

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3664557号
(P3664557)

(45) 発行日 平成17年6月29日(2005.6.29)

(24) 登録日 平成17年4月8日(2005.4.8)

(51) Int.Cl.⁷

G O 1 N 21/05

F I

G O 1 N 21/05

請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平8-337961	(73) 特許権者	591005589
(22) 出願日	平成8年12月18日(1996.12.18)		ロッシュ デイアグノスティクス ゲゼル
(65) 公開番号	特開平10-176987		シャフト ミット ベシュレンクテル ハ
(43) 公開日	平成10年6月30日(1998.6.30)		フツング
審査請求日	平成15年3月27日(2003.3.27)		ドイツ連邦共和国、68305 マンハイ
			ム、ザントホーファー シュトラーセ 1
			16
		(74) 代理人	100065226
			弁理士 朝日奈 宗太
		(74) 代理人	100098257
			弁理士 佐木 啓二
		(72) 発明者	富田 裕之
			東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
			株式会社 日立製作所 中央研究所内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 フロースルーセル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料流体が流入する試料流入部と、試料流出部と、前記試料流入部と試料流出部とを接続する試料流路と、前記試料流路の壁面の一部である光出射面とを備えるフロースルーセルにおいて、前記光出射面は略軸対称な3次元形状を有し、前記光出射面と対向する前記試料流路の壁面は前記光出射面と略相似な表面形状を有し、前記光出射面以外の試料流路の壁面を光反射面とし、
前記光出射面は円柱面であり、前記試料流路は前記試料流入部から流入した試料流体を前記円柱面の周囲を2方向に分岐して流す
 ことを特徴とするフロースルーセル。 —

【請求項 2】

前記円柱面で囲まれた空間の内部に中心軸を前記円柱面の中心軸と略一致させた円錐状の光反射面を配置したことを特徴とする請求項1記載のフロースルーセル。

【請求項 3】

前記光出射面はドーム状のくぼみ面であることを特徴とする請求項1記載のフロースルーセル。

【請求項 4】

少なくとも前記光出射面と対向する前記試料流路の壁面の外部に磁石を配置したことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載のフロースルーセル。

【請求項 5】

10

20

前記磁石に隣接する流路内壁面に光を照射する手段を備えたことを特徴とする請求項 4 記載のフローセル。

【請求項 6】

前記試料流路の内壁に作用電極と対電極を配置したことを特徴とする請求項 4 記載のフローセル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、フローセルに関し、特に、蛍光法、電気化学発光法によりサンプル水溶液中の極微量のホルモン、腫瘍マーカー、薬物、酵素、サイトカイン、核酸等を定量するの

10

【0002】

【従来の技術】

免疫分析の分野では、試料中の極微量 (10^{-14} mol 以下) の測定対象分析物の存在及び濃度を測定するための分析法として、蛍光法、化学発光法及び電気化学発光法が利用されている。蛍光法は光励起により試料から発せられる発光を検出し、電気化学発光法は試料に電圧を印可したときに試料から発せられる発光を検出する。これらの方法は、ホルモン等の測定対象物質に抗原抗体反応により発光試薬を結合させ、発光試薬由来の発光を定量するもので、一般にフローセル中に試料を流しながら測定が行われる。一方、化学発光法は、例えば試験管内で発光試薬を混合し、試験管から 4π 方向に発せられる発光

20

【0003】

蛍光法や電気化学発光法のように、測定試料に対し光照射あるいは電圧印可を行う必要がある測定法では、バッチ方式よりフロー方式が測定時間の短縮の点で有利であり、かつ装置構成を簡単にできるため、装置コストの上昇を抑制でき、保守も行いやすい利点がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従来用いられてきたフローセルの形状は平面型であり、フローセル内で発生した発光の集光は一面方向のみに限られている。特に、電気化学発光法に用いられるフローセルの場合には、セルの内部に電極を有するという原理上の制約、及び電極表面の電位分布を均一に保つという要請により、平板構造の電極が多用されている。また従来、発光量の検知に用いられている光電子増倍管は、サイズが大きく、かつ受光面が一面であるということも平面型のセル形状が採用されてきた一因である。従って、従来のフローセルを用いた免疫分析では発光を効率よく集光することができず、極微量の測定対象分析物を高感度で検出することができなかった。

30

【0005】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みてなされたもので、試料からの微量な発光を効率よく集光して高感度で検出することのできるフローセルを提供することを目的とする。

40

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明においては、試料からの発光が射出するフローセルの光射出面を湾曲した 3 次元形状とし、光射出面以外の壁面を光反射面とするとともに試料から発生された発光を反射して光射出面に集光できるような形状として、試料からの発光を光反射性のセル壁面で反射させた後、光射出面を介してフローセルの外部に配置された光検出器に効率よく集光できるようにしたことで前記目的を達成する。

【0007】

すなわち、本発明は、試料流体が流入する試料流入部と、試料流出部と、試料流入部と試

50

料流出部とを接続する試料流路と、試料流路の壁面の一部である光出射面とを備えるフロースルーセルにおいて、光出射面は略軸対称な3次元形状を有し、光出射面と対向する試料流路の壁面は光出射面と略相似な形状を有し、光出射面以外の試料流路の壁面を光反射面としたことを特徴とする。

【0008】

光反射面とする試料流路の壁面は、試料流体と接する側の壁面とすることもできるし、試料流体と接しない外部表面とすることもできる。試料流路の外部表面を光反射面とする場合には、セル壁部を光透過性の材料で構成する必要がある。フロースルーセルを構成する材料には、蛍光法のように化学反応による劣化が生じない場合はアクリル板等の光透過性材料を採用することができ、電気化学発光法のように化学反応により試料溶液と接する面が腐食を受ける場合はポリメタクリル酸メチル等の腐食に強い高分子材料を光透過性材質として用いることができる。

10

【0009】

光反射面は、化学反応による劣化が生じない場合には、Al, Ag, Au等の金属材料によるメッキや蒸着等の鏡面処理、あるいはそれらの金属そのものを壁面に用いることで形成することができ、試料溶液と接する面が腐食を受ける場合はPt等の腐食に強い金属材料をメッキや蒸着することで形成することができる。

【0010】

光出射面は円柱面とすることができ、試料流路は試料流入部から流入した試料流体を円柱面の周囲を2方向に分岐して流す流路とすることができ、この場合、光検出器として近年開発され改良が進んでいる小型の光電子増倍管またはフォトダイオード等の小型光電セルを採用し、その光検出器を円柱面で囲まれた空間中に配置することで、試料からの発光を効率的に集光して検出することができる。

20

【0011】

また、円柱面で囲まれた空間の内部に中心軸を円柱面の中心軸と略一致させた円錐状の光反射面を配置すると、試料からの発光をフロースルーセルの外部に配置された光検出器に効率よく導いて検出することができる。

光出射面は半球状面、放物面等のドーム状のくぼみ面としてもよく、この場合にもドーム状の光出射面によって形成されるくぼみの近くに、あるいはくぼみに一部挿入されるようにして光検出器を配置することで、光出射面と略相似形の光反射面によって反射集光されてきた試料からの発光を効率よく検出することができる。

30

【0012】

また、少なくとも光出射面と対向する試料流路の壁面の外部に磁石を配置することができる。フロースルーセルの外部に磁石を配置することで、磁性ビーズを用い、B/F分離を行って測定精度を向上させる方法を採用することができる。磁石は、電磁石であってもよいし、永久磁石であってもよい。磁石の磁力によってフロースルーセルの壁面に捕捉されている磁性ビーズは、分析終了後、電磁石への通電を遮断して、あるいは永久磁石を機械的にフロースルーセルより遠ざけて磁力を弱めることにより、フロースルーセルから排出する。

【0013】

フロースルーセルを蛍光分析法で使用する場合には、測定対象物質に結合した発光試薬に励起光を照射するために、磁石に隣接する流路内壁面に光を照射する手段を備える。光照射手段は、ハロゲンランプ等の光源からの光を光ファイバーで導き、光反射面の一部に設けた光透過窓を介して、あるいは光透過性の光射出面を介して、測定対象に対してラベルされた発光性物質に励起光を照射する。

40

【0014】

フロースルーセルを電気化学発光分析法で使用する場合には、試料流路の内壁に測定対象に対してラベルされた発光性物質に電圧を印可するための作用電極と対電極を配置する。このとき、試料流路の内壁にPt等の電気化学腐食に強い金属材料の薄膜をメッキあるいは蒸着することで作用電極とし、その近傍に、やはりPt等の金属材料の薄膜をメッキあ

50

るいは蒸着することで、Pt等の金属材料薄膜によって光反射面と電極とを兼用させることができる。

【0015】

本発明によると、測定対象に対してラベルされた発光性物質由来の発光が光検出器に入る際の実効的な立体角を 2π 以上に大きくすることができ、試料溶液から発せられる微弱な光を効率よく集光して測定することで測定感度の向上を図ることができる。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

図1及び図2は、本発明によるフロースルーセルの一実施の形態である“ドーナツ型”のフロースルーセルを蛍光分析法に適用した場合の概略図である。図1は構造を見やすくするためにセルの外部に配置される一対の磁石のうちの一方を取り除いた状態の一部破断斜視図、図2(a)は平面図、図2(b)は側面図である。

10

【0017】

この実施の形態のフロースルーセルは、中央部に設けられた円柱状の空間10を包囲して円環状の試料流路を形成するセル本体1と、セル本体1の試料流路に接続された試料流入部11及び試料流出部12を備える。図示の例では、フローセル中央部の円柱状空間10は上部が閉じており、この円柱状空間10中に小型光電子増倍管等の光検出器2が配置される。

【0018】

20

セル本体1はアクリル又はポリメタクリル酸メチル等の光透過性を有する高分子材料で構成され、光検出器2が配置されている円柱状空間10の円柱面14を除いて、外側の円柱面13、上面15及び下面16にAl, Ag, Au等の金属によるメッキ処理を施すことで試料流路側の表面を光反射面としている。内側の円柱面14はメッキ処理を施さずに透明なままとされる。また、セル本体1の上面15には光透過性の窓17が複数設けられ、光ファイバー4によって導かれたハロゲンランプ等の光源5からの励起光を、この光透過性の窓17を介してフロースルーセル本体1内に導入し、試料流路外側面13の内側表面に照射できるようになっている。

【0019】

また、フロースルーセル本体1の外側面13の外周に沿って、磁石3a, 3bが配置されている。この磁石3a, 3bの磁力は、電磁石であれば励磁電流をオン・オフすることで、また永久磁石であればセル本体1との距離を変化させることで制御できる。この例で用いた磁石3a, 3bは永久磁石である。磁石3a, 3bは、図ではセル本体1と間隔をあけて配置されているが、分析時にはセル本体1の外壁に密着して配置される。

30

【0020】

次に、このフロースルーセルを用いた蛍光免疫分析法について説明する。例えば、抗体を2種類の抗原で挟んで認識するサンドイッチ法の場合、試料は、(1)抗原認識部位1と蛍光試薬を結合した物質、(2)抗原認識部位2とビオチンを結合した物質、(3)表面にストレプトアビジンをコーティングした直径数マイクロメートルの磁性ビーズ、の3種類の物質を、測定対象の抗体を含む試料溶液に加えて調製される。この後、試料溶液を37でインキュベートすることで(1)と(2)が測定対象抗体をその両側から抗原抗体反応によりサンドイッチし、かつ(2)と(3)がアビジン-ビオチン反応により結合する。これらの反応により抗体に蛍光試薬を結合し、かつ磁性ビーズ上に結合することができる。

40

【0021】

こうして調製された、測定対象を含む試料溶液は、試料流入部11よりフロースルーセル本体1に流入され、円柱状空間10の左右の流路に分かれて流れる。このとき、試料溶液が左右の流路に円滑に分流されるように、仕切板18a, 18bを設けてもよい。試料溶液中の磁性ビーズは、フロースルーセル本体1の外側に配置された磁石3a, 3bの磁力によりセル本体1の外側面13の内壁上に捕捉される。磁性ビーズ以外の成分は試料流出

50

部 1 2 より排出される。こうして抗体と結合した蛍光試薬と抗体に結合していない蛍光試薬の分離 (B / F 分離) を行うことで、抗体と結合していないフリーな蛍光試薬の影響を受けずに免疫分析を行うことができる。

【 0 0 2 2 】

蛍光法の場合、ラベル物質を光励起する必要があるので、光ファイバー 4 によって導かれたハロゲンランプ等の光源 5 からの光を光透過性の窓 1 7 を介してセル本体 1 内に導入し、外壁面 1 3 の内壁上に捕捉されている磁性ビーズに照射する。磁性ビーズ上に結合した蛍光試薬から発生された蛍光は、光反射面となっているセル本体 1 の側面 1 3、上面 1 5 及び下面 1 6 で反射され、セル本体 1 の中央部に集光されて光透過性の円柱面 1 4 から射出し、光検出器 2 によって効率よく検出される。

10

【 0 0 2 3 】

一回の測定が終了したのち、セル内部を洗浄するための洗浄液を試料流入部 1 1 より導入し、かつ磁石 3 a , 3 b の磁力を弱くする (磁石 3 a , 3 b が永久磁石の場合には、セル本体 1 から離す) ことで、磁性ビーズを含めて測定済みの試料溶液が試料流出部 1 2 より排出される。このように、フロースルー方式であるため、数多くの試料溶液を短時間で連続測定することが可能である。

【 0 0 2 4 】

上の例では、セル本体 1 の外表面を光反射面としたが、試料溶液に接するセル本体 1 の内表面をメッキ等により光反射面としてもよい。また、セル本体 1 の中央部に設ける円柱状空間 1 0 は、図 3 に示すように上下に貫通した穴としてもよい。

20

【 0 0 2 5 】

図 4 及び図 5 は、本発明によるフロースルーセルの他の実施の形態を説明する概略図である。先の実施の形態では、フロースルーセルの中央部に形成された円柱状空間の内部に小型光電子増倍管等の光検出器を配置した。それに対して、ここで説明するのは、光検出器としてフォトダイオードを用いた例である。図 4 は図 1 に対応する一部破断斜視図、図 5 は図 2 に対応する平面図及び側面図である。図 4 及び図 5 において、図 1 及び図 2 と同様の部分には図 4 及び図 5 と同じ符号を付し、その詳細な説明を省略する。

【 0 0 2 6 】

この実施の形態では、セル本体 1 の中央部の円柱状空間 1 0 に面するようにフォトダイオード 2 0 を配置する。円柱状空間 1 0 の内部には、光反射性の円錐面 2 5 を付加する。光透過性の円柱状壁面 1 4 より射出した蛍光は、円錐面 2 5 により反射されて進路を曲げられ、セル本体 1 の下方に配置されたフォトダイオード 2 0 の受光面に入射する。フォトダイオード 2 0 には、低雑音 I - V 変換部 2 1、電圧制御部 2 2、BNC コネクタ 2 3、高電圧発生部 2 4 等により構成された信号処理回が接続されている。BNC コネクタ 2 3 よりの信号は、A / D 変換することにより、パーソナルコンピュータによる処理を行うことができる。

30

【 0 0 2 7 】

図示した磁石 3 a , 3 b は永久磁石である。磁石 3 a , 3 b は、図 5 ではセル本体 1 と間隔をあけて配置されているが、分析時にはセル本体 1 の外壁に密着して配置され、セル内部の洗浄時にはセル本体 1 から離して配置される。

40

【 0 0 2 8 】

図 6 は、本発明のフロースルーセルを電気化学発光法に適用した場合の概略図である。ここでは、受光部として図 4 と同様にフォトダイオードを用いた例について説明するが、図 1 のようにセル本体 1 中央部の円柱状空間 1 0 内に配置した小型光電子増倍管等の光検出器を用いることももちろん可能である。図 6 において、図 4 と同様の部分には図 4 と同じ符号を付し、その詳細な説明を省略する。また、図 6 では図を見やすくするため、図 4 と同様に一對の磁石 3 a , 3 b の一方を図示省略している。

【 0 0 2 9 】

電気化学発光法の場合は、蛍光法のように光励起する必要が無いので、図 1 に示したような光源 5、光ファイバー 4、光透過性の窓 1 7 は設ける必要がない。その代わり、P t 等

50

から成る作用電極 30 を試料流路を構成する外側面 13 の内面に試料溶液に接するように配置し、さらに Pt 等から成る対電極 31a ~ 31d を同様に試料溶液に接するようにして作用電極 30 の近傍に配置する。

【0030】

対電極 31a ~ 31d は、図では 4 個設けているが、上面 15 の内面に設けた対電極 31a, 31b のみ、あるいは下面 16 の内面に設けた対電極 31c, 31d のみとしてもよい。また、光反射面は、試料流路の内面に設けた作用電極 30 及び対電極 31a ~ 31d によって兼用することができる。

【0031】

次に、このフローセルを用いた電気化学発光免疫分析法について説明する。例えば、抗体を 2 種類の抗原で挟んで認識するサンドイッチ法の場合、試料は前記した蛍光免疫分析法の場合と同様にして処理され、抗体に発光試薬が結合され、かつ磁性ビーズ上に結合される。こうして調製された、測定対象を含む試料溶液は、試料流入部 11 よりフローセル本体 1 に流入され、円柱状空間 10 の左右の流路に分かれて流れる。試料溶液中の磁性ビーズは、フローセル本体 1 の外側に配置した磁石 3a, 3b の磁力によりセル本体 1 の外側面 13 の内壁上に捕捉され、磁性ビーズ以外の成分は試料流出部 12 より排出される。

10

【0032】

セル本体 1 内に磁性ビーズを捕捉した後、作用電極 30 と対電極 31a ~ 31d との間に 2.0 ~ 2.4 V 程度の電圧を印可すると、発光試薬はこの電圧印可によって発光する。試薬からのこの発光は、光反射面となっているセル本体 1 の側面 13、上面 15 及び下面 16 で反射され、セル本体 1 の中央部に集光されて光透過性の円柱面 14 から射出し、光検出器 20 によって効率よく検出される。一回の測定が終了したのち、セル内部を洗浄するための洗浄液を試料流入部 11 より導入し、かつ磁石 3a, 3b の磁力を弱くすることで、磁性ビーズを含めて測定済みの試料溶液が試料流出部 12 より排出される。

20

【0033】

図 7 及び図 8 は、本発明によるフローセルの他の実施の形態である“くぼみ型”のフローセルを蛍光法に適用した場合の概略図である。図 7 は励起光照射光学系、光検出器としてのフォトダイオード、及び装着する磁石を備えた状態の斜視図、図 8 (a) はセル本体の平面図、図 8 (b) はセル本体の側面図である。

30

【0034】

この実施の形態のフローセルは、本体がアクリル又はポリメタクリル酸メチル等の光透過性を有する高分子材料で構成され、中央部に半球状、放物面状等をしたドーム状のくぼみ 40 を有する。くぼみ 40 の周囲には、ほぼ均一の厚さを有する試料流路 45 が形成されている。くぼみ 40 を形成する流路壁面すなわちくぼみ面 44 は光透過性であり、その光透過性のくぼみ面 44 に対向する凸状の曲面 43 は内面あるいは外面に Al, Ag, Au 等の金属をメッキすることによって光反射性を付与されている。

【0035】

凸状曲面 43 の外部には、凸状曲面 43 にぴったりはまりこむようにして磁石 47 が配置される（図 7 には、磁石 47 を凸状曲面 43 から離して図示してある）。くぼみ 40 の側にはフォトダイオード 20 が配置され、また、光ファイバー 4 によって導びかれたハロゲンランプ等の光源 5 からの励起光を、光透過性のくぼみ面 44 を介して試料流路 45 内に導入できるようになっている。

40

【0036】

次に、このフローセルを用いた蛍光免疫分析法について説明する。例えば、抗体を 2 種類の抗原で挟んで認識するサンドイッチ法の場合、試料は前記した蛍光免疫分析法の場合と同様にして処理され、抗体に蛍光試薬が結合され、かつ磁性ビーズ上に結合される。このようにして調製された試料溶液は、試料流入部 41 よりフローセル本体に流入され、ドーム状のくぼみに沿った試料流路 45 内を流れる。試料溶液中の磁性ビーズは、フローセル本体 1 の外側に配置した磁石 47 の磁力により試料流路 45 を形成す

50

る凸状曲面 4 3 の内壁上に捕捉される。磁性ビーズ以外の成分は試料流出部 4 2 より排出される。

【 0 0 3 7 】

光ファイバー 4 によって導かれた励起光は光透過性のくぼみ面 4 4 を介してセル本体内に導入され、凸状曲面 4 3 の内壁上に捕捉されている磁性ビーズに照射される。磁性ビーズ上に結合した蛍光試薬から発生された蛍光は、光反射面となっている凸状曲面 4 3 で反射され、くぼみ 4 0 側に集光されて光透過性のくぼみ面 4 4 から射出し、フォトダイオード 2 0 によって効率よく検出される。一回の測定が終了したのち、セル内部を洗浄するための洗浄液を試料流入部 4 1 より導入し、かつ磁石 4 7 の磁力を弱くすることで、磁性ビーズを含めて測定済みの試料溶液が試料流出部 4 2 より排出される。

10

【 0 0 3 8 】

ここでは蛍光法に適用した場合について説明したが、励起光照射光学系の代わりに試料流路 4 5 の内面に作用電極と対電極を配置することにより、図 7 及び図 8 に示したフロースルーセルを電気化学発光法に適用することもできる。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

本発明によると、測定セル構造を集光性に優れた形状としたことにより、低コストで蛍光法及び電気化学発光法の測定感度を向上することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明によるフロースルーセルの一例を示す一部破断斜視図。

20

【図 2】図 1 に示したフロースルーセルの、(a) は平面図、(b) は側面図。

【図 3】本発明によるフロースルーセルの他の例を示す一部破断斜視図。

【図 4】本発明によるフロースルーセルの他の例を示す一部破断斜視図。

【図 5】図 4 に示したフロースルーセルの、(a) は平面図、(b) は側面図。

【図 6】本発明によるフロースルーセルの他の例を示す一部破断斜視図。

【図 7】本発明によるフロースルーセルの他の例を示す斜視図。

【図 8】図 7 に示したフロースルーセルのセル本体の、(a) は平面図、(b) は側面図。

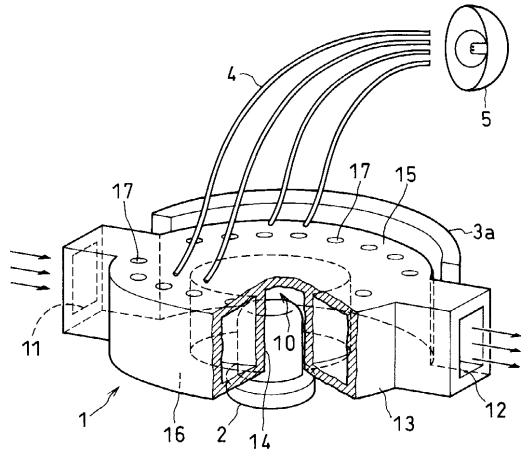
。

【符号の説明】

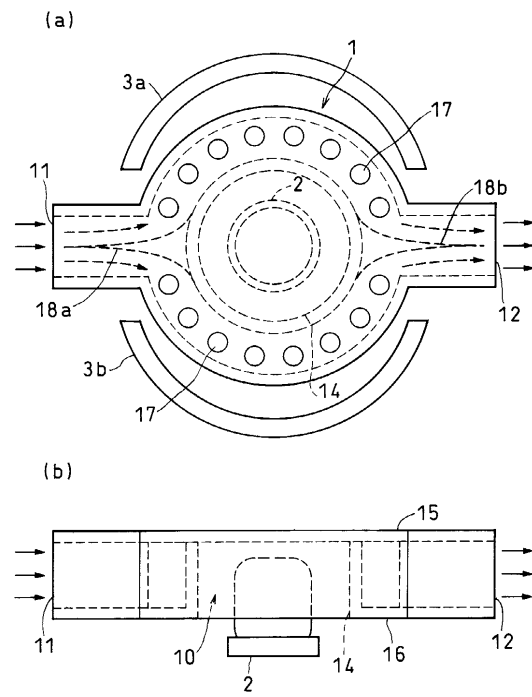
1 ... セル本体、2 ... 光検出器、3 a , 3 b ... 磁石、4 ... 光ファイバー、5 ... 光源、1 0 ... 円柱状空間、1 1 ... 試料流入部、1 2 ... 試料流出部、1 3 ... 外側面、1 4 ... 円柱面、1 5 ... 上面、1 6 ... 下面、1 7 ... 光透過性の窓、1 8 a , 1 8 b ... 仕切版、2 0 ... フォトダイオード、2 1 ... 低雑音 I - V 変換部、2 2 ... 電圧制御部、2 3 ... BNC コネクタ、2 4 ... 高電圧発生部、2 5 ... 光反射性円錐面、3 0 ... 作用電極、3 1 a ~ 3 1 d ... 対電極、4 1 ... 試料流入部、4 2 ... 試料流出部、4 3 ... 凸状曲面、4 4 ... くぼみ面、4 5 ... 試料流路、4 7 ... 磁石

30

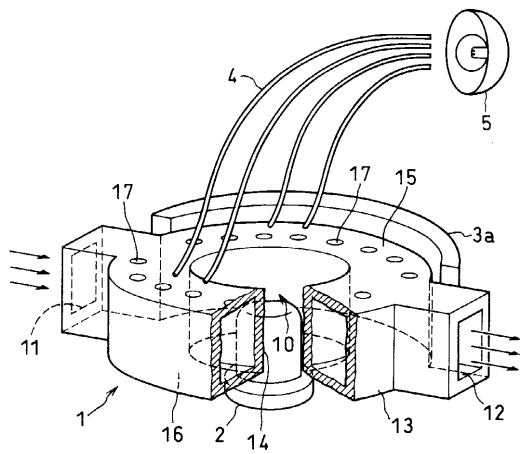
【図 1】



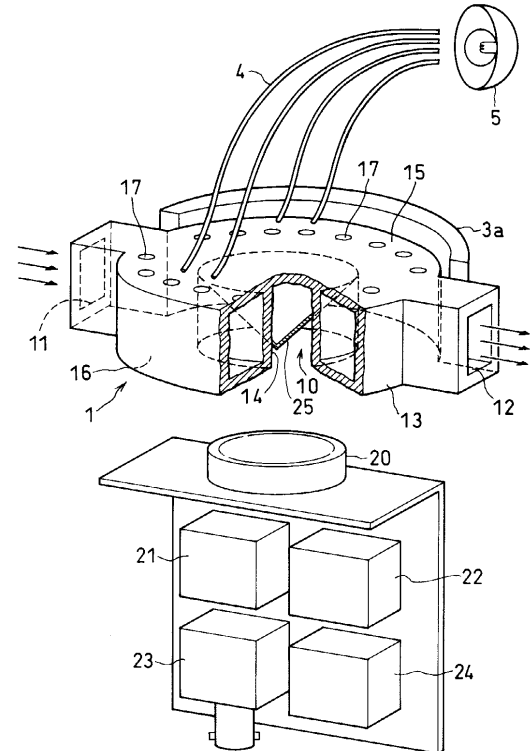
【図 2】



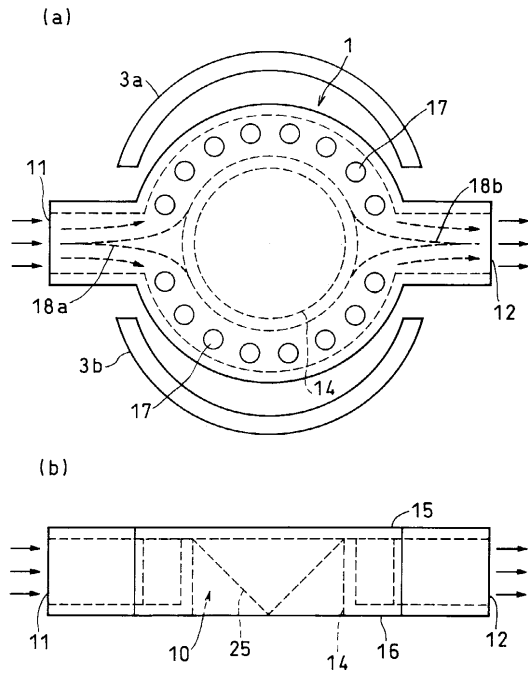
【図 3】



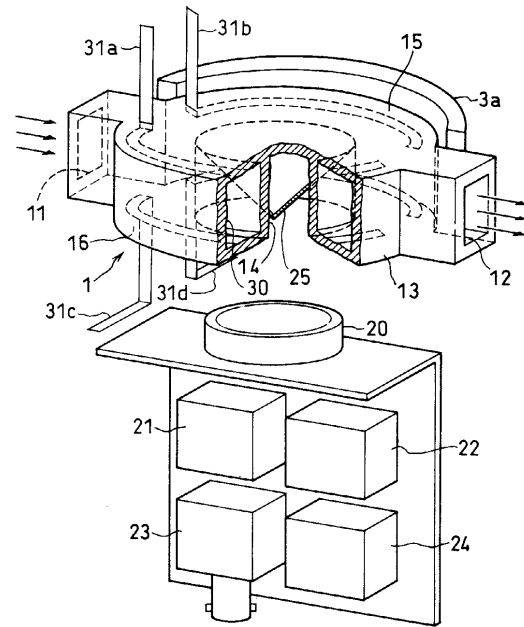
【図 4】



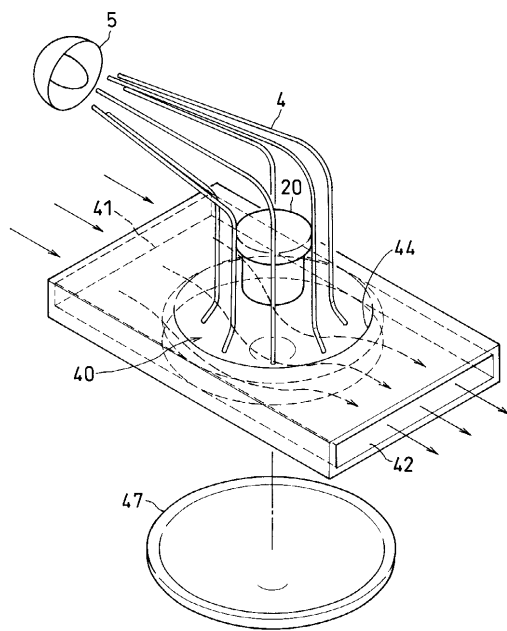
【図 5】



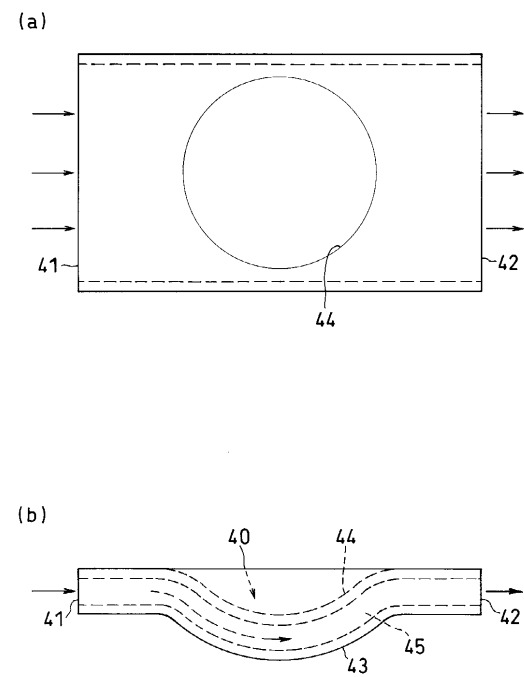
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(72)発明者 宮原 裕二

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作所 中央研究所内

(72)発明者 梶山 智晴

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作所 中央研究所内

審査官 横井 亜矢子

(56)参考文献 特開平05-240774(JP,A)

特開平10-115584(JP,A)

特開昭61-132842(JP,A)

特表平07-500191(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 21/00-21/83

G01N 33/48-33/98