

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-91527

(P2010-91527A)

(43) 公開日 平成22年4月22日(2010.4.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2008-264217 (P2008-264217)	(71) 出願人	000001270
(22) 出願日	平成20年10月10日 (2008.10.10)		コニカミノルタホールディングス株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
		(74) 代理人	100103218 弁理士 牧村 浩次
		(74) 代理人	100115392 弁理士 八本 佳子
		(72) 発明者	彼谷 高敏 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
		(72) 発明者	二宮 英隆 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
		(72) 発明者	石田 賢治 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

(54) 【発明の名称】 表面プラズモンを利用したアッセイ法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 表面プラズモンを利用したアッセイ法、装置およびキットを提供する。

【解決手段】 (a) : リガンドが表面に固定された粒子と検体とを接触させる工程、 (b) : (a) で得られた粒子に該リガンドと同一又は異なるリガンドと酵素とのコンジュゲートを反応させる工程、 (c) : (b) で得られた粒子にさらに酵素蛍光基質を反応させ蛍光色素が生成される工程、 (d) : (c) で得られた蛍光色素を単離する工程、 (e) : 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 (d) で得られた蛍光色素を接触させる工程、 (f) : (e) で得ら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經由してレーザー光を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、 (g) : (f) で得られた測定結果から、検体中のアナライト量を算出する工程。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも下記工程（a）～（g）からなることを特徴とするアッセイ法。

工程（a）：リガンドがその表面に固定化された粒子と、検体とを接触させる工程、

工程（b）：該工程（a）を経て得られた粒子に、該リガンドとは同じであっても異なっているいてもよいリガンドと酵素とのコンジュゲートを反応させる工程、

工程（c）：該工程（b）を経て得られた粒子に、さらに酵素蛍光基質を反応させ、蛍光色素が生成される工程、

工程（d）：該工程（c）を経て得られた蛍光色素を単離する工程、

工程（e）：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（d）を経て得られた蛍光色素を接触させる工程、

工程（f）：該工程（e）で得ら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、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、および

工程（g）：該工程（f）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量を算出する工程。

【請求項 2】

上記工程（a）～（d）の免疫反応場および、上記工程（e）～（g）の検出場が、それぞれ独立している請求項 1 に記載のアッセイ法。

【請求項 3】

上記検体が、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液および唾液からなる群から選択される少なくとも 1 種の体液である請求項 1 または 2 に記載のアッセイ法。

【請求項 4】

上記酵素が、アルカリフォスファターゼ（ALP）、ペルオキシダーゼ（POD）およびガラクトシダーゼ（GAL）からなる群から選択される少なくとも 1 種の酵素である請求項 1～3 のいずれかに記載のアッセイ法。

【請求項 5】

上記金属薄膜が、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 1～4 のいずれかに記載のアッセイ法。

【請求項 6】

上記プラズモン励起センサが、さらにスペーサ層を有し、

該スペーサ層が、上記金属薄膜の、上記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 1～5 のいずれかに記載のアッセイ法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の工程（f）に用いられることを特徴とする装置。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれかに記載のアッセイ法に用いられることを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面プラズモンを利用したアッセイ法、該アッセイ用装置および該アッセイ用キットに関する。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）の原理に基づき、表面プラズモンを利用したアッセイ法、該アッセイ用装置および該アッセイ用キットに関する。

【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

10

20

30

40

50

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、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りガンド（1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示されている。

【0004】

しかしながら、極微量アナライト（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コンジュゲート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上がらず、アッセイ感度の向上は難しい。

【0005】

また、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、シグナル増幅および非特異反応低減を検討している。

しかしながら、このような測定系を成立させるためには、極めて精密な分子配向技術が前提となっていることから、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、測定系そのものが成立しない危険性が高い。

【特許文献1】特許第3294605号

【特許文献2】特開2008-139245号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、免疫反応場と検出場とをそれぞれ独立させることによって、高感度かつ高精度であり、イムノアッセイに必要な不可欠である特異性に優れた、表面プラズモンを利用したアッセイ法、該アッセイ用装置および該アッセイ用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】

【0007】

本発明者らは、上記の問題を解決すべく鋭意研究した結果、酵素により標識された2次抗体を用いることによって、免疫反応場と検出場とを完全に分離することができ、さらに極微量の標的抗原であってもフォトン量に見合った蛍光発光と特異性とを両立できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明のアッセイ法は、少なくとも下記工程（a）～（g）からなることを特徴とする。

工程（a）：リガンドがその表面に固定化された粒子と、検体とを接触させる工程、

工程（b）：該工程（a）を経て得られた粒子に、該リガンドとは同じであっても異なっておりてもよいリガンドと酵素とのコンジュゲートを反応させる工程、

工程（c）：該工程（b）を経て得られた粒子に、さらに酵素蛍光基質を反応させ、蛍光色素が生成される工程、

工程（d）：該工程（c）を経て得られた蛍光色素を単離する工程、

工程（e）：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（d）を経て得られた蛍光色素を接触させる工程、

工程（f）：該工程（e）で得ら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、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、および

10

20

30

40

50

工程（g）：該工程（f）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量を算出する工程。

【0009】

上記工程（a）～（d）の免疫反応場および、上記工程（e）～（g）の検出場は、それぞれ独立していることが好ましい。

上記検体は、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液および唾液からなる群から選択される少なくとも1種の体液であってもよい。

【0010】

上記酵素は、アルカリフォスファターゼ（ALP）、ペルオキシダーゼ（POD）およびガラクトシダーゼ（GAL）からなる群から選択される少なくとも1種の酵素であってもよい。

10

【0011】

上記金属薄膜は、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種の金属から形成されることが好ましい。

上記プラズモン励起センサは、さらにスペーサ層を有し、該スペーサ層は、上記金属薄膜の、上記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。

【0012】

本発明の装置は、上記工程（f）に用いられることを特徴とする。

また、本発明のキットは、本発明のアッセイ法に用いられることを特徴とする。

【発明の効果】

20

【0013】

本発明は、粒子の除去、すなわち免疫反応場と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をすることができ、散乱ノイズの影響を受けにくく、さらに、3つの感度増幅機構、すなわち免疫反応最適化、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・高精度のアッセイ法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明について具体的に説明する。

<アッセイ法>

本発明のアッセイ法は、少なくとも下記工程（a）～（g）からなることを特徴とするものであって、さらに洗浄工程を含むことが好ましい。

30

【0015】

工程（a）：リガンドがその表面に固定化された粒子と、検体とを接触させる工程、

工程（b）：該工程（a）を経て得られた粒子に、該リガンドとは同じであっても異なってもよいリガンドと酵素とのコンジュゲートを反応させる工程、

工程（c）：該工程（b）を経て得られた粒子に、さらに酵素蛍光基質を反応させ、蛍光色素が生成される工程、

工程（d）：該工程（c）を経て得られた蛍光色素を単離する工程、

工程（e）：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（d）を経て得られた蛍光色素を接触させる工程、

40

工程（f）：該工程（e）で得ら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、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、および

工程（g）：該工程（f）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量を算出する工程。

【0016】

（工程（a））

工程（a）とは、リガンドがその表面に固定化された粒子と、検体とを接触させる工程である。

50

【0017】

「粒子」とは、本発明において、検体中に含有されるアナライトを検出するために使用される水不溶性の担体である。水不溶性の粒子を形成する材料は、水に不溶であればよい。なお、「水不溶性」とは、具体的に水、他のいかなる水溶液に溶解しない固相を意味する。粒子は、固定・分離などの用途に現在広く使用され、提案されている公知の支持体またはマトリックスのいずれであってもよい。

【0018】

水不溶性の粒子を形成する材料としては、無機化合物、金属、金属酸化物、有機化合物またはこれらを組み合わせた複合材料を含む。粒子の表面に固定化したりガンドが、検体中に含有されるアナライトを結合できるものであれば、粒子の材質・形状・サイズは特に限定されないが、好ましくは、リガンドの固定化量を多くする観点から、大きい表面積を与え得る材料である。

【0019】

粒子として使用される材料は、特に限定されるものではないが、一般に、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレン、ポリアミド、ラテックス等の合成有機高分子；ガラス、シリカ、二酸化珪素、窒化珪素、酸化ジルコニウム、酸化アルミニウム、酸化ナトリウム、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化亜鉛、酸化鉄、酸化クロム等の無機物；またはステンレス、ジルコニア等の金属などであってもよい。また、これらの材料は、一般に多孔質性の不規則な表面を有し、例えば、繊維、ウェブ、焼結体、多孔体などであってもよい。

【0020】

粒子の形状としては、例えば、球体状、楕円体状、錐体状、立方体状、直方体状などが挙げられる。これらのうち球体状の粒子は、製造が容易であり、使用時に粒子の回転撹拌が容易であることから好ましい。

【0021】

粒子のサイズ、すなわち平均粒子径としては、 $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ が好ましく、 $2 \sim 6 \mu\text{m}$ がより好ましい。平均粒子径が $0.5 \mu\text{m}$ 未満であると、粒子が磁性粒子である場合、十分な磁気応答性を発現せず、磁性粒子を分離するために相当に長い時間を要し、また分離するために極めて大きい磁力が必要となる。一方、平均粒子径が $10 \mu\text{m}$ を超えると、粒子が水溶液中で沈降しやすいものとなるため、検体を接触させる際に媒体を撹拌する操作が必要となる。また、粒子本体の表面積が小さくなるため、検体中に含有されるアナライトを捕捉することが困難となることがある。

【0022】

その表面も含めた粒子全体が同一の材料から構成されている態様の他に、必要に応じて複数の素材から構成されるハイブリット体から構成されていてもよい。例えば、分析の自動化に対応することができるために、コア部分は酸化鉄、酸化クロム等の磁気応答性材料で作製され、その表面を有機合成ポリマーで被覆された複合ビーズなどが挙げられる。

【0023】

このような「粒子」として、下記リガンドの表面固定化密度を容易に調節でき、B/F分離さらには固液分離が容易な観点から、磁性粒子が好ましく、図2に記載の工程(d)のように、磁性粒子を磁石の磁力によって容易に(固液)分離・回収することができる点で、該磁性粒子は、常磁性体、強常磁性体または強磁性体などの磁性体を含むものが好ましく、常磁性体および/または強常磁性体を含むものがより好ましい。特に残留磁化がないかまたは少ない点で、強常磁性体を用いることが好ましい。

【0024】

このような「磁性体」の具体例としては、四三酸化鉄(Fe_3O_4)、 γ -重三二酸化鉄($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、各種フェライト、鉄、マンガン、コバルト、クロム等の金属；コバルト・ニッケル・マンガン等の各種合金を挙げることができ、これらのうち、四三酸化鉄が特に好ましい。なお、コバルトおよびニッケルは、ヒスチジンタグと親和性を有する。

【0025】

粒子に用いられる「磁性体」は、小粒径の粒子よりなるビーズであって、優れた磁気分離性（すなわち、磁気によって短時間で分離する性能）を有し、かつ緩い上下震盪の操作によって再分散し得るものであることが好ましい。

【0026】

磁性粒子における磁性体の含有割合は、非磁性体の有機物質などの含有割合が30重量%以上であることから、70重量%以下とされ、好ましくは20～70重量%、より好ましくは30～70重量%であることが望ましい。このような含有割合が20重量%未満であると、十分な磁気応答性が発現されず、所要の磁力によって短時間で粒子を分離することが困難となることがある。一方、この含有割合が70重量%を超えると、粒子本体表面に露出する磁性体の量が多くなるため、該磁性体の構成成分、例えば、鉄イオンなどの溶出が発生し、使用時に他の材料に悪影響を及ぼすことがあり、また、粒子本体が脆くなって実用的な強度が得られないことがある。

10

【0027】

このような磁性粒子として、市販品も用いることができ、例えば、Dynabeadsシリーズ（Dynal Biotech ASA社製）などが挙げられる。

「リガンド」とは、検体中に含有されるアナライトを特異的に認識し（または、認識され）結合し得る分子または分子断片であって、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）等、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、糖鎖等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などであれば、特に限定されない。

20

【0028】

「タンパク質」としては、例えば、抗体などが挙げられ、具体的には、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CA19-9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。

【0029】

なお、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。

30

粒子表面へのリガンドの固定化方法としては、粒子表面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、粒子表面の性状によっては、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。

【0030】

「検体」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、緩衝液等によって適宜希釈して用いてもよい。これら検体のうち、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。

【0031】

上記検体中に含有される「アナライト」とは、上記粒子表面に固定化されたりリガンドを特異的に認識され（または、認識し）結合し得る分子または分子断片であって、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）等、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、糖鎖等）、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）等の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。

40

【0032】

リガンドがその表面に固定化された粒子と、検体とを接触させる条件として、温度は、

50

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。

【0033】

(洗浄工程)

洗浄工程とは、下記工程 (b) の前および／または後に含まれることが好ましく、上記工程 (a) で得られた粒子または下記工程 (b) で得られた粒子の表面を洗浄する工程である。

【0034】

該工程に使用される洗浄液としては、Tween 20、Triton X100 などの界面活性剤を、工程 (a) および (b) の反応で用いたものと同じ溶媒または緩衝液に溶解させ、好ましくは 0.00001～1 重量% 含有するものが望ましい。

10

【0035】

洗浄液を循環させる温度および流速は、上記工程 (a) の「送液を循環させる温度および流速」に等しいことが好ましい。

洗浄液を循環させる時間は、通常 0.5～180 分間、好ましくは 5～60 分間である。

【0036】

(工程 (b))

工程 (b) とは、上記工程 (a)、好ましくは上記洗浄工程を経て得られた粒子に、該工程 (a) で用いたりガンドとは同じであっても異なってもよいリガンドと酵素とのコンジュゲートを反応させる工程である。

20

【0037】

工程 (b) で用いるリガンドとは、検体中に含有されるアナライトを特異的に認識し結合し得る分子または分子断片であって、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）等、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、糖鎖等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などであれば、特に限定されず、また上記工程 (a) で用いたりガンドと同じであっても異なってもよい。

30

【0038】

「タンパク質」としては、例えば、抗体などが挙げられ、抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体に関わらず特に限定されるものではない。ただし、粒子表面に固定化された「リガンド」（工程 (a)）が、モノクローナル抗体である場合、工程 (b) で用いられる「リガンド」は、工程 (a) で用いた「リガンド」が認識する部位以外を認識することが好ましい。

【0039】

「酵素」としては、例えば、アルカリフォスファターゼ（ALP）、ペルオキシダーゼ（POD）、ガラクトシダーゼ（GAL）などが挙げられ、免疫反応、すなわちリガンドとアナライトとの反応に影響を及ぼしづらい分子サイズを有するという観点から、ALP、POD および GAL であってもよいが、本発明は特にこれらの酵素に限定されない。なお、これらの酵素は 1 種単独で用いることもでき、また 2 種以上併用することもできる。

40

【0040】

「リガンドと酵素とのコンジュゲート」とは、酵素により標識されたりガンドのことである。リガンドに酵素を標識する方法としては、ストレプトアビジン化された酵素をビオチン化されたりガンドと反応させる方法などが挙げられる。ストレプトアビジン化された酵素としては、市販品を用いてもよく、例えば、Phosphatase-labeled streptavidin（KPL 社製）などが挙げられる。

【0041】

このように作製された「酵素により標識されたりガンド」の濃度は、0.001～10

50

, 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましく、1 ~ 1, 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好ましい。

反応条件として温度および時間は、それぞれ上記工程 (a) の場合と同じであってもよい。

【0042】

(工程 (c))

工程 (c) とは、上記工程 (b)、好ましくは上記洗浄工程を経て得られた粒子に、さらに酵素蛍光基質を反応させ、蛍光色素が生成される工程である。

【0043】

「酵素蛍光基質」とは、上記「酵素」によって加水分解されることにより、蛍光色素を生成することができる物質であって、例えば、表 1 に記載の 1 ~ 8 などが挙げられる。

「蛍光色素」とは、本発明において、所定の励起光を照射する、または電界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。

【0044】

なお、表 1 中、POD は、ペルオキシダーゼ； βGlu は、 β グルコシダーゼ；GAL は、ガラクトシダーゼ；ALP は、アルカリホスファターゼを表す。

これら酵素蛍光基質のうち、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。

【0045】

酵素蛍光基質の自家蛍光波長は、該自家蛍光波長と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。

【0046】

10

20

【表 1】

	酵素蛍光基質	酵素	最大吸収波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)	製造会社
1	QuantaBlu(登録商標) Fluorogenic Peroxidase Substrate	POD	325	420	Pierce社
2	Amplex(登録商標) Red	POD	563	587	Molecular Probes社
3	3-p-Hydroxyphenyl propionic acid (HPPA)	POD	323	410	—
4	TokyoGreen(登録商標) - β Gl	β Glu	492	510	積水メディカル(株)社
5	4-Methylumbelliphenyl - β -D-galactoside	GAL	330	453	—
6	4-Methylumbelliphenylphosphate	ALP	330	453	—
7	1, 3-dichloro-9, 9-dimethyl-acridine-2-on e-7-yl phosphate (DDAO Phosphate)	ALP	647	656	Molecular Probes社
8	AttoPhos(登録商標)	ALP	482	560	Boehringer Mannheim社

表 1

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

(工程 (d))

工程 (d) とは、上記工程 (c) を経て得られた蛍光色素を単離する工程である。

蛍光色素を単離する方法としては、例えば、粒子が磁性粒子である場合は、磁力または遠心分離により、蛍光色素が含まれる溶液と粒子とを固液分離する方法が挙げられ、粒子が焼結体、多孔体または基板などの場合は、固液分離の方法を用いずに蛍光色素が含まれる溶液と粒子とを単離することができる。

【0048】

(工程 (e))

工程 (e) 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 (d) を経て得られた蛍光色素を接触させる工程である。

10

【0049】

「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、該スペーサ層は、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。

【0050】

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。

【0051】

20

「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 0.01~10 mm、より好ましくは 0.5~5 mm であれば、大きさ (縦×横) は特に限定されない。

【0052】

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。

30

【0053】

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。

酸による洗浄処理としては、0.001~1 N の塩酸中に、1~3 時間浸漬することが好ましい。

【0054】

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。

「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。

40

【0055】

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。

【0056】

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

50

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。

【0057】

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。

【0058】

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。

10

【0059】

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。

【0060】

「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。

20

【0061】

「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-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。

【0062】

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-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-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、金属薄膜の表面上で自己組織化し、SAMを形成する。

30

【0063】

「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（SiO₂）または二酸化チタン（TiO₂）を含むことが好ましい。

【0064】

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。

40

【0065】

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、またはスピニングによる塗布などが挙げられる。

【0066】

このような「プラズモン励起センサ」のスペーサ層側表面に、上記工程（d）を経て得られた蛍光色素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

50

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。

【0067】

「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近傍は管状を有することが好ましい。

【0068】

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、ポリオレフィン等となり、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、ポリプロピレン等のポリマーを用いる。

【0069】

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。

【0070】

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等の閉め具により固定する方法が好ましい。

【0071】

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。

【0072】

「送液」としては、検体を希釈した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。

【0073】

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20～40℃×1～60分間、好ましくは37℃×5～15分間である。

【0074】

送液中の検体中に含有されるアナライトの初期濃度は、100μg/mL～0.001pg/mLであってもよい。

送液の総量、すなわち流路の容積としては、通常0.001～20mL、好ましくは0.1～1mLである。

【0075】

送液の流速は、通常1～2,000μL/min、好ましくは5～500μL/minである。

(工程(f))

工程(f)とは、上記工程(e)で得ら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、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程である。

10

20

30

40

50

【0076】

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。

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10～20倍の増加量となる。

【0077】

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。

【0078】

「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。

【0079】

「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。

【0080】

「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。

「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。

【0081】

「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。

「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）、酵素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。

【0082】

「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。

【0083】

「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。

【0084】

表2に、蛍光色素として、それぞれAlexa Fluor（登録商標）647（表2中、条件1～3）およびHiLyte Fluor（登録商標）647（表2中、条件4

10

20

30

40

50

～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。

【0085】

表2中、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。

【0086】

表2から、蛍光色素が極微量な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、酵素反応により酵素蛍光基質から生成した蛍光色素が、少なくとも表2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、酵素蛍光基質を用いた本願のアッセイ法において、免疫測定結果として、高感度な測定の実現が可能であることを示している。

【0087】

【表2】

表2

		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

【0088】

また、表3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。

【0089】

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、10nM 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。

【0090】

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。

屈折率〔nd〕1.72、厚さ1mm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1～3nm、金薄膜の厚さは44～52nmである。

【0091】

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有したものである。

【0092】

【表3】

表3

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

10

【0093】

表3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。

20

【0094】

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等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。

【0095】

（工程（g））

工程（g）とは、上記工程（f）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量を算出する工程である。

30

【0096】

より具体的には、既知濃度の標的抗原もしくは標的抗体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被測定検体中の標的抗原量もしくは標的抗体量を測定シグナルから算出する工程である。

【0097】

<装置>

本発明の装置は、上記工程（f）に用いられることを特徴とするものである。

すなわち、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ものである。

40

【0098】

「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った送液系を有することが好ましい。送液系としては、送例えば、液ポンプと連結したマイクロ流路デバイスなどでもよい。

【0099】

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

50

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。）、S P F S 検出部に入力された情報を処理するためのコンピュータなども含んでもよい。

【0100】

光源、光学フィルタ、カットフィルタ、集光レンズおよびS P F S 検出部の好ましい態様は上述したものと同様である。

「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。

【0101】

<キット>

本発明のキットは、本発明の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、1次抗体、抗原などのリガンド、検体および2次抗体以外に必要なとされるすべてのものを含むことが好ましい。

【0102】

例えば、本発明のキットと、検体として血液または血清と、特定の腫瘍マーカーに対する抗体とを用いることによって、特定の腫瘍マーカーの含有量を、高感度かつ高精度で検出することができる。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。

【0103】

このような「キット」としては、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；検体を溶解または希釈するための溶解液または希釈液；プラズモン励起センサと検体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や上記「装置」を含めることもできる。

【0104】

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。

【実施例】

【0105】

次に、本発明について実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

〔作製例1〕（プラズモン励起センサの作製）

屈折率 $[n_d]$ 1.72、厚さ1mm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1～3nm、金薄膜の厚さは44～52nmであった。

【0106】

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1mM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。

【0107】

SAMの表面に、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。

【0108】

〔作製例2〕（アルカリフォスファターゼ標識2次抗体の作製）

2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

10

20

30

40

50

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。

【0109】

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アルカリフォスファターゼ（ALP）（Phosphatase-labeled streptavidin（KPL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。

【0110】

最後に、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、アルカリフォスファターゼ標識抗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定量後、4℃で保存した。

10

【0111】

〔作製例3〕（Alexa Fluor（登録商標）647標識2次抗体の作製）

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Alexa Fluor（登録商標）647（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。

【0112】

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、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定量後、4℃で保存した。

【0113】

20

〔実施例1〕

工程（a）として、まず抗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から入手）を1次抗体として用いて、磁性粒子であるDynabeads（Dynal Biotech ASA社製）に固定化した。その固定化方法は、Dynabeadsに添付のプロトコールに準じた。

【0114】

抗AFPモノクローナル抗体がその表面に固定化された磁性粒子（0.015重量%のTBS溶液に調製）100μLに、標的抗原としてAFP（1ng/mLのTBS溶液に調製）を含有する検体を接触させ、10分間反応させた。

【0115】

30

洗浄工程として、上記工程（a）を経て得られた粒子を磁石により集めることで固液分離し、該工程（a）を経た反応溶液の液体のみを廃棄した。残存した該粒子に対して、Tween20を0.05重量%含むTBS300μLを分注し、1分間攪拌した後に該粒子を磁石により集めた。このような洗浄工程を3回繰り返した。

【0116】

工程（b）として、上記洗浄工程を経て得られた粒子に、作製例2で得られた、アルカリフォスファターゼ標識抗AFPモノクローナル抗体（1,000ng/mLに調製したTBS溶液）を200μL添加し、10分間反応させた。

【0117】

洗浄工程として、上記工程（b）を経て得られた粒子を磁石により集めることで固液分離し、該工程（b）を経た反応溶液の液体のみを廃棄した。残存した該粒子に対し、Tween20を0.05重量%含むTBS300μLを分注し、1分間攪拌した後に粒子を磁石により集めた。このような洗浄工程を3回繰り返した。

40

【0118】

工程（c）として、上記洗浄工程を経て得られた粒子に、TBSで調整した酵素蛍光基質溶液（1,3-dichloro-9,9-dimethyl-acridine-2-one-7-yl phosphate（DDAO phosphate）（Molecular Probes社製））100μLを分注し、攪拌後、5分間反応させた。

【0119】

工程（d）として、上記工程（c）を経て得られた反応溶液を、磁石により粒子を集め

50

ることで固液分離を行い、蛍光色素溶液として単離した。

工程（e）として、上記工程（d）を経て得られた蛍光色素溶液を、作製例1で得られたプラズマ励起センサの表面に送液することで接触させた。

【0120】

工程（f）として、上記工程（e）で得られたプラズモン励起センサに、ガラス製の透明平面基板の、金薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズム（シグマ光機（株）製）を経由してレーザ光（640nm、40μW）を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を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。

【0121】

なお、AFPが0ng/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。

10

工程（g）として、上記工程（f）で得られた測定結果から、感度に関しては、アッセイS/N比を以下の式で評価し、精度に関しては、CV値を算出することで評価した。CV値は、同条件の6回測定の結果より、平均値に対する標準偏差の100分率の値を算出した。

【0122】

アッセイS/N比 = $\frac{|(\text{アッセイ蛍光シグナル})|}{|(\text{アッセイノイズシグナル})|}$
すなわち、アッセイS/N比から、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が充分小さければ、イムノアッセイ測定の信頼性が高いことがわかる。

20

【0123】

得られた結果を表4に示す。

〔比較例1〕

まず、作製例1で得られたプラズモン励起センサを流路に固定し、送液として超純水を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500μL/minで循環させ、その表面を平衡化した。

【0124】

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、抗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）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。なお、1重量%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、非特異的吸着防止処理を行った。

30

【0125】

送液をPBSに代え、AFPを1ng/mL含むPBS溶液を0.5mL添加し、25分間循環させた。

Tween20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。

【0126】

Alexa Fluor（登録商標）647を標識した2次抗体（1,000ng/mLとなるように調製したPBS溶液）を2.5mL添加し、20分間循環させた。

40

その後、Tween20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。

【0127】

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0ng/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。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。

【0128】

得られた結果を表4に示す。

50

〔比較例 2〕

まず、作製例 1 で得られたプラズモン励起センサを流路に固定し、送液として超純水を 10 分間、その後 PBS を 20 分間、ペリスタポンプにより、室温で流速 $500 \mu\text{L}/\text{min}$ で循環させ、その表面を平衡化した。

【0129】

続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) を 50 mM と、水溶性カルボジイミド (WSC) を 100 mM とを含む PBS 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 ($1 \text{ D}5$ 、 $2.5 \text{ mg}/\text{mL}$ 、(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。なお、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、非特異的吸着防止処理を行った。

【0130】

送液を PBS に代え、AFP を $1 \text{ ng}/\text{mL}$ 含む PBS 溶液を 0.5 mL 添加し、25 分間循環させた。

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。

【0131】

作製例 2 で得られたアルカリフォスファターゼ標識抗 AFP モノクローナル抗体 ($1,000 \text{ ng}/\text{mL}$ となるように調製した PBS 溶液) を 2.5 mL 添加し、20 分間循環させた。

【0132】

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。

TBS で調製した酵素蛍光基質溶液 ($1,3\text{-dicloro-}9,9\text{-dimethyl-}1\text{-acridine-}2\text{-one-}7\text{-yl phosphate}$ (DDAO phosphate) (Molecular Probes 社製)) $100 \mu\text{L}$ をプラズモン励起センサに導入し、5 分間反応させた。

【0133】

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 $0 \text{ ng}/\text{mL}$ 時の SPFS 測定シグナルをアッセイノイズシグナルとした。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。

【0134】

得られた結果を表 4 に示す。

【0135】

【表 4】

表 4

	AFP: $1 \text{ ng}/\text{mL}$		AFP: $0 \text{ ng}/\text{mL}$		アッセイ S/N 比
	平均値 (任意単位: au)	CV 値 (%)	平均値 (任意単位: au)	CV 値 (%)	
実施例 1	320540	2.3	8014	10.4	24.6
比較例 1	15011	6.3	2109	9.4	7.11
比較例 2	160403	9.1	22308	15.4	7.19

【0136】

表 4 から、免疫反応場と検出場とをそれぞれ完全に分離し、プラズモン励起を用いた蛍光測定イムノアッセイである実施例 1 は、比較例 1 と比較して、高い蛍光シグナル値とアッセイ S/N 比を達成しており、極めて高感度かつダイナミックレンジの広い測定が可能

であることがわかった。

【0137】

また、センサ基板上で酵素増幅させたイムノアッセイ結果である比較例2は、比較例1と比べるとシグナルが増幅された。しかしながら、ノイズも同様に上昇しており、同一基板上での増幅反応が、アッセイS/N比では優位性を見出すことができない。

【0138】

それに対して、実施例1においては、免疫反応（洗浄工程も含む）、増幅反応および検出反応のそれぞれを完全に分離することにより、各反応系を最適化することができ、高感度測定が可能となった。また、精度に関しても、比較例1および2と比較して実施例1のC/V値結果が良好となった。特にAFP（1 ng/mL）シグナル時に関して有意性が認められ、本発明が高感度かつ高精度な測定方法であることがわかった。

10

【産業上の利用可能性】

【0139】

本発明のアッセイ法は、高感度かつ高精度に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。

【図面の簡単な説明】

【0140】

【図1】図1は、免疫反応場において、検体中に含有される標的抗原3を、粒子1の表面に固定化した1次抗体2と、酵素により標識された2次抗体4とが認識し結合し、さらに蛍光基質（図示せず）を添加することによって、蛍光色素10が生成し、単離した蛍光色素10を、検出場である、ガラス製の透明平面基板6と、該基板6の一方の表面に形成された金薄膜7と、該薄膜7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（図示せず）とを有するプラズモン励起センサの該スペーサ層側の表面に接触させ、該基板6の、該薄膜7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ー光を照射し（図示せず）、蛍光色素10が表面プラズモンによって励起され発光している、本発明のアッセイ法の模式図を示す。

20

【図2】図2は、工程（a）～（c）：免疫反応場である試験管12中で、検体中に含有される標的抗原3を、磁性を有する粒子1の表面に固定化した1次抗体2と、酵素により標識された2次抗体4とが認識し結合して、さらに蛍光基質（図示せず）を添加することによって、蛍光色素10が生成し、工程（d）：試験管12の外側から磁石11を近づけることにより、蛍光色素10を単離し、工程（e）、（f）：検出場である、ガラス製の透明平面基板6と、該基板6の一方の表面に形成された金薄膜7と、該薄膜7の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成した誘電体からなるスペーサ層（図示せず）とを有するプラズモン励起センサの該スペーサ層側の表面に、単離した蛍光色素10を接触させ、該基板6の、該薄膜7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ー光を照射し（図示せず）、蛍光色素10が表面プラズモンによって励起され発光している、本発明のアッセイ法の模式図を示す。

30

【符号の説明】

40

【0141】

- 1・・・粒子
- 2・・・1次抗体
- 3・・・検体中に含有される標的抗原
- 4・・・2次抗体
- 5・・・ルテニウム錯体
- 6・・・ガラス製の透明平面基板
- 7・・・金薄膜
- 9・・・酵素
- 10・・・蛍光色素

50

- 1 1 . . . 磁石
- 1 2 . . . 試験管

【図 2】

