluor 647/Cy5.5、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)/テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、R-フィコエリトリン(R-PE)/アロフィコシアニン(APC)のペア群から選ばれる。R-PE/APCペアは、90%のFRET効率が、R-PEおよびAPCの寸法にもかかわらず達成され得るので、非常に期待できる。さらに、このFRETペアは、488および632 nmで放射する構造において2つの

一般的なレーザを利用して容易に検出され得る。しかし、本発明における FRET ペアはこれらの例に限定されるものではない。

[0056] Wallace 蛍光ランタニドキレートによる時間分解蛍光技術と FRET 技術とを組み合わせた LANCE アッセイが知られている。時間分解蛍光イムノアッセイ技術とを応用した LANCE TR-FRET では、ドナー標識（ユーロビウムキレート）とアクセプター標識（アロフィコシアニン、Allophycocyanin）とが相互に近接することに基づく。ユーロビウムキレートの励起されたエネルギーは非放射的な共鳴エネルギー転移によって、近距離にあるアクセプターにエネルギー転移をする。蛍光物質であるランタニドは長時間の励起状態にあるため、励起光によるアクセプターの直接励起により発生しうる短寿命の蛍光による非特異的バックグラウンドを回避することができる。

[0057] 下記「プラズモン励起センサ」が含む金属薄膜が、金を含む金属から形成されている場合、金の透過率や励起波長の観点から、1, 3-dichloro-9, 9-dimethyl-acridine-2-one-7-yl phosphate (DDAO phosphate) (Molecular Probes 社製) が好ましい。

[0058] ドナー分子の自家蛍光波長は、その自家蛍光波長と FRET に基づくアクセプター蛍光色素の蛍光波長との差が大きいほどバックグラウンドシグナルの影響を回避しやすく、結果的に高精度な測定が可能となるが、特に制限されるものではない。

[0059] 工程 (b) : SPFS/FRET

形成された前記免疫複合体は、それを構成する一次抗体の蛍光を SPFS により励起させ、次いで FRET により増強された二次抗体のアクセプター分子の蛍光発色を測定することにより定性的にまたは定量的にアッセイすることができる。

[0060] 上記透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成した金属薄膜とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該薄膜表面に、該工程 (a) を経て得られた蛍光色素を接触させることにより、一次抗体に結合させたドナー分子

蛍光色素を励起させる。かかる検出場は、好ましい態様では免疫反応場と完全に分離されている。これは上記抗原抗体反応において、1番目の方式と2番目の方式が該当するが、具体的には形成された免疫複合体を含む抗原抗体反応溶液をプラズモン励起センサ基板の薄膜表面またはスペーサ層表面に流すか、通過させる。したがって後記する流路系を適宜設けることにより、既知濃度の標準アナライト、コントロール、試料検体を含む多数の検体を迅速にアッセイすることも可能となる。またアッセイのハイスループット処理用態様として、 μ -TAS (Micro total Analysis System) 形態をとってもよい。

[0061] ・表面プラズモン励起蛍光法 (SPFS)

SPFSは、照射したレーザ光が金薄膜表面で全反射減衰 (ATR) する条件において、金属薄膜表面に粗密波 (表面プラズモン) を発生させることによって、照射したレーザ光が有するフォトン量を数十倍～数百倍に増やし (表面プラズモンの電場増強効果)、これにより金薄膜近傍の蛍光色素を効率良く励起させることによって、高感度の蛍光測定を可能とする。

[0062] 「プラズモン励起センサ」とは、透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成した金属薄膜とを有し、さらにスペーサ層を有することが好ましく、該スペーサ層が該金属薄膜の、該透明平面基板とは接していないもう一方の表面に形成されることが望ましい。

[0063] このようなプラズモン励起センサは、例えば、GEヘルスケア バイオサイエンス (株) 製の Biacore システムに用いられるセンサーチップなどのように基板と金薄膜とを有するもの、さらに該金薄膜にスペーサ層を形成したものも包含する。

[0064] 「透明平面基板」としては、ガラス製であっても、ポリカーボネート (PC)、シクロオレフィンポリマー (COP) などのプラスチック製であってもよく、屈折率 $[n_d]$ が好ましくは1.40～2.20であり、厚さが好ましくは0.01～10mm、より好ましくは0.5～5mmであれば、大きさ (縦×横) は特に限定されない。

- [0065] なお、ガラス製の透明平面基板は、市販品として、SCHOTT AG社製のBK7（屈折率〔 n_d 〕1.52）およびLaSFN9（屈折率〔 n_d 〕1.85）、（株）住田光学ガラス製のK-PSFn3（屈折率〔 n_d 〕1.84）、K-LaSFn17（屈折率〔 n_d 〕1.88）およびK-LaSFn22（屈折率〔 n_d 〕1.90）、（株）オハラ製のS-LAL10（屈折率〔 n_d 〕1.72）などが光学的特性と洗浄性との観点から好ましい。
- [0066] 透明平面基板は、その表面に金属薄膜を形成する前に、その表面を酸および／またはプラズマにより洗浄することが好ましい。
- [0067] 酸による洗浄処理としては、0.001～1Nの塩酸中に、1～3時間浸漬することが好ましい。
- [0068] プラズマによる洗浄処理としては、例えば、プラズマドライクリーナー（ヤマト科学（株）製のPDC200）中に、0.1～30分間浸漬させる方法が挙げられる。
- [0069] 「金属薄膜」は、上記「透明平面基板」の一方の表面に形成され、好ましくは、金、銀、アルミニウム、銅、および白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属からなり、より好ましくは金からなることが望ましく、これら金属の合金であってもよい。このような金属種は、酸化に対して安定であり、かつ表面プラズモンによる電場増強が大きくなることから好適である。また、表面金属薄膜としての金に親和性を有する基を一次抗体に結合させることが好ましい。例えばメルカプト基（-SH）、ジチオ基（-SS-）、スルホ基（-SO₃H）、チオカルボキシ基（-C（O）SH）、ジチオカルボキシ基（-CSSH）、アミノ基（-NH₂）またはヒドロキシル基（-OH）などが挙げられる。金に特に親和性が高い基は、メルカプト基、ジチオ基、スルホ基、チオカルボキシ基、ジチオカルボキシ基であり、特に好ましくはメルカプト基である。
- [0070] なお、上記「透明平面基板」としてガラス製平面基板を用いる場合に限り、ガラスと上記金属薄膜とをより強固に接着することができることから、あ

らかじめクロム、ニッケルクロム合金またはチタンの薄膜を形成することが好ましい。

[0071] 透明平面基板上に金属薄膜を形成する方法としては、例えば、スパッタリング法、蒸着法（抵抗加熱蒸着法、電子線蒸着法等）、電解メッキ、無電解メッキ法などが挙げられる。薄膜形成条件の調整が容易なことから、スパッタリング法または蒸着法によりクロムの薄膜および／または金属薄膜を形成することが好ましい。

[0072] 金属薄膜の厚さとしては、金：5～500nm、銀：5～500nm、アルミニウム：5～500nm、銅：5～500nm、白金：5～500nm、およびそれらの合金：5～500nmが好ましく、クロムの薄膜の厚さとしては、1～20nmが好ましい。

[0073] 電場増強効果の観点から、金：20～70nm、銀：20～70nm、アルミニウム：10～50nm、銅：20～70nm、白金：20～70nm、およびそれらの合金：10～70nmがより好ましく、クロムの薄膜の厚さとしては、1～3nmがより好ましい。

[0074] 金属薄膜の厚さが上記範囲内であると、表面プラズモンが発生し易いので好適である。また、このような厚さを有する金属薄膜であれば、大きさ（縦×横）は特に限定されない。

[0075] 「スペーサ層」は、上記「金属薄膜」による蛍光色素の金属消光を防止することを目的として、該金属薄膜の、上記「透明平面基板」と接していないもう一方の表面に形成したものであって、例えば、SAM（Self Assembled Monolayer；自己組織化単分子膜）、誘電体からなるものなどであってもよい。さらに、複合体を構成する一次抗体を介してプラズモン励起センサ表面に該免疫複合体を捕捉するために、スペーサ層にストレプトアビジンを結合するか、ストレプトアビジン化された部分を含めてもよい。上記一次抗体に結合させたビオチンとそのストレプトアビジンとが特異的に相互作用することにより、「捕捉による該一次抗体の固定化」が達成される。

- [0076] 「SAM」が含む単分子としては、通常、炭素原子数4～20程度のカルボキシルアルカンチオール（例えば、（株）同仁化学研究所、シグマ アルドリッチ ジャパン（株）などから入手可能）、特に好ましくは10-カルボキシー1-デカンチオールが用いられる。炭素原子数4～20のカルボキシルアルカンチオールは、それを用いて形成されたSAMの光学的な影響が少ない、すなわち透明性が高く、屈折率が低く、膜厚が薄いなどの性質を有していることから好適である。
- [0077] SAMの形成方法としては、特に限定されず、従来公知の方法を用いることができる。具体例として、金属薄膜がその表面に形成されたガラス製平面基板を、10-カルボキシー1-デカンチオール（（株）同仁化学研究所製）を含むエタノール溶液に浸漬する方法などが挙げられる。このように、10-カルボキシー1-デカンチオールが有するチオール基が、金属と結合し固定化され、金薄膜の表面上で自己組織化し、SAMを形成する。
- [0078] 「誘電体」としては、光学的に透明な、各種の無機物、または天然もしくは合成ポリマーを用いることもでき、化学的安定性、製造安定性および光学的透明性の観点から、二酸化ケイ素（ SiO_2 ）または二酸化チタン（ TiO_2 ）を含むことが好ましい。
- [0079] 誘電体からなるスペーサ層の厚さは、通常10nm～1mmであり、共鳴角安定性の観点からは、好ましくは30nm以下、より好ましくは10～20nmである。一方、電場増強の観点から、好ましくは200nm～1mmであり、さらに電場増強の効果の安定性から、400nm～1,600nmがより好ましい。
- [0080] 誘電体からなるスペーサ層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、電子線蒸着法、熱蒸着法、ポリシラザン等の材料を用いた化学反応による形成方法、またはスピコートによる塗布などが挙げられる。
- [0081] このような「プラズモン励起センサ」の金属薄膜基板の表面もしくはスペーサ層側表面に、上記工程（a）を経て得られた免疫複合体を接触させる方法としては、該蛍光色素を含有した溶液の滴下、吹付、塗布などの方法が挙

げられる。また、プラズモン励起センサ上に下記のような流路を構成し、該蛍光色素を含有した溶液をプラズモン励起センサ表面に接触させるような方法も挙げられる。

- [0082] 「流路」とは、微量な薬液の送達を効率的に行うことができ、反応促進を行うために送液速度を変化させたり、循環させたりすることができる直方体または管状のものであって、プラズモン励起センサを設置する個所近傍は直方体構造を有することが好ましく、薬液を送達する個所の近傍は管状を有することが好ましい。
- [0083] その材料としては、プラズモン励起センサ部ではメチルメタクリレート、スチレン等を原料として含有するホモポリマーまたは共重合体、ポリエチレン、ポリオレフィン等からなり、薬液送達部ではシリコンゴム、テフロン(登録商標)、ポリエチレン、ポリプロピレンなどのポリマーを用いる。
- [0084] プラズモン励起センサ部においては、検体との接触効率を高め、拡散距離を短くする観点から、プラズモン励起センサ部の流路の断面として、縦×横がそれぞれ独立に100nm～1mm程度が好ましい。
- [0085] 流路にプラズモン励起センサを固定する方法としては、小規模ロット（実験室レベル）では、まず、該プラズモン励起センサの金属薄膜が形成されている表面に、流路高さ0.5mmを有するポリジメチルシロキサン（PDMS）製シートを該プラズモン励起センサの金属薄膜が形成されている部位を囲むようにして圧着し、次に、該ポリジメチルシロキサン（PDMS）製シートと該プラズモン励起センサとをビスなどの閉め具により固定する方法が好ましい。
- [0086] 工業的に製造される大ロット（工場レベル）では、流路にプラズモン励起センサを固定する方法としては、プラスチックの一体成形品に金基板を形成、または別途作製した金基板を固定し、金表面に誘電体層、蛍光色素層およびリガンド固定化を行った後、流路の天板に相当するプラスチックの一体成形品により蓋をすることで製造できる。必要に応じてプリズムを流路に一体化することもできる。

[0087] 「送液」としては、検体を希釈する溶媒または緩衝液と同じものが好ましく、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、トリス緩衝生理食塩水（TBS）などが挙げられるが、特に限定されるものではない。

[0088] 送液を循環させる温度および時間としては、検体の種類などにより異なり、特に限定されるものではないが、通常 $20 \sim 40^{\circ}\text{C} \times 1 \sim 60$ 分間、好ましくは $37^{\circ}\text{C} \times 5 \sim 15$ 分間である。

[0089] ・蛍光量測定

本アッセイの後半の工程は、上記免疫複合体が固定化されたプラズモン励起センサに、該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射し、励起された二次抗体蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程である。上記工程で得られた測定結果から、検体中に含有されるアナライトの抗原量を算出する。

[0090] より具体的には、表面プラズモン励起蛍光法によるレーザ光の照射は、プラズモン励起センサの金属薄膜を形成していないもう一方の透明基板表面から、プリズムを経由してレーザ光を上記免疫複合体に照射し、これにより該一次抗体の励起されたドナー分子蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）現象によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を求める。既知濃度の標的抗原での測定を実施することで検量線を作成し、作成された検量線に基づいて検体中の標的抗原の量を測定された蛍光量から算出することができる。

[0091] レーザ光は、光学フィルタおよび偏光フィルタを通して、プリズムに入射する直前のエネルギーおよび光子量を調節することが望ましい。

[0092] レーザ光の照射により、全反射減衰条件（ATR）において、金属薄膜の表面に表面プラズモンが発生する。表面プラズモンの電場増強効果により、照射した光子量の数十～数百倍に増えた光子により蛍光色素を励起する。なお、該電場増強効果による光子増加量は、基板となるガラスの屈折率、金属薄膜の金属種および膜厚に依存するが、通常、金では約 $10 \sim 20$ 倍の増加量となる。

- [0093] 蛍光色素は光吸収により分子内の電子が励起され、短時間のうちに第一電子励起状態に移動し、この状態（準位）から基底状態に戻る際、そのエネルギー差に相当する波長の蛍光を発する。
- [0094] 「レーザ光」としては、波長200～900nm、0.001～1,000mWのLDレーザ、または波長230～800nm、0.01～100mWの半導体レーザが好ましい。
- [0095] 「プリズム」は、各種フィルタを介したレーザ光が、プラズモン励起センサに効率よく入射することを目的としており、屈折率が上記「透明平面基板」と同じであることが好ましい。本発明は、全反射条件を設定できる各種プリズムを適宜選択することができることから、角度、形状に特に制限はなく、例えば、60度分散プリズムなどであってもよい。このようなプリズムの市販品としては、上述した「ガラス製の透明平面基板」の市販品と同様のものが挙げられる。
- [0096] 「光学フィルタ」としては、例えば、減光（ND）フィルタ、ダイアフラムレンズなどが挙げられる。
- [0097] 「減光（ND）フィルタ」は、入射レーザ光量を調節することを目的とするものである。特に、ダイナミックレンジの狭い検出器を使用するときには精度の高い測定を実施する上で用いることが好ましい。
- [0098] 「偏光フィルタ」は、レーザ光を、表面プラズモンを効率よく発生させるP偏光とするために用いられるものである。
- [0099] 「カットフィルタ」は、外光（装置外の照明光）、励起光（励起光の透過成分）、迷光（各所での励起光の散乱成分）、プラズモンの散乱光（励起光を起源とし、プラズモン励起センサ表面上の構造体または付着物などの影響で発生する散乱光）、ドナー蛍光基質の自家蛍光、などの各種ノイズ光を除去するフィルタであって、例えば、干渉フィルタ、色フィルタなどが挙げられる。
- [0100] 「集光レンズ」は、検出器に蛍光シグナルを効率よく集光することを目的とするものであり、任意の集光系でよい。簡易な集光系として、顕微鏡など

で使用されている、市販の対物レンズ（（株）ニコン製またはオリンパス（株）製）を転用してもよい。対物レンズの倍率としては、10～100倍が好ましい。

[0101] 「SPFS検出部」としては、超高感度の観点からは光電子増倍管（浜松ホトニクス（株）製のフォトマルチプライヤー）が好ましい。また、これらに比べると感度は下がるが、画像として見ることができ、かつノイズ光の除去が容易なことから、多点計測が可能なCCDイメージセンサも好適である。

[0102] 表1に、蛍光色素として、それぞれAlexa Fluor（登録商標）647（表1中、条件1～4）およびHiLyte Fluor（登録商標）647（表1中、条件5～6）を用いて、プラズモン励起センサによるSPFS蛍光シグナルを示す。

[0103] 表1中でプラズモン励起センサに、それぞれ濃度調整した蛍光色素溶液を送液した条件におけるCCD観察時の蛍光シグナル値と、MilliQ水を送液した条件におけるCCD観察時の蛍光シグナル値との差を、各濃度に調整した蛍光色素のSPFSシグナルとする。

[0104] 表1から、蛍光色素が極微量である溶液においても高感度な測定が実施できていることがわかる。この結果は、少なくとも蛍光色素が表1の程度に極微量存在する条件においても、測定が可能であることを示している。すなわち、本発明の免疫アッセイ法において、形成された免疫複合体の測定を通じて高感度な測定が可能であることを示している。

[0105]

[表1]

表 1

		蛍光色素	濃度 (nM)	SPFS蛍光シグナル (任意単位: au)
条 件	1	Alexa Fluor (登録商標)647	88	504, 310
	2		6	35, 840
	3		0. 45	9, 180
	4		0	100
	5	HiLyte Fluor (登録商標)647	73	489, 010
	6		5. 2	35, 920
	7		0. 4	11, 360
	8		0	95

[0106] また、表 2 は、プラズモン励起センサが、「Signal」と「Noise」との比が大きく、蛍光色素量により変化する「Signal」の数値が「Noise」と比較して相対的に大きく、高感度な測定が可能となることを示している。

[0107] なお、プラズモン励起センサに対して、MilliQ水を送液した時に、CCDから観察したときのシグナル値を「Noise」（プラズモン散乱ノイズ）とし、10 nM Alexa Fluor（登録商標）647水溶液を送液した時に、CCDから観察したときの蛍光シグナルの数値を「Signal」とする。

[0108] 表 2 中のプラズモン励起センサ 1 は、以下のように作製するものである。

[0109] 屈折率〔nd〕1. 72、厚さ1 mmのガラス製の透明平面基板（（株）オハラ製のS-LAL 10）をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。なお、クロム薄膜の厚さは1～3 nm、金薄膜の厚さは44～52 nmである。

[0110] プラズモン励起センサ2は、プラズモン励起センサ1の作製方法において、スパッタリングの代わりに抵抗加熱蒸着法を用いる以外はプラズモン励起センサ1と同様にして作製したものであって、プラズモン散乱をより増加させたものであり、プラズモン励起センサ3は、プラズモン励起センサ2の表面に、平均粒径約100nmのポリスチレン微粒子（Polysciences Inc. 社製）を分散させた塩濃度調整液を滴下し、数分間静置後、MilliQ水にて洗浄することで、センサ表面に該微粒子を表面に付着させたものである。

[0111] [表2]

表2

プラズモン 励起センサ	《Noise》 プラズモン散乱ノイズ (任意単位:au)	《Signal》 10nM Alexa Fluor(登録商 標)647(任意単位:au)	S/N比
1	10,000	44,000	4.40
2	64,000	70,000	1.09
3	526,000	220,000	0.42

[0112] 表2から、SignalとNoiseの比（S/N比）は、Noiseの増加に伴い低下していることがわかる。すなわち、高感度な測定を実現するためには、プラズモン散乱ノイズができる限り小さなプラズモン励起センサが適していることが明らかである。

[0113] また、プラズモン励起センサ3では金属箔膜状に固定化された粒子によってNoiseが大幅に上昇している。すなわち、プラズモン増強場を用いた蛍光測定においては、センサ表面に微粒子などが存在するとノイズが上昇してしまうことで、高感度な測定の実現が困難となることが明らかである。よって、プラズモン増強場を用いた蛍光測定において、免疫反応場と検出場の完全分離が高感度測定実現のための1つの解決策となる。

[0114] 本発明の免疫アッセイによるとプラズモン励起センサによる検出場において、プラズモン増強場を用いた蛍光測定により、遊離の二次抗体、または一次抗体に非特異的に結合した二次抗体が有する蛍光色素は、FRETが発現しないために蛍光を発しないか、極めて微弱の発光にとどまる（図2）。そ

れゆえ、蛍光のバックグラウンドノイズが低いレベルである。形成された免疫複合体に由来する蛍光のみを検出することができるので、極微量の免疫複合体であっても増強された蛍光の発光により高感度で検出することを可能とする。特に、上記したように免疫複合体を形成する反応場と蛍光発光に基づく検出場とが分離していると、諸条件の最適化、ノイズおよびバックグラウンドのレベル抑制は極めて有効に達成できる。この意味で、工程（a）における上記方式1または方式2の態様が好適である。

[0115] これに対して従来のサンドイッチ型免疫アッセイでは、二次抗体に蛍光色素を標識してそれを励起することにより検出をしている。本来、免疫複合体に由来する蛍光のみを検出したくとも、実際には非特異的に結合した、または遊離の二次抗体の蛍光色素も発光することは避けられないためにバックグラウンドのノイズが高くなる（図1）。そうしたノイズのレベルを充分に下げするためには、洗浄操作を行なってB/F分離することが必要となる。

[0116] <免疫アッセイシステム>

本発明のシステムは、本発明の装置は、上記プラズモン励起センサを用いて、本発明のアッセイ法を実施するための装置一式である。すなわち、

少なくとも、

プラズモン励起センサの金属薄膜基板上に固定化される、ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体、

アクセプター分子となる蛍光色素が結合した二次抗体、

プラズモン励起センサ、表面プラズモン励起蛍光法用の光源および蛍光検出器

を含み、該一次抗体および該二次抗体の両抗体と検体中に含まれる抗原との間でサンドイッチ形式の抗原抗体反応を生じさせ、プラズモン励起センサ金属薄膜基板上に固定化された免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法によりレーザ光を照射して励起された該一次抗体の蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定することにより該抗原量を測定することを特徴とする免疫アッセイシステムであ

る。

[0117] 本発明システムの「装置」としては、少なくとも光源、各種光学フィルタ、プリズム、カットフィルタ、集光レンズおよびSPFS検出部を含むものとする。なお、検体液、洗浄液または標識抗体液などを取り扱う際に、プラズモン励起センサと組み合わせた送液系を有することが好ましい。送液系としては、例えば、送液ポンプと連結したマイクロ流路デバイス（例えば μ -TAS）などでもよい。

[0118] また、表面プラズモン共鳴（SPR）検出部、すなわちSPR専用の受光センサとしてのフォトダイオード、SPRおよびSPFSの最適角度を調製するための角度可変部（サーボモータで全反射減衰（ATR）条件を求めるためにフォトダイオードと光源とを同期して、 $45 \sim 85^\circ$ の角度変更を可能とする。分解能は 0.01° 以上が好ましい。）、SPFS検出部に入力された情報を処理するためのデータ処理用コンピュータなども含んでもよい。

[0119] 光源、光学フィルタ、カットフィルタ、集光レンズおよびSPFS検出部の好ましい態様は上記したものと同様である。

[0120] 「送液ポンプ」としては、例えば、送液が微量な場合に好適なマイクロポンプ、送り精度が高く脈動が少なく好ましいが循環することができないシリンジポンプ、簡易で取り扱い性に優れるが微量送液が困難な場合があるチューブポンプなどが挙げられる。

[0121] <キット>

本発明のキットは、本発明の免疫アッセイ法に用いられることを特徴とするものであって、本発明のアッセイ法を実施するにあたり、一次抗体および二次抗体に加え、必要とされるすべてのものを含むことが好ましい。好ましいキットとして、

少なくとも、プラズモン励起センサ、その金属薄膜基板の表面上に固定化される抗体であってドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体、アクセプター分子となる蛍光色素が結合した二次抗体を含み、上記の免疫アッセイ

方法において、該一次抗体、検体中の抗原、該二次抗体の間でサンドイッチ形式の抗原抗体反応を生じさせることにより免疫複合体を形成させる工程を実施するために用いられるキットが示される。

[0122] プラズモン励起センサの部材である金属薄膜が、金、銀、アルミニウム、銅および白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属から形成されることが望ましい。より好ましい金属薄膜は金薄膜である。さらに上記プラズモン励起センサが、上記金属薄膜および透明平面基板から構成され、さらにスペーサ層を有して、該スペーサ層が、上記金属薄膜の、透明平面基板とは接していないもう一方の表面に形成されている態様が好ましい。このようなスペーサ層の構成、設置する方法、意義などについては、上記したとおりである。そのような上記スペーサ層は、SAM (Self Assembled Monolayer; 自己組織化単分子膜) であることが望ましい。

[0123] 本発明の「キット」の構成要素として、具体的に、透明平面基板の一方の表面に金属薄膜を形成したプラズモン励起センサの他に、検体を溶解または希釈するための溶解液または希釈液; 抗体とアナライトとを反応させるための各種反応試薬および洗浄試薬が挙げられ、本発明のアッセイ法を実施するために必要とされる各種器材または資材などを含めることもできる。さらにキット要素として、検量線作成用の標準物質、説明書、多数検体の同時処理ができるマイクロタイタープレートなどの必要な器材一式などを含んでもよい。

[0124] FRETの問題点

本発明においてFRET技術は、2種類の抗体（結合パートナーである一次、二次抗体）をFRETドナー・アクセプターのペアを形成する蛍光色素でそれぞれ標識することによって適用される。検体を一次抗体、二次抗体と接触させることによって検体中の抗原と抗体間で免疫複合体が形成される。かかる免疫複合体において結合パートナーおよびアナライトが比較的小さい場合には、蛍光発色団（フルオロフォア）は互いに近傍まで接近して来て、その結果、所望の測定可能なFRETシグナルが得られることが期待される

。

[0125] ドナー／アクセプターのペアが検出可能な FRET 蛍光シグナルを誘導することを可能にするには、上記のようにドナー分子とアクセプター分子との間の距離（1～10 nm）が短いことが要件とされる。しかしながら本発明が目的とする極微量のアナライトを極めて高感度で検出するためには、さらに、形成された免疫複合体に存在するドナー分子とアクセプター分子との間の距離を10 nm前後と設定し、かつ2つの抗体の蛍光色素が FRET に好適であるように互いに配向する（または並列する）必要がある。かかる精密な分子配向を実現するための工夫が必要とされる。

[0126] ・ FRET 効果の最適化

本発明のアッセイにおいては、上記のようにドナー／アクセプターのペアが測定可能な FRET 蛍光シグナルを誘導することが免疫複合体を検出するための前提となる。

[0127] 完全な抗体は大きい Y 型タンパク質分子であって、その長さ（30～40 nm）および抗体ヒンジ領域の柔軟性に起因して、抗体分子同士は、比較的大きい間隔でコンジュゲートするであろう。抗体の柔軟性は、並列している抗体に結合された色素のペア間でのエネルギー転移の可能性を減少させ得る。また、抗体または蛍光色素のサイズは、発揮する負の立体効果を介して、エネルギー転移に干渉するかも知れない。さらに抗体に蛍光色素を結合させる場合、一般的に複合化の部位を制御することは容易ではない。すなわち抗体複合体の場合において、蛍光色素部分は抗体分子の異なる部分に付着し得る。そのような部位次第で、抗体分子における色素の空間的配向は、エネルギー転移効率に関して、好都合にも不都合にもなり得る。したがって、FRET を誘導する分子どうしの近接した並列は、ドナー／アクセプターペア間のエネルギー転移のための要件である一方で、それは、相互作用する分子または複合体の部分である分子において、前記並列された抗体に付着された色素間、たとえば蛍光色素複合抗体間の有効なエネルギー転移を達成するためには必ずしも充分ではないかもしれない。

- [0128] FRETとしてのエネルギー転移が生じるための初期条件のうち、その1つはドナーおよびアクセプター分子が、極めて近接していなければならないことであり、典型的には0.2～10 nmである。想定される上記問題点に鑑み、FRETシグナルを所望する強度として得られるようにする方策として、次の手段を採ることが可能である。
- [0129] 1. 抗体をフラグメント (Fab) 化し、分子サイズを小さくすることで分子構造の揺らぎを減らしてFRET阻害を減らす。併せて、標識蛍光色素間の距離も短縮することができる。
- [0130] 2. 抗体を還元型にし、抗体のFc部に現れるSH基を利用して蛍光標識を行う。この場合、1分子当たりの標識率はアミノ基を利用する方法よりも下がる可能性があるが、SH基の位置は決まっているため、標識する位置を確定できる（他にフリーのSHがあれば、これも標識されるが）。さらに抗体分子の中央付近に蛍光色素を標識できるので、色素間の距離は短縮できる。
- [0131] 3. 上記エネルギー転移が生じる可能性の増加、および／またはエネルギー転移効率が増加するように、抗体分子においてFRETの空間的構造を調節可能とする結合反応基を導入することにより抗体間の並列を安定化し、かつ／または高めることができる。
- [0132] そのような結合反応基は、色素間のエネルギー転移の可能性を高めるように、前記抗体間の並列を調節可能にする。このような抗体セットの使用は、結合反応基なしの抗体セットの使用と比較してエネルギー転移の確率を飛躍的に高めるかも知れない。ここでいう空間的構造とは、色素間の間隔のみならず、これらの相対的な配向の両方をいう。抗体間の空間的構造を調節することは、色素の空間的構造を調節かつ安定化させることを含む。結合反応基は、前記色素を、互いに10 nm以内の間隔に、より好ましくは5 nm以内の間隔に、最も好ましくは互いに2 nm以内の間隔に至らせることができる。したがって、好ましくは、結合反応基は、小さく、たとえば10キロダルトン (kDa) よりも小さく、好ましくは5 kDa よりも小さく、より好ましくは2 kDa よりも小さく、または最も好ましくは1 kDa よりも小さい

(特許文献3)。

[0133] 3-1. ビオチン- (ストレプト) アビジン系を用いる方法

抗体中に付加され、蛍光色素の空間的配置を調節するための上記結合反応基の一例として、ビオチン- (ストレプト) アビジン系が好ましく、このような小さいサイズの結合反応基は、蛍光色素ペア間の近接した間隔を達成するのに好都合である。ビオチンは、僅か244ダルトン(Da)の分子量を有する小分子でタンパク質と結合することができる。ビオチン複合体を調製するための種々の標準的な手順が、当業者に知られている。例えば、二次抗体にストレプトアビジンを結合させ、一次抗体にはビオチンを結合させると、共通の抗原を介する両抗体の複合体が形成される時に、これらの抗体の結合反応基であるビオチンとストレプトアビジンとが結合する。その結合形成に基づく空間的な再配置が起こる結果、両抗体の蛍光色素ペア間に近接配向を達成させる。さらに上記一次抗体のFc基部にも、プラズモン励起センサの金属薄膜もしくはスペーサ層へ係留して固定化するための結合基を付けておくことも望ましい(この場合、該一次抗体は予め固定化されていてもよい)。

[0134] あるいは、次のように結合反応基として適切な大きさのDNAもしくはポリヌクレオチドを導入し、そのハイブリダイゼーションを利用してもよい。

[0135] 3-2. DNAを用いる方法

- 1) 一次抗体にDNA-ドナー色素、二次抗体に相補鎖DNA-アクセプター分子を標識する。
- 2) 一次抗体を基板上に固定化する。
- 3) 前記一次抗体に抗原、次いで二次抗体を反応させて免疫複合体を形成させ、これを該一次抗体を介して基板に固定化させる。あるいは二次抗体と検体との反応液(抗原と二次抗体との複合体を含有する反応液)を前記基板に接触させて免疫複合体を固定化してもよい。

[0136] このとき、通常の場合では免疫複合体形成の有無に拘らず、DNAと相補鎖DNAがハイブリダイズする可能性がある。そこで始めの条件として、『

免疫複合体は形成するが、DNAのハイブリダイズは起こらない』条件（塩濃度、温度といった条件）を設定する。例えば塩濃度が低いとハイブリダイズは起こらない。

4) 洗浄緩衝液で未反応の二次抗体を除去する。

5) 次に、『免疫複合体を維持し、かつDNAがハイブリダイズする』条件（例えば、塩濃度、温度）を設定してその条件を適用する。なお、塩濃度が高いとハイブリダイズは起こるが、高すぎると免疫反応を阻害する恐れがある。したがって塩濃度は、150mMまでぐらいが望ましい。

6) 一次抗体のDNA-ドナー色素、二次抗体の相補鎖DNA-アクセプター色素がハイブリダイゼーションを起し、ドナー色素-アクセプター色素間でFRETが発現する。

[0137] この方法によってS/N向上が期待される。なぜならば、DNAの色素修飾率が高ければ、それだけシグナルの向上が期待できるからである。なお、DNA-相補鎖DNAのハイブリダイズは、特異的（例えばSNP解析のような）である必要はなく、近傍にあるものと一定距離以内にあればよい。

[0138] 上記方法の改変例として、1)、2)は同じであるが、3)以降の段階を以下のように変えてもよい。

3) 前記一次抗体に抗原、次いで二次抗体を反応させて免疫複合体を形成させ、これを該一次抗体を介して基板に固定化させる。あるいは二次抗体と検体との反応液（抗原と二次抗体との複合体を含有する反応液）を前記基板に接触させて免疫複合体を固定化してもよい。その際、免疫複合体形成の有無に関わらず、DNAと相補鎖DNAがハイブリダイズする。

4) 『免疫複合体を維持し、かつ二本鎖DNAが解離する』条件（例えば、塩濃度、温度）を設定してその条件を適用する。免疫複合体を形成していない未反応の二次抗体を洗浄緩衝液で除去する。このとき免疫複合体を形成しているDNAと相補鎖DNAとのハイブリダイゼーションもいったん、解離する。

5) 『免疫複合体を維持し、かつDNAがハイブリダイズする』条件（例え

ば、塩濃度、温度)を設定し、その条件を適用する。

6) DNAと相補鎖DNAは最も近傍にあるもの同士でハイブリダイズする。

[0139] すなわち、免疫複合体の形成により接近している一次抗体と二次抗体に標識されたDNAが優先的にハイブリダイズし、ドナー色素-アクセプター色素間でFRETが発現する。

[0140] この場合は、S/N向上とともにB/F分離は必要とされない利点がある。

[0141] また上記改変例の別の態様として、上記の1)～4)は同じであるが、5)以降の段階を次のとおりにする。

5) タンパク質変性剤(尿素など)を含み、塩濃度の高い緩衝液を基板上に展開する。これにより、タンパク質は変性し、構造が崩れた状態で溶解する。基板上にあるDNAと相補鎖DNAは、立体的構造の阻害を受けず、高確率でハイブリダイズする。一次抗体は共有結合で基板に固定化されていれば外れない。また、DNAも、抗体分子に共有結合的に結合されていれば、変性条件下でも基板からは外れない。これに対して、二次抗体は遊離してもよい。また、二次抗体に結合していた相補鎖DNAは抗体分子から外れてもよい。

6) 基板上に固定化された一次抗体のDNA-ドナー色素、二次抗体由来の相補鎖DNA-アクセプター色素がハイブリダイゼーションを起し、ドナー色素-アクセプター色素間でFRETが発現する。

[0142] この場合、FRET効率の向上が期待でき、しかも免疫反応のカイネティクスの影響を受けない。なおDNAが安定であって、しかも相補鎖DNAとハイブリダイズするようなタンパク質変性条件を設定する必要がある。

[0143] なお、一次抗体、検体および二次抗体を予め反応させ、形成された免疫複合体を次いで(プラズモン励起センサ)金属薄膜基板に接触させることにより、該免疫複合体の一次抗体を該基板上に結合させて最終的に基板上に固定化する方式では、固定化した後に『免疫複合体を維持し、かつDNAがハイブリダイズする』条件(例えば、塩濃度、温度)を設定してその条件を適用

すればよい。

[0144] 好適な実施形態

好ましい本発明アッセイの形態は、免疫反応場と蛍光検出場とを分離して実施する態様である。すなわち免疫反応場において、ドナー分子で標識された一次抗体が検体中に含有される標的抗原を認識してこれに結合し、またアクセプター分子で標識された二次抗体も該抗原の別エピトープを認識して結合し、その結果、サンドイッチ型免疫複合体が形成される。

[0145] これらの抗原と両抗体との反応物は、次いでプラズモン励起センサに適用される。その金属薄膜基板表面に設けられた係留用の結合基により、上記一次抗体Fc基部の結合基が捕捉されて、サンドイッチ型免疫複合体が金属薄膜基板上に固定化される（上記の工程（a））。ここで必要であれば洗浄用緩衝液による洗浄操作を行ってもよい。

[0146] アッセイの検出場は、ガラス製の透明平面基板と、該基板の一方側の表面に形成された金属薄膜と、さらに該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成したスペーサ層とを有するプラズモン励起センサである。その該スペーサ層側の表面に接触させて固定化された上記サンドイッチ型免疫複合体に対し、該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射する。一次抗体ドナー分子が表面プラズモンによって励起されて発光する。FRET発現により二次抗体に結合した蛍光色素（アクセプター分子）が、励起して発光する。このようにして形成された免疫複合体のみが増強された蛍光を発するので、これを検出して蛍光量を測定する（上記の工程（b））。

実施例

[0147] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、かかる実施例により限定されるものではない。なお、ここで使用している装置名、使用する材料、使用材料の濃度、使用量、ならびに処理時間、処理温度などの数値的条件、処理方法などは、本発明の範囲内の好適例にすぎない。

[0148] [作製例 1] (プラズモン励起センサの作製)

屈折率 [nd] 1.72、厚さ 1 mm のガラス製の透明平面基板 ((株) オハラ製の S-LAL-10) をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは 1 ~ 3 nm、金薄膜の厚さは 44 ~ 52 nm であった。

[0149] このようにして得られた基板を、10-カルボキシー-1-デカンチオールを 1 mM 含むエタノール溶液に 24 時間以上浸漬し、金薄膜の片面に SAM (Self Assembled Monolayer; 自己組織化単分子膜) を形成した。基板を該溶液から取り出し、エタノールおよびイソプロパノールで洗浄した後、エアガンで乾燥させた。

[0150] SAM の表面に、流路高さ 0.5 mm を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) 製シートを設け、SAM 表面が流路の内側となるように基板を配置し (ただし、該シリコンゴムスペーサは送液に触れない状態とする。)、流路の外側から圧着し、ビスで流路シートと該プラズモン励起センサとを固定した。

[0151] [作製例 2] (Alexa Fluor 647 標識一次抗体の作製)

一次抗体として抗 α フェトプロテイン (AFP) モノクローナル抗体 ((株) 日本医学臨床検査研究所などから入手可能) を、ビオチン化キット ((株) 同仁化学研究所製) を用いてビオチン化した。手順は、該キットに添付のプロトコールに従った。

[0152] 次に、得られたビオチン化抗 AFP モノクローナル抗体の溶液とストレプトアビジン標識 Alexa Fluor (登録商標) 647 (Molecular Probes 社製) 溶液とを混合し、4 °C で 60 分間、攪拌混合することで反応させた。次いで未反応抗体および未反応酵素を、分子量カットフィルタ (日本ミリポア (株) 製) を用いて精製することで、Alexa Fluor (登録商標) 647 標識抗 AFP モノクローナル抗体溶液を得た。得られた抗体溶液はタンパク質量の定量後、4 °C で保存した。

[0153] [作製例3] (Cy5.5標識二次抗体の作製)

上記作製例2で得られたビオチン化抗AFPモノクローナル抗体の溶液とストレプトアビジン標識Cy5.5(登録商標)(Molecular Probes社製)溶液とを混合し、4℃で60分間、攪拌混合することで反応させた。

[0154] 次に、未反応抗体および未反応酵素を、分子量カットフィルタ(日本ミリポア(株)製)を用いて精製することで、Cy5.5(登録商標)標識抗AFPモノクローナル抗体溶液を得た。得られた抗体溶液はタンパク質の定量後、4℃で保存した。

[0155] [実施例1]

(プラズモン励起センサの作製)

[作製例1]と同様の方法でプラズモン励起センサを準備し、1次抗体の固相化を行う。

[0156] まず、超純水を10分間、その後PBSを20分間、ペリスタポンプにより、室温、流速500 μ L/minで循環させた。続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を50mMと、水溶性カルボジイミド(WSC)を100mMとを含むPBSを5mL送液し、20分間循環送液させた後に、[作製例2]の方法で α フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体(1D5、2.5mg/mL、(株)日本医学臨床検査研究所製)を標識したAlexa Fluor 647標識一次抗体溶液2.5mLを30分間循環送液することで、SAM上に1次抗体を固相化した。最後に重量1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS緩衝生理食塩水にて、30分間循環送液することで非特異吸着防止処理を行うことで、プラズマ励起センサを作製し、SPFSを用いてアッセイを行った。

[0157] (アッセイ法の実施)

工程(i): 送液をPBSに代え、AFPを1ng/mL含むPBSを2.5mL添加し、25分間循環させた。

[0158] 洗浄工程: Tween 20を0.05重量%含むTBSを送液として20分

間循環させることによって洗浄した。ここでブランクの蛍光を、光源として LD レーザを用いて、波長 635 nm のレーザ光を、光学フィルタ：（シグマ光機（株））により光子量を調節し、プリズム：（（株）オハラ製の S-LAL10（屈折率 $[n] = 1.72$ ））を通して、流路に固定されているプラズモン励起センサに照射し、カットフィルタ（シグマ光機（株））、集光レンズとして 20 倍の対物レンズ（（株）ニコン製）を用いて CCD イメージセンサ（テキサスインスツルメント（株）製）により検出した。

[0159] 工程（i i）：[作製例 3]の方法で α フェトプロテイン（AFP）モノクローナル抗体（6D2、2.5 mg/mL、（株）日本医学臨床検査研究所製）を標識した Cy5.5 標識二次抗体を 1,000 ng/mL 含む PBS を 2.5 mL 添加し、20 分間循環させた。

[0160] 工程（i i i）：送液開始から 20 分後の CCD から観察したときのシグナル値を計測しアッセイシグナルとした。なお、AFP を 0 ng/mL 時の SPFS 測定シグナルをアッセイノイズシグナルとした。

[0161] 工程（i v）：本発明のプラズモン励起センサにおけるアッセイ S/N 比を以下の式で評価した。すなわち、抗原量に比例する蛍光色素量により変化する蛍光シグナルの数値が大きく、またアッセイノイズシグナルがアッセイ蛍光シグナルに対して数値的に充分小さいことがイムノアッセイ測定の信頼性が高いことに繋がる。

[0162] アッセイ S/N 比 = $\frac{|\text{アッセイ蛍光シグナル}|}{|\text{アッセイノイズシグナル}|}$

得られた結果を表 3 に示す。

[0163] [実施例 2]
（プラズモン励起センサの作製）
実施例 1 と同様に作製した。

[0164] （アッセイ法の実施）
工程（i）：送液を PBS に代え、AFP を 1 ng/mL 含む PBS を 2.5 mL 添加し、25 分間循環させた。

- [0165] 洗浄工程：T w e e n 2 0 を 0.05 重量% 含む T B S を送液として 20 分間循環させることによって洗浄した。ここでブランクの蛍光を、光源として L D レーザを用いて、波長 635 nm のレーザ光を、光学フィルタ：（シグマ光機（株））によりフォトン量を調節し、プリズム：（（株）オハラ製の S - L A L 1 0（屈折率 $[n] = 1.72$ ））を通して、流路に固定されているプラズモン励起センサに照射し、カットフィルタ（シグマ光機（株））、集光レンズとして 20 倍の対物レンズ（（株）ニコン製）を用いて C C D イメージセンサ（テキサスインスツルメント（株）製）により検出した。
- [0166] 工程（i i）：[作製例 3]の方法で α フェトプロテイン（A F P）モノクローナル抗体（6 D 2、2.5 mg/mL、（株）日本医学臨床検査研究所製）を標識した C y 5.5 標識二次抗体を 1,000 ng/mL 含む P B S を 2.5 mL 添加し、20 分間循環させた。
- [0167] 洗浄工程：T w e e n 2 0 を 0.05 重量% 含む T B S を送液として 10 分間循環させることによって洗浄した。
- [0168] 工程（i i i）：洗浄開始から 10 分後の C C D から観察したときのシグナル値を計測しアッセイシグナルとした。なお、A F P を 0 ng/mL 時の S P F S 測定シグナルをアッセイノイズシグナルとした。
- [0169] 工程（i v）：アッセイ評価としては実施例 1 と同様のアッセイ S/N 比を算出することで評価した。
- [0170] 得られた結果を表 3 に示す。
- [0171] [比較例 1]
（プラズモン励起センサの作製）
[作製例 1] と同様の方法でプラズモン励起センサを準備し 1 次抗体の固相化を行った。
- [0172] まず、超純水を 10 分間、その後 P B S を 20 分間、ペリスタポンプにより、室温、流速 500 μ L/min で循環させた。続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド（N H S）を 50 mM と、水溶性カルボジイミド（W S C）を 100 mM とを含む P B S を 5 mL 送液し、20 分間循環送液させた後に

、抗 α フェトプロテイン（AFP）モノクローナル抗体（1D5、2.5 mg/mL、（株）日本医学臨床検査研究所製）溶液2.5 mLを30分間循環送液することで、SAM上に1次抗体を固相化した。最後に重量1%牛血清アルブミン（BSA）を含むPBS緩衝生理食塩水にて、30分間循環送液することで非特異吸着防止処理を行うことで、プラズマ励起センサを作製し、SPFSを用いてアッセイを行った。

[0173] （アッセイ法の実施）

工程（i）：送液をPBSに代え、AFPを1 ng/mL含むPBSを2.5 mL添加し、25分間循環させた。

[0174] 洗浄工程：Tween 20を0.05重量%含むTBSを送液として20分間循環させることによって洗浄した。ここでブランクの蛍光を、光源としてLDレーザを用いて、波長635 nmのレーザ光を、光学フィルタ：（シグマ光機（株））によりフォトン量を調節し、プリズム：（（株）オハラ製のS-LAL10（屈折率 $[n] = 1.72$ ））を通して、流路に固定されているプラズモン励起センサに照射し、カットフィルタ（シグマ光機（株））、集光レンズとして20倍の対物レンズ（（株）ニコン製）を用いてCCDイメージセンサ（テキサスインスツルメント（株）製）により検出した。

[0175] 工程（ii）：[作製例2]の方法で α フェトプロテイン（AFP）モノクローナル抗体（6D2、2.5 mg/mL、（株）日本医学臨床検査研究所製）を標識したAlexa Fluor 647標識二次抗体溶液を1,000 ng/mL含むPBSを2.5 mL添加し、20分間循環させた。

[0176] 洗浄工程：Tween 20を0.05重量%含むTBSを送液として10分間循環させることによって洗浄した。

工程（iii）：洗浄開始から10分後のCCDから観察したときのシグナル値を計測しアッセイシグナルとした。なお、AFPを0 ng/mL時のSPFS測定シグナルをアッセイノイズシグナルとした。

[0177] 工程（iv）：アッセイ評価としては実施例1と同様のアッセイS/N比を算出することで評価した。

[0178] 得られた結果を表3に示す。

[0179] [表3]

表3

	AFP濃度 ng/mL	SPFS蛍光シグナル(任意単位:au)
実施例1	0	1060
	1	54,560
S/N		51.5
実施例2	0	1000
	1	51,980
S/N		52.0
比較例1	0	6,040
	1	65,480
S/N		10.84

[0180] 表3から、本発明において、従来の蛍光標識SPFS測定と比べて非常に高いアッセイS/N比を達成しており、極めて高感度な測定方法可能であることがわかった。

[0181] 実施例1のアッセイ工程に洗浄操作を加えたものが実施例2であるが、洗浄操作を加えたことにより、実施例1よりもアッセイシグナルが僅かに低下している。しかし、アッセイシグナルノイズがほとんど変化していないことから、実施例1において、非特異的な吸着によるアッセイシグナルの底上げはほとんどないと考えられる。このことから、アッセイシグナルの低下は、洗浄操作によって反応液が置換されたことにより、免疫複合体の平衡状態が変化し、二次抗体が徐々に解離していることに由来するものと考えられる。

[0182] また、比較例1に示した蛍光標識SPFS測定のアッセイシグナルに比べて、20%程度アッセイシグナルが減少している。これは、FRET効率が十分でないことの影響と考えられ、FRET効率の最適化により、さらなる向上が期待できる。

産業上の利用可能性

[0183] 本発明のアッセイ法は、高感度かつ高精度に目的とする抗原を検出するこ

とができる方法であるから、例えば、血液中に含まれる極微量の腫瘍マーカーであっても検出することができ、この結果から、触診などによって検出することができない前臨床期の非浸潤癌（上皮内癌）の存在も高精度で予測することができる。

符号の説明

- [0184] 1 0 金属薄膜基板
2 0 一次抗体
3 0 抗原
4 0 二次抗体
4 1 遊離の二次抗体
4 2 非特異結合の二次抗体
5 0 蛍光色素
6 0 ドナー分子となる蛍光色素
7 0 アクセプター分子となる蛍光色素
1 0 0 励起
2 0 0 検出
3 0 0 ノイズ
4 0 0 FRET
5 0 0 検出対象（免疫複合体）

請求の範囲

- [請求項1] ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体およびアクセプター分子となる蛍光色素を結合した二次抗体を用いて検体中の抗原量を測定する免疫アッセイ方法であって、少なくとも、
- 工程（a）：検体中に含まれる抗原と上記の一次抗体および二次抗体の両抗体との間で抗原抗体反応を生じさせ、両抗体により該抗原がサンドイッチされた免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させる工程、
- 工程（b）：形成された前記免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法によりレーザ光を照射し、該一次抗体の励起されたドナー分子蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定する工程、
- を含むことを特徴とする免疫アッセイ方法。
- [請求項2] 前記工程（a）において、検体と該二次抗体とを接触させ、次いで抗原を結合した該二次抗体を、該一次抗体を固定化した金属薄膜基板に接触させることにより、前記免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させる、請求項1に記載の免疫アッセイ方法。
- [請求項3] 前記工程（a）において、該一次抗体を固定化した金属薄膜基板と検体とを接触させ、次に該基板に二次抗体を適用することにより、前記免疫複合体を金属薄膜基板上に固定化させる、請求項1に記載の免疫アッセイ方法。
- [請求項4] 前記のドナー分子およびアクセプター分子がFRETペアである、請求項1～3のいずれかに記載の免疫アッセイ方法。
- [請求項5] 前記金属薄膜基板が、透明平面基板とその一方の表面に形成した金属薄膜とを少なくとも有するプラズモン励起センサの基板である、請求項1～4のいずれかに記載の免疫アッセイ方法。
- [請求項6] 前記工程（b）において、表面プラズモン励起蛍光法によるレーザ光の照射は、プラズモン励起センサの金属薄膜を形成していないもう

一方の透明基板表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射することである、請求項1～5のいずれかに記載の免疫アッセイ方法。

[請求項7] 少なくとも、プラズモン励起センサ、その金属薄膜基板の表面上に固定化される抗体であってドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体、アクセプター分子となる蛍光色素が結合した二次抗体を含み、請求項1～6のいずれかに記載の免疫アッセイ方法において、該一次抗体、検体中の抗原、該二次抗体の間でサンドイッチ形式の抗原抗体反応を生じさせることにより免疫複合体を形成させる工程を実施するために用いられるキット。

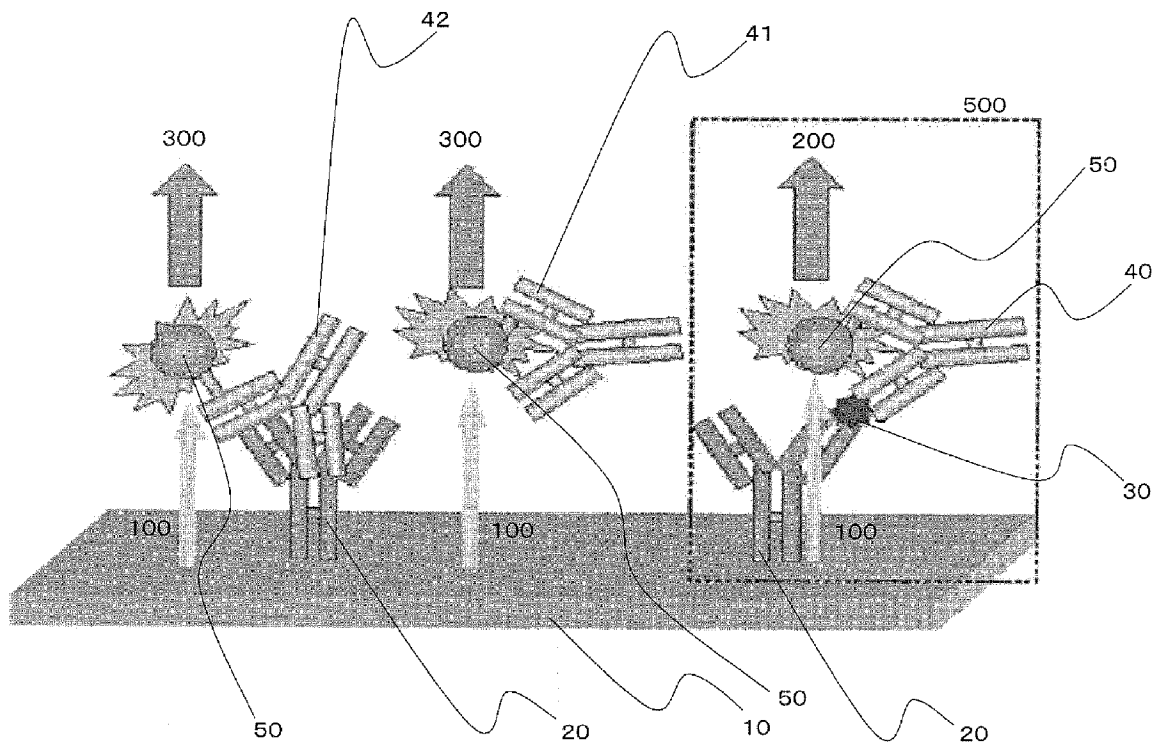
[請求項8] 前記金属薄膜が、金、銀、アルミニウム、銅および白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属から形成される請求項7に記載のキット。

[請求項9] 前記プラズモン励起センサが上記金属薄膜および透明平面基板から構成され、さらにスペーサ層を有して、該スペーサ層が、上記金属薄膜の、透明平面基板とは接していないもう一方の表面に形成される、請求項7または8に記載のキット。

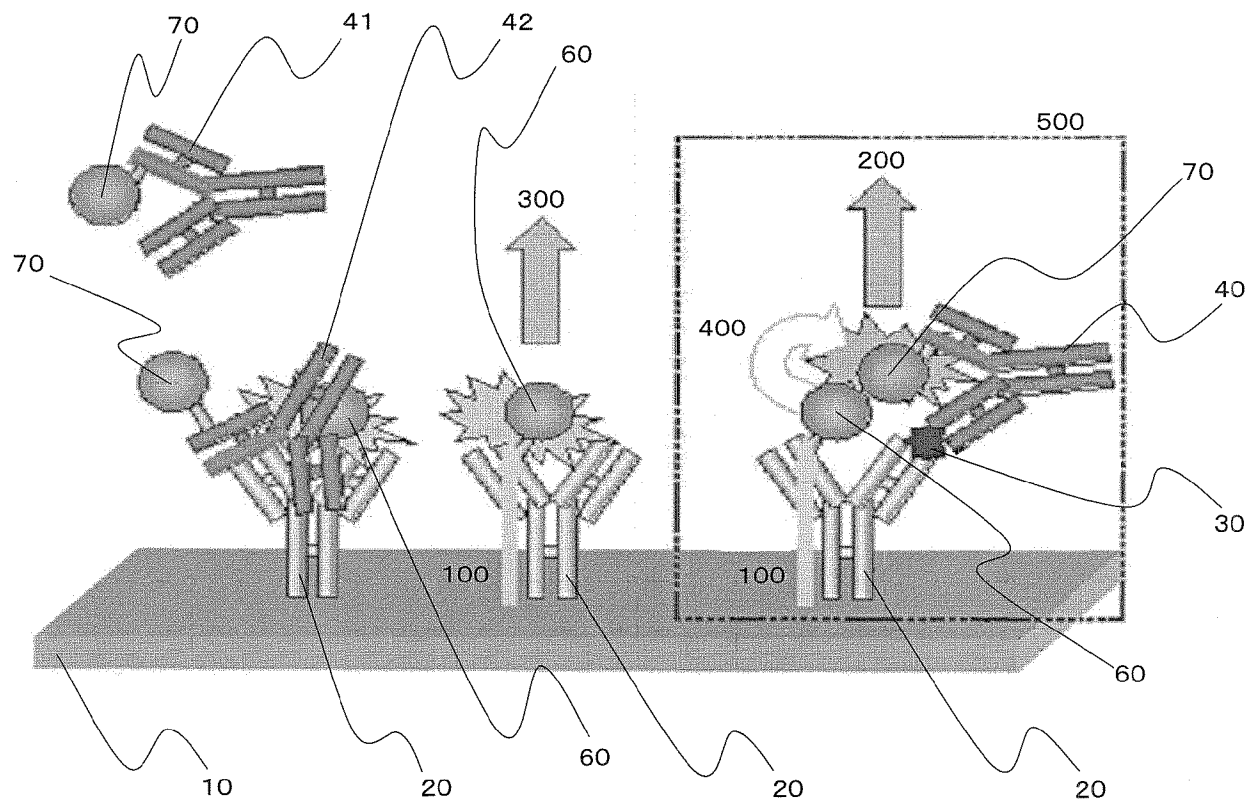
[請求項10] 少なくとも、
プラズモン励起センサの金属薄膜基板上に固定化される、ドナー分子となる蛍光色素を結合した一次抗体、
アクセプター分子となる蛍光色素が結合した二次抗体、
プラズモン励起センサ、表面プラズモン励起蛍光法用の光源および蛍光検出器
を含み、該一次抗体および該二次抗体の両抗体と検体中に含まれる抗原との間でサンドイッチ形式の抗原抗体反応を生じさせ、プラズモン励起センサ金属薄膜基板上に固定化された免疫複合体に対して、表面プラズモン励起蛍光法によりレーザ光を照射して励起された該一次抗体の蛍光色素からの蛍光共鳴エネルギー転移によって発光した該アクセプター分子の蛍光量を測定することにより該抗原量を測定すること

を特徴とする免疫アッセイシステム。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i, G01N33/553(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)

G01N33/53-G01N33/579, G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2009-080011 A (Fujifilm Corp.), 16 April 2009 (16.04.2009), (Family: none)	1-10
A	VAREIRO et al. "Surface Plasmon Fluorescence Measurements of Human Chorionic Gonadotrophin: Role of Antibody Orientation in Obtaining Enhanced Sensitivity and Limit of Detection" Anal. Chem., 2005, Vol.77, p.2426-2431	1-10
A	KOMARALA et al. "Enhanced Forster resonance energy transfer between the CdTe quantum dots in proximity to gold nanoparticles." Proc.of SPIE, 2007, Vol.6641, p.66410Y-1-66410Y-8	1-10



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

17 February, 2010 (17.02.10)

Date of mailing of the international search report

02 March, 2010 (02.03.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-512562 A (Saint Louis University), 13 April 2006 (13.04.2006), & EP 1476557 A & US 7172865 B2 & WO 2003/064657 A1	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/553(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-G01N33/579, G01N21/64			
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 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 1 9 7 1 - 2 0 1 0 年 1 9 9 6 - 2 0 1 0 年 1 9 9 4 - 2 0 1 0 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） CA/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)			
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	
PX	JP 2009-080011 A（富士フイルム株式会社）2009.04.16,（ファミリーなし）	1-10	
A	VAREIRO et al." Surface Plasmon Fluorescence Measurements of Human Chorionic Gonadotrophin:Role of Antibody Orientation in Obtaining Enhanced Sensitivity and Limit of Detection" Anal. Chem., 2005, Vol.77, p.2426-2431	1-10	
☒ 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 1 7 . 0 2 . 2 0 1 0		国際調査報告の発送日 0 2 . 0 3 . 2 0 1 0	
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 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 山村 祥子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2	2 J 9 2 1 7

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	KOMARALA et al. "Enhanced Forster resonance energy transfer between the CdTe quantum dots in proximity to gold nanoparticles." Proc.of SPIE, 2007, Vol.6641, p.66410Y-1-66410Y-8	1-10
A	JP 2006-512562 A (セント・ルイス・ユニバーシティ) 2006.04.13, & EP 1476557 A & US 7172865 B2 & WO 2003/064657 A1	1-10