

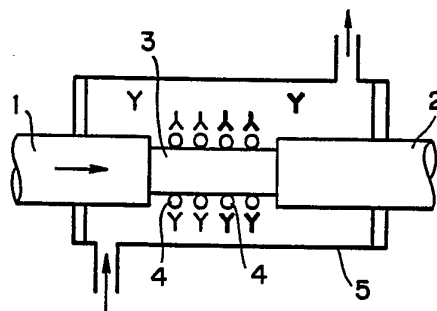


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類5 G01N 33/533, 33/543, 33/58 G01N 21/78</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 90/13029</p> <p>(43) 国際公開日 1990年11月1日(01. 11. 1990)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP90/00514 (22) 国際出願日 1990年4月19日(19. 04. 90)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平1/97481 1989年4月19日(19. 04. 89) JP 特願平1/97482 1989年4月19日(19. 04. 89) JP 特願平1/185893 1989年7月20日(20. 07. 89) JP 特願平1/314404 1989年12月5日(05. 12. 89) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) イビデン株式会社 (IBIDEN CO., LTD.) [JP/JP] 〒503 岐阜県大垣市神田町2丁目1番地 Gifu, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 小林 猛 (KOBAYASHI, Takeshi) [JP/JP] 〒464 愛知県名古屋市中千種区下方町4-29 Aichi, (JP) 本多裕之 (HONDA, Hiroyuki) [JP/JP] 〒465 愛知県名古屋市中東区よもぎ台3-1410 Aichi, (JP) 島田憲一 (SHIMADA, Kenichi) [JP/JP] 〒503 岐阜県大垣市河間町3丁目200番地 イビデン株式会社内 Gifu, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime) 〒107 東京都港区赤坂2丁目10番8号 第一信和ビル Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 JP, US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: REAGENT FOR ASSAYING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, METHOD OF PRODUCTION THEREOF, AND METHOD AND APPARATUS FOR ASSAYING

(54) 発明の名称 生体活性物質測定用試薬、その製法、測定方法及び装置



(57) Abstract

A reagent for assaying a biologically active substance comprising a combination of (fluorochrome)_n-avidin-a compound having a number of reactive groups, or one wherein avidin is bound via biotin to the compound having a number of reactive groups; a method of producing the reagent; an optical fiber made of a resin necessary for utilizing the reagent; an apparatus for assaying provided with a detecting unit utilizing the optical fiber; and a method of assaying the biologically active substance with the use of the above reagent and apparatus. This assaying method can be employed in the immunoassay of trace amounts of biologically active substances contained in blood or a humor for medical diagnosis, such as antigens, antibodies or enzymes, with a remarkably improved sensitivity of detection.

(57) 要約

本発明は、(蛍光色素)_n-アビジン-複数の反応活性基を有する化合物-生体活性物質、又は上記においてアビジンがビオチンを介して複数の反応活性基を有する化合物に結合している生体活性物質測定試薬、その製造方法、これを利用するために必要な樹脂性光ファイバー、この光ファイバーを利用した検出部を有する測定装置、及びこれら試薬と装置を用いる生体活性物質の測定方法である。

この測定方法は、医療診断における血液又は体液中に極微量含まれている抗原、抗体、酵素などの生体活性物質の免疫測定法に用いることができ、検出感度を大幅に向上させるものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバードス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NO ノルウェー
BJ バナン	HU ハンガリー	RO ルーマニア
BR ブラジル	IT イタリア	SD スーダン
CA カナダ	JP 日本	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SN セネガル
CG コンゴ	KR 大韓民国	SU ソビエト連邦
CH スイス	LI リヒアンシェタイン	TD チャード
CM カメルーン	LK スリランカ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	LU ルクセンブルグ	US 米国
DK デンマーク	MC モナコ	

明 細 書

生体活性物質測定用試薬、その製法、測定方法及び装置

〔技術分野〕

本発明は、免疫測定法による生体活性物質の測定に使用できる試薬、その製法、これを利用するために必要な樹脂性光ファイバー、この光ファイバーを利用した検出部を有する測定装置、及びこれら試薬と装置を用いる生体活性物質の測定方法に関する。

〔背景技術〕

従来、医療診断、臨床検査などの研究分野において極微量成分を検出する方法として、種々の免疫測定法が知られており、これに関しては色素で標識された試薬、測定方法、あるいは装置などについて様々な技術が提案されている。

1) 標識試薬

標識試薬には、従来、放射性同位元素、発光剤、酵素で標識された抗原、抗体などが開発されてきた。

この中で、最も感度が高いものは、放射性同位元素で標識されたものであるが、取り扱いが容易でない。また酵素で標識されたものは、一部の物質に対してのみ有効である。このため、発光剤標識試薬の高感度化

が望まれている。

このような、発光免疫測定法に使用できる高感度試薬として特開昭58-61468号には、複数個のルミネセントが結合した有機高分子化合物と抗体又は抗原のいずれかと結合した免疫試薬及びそれを用いた免疫定量法が、また米国特許4166105号には、多官能性ポリマー骨格分子アナライト体と特異的に反応可能な第一反応体（抗体）で、多数の蛍光染料分子が結合したアナライト体の検出試薬がそれぞれ提案されている。しかしながら、これらの試薬は、結合させることができる色素の量が充分ではないため、長波長で励起される感度の低い色素を用いた場合には、検出感度が実用的でないという問題がある。

また、特開昭60-252265号には、発光剤が結合した水溶性有機高分子化合物をアビジンに結合させ、これを用いた生物学的に活性な物質の測定方法が開示されている。しかしながら、この試薬及び方法は、抗体あるいは抗原を分子量の小さいビオチンを介してアビジンに結合させているため、抗体あるいは抗原のまわりに多量のビオチンが結合し、免疫活性を減退させる可能性があり、これを防ぐ処理を講ずる必要があること、また、水溶性高分子をアビジンに結合させるのは立体障害により結合させにくいという問題が

ある。

2) 発光免疫分析用光ファイバー

発光免疫分析では、光ファイバーを利用して蛍光色素（発光剤）を励起したり、蛍光を伝播する方法が有効であり、種々の技術が開示されている。

光ファイバーをセンサーとして使用するためには、抗原、抗体を光ファイバーに固定化する必要がある、このための技術として、セロファンなどの膜に抗原、抗体などを固定化させる膜固定化法、アクリルアミドゲルなどの空隙に抗原、抗体などを封じ込める包括法などがあるが、前者は、光散乱による感度低下が、後者は、応答性が悪いという問題があった。このため、光ファイバーに直接抗原、抗体などを共有結合させる方法として、Analytical Chemistry Vol. 59 No. 8 p1226~1230 (1987)には、石英製光ファイバーの表面のシラノール基にシランカップリング剤である（3-グリシドキシプロピル）トリメトキシシラン（GOPS）を反応させ、次いでこれを HIO_4 で処理して、石英製光ファイバーの表面にホルミル基を導入し、このホルミル基に蛋白質のアミノ基を反応させて固定化する方法が開示されている。しかしながら、この方法は、石英ファイバーにのみ有効な方法であり、樹脂製光ファイバーには使用できない。樹脂製光

ファイバーは、値段も安価で、研磨加工しやすく、柔軟であり、取り扱いやすいため、樹脂製ファイバーに抗原や抗体などの蛋白質を結合させる方法が望まれている。

また、光ファイバーを用いた装置としては、特開昭59-501873号（米国特許4582809）に免疫検定装置及び方法が、また特開昭62-123358号、特開昭62-501102号（スイス特許出願5306/84-5号）に光ファイバー型免疫センサーがそれぞれ提案されている。しかしながら、これらの明細書には、抗原、抗体の高感度標識を行うための技術は何ら記載されておらず、このため、光源として、Hgランプ、XeランプやArレーザで励起するような感度の高い蛍光色素を用いた場合にしか利用できず、また、装置が大型で、高価なものになるという問題がある。

3) 測定方法

発光剤を使用した免疫測定の方法も種々提案され、例えば、特開昭60-24450号には、ビオチン-アビジン結合により免疫複合体に結合した発光剤結合アビジンの発光反応による発光量を測定する生物学的に活性な物質の測定方法が提案されている。この方法は発光剤と抗体又は抗原の間にアビジン-ビオチン結

合を介しているが、他の有機高分子化合物を介していないため、結合できる色素量が少なく、低感度の色素を使用できないという問題がある。また、ビオチン-アビジン結合を用いた試薬としては、特開昭58-30667号（スイス特許出願6989/81-01号）に標識化された免疫活性物質が提案されている。しかし、この技術は免疫物質が酵素で標識させており、酵素活性を測定するための処理が面倒であるという問題がある。

[発明の開示]

本発明者は、鋭意研究した結果、生体活性物質の濃度を測定する方法において、測定感度をさらに向上させるためには、蛋白分子1個あたりの蛍光色素の結合量を増やす必要があり、このために、生体活性物質を反応活性基を多数有する化合物に結合させ、各反応活性基に蛍光色素が多数結合した化合物を結合させることに想達した。また、蛍光色素の発する光を効率良く集光し、測定できるような光ファイバーからなる検出部と、これを具備する装置、及びこれら試薬と装置を使用した測定方法の開発に成功した。

(生体活性物質測定試薬)

本発明の生体活性物質測定試薬は、蛍光標識体が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反

応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合していることを特徴としている。

本発明で述べるところの蛍光色素とは、光にて励起される色素を指し、化学発光や生物発光する蛍光色素を意味しない。前記光は、レーザ光などのコヒーレント光が望ましい。

前記生体活性物質測定試薬は、複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基の大部分に、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合した該複数の反応活性基を有する化合物を、生体活性物質と結合させることにより、生体活性物質当りの蛍光色素の結合量を増やすことにより、検出感度を飛躍的に向上させるものである。

前記反応活性基としては、アミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ホルミル基などが挙げられるが、特にアミノ基が望ましい。この理由は、アミノ基は比較的反応活性が高く、生成した結合が安定なためである。

また、前記反応活性基は、1分子あたり20～100000個存在していることが望ましい。この理由は、20個より少ない場合は、検出感度の向上が期待できず、100000個より多い場合、このような

高分子を溶媒に溶解させることが困難なためである。
前記反応活性基は、1分子当り3000～6000個存在していることがより好ましく、4000～5000個が好適である。

前記複数の反応活性基を有する化合物は、アミノグルカンあるいはポリアミノペプチドなどの化合物であることが望ましい。この理由は、これらの化合物には4000～5000個のアミノ基が存在しているためである。

前記アミノグルカンとしては、キトサン、ポリガラクトサミン、ポリノイラミン酸などを用いることができるが、キトサンを用いることが好適である。

また、前記ポリアミノペプチドとは、アミノ基を2つ以上有するアミノ酸がペプチド結合により重合したものであって、ポリリジンなどが挙げられる。

本発明で使用する蛍光色素で修飾される化合物は、分子量1000程度の準高分子(semi-high molecule)以上の分子量をもつ天然高分子化合物であることが望ましい。

天然高分子化合物は比較的容易に入手できるアビジン、プロテインA、抗体、ホルモン、ホルモンレセプターなどが望ましい。

前記複数の反応活性基を有する化合物と生体活性物質との結合、及び複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基と複数の蛍光色素で修飾された化合物との結合は、適当な架橋剤を用いることができる。

また、前記化合物は、該化合物と特異的に結合する物質を介して、前記複数の反応活性基を有する化合物に結合されていることが好ましい。

例えば、前記化合物が、アビジン、プロテイン A、抗体、ホルモン又はホルモンレセプターである場合、それぞれビオチン、抗体、プロテイン A、ホルモンレセプター、ホルモンを介して前記複数の反応活性基を有する化合物と結合し、特に「アビジン-ビオチン」の組合せが好適である。

前記「アビジン-ビオチン」の組合せを用いた場合は、アビジンの表面に多数存在するアミノ基に蛍光色素を結合させる。

また、前記「プロテイン A-抗体」なる組合せを用いた場合は、蛍光色素をプロテイン A、抗体、いずれに結合させてもよい。

前記アビジンは、分子量約 68000 の塩基性のアルブミン様の結晶蛋白であって、ビオチンに対して選択的に非常に高い親和性を持っている。またアビジンは、熱、pH、化学修飾などに対して安定である上、等

電点が10であることから、分子表面に多くのアミノ基をもつので、アビジンは蛍光色素で修飾するのに適する。

アビジンのアミノ基の数は36個で、そのうちビオチンとの結合に寄与するものもあるので、アビジン1分子あたり2～10個の蛍光色素を結合させることが望ましい。

さらに前記修飾アビジンで、ビオチン-複数の反応活性基を有する化合物-生体活性物質複合体を標識することにより、本発明の生体活性物質測定試薬が得られる。

また、前記プロテインAは、黄色ぶどう球菌の細胞壁の5%を占める分子量42000の蛋白であり、免疫グロブリン（抗体蛋白）と高い親和性をもつため、蛍光色素で修飾されたプロテインAで、抗体蛋白-複数の反応活性基を有する化合物-生体活性物質複合体を標識することにより、本発明の生体活性物質測定試薬が得られる。

前記プロテインAと抗体は、いずれも被測定物質である生体活性物質と反応しないことが必要である。

このように、複数の蛍光色素で修飾された化合物を結合させることにより、一つの反応活性基に複数の蛍

光色素を結合させることができ、感度を飛躍的に向上させることができる。

本発明においては、蛍光色素の励起を光により行うことが必要である。

この理由は、光により励起することにより、従来技術である放射性同位元素による免疫測定（ラジオイムノアッセイ）に比べ、遥かに安全な測定ができ、また、化学発光や生物発光における面倒な発光処理を省略でき、より短時間で精度が高く、再現性のよい測定を実現できるからである。

前記光は、レーザ光あるいはLED光（発光ダイオード）であることが望ましく、該レーザ光はHe-Neレーザ、あるいは半導体レーザであることが望ましい。この理由は、上記レーザは、XeランプやArレーザに比べ、小型で、値段も安価なためである。上記半導体レーザを使用する場合は、SHG素子（第2高調波発生素子；光の波長を $\frac{1}{2}$ にする素子）と組み合わせることにより、短波長領域のレーザ光を発信できる。

本発明に使用される蛍光色素は、200～800nmの光にて励起されることが望ましい。

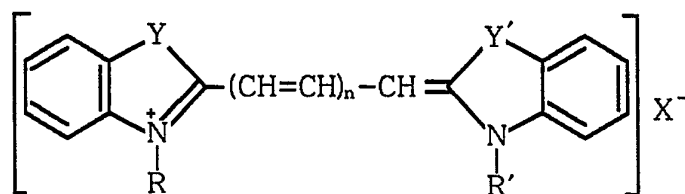
この理由は、上記波長より短い波長の場合は、エネルギーが高すぎるため化学結合を破壊してしまい、該

範囲より長い波長の場合は、量子収率が低すぎて実用的でないからである。

前記蛍光色素としては、ウンベリファロンなどのクマリン誘導体、多環芳香族誘導体、ローダミンイソチオシアネート、フルオレセインイソチオシナネート、シアニン色素、フィコビリタンパク、ダンシル誘導体、*o*-フタルアルデヒドなどが使用できるが、特にシアニン色素が好適である。

シアニン色素は、アゾニウムイオンを含む複素環をメチン鎖で結合した構造、

例えば、



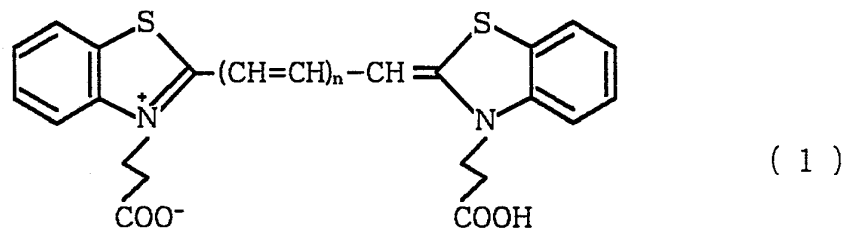
(式中、Y及びY'は、O、S、Se、-NH-又は-CH=CH-を表し、R及びR'は、メチル、エチル、プロピルのようなアルキル基または、カルボキシエチルのようなカルボキシアルキル基を表し、Xは、ハロゲン原子を表し、nは0~3の自然数)で表されるものを指す。

これらのシアニン色素は、He-Neレーザー(633nm)や、現在発信している最も短い波長の

半導体レーザー（638 nm）で励起することができる。

従って、ArレーザーやXeランプを用いる場合や、高価なSHG素子と組み合わせた半導体レーザーを使用する場合に比べて、小型化、低コスト化を図ることができる。

前記シアニン色素としては、特に式（1）で示されるシアニン色素が好適に用いられる。

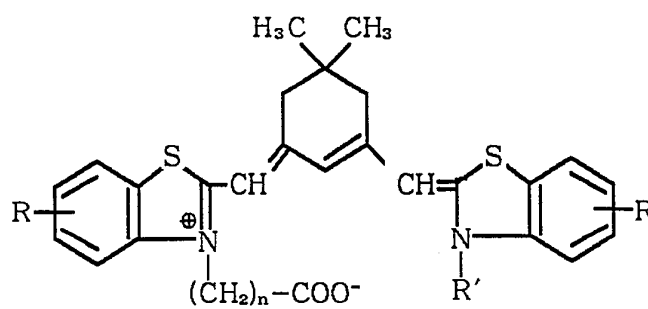
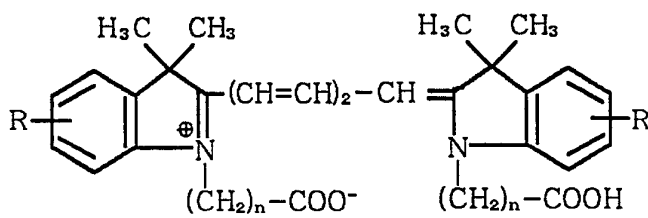
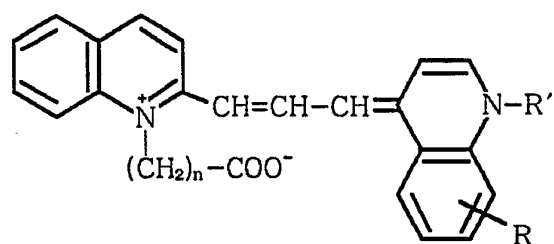
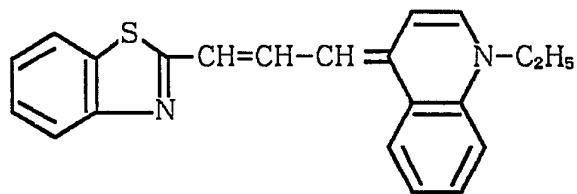


式中、 n は0、1、2又は3を表す。特に好ましくは、 n は2である。

蛍光色素による標識は、生物活性を有するものが対象となるため、できるだけ温和な条件で反応が短時間のうちに終結し、かつ副反応が起こらないで反応活性基と結合しうるものであることが必要である。そのために官能基として共役系外にカルボキシル基をもつ上記式（1）で示されるカルボシアニン系の色素が好適に使用される。

また、前記シアニン色素として、次に示すものも使

用できる。



本発明で使用される生体活性物質は、糖類や蛋白質などがあるが、特に蛋白質が望ましい。

前記蛋白質からなる生体活性物質としては、抗原、抗体、酵素、ハプテン又は酵素阻害剤であることが望ましい。

本発明の生体活性物質測定試薬は、測定の際に、光ファイバーに結合されて、励起されることが望ましい。

(樹脂製光ファイバー)

本発明の樹脂製光ファイバーは、前記生体活性物質測定試薬を特異的に結合する物質を共有結合させることのできる反応活性基を、コア表面に有する樹脂製光ファイバーが必要である。

前記光ファイバーが樹脂製である理由は、樹脂製光ファイバーは、価格が安く、ガラス製光ファイバーに比べて研磨加工がしやすく、コア径を大きくできるので多くの光量を伝送でき、かつコア径を大きくしてもフレキシビリティが保てる特徴がある。特にポリメタクリル酸メチル製の光ファイバーの場合、560～650 nm付近の波長領域の伝送性に優れているからである。

前記反応活性基の密度は、 $1.0 \times 10^{10} \sim 6.0 \times 10^{13}$ 個/cm² であることが望ましい。この理由

は、前記範囲より密度が低い場合、樹脂製光ファイバー表面の反応活性基の絶対数が少なくなり、測定感度が低下するため実用的ではなく、また、前記範囲より高い場合、蛍光色素が発する蛍光の光ファイバーへの透過率が非常に悪くなるためである。（第7図参照：ポリメタクリル酸メチルの場合）

さらに前記反応活性基の密度は $3.0 \times 10^{12} \sim 4.0 \times 10^{13}$ 個/cm² であることが好ましく、 $1.5 \times 10^{13} \sim 3.5 \times 10^{13}$ 個/cm² であることが好適である。この理由は、前記範囲より密度が高い場合は、反応活性基間の距離が短くなるため、前記生体活性物質測定試薬の立体障害のため、再現性が低下し始めるからである。

前記樹脂製光ファイバーを構成する樹脂は、生体活性物質を吸着しない材質で透光性のよいものが必要であり、例えば、ポリスチレン、ポリアクリル酸エステル、ポリエステル、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、あるいはこれらの共重合体などが使用できる。

前記樹脂製光ファイバーは、架橋剤と反応するような構造を有している樹脂を主成分としていることが望ましい。この理由は、光ファイバーの表面に反応活性

基を導入するための架橋剤を反応させやすいからである。

前記架橋剤と反応するような構造としては、エステル結合、アミド結合、エステル基、カルボキシル基、ホルミル基、アミノ基、ヒドロキシル基、エポキシ基、チオール基などが望ましいが、エステル結合あるいはエステル基などのエステル構造が好適である。

前記架橋剤と反応するような構造あるいは官能基を有する透光性樹脂としては、ポリアクリル酸エステルあるいはポリエステルなどが好ましい。

前記アクリル酸エステルポリマーは、アクリル酸樹脂の内、エステル構造を有するものであって、例えばアクリル酸、メタクリル酸などのエステル誘導体の重合体からなる合成樹脂であり、具体的には、アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチルなどの重合体である。また、前記アクリル酸エステルポリマーの内、本発明において特に好適に用いられるものは、ポリメタクリル酸メチルである。ポリメタクリル酸メチルは他の樹脂に比べ、透光性がよいからである。

ところで、樹脂製光ファイバーの表面に、蛋白質を結合させる技術は、特開昭59-501873号

(米国特許4582809号)に、ナイロン製光ファイバーの表面に、架橋剤を用いて抗原、抗体を結合させた例が記載されている。また、光ファイバーではないが、特開昭56-129841号には、ポリメタクリル酸メチルやナイロンの吸光度測定セルの表面に蛋白質を結合させる技術が記載されている。

しかしながら、前者の技術は、透光性が低いナイロン製光ファイバーを使用しており、本発明者らが試したところ、ナイロンファイバーの伝播損失が大きく、本発明者らが意図するところの高感度測定は困難であった。

また、後者の技術は、吸光度測定セルに蛋白質を結合させるもので、光ファイバーに固定化するための技術ではない。

本発明において用いられる樹脂製光ファイバーは、例えば、アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチルなどのモノマーとスチレンなどのモノマーとの共重合体であってもよい。

前記光ファイバー表面の反応活性基としては、ホルミル基、カルボキシル基、アミノ基、ヒドロキシル基、エポキシ基、チオール基、イソシアナート基、イソチオシアナート基などが挙げられるが、ホルミル基が好適である。この理由は、本発明のファイバーに共

有結合される物質は、生体活性物質であり、その活性を低下させない温和な反応条件が必要であるが、ホルミル基は前記生体活性物質、特に蛋白質のアミノ基と容易に反応するからである。

本発明の樹脂製光ファイバーの製造方法を以下に説明する。

樹脂製光ファイバーの樹脂が架橋剤と反応する構造を有していない場合は、樹脂に官能基を導入し、架橋剤と反応する構造を有している場合には、該構造部に適当な架橋剤を反応させることにより官能基を導入する。

前記架橋剤には、多官能性化合物を用いることが望ましく、例えば、グルタルアルデヒド、スクシンジアルデヒド、アジポアルデヒドなどのジアルデヒド、 N, N' -エチレンビスマレイミド、 N, N' -オ-フェニレンジマレイミド、ビスジアゾベンゼン、あるいはヘキサメチレンジイソシアナートなどのジイソシアナート又はジイソチオシアナートなどが用いられる。

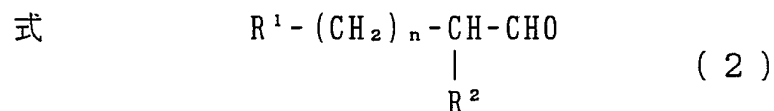
前記架橋剤を用いた具体的な導入法としては、例えば、ポリスチレン製光ファイバーにホルミル基を導入する場合、側鎖であるベンゼン環をニトロ化し、次いで還元を行い、これをアミノ基とした後、グルタルア

ルデヒドを反応させることによりホルミル基を導入できる。

本発明において、最も好適な生体活性物質測定用樹脂製光ファイバーは、エステル構造を有する樹脂を主成分とする樹脂製光ファイバーのコア表面にホルミル基を持った形態である。

前記生体活性物質測定用樹脂製光ファイバーは、樹脂製光ファイバーの露出したコア表面に、多官能性化合物として、ホルミル基を有する求核試薬を反応させて、コア表面にホルミル基を導入することにより製造される。

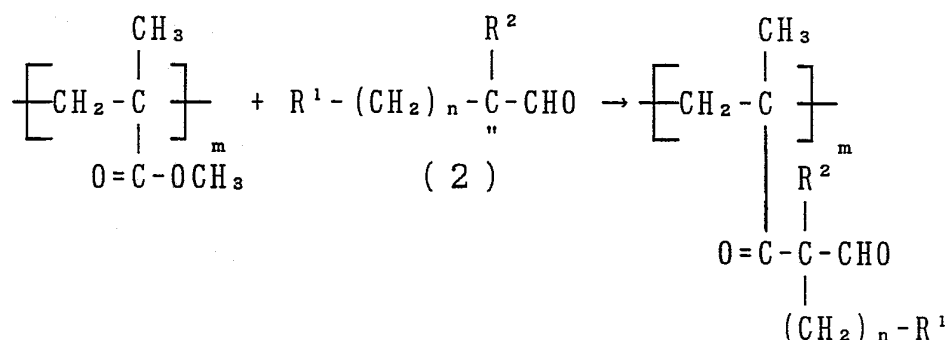
前記ホルミル基を有する求核試薬として、式(2)で表される試薬が好適である。



(式中 R¹ および R² は、それぞれ水素原子、アルキル基又はホルミル基を表し、n は 0 ~ 5 の整数を表す)

前記式(2)で表される試薬としては、グルタルアルデヒド、スクシンアルデヒドが挙げられる。

式(2)の試薬は、次の反応式に示すように樹脂(下記反応式では、ポリメタクリル酸メチル)のエステル基に求核的に反応する。



前記架橋剤を反応させる場合、光ファイバーのクラッド層を剥離してコア表面を露出させることが望ましい。

この理由は、通常光ファイバーの直径は1mmで、コア断面の直径は0.97mm位（断面積は0.739mm²）しかないので、活性基を多く導入するためには、クラッド層を剥離してコア表面積を増やす必要があるためである。

前記光ファイバーの端面は、研磨しておくことが望ましい。前記研磨は、アルコールを潤滑材とすることが好ましい。

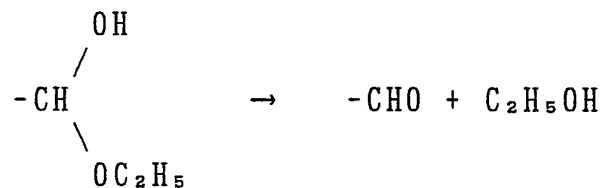
前記ホルミル基を有する求核試薬は、KOHなどの塩基、エタノールなどのアルコール系有機溶媒、NiSO₄のようなNi塩のエタノール溶液、およびホルミル基を有する求核試薬を添加溶解させて調製することが望ましい。

前記KOHなどの塩基の濃度は、50～100mMが好ましい。

前記 Ni 塩を加える理由は、Ni 塩は反応を促進させると同時に、ホルミル基の酸化や OH 基の付加を防止するからである。

前記反応試薬に前記樹脂製光ファイバーのコア部分を浸漬して、エステル構造に反応させるが、反応温度は適宜調節することが望ましい。

前記反応処理後、水で洗浄し、HCl などの酸に浸漬すると、アセタール化したアルコールが脱離して、ホルミル基が結合した樹脂製光ファイバーが得られる。(下記反応式参照)



(測定用検出部)

本発明の生体活性物質測定用の検出部は、前記樹脂製光ファイバーの反応活性基に被測定物質と特異的に結合する物質を共有結合させることが必要である。

前記被測定物質と特異的に結合する物質は、蛋白質であることが望ましく、抗原、抗体、酵素、ハプテン、酵素阻害物などが考えられる。

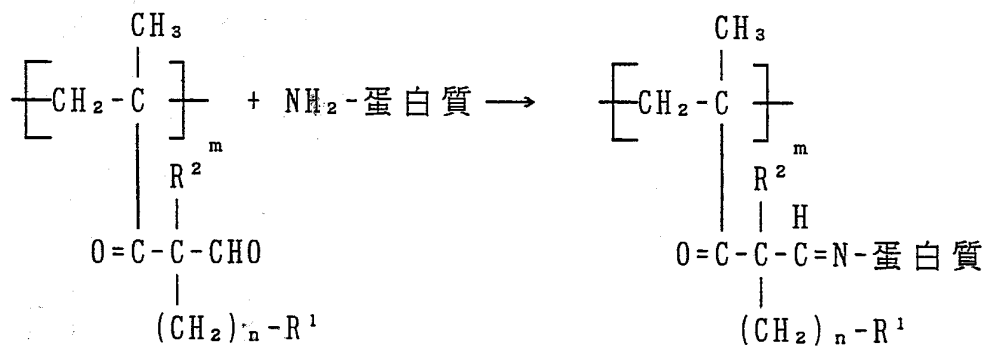
前記樹脂製光ファイバーの反応活性基が、ホルミル基の場合、被測定物質と特異的に結合する物質を反応させた後、固定化処理を行うことが望ましい。この理

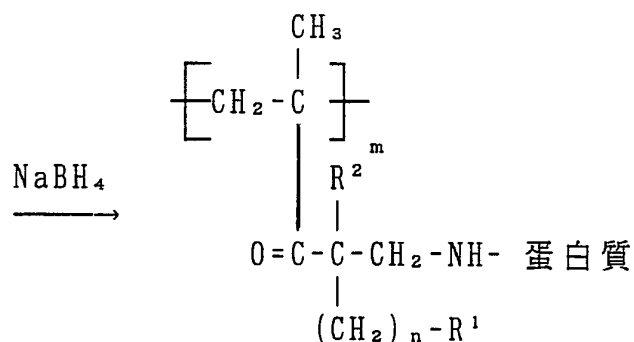
由は、固定化処理を行わない場合、被測定物質と特異的に結合する物質が可逆反応で離脱しやすいからである。

前記固定化処理を、前記被測定物質と特異的に結合する物質として蛋白質を選んだ場合について、以下に説明する。

まず、ホルミル基を導入した樹脂製光ファイバーを蛋白溶液中に浸漬すると、ホルミル基が蛋白質のアミノ基と反応して結合部位はイミノ基となる。これを水で洗浄後、適当な濃度の還元剤、例えば NaBH_4 などで処理することにより、イミノ基が還元されて不活性化し、蛋白質が固定化される。

(下記反応式参照。樹脂はポリメタクリル酸メチル)





本発明の検出部は、第1図に示すようにフローセル5にて覆われていてもよく、第3図に示すような対向型でもよく、また、第2図に示すような先端にミラー12のついた反射型でもよい。

前記対向型の場合は、励起光は先端に対向する側から入射され、蛍光は検出部が取り付けられている光ファイバー3を伝播する。一方、反射型は、励起光は検出部が取り付けられている光ファイバー3を伝播して入射され、励起光は、先端のミラー12にて反射され、前記光ファイバー3を伝播する。

(生体活性物質測定試薬の製造方法)

本発明の生体活性物質測定用試薬は、種々の有機化学反応にて製造されるが、本発明の複数の蛍光色素で修飾された蛋白質を製造するには、蛍光色素と蛋白質とを反応させて、反応生成物から溶媒を除去した残留物をpHが2～7の緩衝液に懸濁させ、未反応色素を分離除去するものである。

前記pHが2～7の緩衝液では、蛍光色素で標識され

た蛋白質は溶解するが、未反応の蛍光色素は溶解しないため、容易に分離できるからである。

前記緩衝液のpHが2以下の場合には、蛋白質は加水分解を起こしてしまい、またpHが7以上の場合には、蛍光色素が溶解してしまうためである。

前記緩衝液のpHは、4.9～7.0であることが望ましく、特にシアニン色素で修飾されたアビジンを製造する場合には、 6.5 ± 0.5 が好適である。

前記蛍光色素は、塩基性緩衝液に良好な溶解性を示す酸性蛍光色素であることが望ましい。

前記蛍光色素は、レーザ光で励起されるものであることが望ましい。

前記蛍光色素としては、前記シアニン色素、フルオレセインイソチオシアネートなどが用いられる。

本発明の蛋白質は、種々の蛋白質、例えばネオカルチノスタン、酵素、ホルモンなどが考えられるが、塩基性蛋白質（ $PI \geq 7$ なる蛋白質）であることが望ましい。この理由は、前記塩基性蛋白質は、疎水性の蛍光色素が結合していても、前記pHが2～7の緩衝液中で良好な溶解性を示すからである。

前記塩基性蛋白質としては、アビジンが好適である。

前記蛍光色素と蛋白質との反応は、ジシクロヘキシ

ルカルボジイミド、ジ- ρ -トルオイルカルボジイミドのようなカルボジイミド試薬を用いることにより、蛋白質のアミノ基と蛍光色素の反応活性基とを縮合させる。

反応溶媒は、蛍光色素及び蛋白質を溶解させるものであればよく、例えばメタノール、エタノール、メチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミンのような有機溶媒又は塩基性水溶液のような溶媒中で行う。

反応が進みすぎて蛋白質のOH基やSH基と蛍光色素が反応を起こし、蛋白質の持つ反応特異性（抗原抗体反応や、蛋白質がアビジンの場合にビオチンに対する反応性）が失活してしまわないように、必要により酢酸などを用いて反応を停止させる。

反応終了後、溶媒を減圧下に留去して取り除き乾固させ、pHが2～7の緩衝液に溶解させる。

未反応の蛍光色素は溶解しないので、適当な分離手段により、蛍光色素を容易に分離できる。

未反応色素の分離手段としては、遠心分離を行い、上澄み液をガラスウールを充填した管に通すことにより、除去できる。

次に、本発明の生体活性物質測定試薬のうち、特異的に結合する2種類の化合物、化合物Aと化合物Bを

含み、生体活性物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には化合物 B が結合し、該化合物 B には複数の蛍光色素で修飾された化合物 A が結合したもの（簡略化の為、以後、蛍光色素 - 化合物 A - 化合物 B - 複数の反応活性基を有する化合物 - 生体活性物質という）は、以下の方法で製造することが望ましい。

すなわち、化合物 B を複数の反応活性基を有する化合物の大部分の反応活性基に反応させ、複数の反応活性基を有する化合物を化合物 B で修飾した後、生体活性物質を反応させ、化合物 B - 複数の反応活性基を有する化合物 - 生体活性物質複合体とした後、蛍光色素で修飾された化合物 A を反応させて、蛍光色素 - 化合物 A - 化合物 B - 複数の反応活性基を有する化合物 - 生体活性物質複合体を製造する。

上記製造方法が望ましい理由は、反応順序を変えた場合、副反応がおき、収率が低下してしまうからである。

上記製造方法において、化合物 A と化合物 B の組み合わせは、蛋白質と該蛋白質と特異的に結合する化合物であることが望ましく、具体的には、アビジンとビオチン、プロテイン A と抗体、抗体とプロテイン A な

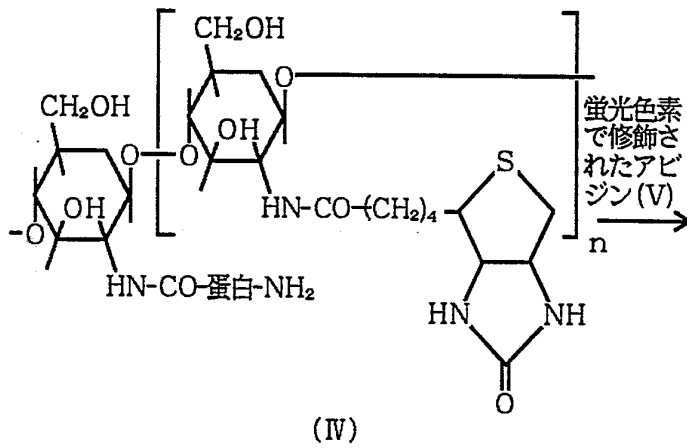
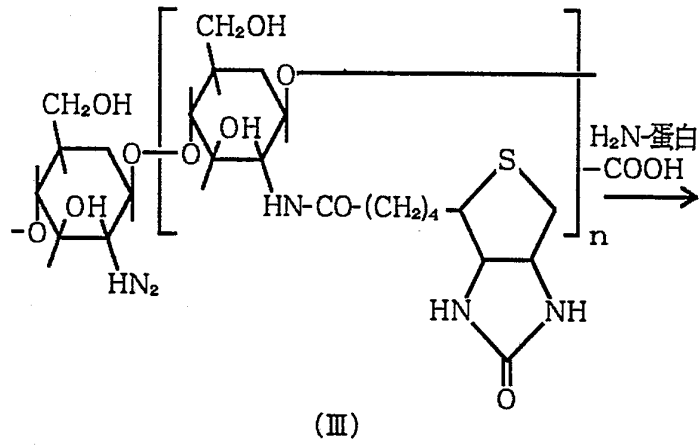
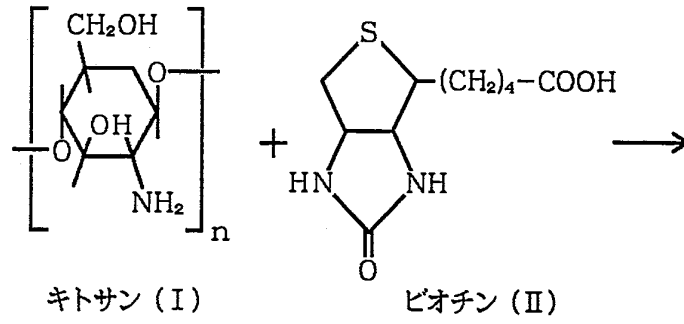
どが好ましく、特にアビジンとビオチンの組み合わせが最適である。

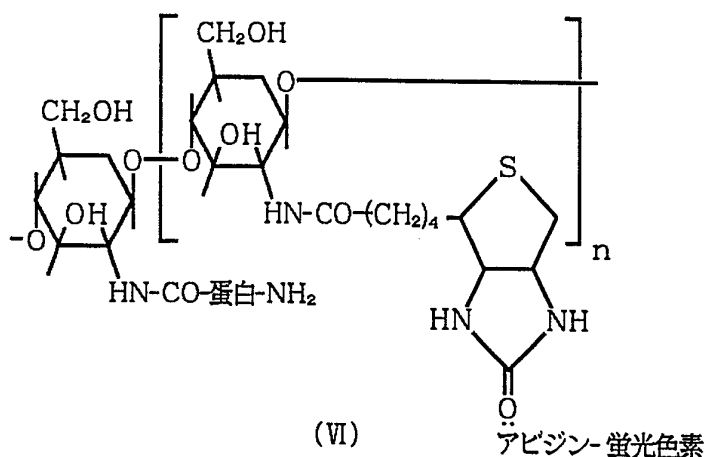
これらの反応をより具体的に説明する。

複数の反応活性基を有する化合物、例えばキトサン (I) は分子中に多数のアミノ基を有しており、キトサン (I) にビオチン (II) を塩基性溶液中、水溶性カルボジイミド (CHMC)、N-ヒドロキシスクシンイミドのような脱水剤の存在下で反応させると、大部分のキトサンのアミノ基にビオチンが酸アミド結合してビオチン化キトサン (III) を得る。このビオチン化キトサン (III) に生体活性物質である蛋白質を上記と同様の脱水剤を用いて反応させ、キトサン (I) の残余の遊離アミノ基に蛋白質が結合したビオチン化キトサン (IV) を得る。

一方、蛍光色素で修飾したアビジン (V) は、蛍光色素、例えばシアニン色素のカルボキシル基と蛋白質であるアビジンのアミノ基とを上記と同様の方法で反応させて得ることができる。

次に、上記蛋白質が結合したビオチン化キトサン (IV) に上記蛍光色素で修飾したアビジン (V) を反応させると、アビジンはビオチンと選択的に非常に高い親和力を持って結合し、本発明の蛍光標識蛋白質 (VI) を得ることができる。





上記シアニン色素のカルボキシル基は、アビジンのアミノ基と有機溶媒中で、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドのような脱水縮合剤を用いて、常法により容易に縮合させてアミド結合させることができる。シアニン色素とアビジンとの反応終了後、未反応物となるべく除去することが好ましく、例えば透析法、遠心分離法、ゲル濾過法又は濾過材を用いる濾過法などによって除くことができる。

なお、キトサンにビオチンを結合させて形成される酸アミド結合は、pH6で励起波長225.5nmのとき、450nm、300nm及び490nmの各付近に特徴的な蛍光ピークをもつ。

そして、458nmと300nmの蛍光強度の差と酸アミド結合の濃度間とは、直線関係があるので、この特性を利用してキトサンの検量線を作成し、ビオチン化量を酸アミド結合量から推定できる。

(生体活性物質の測定法)

本発明の生体活性物質測定用試薬を使用した測定方法について説明する。

本発明の生体活性物質測定用試薬を使用した測定方法は、次のような方法で行われる。

1) 蛍光色素-アビジン-ビオチン-被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質からなる複合体を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする測定方法。

2) ビオチンが結合した被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾されたアビジンを反応させ、光ファイバー上にアビジン-ビオチン結合により複合体を形成させた後、光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする測定方法。

3) 被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合している試薬を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結

合する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする測定方法。

4) 互いに特異的に結合する2種類の物質を化合物A、化合物Bとするとき、被測定物質あるいは被測定物質と特異的に反応する物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該反応活性基には化合物Bが結合している試薬を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾された化合物Aを反応させ、光ファイバー上に化合物A-化合物Bの結合により、複合体を形成させた後、蛍光色素を光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする測定方法。

前記測定方法1) について説明する。

前記測定方法1) では、蛍光色素-アビジン-ビオチン-被測定物質又は被測定物質と特異的に結合する物質からなる複合体を試薬として用いることが必要である。

前記試薬を使用する理由は、蛍光色素で直接被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質を標識とすると、蛍光色素の結合量は限られ、また蛍光色素の結合によって被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質の結合活性部位が損傷する恐れがあ

る。

このため、前記アビジン-ビオチンを介することにより、結合活性部位を損傷することなく、多くの蛍光色素を結合させることができる。

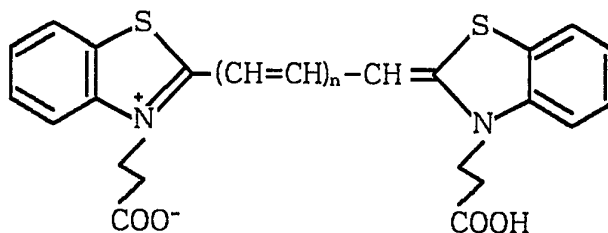
前記試薬は、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と特異的に反応させた後、光にて励起させる。

光ファイバー上で励起させるのは、光ファイバーにより、励起光と蛍光を伝播でき、効率的な測定が可能であるからである。

前記蛍光色素は、シアニン色素であることが望ましい。

この理由は、シアニン色素は、He-Neレーザ(633nm)や半導体レーザ(638nm)で励起することができ、装置の小型化や低コスト化が可能である。

前記シアニン色素をアビジンに結合させるには、できるだけ温和な条件で反応が短時間のうちに終結し、かつ副反応が起こらないで反応活性基と結合しうるものであることが必要であり、そのために官能基として、共役系外にカルボキシル基をもつ下記式で示されるカルボシアニン系の色素が好適に使用される。



(式中、 n は 0、1、2 又は 3 を表す)

シアニン色素で修飾されたアビジンを得るには、シアニン色素のカルボキシル基と蛋白質のアミノ基を有機溶媒中で、カルボジイミドのような脱水縮合剤の存在化でアミド結合を形成させることにより得られる。この際、未反応の色素は分離する。

本発明において使用される光源は、レーザー光あるいはLED光であることが望ましい。

前記測定方法は、競合法とサンドイッチ法に大別される。

前記競合法は、被測定試料と、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質からなる濃度既知の試薬を混合し、そこに、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを浸漬し、特異的に反応させた後、光にて励起し、蛍光を測定する方法である。前記競合法の場合、光ファイバーには、被測定試料と、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質からなる試薬が、それぞれの濃度比に従って結合す

る。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質からなる試薬の結合量が相対的に減り、蛍光強度は低下し、濃度－蛍光強度の検量線の傾きは負になる。

前記サンドイッチ法は、被測定試料に、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを入れる。前記光ファイバーには、その濃度に従って被測定物質が結合される。該被測定物質が結合された光ファイバーを、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬の溶液に浸漬する。前記光ファイバーには、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬が結合する。

前記サンドイッチ法においては、光ファイバーには、測定試料と同じ数の蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬が結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬の結合量が増え、蛍光強度は増加し、濃度－蛍光強度の検量線の傾きは正になる。

次いで測定方法2)について説明する。

前記測定方法 2) は、基本的には、測定方法 1) と同様の効果を有するが、この方法では、初めにビオチンが結合した被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾されたアビジンを反応させることが必要である。

この理由は、蛍光色素で修飾されたアビジンを最後に結合させるため、蛍光色素の加水分解や酸化に伴う蛍光強度の低下を防止でき、再現性の高い測定を行うことができるからである。

前記蛍光色素は、シアニン色素であることが望ましい。

本発明において使用される光源は、レーザー光あるいは LED 光であることが望ましい。

前記測定方法は、競合法とサンドイッチ法に大別される。

前記競合法は、被測定試料と、ビオチン-被測定物質からなる濃度既知の試薬を混合し、そこに被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを入れ、特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾されたアビジンを結合させ、光にて励起、測定する方法である。前記競合法の場合、光ファイバーには、被

測定試料と、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質からなる試薬が、それぞれの濃度比に従って結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質からなる試薬の結合量が相対的に減り、蛍光強度は低下し、濃度－蛍光強度の検量線の傾きは負になる。

前記サンドイッチ法は、被測定試料に、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを入れる。前記光ファイバーには、その濃度に従って、被測定物質が結合される。該被測定物質が結合された光ファイバーを、ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬の溶液に浸漬する。前記ファイバーには、ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬が結合する。前記ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質からなる試薬が結合した光ファイバーに、蛍光色素で修飾されたアビジンを結合させる。

前記サンドイッチ法においては、光ファイバーには、測定試料と同じ数の蛍光色素－アビジン－ビオチン－被測定物質と特異的に結合する物質が結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、蛍光色素－

アビジン-ビオチン-被測定物質と特異的に結合する物質の結合量が増え、蛍光強度は増加し、濃度-蛍光強度の検量線の傾きは正になる。

次いで測定方法3)について説明する。

前記測定方法3)は、被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合している試薬を使用することが必要である。

前記試薬を使用することにより、生体活性物質当りの蛍光色素の結合量を増やすことができ、検出感度を飛躍的に向上させることができる。

前記蛍光色素は、シアニン色素であることが望ましい。

また、前記複数の蛍光色素で修飾された化合物はアビジンであることが好ましく、ビオチンを介して複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基に結合していることが望ましい。

また、前記複数の反応活性基を有する化合物は、アミノグルカンから選ばれることが望ましく、特にキトサンが好適である。

また、前記蛍光色素を励起するための光源は、レー

ザ光あるいはLED光であることが望ましい。

前記測定方法は、競合法とサンドイッチ法に大別される。

前記競合法は、被測定試料と、被測定物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合している試薬を混合し、そこに、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを浸漬し、特異的に反応させた後、光にて励起し、蛍光を測定する方法である。前記競合法の場合、光ファイバーには、被測定試料と、前記試薬とが、それぞれの濃度比に従って結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、前記試薬の結合量が相対的に減り、蛍光強度は低下し、濃度-蛍光強度の検量線の傾きは負になる。

前記サンドイッチ法は、被測定試料に、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを入れる。前記光ファイバーには、その濃度に従って被測定物質が結合する。該被測定物質を結合した光ファイバーを、被測定物質と特異的に結合する物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の

蛍光色素で修飾された化合物が結合している試薬の溶液に入れる。

前記サンドイッチ法においては、光ファイバーには、測定試料と同じ数の測定試薬が結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、測定試薬の結合量が増え、蛍光強度は増加し、濃度－蛍光強度の検量線の傾きは正になる。

次いで測定方法4)について説明する。

前記測定方法は、互いに特異的に結合する2種類の物質を化合物A、化合物Bとすると、最初に、被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該反応活性基には化合物Bが結合している試薬を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾された化合物Aを反応させることが必要である。

このような方法を用いることにより、被測定物質当りの蛍光色素量を増やすことができ、なお且つ、蛍光色素の加水分解や酸化に伴う蛍光強度の低下を防止でき、再現性の高い測定を行うことができるからである。

前記蛍光色素は、シアニン色素であることが望ましい。

また、前記化合物 A、化合物 B はそれぞれ、アビジン-ビオチン、プロテイン A-抗体、抗体-プロテイン A の組合せが望ましく、特にアビジン-ビオチンの組合せが好適である。

前記化合物 A、化合物 B として用いられる抗体は、被測定物質と特異反応をおこさないものであることが必要である。

また、前記複数の反応活性基を有する化合物は、アミノグルカンから選ばれることが好ましく、特にキトサンが好適である。

また、前記蛍光色素を励起するための光源は、レーザー光あるいは LED 光であることが望ましい。

前記測定方法は、競合法とサンドイッチ法に大別される。

前記競合法は、被測定物質と、被測定物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該反応活性基には化合物 B が結合している濃度既知の試薬を混合し、そこに、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを浸漬し、特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾された化合物 A を結合させ、光にて励起し、蛍光を測定する方法である。前記競合法の場合、光ファイバーには、被測定試料と前記試薬とが、それぞれの濃度比に従って結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、試薬の結合量が相対的に減り、蛍光強度は低下し、濃度－蛍光強度の検量線の傾きは負になる。

前記サンドイッチ法は、被測定試料に、被測定物質と特異的に結合する物質が固定化された光ファイバーを浸漬する。前記光ファイバーには、その濃度に従って被測定物質が結合する。該被測定物質を結合した光ファイバーを、被測定物質と特異的に結合する物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該反応活性基には化合物 B が結合している試薬の溶液に入れる。前記ファイバーには試薬が結合する。前記被測定物質と特異的に結合する物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該反応活性基には化合物 B が結合している試薬が結合した光ファイバーに、蛍光色素で修飾された化合物 A を結合させる。

前記サンドイッチ法においては、光ファイバーには、測定試料と同じ数の試薬が結合する。

従って、被測定試料の濃度が高ければ、試薬の結合量が増え、蛍光強度は増加し、濃度－蛍光強度の検量線の傾きは正になる。

(生体活性物質測定装置)

次に装置について説明する

本発明の装置は、生体活性物質が、複数の反応活性

基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合している前記生体活性物質測定試薬を利用して生体活性物質を測定するための装置である。

本発明の装置は、少なくとも以下の構成、即ち、小型光源及び励起光又は蛍光を伝播するための光ファイバーと、その一方の端面のコア表面を露出させ、その表面に被測定物質と特異的に結合する物資を固定化した検出部；検出部で励起された蛍光のみを取り出す機構；並びに検出部で励起された蛍光の強度を測定するためのフォトカウンターからなることを特徴とする。

前記光ファイバーを使用する理由は、光ファイバーによって、励起光と蛍光を伝播でき、光損失がなく、効率の良い測定ができる。

前記光ファイバーは、樹脂製であることが望ましい。この理由は、樹脂の方が低価格であり、使用しやすいからである。

前記樹脂性ファイバーは、架橋剤と反応する構造を有することが望ましい。この理由は、架橋剤を介することにより、生体活性物質を共有結合させ、検出部を形成できるからである。

前記架橋剤と反応する構造はエステル構造であることが望ましい。

前記樹脂としては、ポリメタクリル酸メチルなどの(メタ)アクリル酸エステル樹脂又はポリエステル樹脂が好適である。

さらに、本発明の検出部には、生体活性物質が複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合している生体活性物質測定試薬が、測定の際に結合されることが必要である。

このような試薬が結合することにより、高感度測定が可能である。

前記蛍光色素は、シアニン色素であることが望ましい。この理由は、前記シアニン色素は、He-Neレーザー光(630nm)や現在発信している最も短波長の半導体レーザー(638nm)で励起できるため、大型で高価なXeランプやArレーザー又は、高価なSHG素子(光の波長を $\frac{1}{2}$ にする素子)を使用する必要もないため、安価で小型の装置を得ることができるからである。

前記検出部は、励起光又は蛍光を伝播する光ファイバーから連結器により、脱着可能であることが望まし

い。

前記連結器としては、第3図のようなガイドレールタイプが好適である。

本発明の装置の光源は、小型、低価格のものであることが必要で、He-Neレーザ、半導体レーザ、半導体レーザとSHG素子を組み合わせたレーザ、又はLED（発光ダイオード）であることが望ましい。

前記蛍光のみを取り出す機構は、ハーフミラーやフィルターなどが考えられるが、フィルターであることが望ましい。

この理由は、ハーフミラーを用いた場合、光学系を配置するためのスペースが必要で、小型化しにくいからである。前記ハーフミラーは検出部が反射型の場合に、また前記フィルターは検出部が対向型の場合に主に使用されている。

このため、前記検出部は、対向型であることが好ましい。

[発明を実施するための最良の形態]

次に、本発明の実施例を示す。

実施例1

(1) 100 μ lの水に3mgのNa₂CO₃と4mgのピオチンを溶かした。

(2) ついで、 $1.8 \mu\text{M}$ のキトサン溶液の 2 ml に前記(1)で得られた溶液を添加した。

(3) 水 $100 \mu\text{l}$ を添加した後、 50 mg のCHMC(水溶液カルボジイミド)を添加した。さらに攪拌しながら、5時間～一晩室温で反応させた。

(4) 酢酸を3滴滴下して、反応を停止させた。

(5) ついで、 Na_2CO_3 0.3 g/ml 及び NaCl 0.3 g/ml の混合液 4 ml を加えて、ビオチン化キトサンを沈澱させた。

(6) 遠心分離器で沈澱を回収した後、 0.3 g/ml の NaCl と 0.1 g/ml Na_2CO_3 緩衝液で沈澱を洗浄した。

(7) 前記(6)で得られた沈澱を 10 ml の 10 mM のカリウム-リン酸緩衝液($\text{pH}=7$)で一晩、 4°C で透析してビオチン化キトサンを得た。

(8) 前記ビオチン化キトサンの懸濁液に抗IgG(抗体Y)溶液と、CHMCを添加して、 4°C で1夜反応させた。反応終了後、12時間透析を行い、さらに、陰イオン交換カラムを用いて未反応物を除去し、抗体が結合したビオチン化キトサンを得た。

(9) アビジン 1 mg 及びトリエチルアミン 0.2 ml を 1 ml のエタノールに溶解させた。次いで、 2 mg のNK1160(日本感光色素研究所製;前記式(1))

において $n = 2$ のシアニン色素) を加えて十分に溶解させ、溶液を作成した。さらに前記溶液にジシクロヘキシルカルボジイミド 14 mg を加えて、室温で 4 時間反応させた。

(10) 反応終了後、エバポレータでエタノールとトリエチルアミンを減圧除去した。

(11) 前記 (10) の工程で生じた残留物を、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH = 6.5) 2 ml に懸濁した後、遠心分離器を用いて 5000 rpm で 10 分間遠心分離を行って、上澄みを採取し、再度遠心分離にかけて NK 1160 で修飾されたアビジンの溶液を得た。

(12) ポリメタクリル酸メチルを主成分とする直径 1 mm の樹脂製光ファイバー (三菱レイヨン製、商品名: エスカ) の先端を酢酸エチルに浸して拭きとり、クラッド層を 1 cm 剥離し、水洗した。ついで、光ファイバーの端面をエタノールを潤滑剤としてポリシングフィルムで研磨した。

(13) 0.5 ml の水に 10 mg の NiSO_4 を溶解させ、次いでエタノール 2.5 ml を加えた。この時、白色沈澱が生ずるため、これを 3000 rpm で遠心分離して上澄液を採取し、これを Ni-エタノール溶液とした。

50 mM水酸化カリウム-エタノール溶液 0.4 ml に Ni-エタノール溶液 0.1 ml を加え、さらに 50 % グルタルアルデヒドを 50 μ l 添加し反応溶液とした。

(14) 前記(13)で調製した反応溶液に前記(12)の樹脂製光ファイバーを 50 °C で、10 分間浸漬した後水洗した。

(15) 対で、20 mM の塩酸溶液に 5 ~ 10 分浸漬した後、水で洗浄し、樹脂製光ファイバーのコア部分表面にホルミル基を導入した。

第6図(b)には上記方法にて、光ファイバーの表面にホルミル基を導入した場合の、処理温度と、固定可能な酵素(蛋白質)量との関係、及び第6図(a)には処理温度とファイバーの光伝送率との関係を示す。

また、ホルミル基のファイバー表面上の密度と、光伝送減少率の関係を第7図に示す。

ポリメタクリル酸メチル製光ファイバーは、熱処理すると光伝送率が向上するが、反応温度が高くなると、結合するホルミル基の密度が増えるため、光伝送率が低下する。このため、第6図(a)に示すように、最も好適な温度は、50 °C 付近となる。

(16) バチルス属 16-3 F 株が産生する耐熱性

α -アミラーゼに対するモノクローナル抗体であるマウス I g G 抗原 4 1 mg をりん酸緩衝生理食塩水 (pH = 7.5) に溶かした。この溶液に樹脂製光ファイバーを 4°C で 12 時間浸漬した。

(17) 樹脂製光ファイバーを溶液から取り出し、水で洗浄した後、1% NaBH₄ 水溶液に 15 分間浸漬した後、水で洗浄してマウス I g G 抗原 4 を固定化し、抗原固定化センサーとした。

(18) 上記のようにして製造した樹脂製光ファイバーを検出部とした。

(19) 濃度既知の抗マウス I g G (Y) 溶液を (18) で作成した検出部 5 に浸漬した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(20) 次に、前記 (8) で得た抗体が結合したビオチン化キトサン溶液に検出部 5 を浸漬した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(21) 次に、前記 (11) で得られた NK 1160 で修飾されたアビジン溶液を検出部 5 に浸漬した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(22) 次に、第 4 図に示す本発明の装置にて He-Ne レーザ光学系で蛍光を分光光度計 8 を用いて測定した。

(23) 抗マウス I g G (Y) の濃度を変え、前

記(18)～(22)と同様の測定を繰り返し、抗マウスIgG(Y)の濃度と蛍光強度の関係を調べ検量線を作成した。これを、第8図の(a)に示す。また、センサーの応答性を第9図に示す。

検量線から、検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例2

(1) 実施例1の(1)～(18)と同様の方法により抗体が結合したビオチン化キットサン溶液、NK1160で修飾されたアビジン溶液、抗原固定化センサー及び検出部を作成した。

(2) 濃度既知の抗マウスIgG(Y)溶液と前記(1)で作成した抗体が結合したビオチン化キットサン溶液を1:1の割合で混合し、第1図に示すフローセル5に通した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(3) 次に前記(1)で作成したNK1160で修飾されたアビジン溶液をフローセル5に通した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(4) 次に、前記実施例1の(22)及び(23)と同様の方法にて抗マウスIgG(Y)の濃度と蛍光強度の関係を調べ、検量線を作成した。検量線を第8図(b)に示す。

検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例 3

(1) 100 μ l の水に 3 mg の Na_2CO_3 と 4 mg の抗体蛋白を溶かした。

(2) 次いで、1.8 μ M の β -1, 4-ポリガラクトサミン溶液の 2 ml に前記(1)で得た溶液を添加した。

(3) 水 100 μ l を添加した後、50 mg の CHMC (水溶液カルボジイミド) を添加した。さらに攪拌しながら一晩 4 $^{\circ}$ C で反応させた。

(4) 次いで Na_2CO_3 0.3 g/ml 及び NaCl 0.3 g/ml の混合液 4 ml を加えて抗体蛋白が結合した β -1, 4-ポリガラクトサミンを沈澱させた。

(5) 遠心分離機で沈澱を回収した後、0.3 g/ml の NaCl と 0.1 g/ml の Na_2CO_3 緩衝液で沈澱を洗浄した。

(6) 前記(5)で得られた沈澱を 10 ml の 10 mM のカリウム-リン酸緩衝液 (pH=7) に懸濁し、一晩 4 $^{\circ}$ C で透析して、抗体蛋白が結合した β -1, 4-ポリガラクトサミンを得た。

(7) 前記抗体蛋白結合 β -1, 4-ポリガラクト

サミン懸濁液に、抗マウス Ig G (Y) 溶液と、CHMC を添加して、4°C で 1 夜反応させた。反応終了後、12 時間透析を行い、さらに、陰イオン交換カラムを用いて未反応物を除去し、抗体蛋白結合 β -1, 4-ポリガラクトサミンを得た。

(8) プロテイン A 1 mg 及びトリエチルアミン 0.2 ml を 1 ml のエタノールに溶解させた。次いで、2 mg の NK 1160 (日本感光色素研究所製) を加え、十分に溶解させ、溶液を作成した。さらに前記溶液にジシクロヘキシルカルボジイミド 14 mg を加えて、室温で 4 時間反応させた。

(9) 反応終了後、エバポレータで溶媒を除去した。

(10) 前記 (9) の工程で生じた残留物を、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH=6.5) 2 ml に懸濁した後、遠心分離機を用いて 5000 rpm で 10 分間分離を行って、上澄みを採取し、再度遠心分離にかけて NK 1160 で修飾されたプロテイン A の溶液を得た。

(11) 前記 (8) で得た抗体蛋白結合 β -1, 4-ポリガラクトサミンと、前記 NK 1160 で修飾されたプロテイン A とを、リン酸緩衝生理食塩水中 4°C で反応させ、シアニン色素-プロテイン A-抗体蛋白

— β —1, 4—ポリガラクトサミン—抗体 (Y) の複合体溶液を得た。

(12) 実施例1の(13)においてグルタルアルデヒドの代わりに、スクシンジアルデヒドを用い、ポリメタクリル酸メチル製光ファイバーの代わりに、ポリエステルを含有する光ファイバーを使用し、実施例1の(12)～(18)と同様の方法にて第1図に示す検出部を作成した。

(13) 濃度既知の抗マウスIgG (Y) 溶液と、前記(12)で得たシアニン色素—プロテインA—抗体蛋白— β —1, 4—ポリガラクトサミン—抗体 (Y) の複合体溶液を1:1の割合で混合し、第1図に示すフローセル5に通し、次いでリン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した後、第5図に示す本発明の装置にてHe—Neレーザー光学系で蛍光を分光蛍光光度計8で測定した。抗マウスIgG (Y) の濃度を変え、同様の測定を繰り返して抗マウスIgG (Y) の濃度と蛍光強度の関係を調べ、検量線を作成した。検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例4

(1) 実施例1の(1)～(8)と同様の方法にて抗体が結合したビオチン化キットサン溶液を作成し

た。

(2) アビジン 1 mg 及びフルオレセインイソチオシアナート 1.8 mg を、0.5 M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH=9.0) からなる塩基性溶媒 5 ml に溶解させ、4 °C で光を遮断して攪拌を続け、20 時間反応させた。

(3) 次に反応液は、エバポレーターを用いて減圧下で溶媒を留去した。

(4) この残留物、0.05 M のリン酸緩衝液 (pH=4.0) の 5 ml に懸濁させた。

(5) 5000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、未反応色素を除去して上澄みを採取した。

(6) 上記 (3) 及び (4) の操作をさらに 2 回繰り返す、さらに得られた上澄みをガラスウールを充填した管に通して未反応色素を除去し、フルオレセインイソチオシアナートで修飾されたアビジンを得た。

(7) 実施例 1 の (12) ~ (18) と同様の方法にて抗原固定化センサー及び検出部を作成した。

(8) 濃度既知の抗マウス IgG (Y) 溶液を第 1 図に示すフローセル 5 に通した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(9) 次に、(1) で得た抗体が結合したビオチン

化キトサン溶液をフローセル5に通した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(10) 次に、(6) で得たフルオレセインイソチオシアナートで修飾されたアビジンの溶液をフローセル5に流した後、リン酸緩衝生理食塩水を通して洗浄した。

(11) 次に、第4図に示す本発明の装置にて半導体レーザと薄膜導波路型SHG素子を組み合わせたレーザ光学系(波長490nm)と分光光度計8を用いて蛍光を測定した。

(12) 抗マウスIgG(Y)の濃度を変え、前記(8)～(11)と同様の測定を繰り返し、抗IgG(Y)の濃度と蛍光強度の関係を調べ検量線を作成した。

検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例5

本発明は、基本的には、実施例1と同様であるが、(11)の処理を行った後、0.17g/mlの飽和硫酸ナトリウム溶液(溶媒:10mMカリウムリン酸緩衝液、pH=7)4mlを加え、2000rpmで10分遠心分離し、4℃で1時間放置した。

得られた沈澱を10mMカリウムリン酸緩衝液に懸濁

した。

遠心分離で硫酸ナトリウム結晶を除去し、上澄液を透析して濃縮して使用した。

検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例 6

実施例 1 の (1) で得た溶液にさらに、50 mg の CHMC を加えて溶かし、12℃で2時間放置し、この溶液を用いて、実施例 1 の (2) 以降の処理を行った。検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例 7

本実施例は、実施例 1 のキトサンの代わりに、ポリリジンを使用した。反応条件は実施例 1 の条件に準ずる。検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

実施例 8

(1) 実施例 1 の (9) ~ (1 1) の処理で、得られた NK 1 1 6 0 で修飾されたアビジンの溶液を得た。

(2) 実施例 1 の検出部をマウス IgG (抗原) 溶液に 4℃で12時間浸漬した。

(3) ついで、洗浄して、1%の NaBH₄ で処理

して、抗原を固定化した。

(4) 濃度既知の抗マウス I g G 溶液に検出部を浸漬、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。

(5) ビオチン化された抗体溶液に検出部を浸漬し、洗浄した。

(6) ついで、(1) の溶液に検出部を浸し、洗浄してから第 1 図の装置で測定した。

(7) このような操作を繰り返し、第 6 図 (c) の検量線を作成し、これから検出限界を測定し、これを第 1 表に示した。

実施例 9

実施例 7 の (1) の溶液と、ビオチン化抗体を反応させて検出試薬を作成し、この試薬と、濃度既知の抗マウス I g G 溶液を 1 : 1 の割合で混合し、実施例 7 の検出部を浸漬し、測定を行い検量線を作成し、これから検出限界を測定し、これを第 1 表に示した。

実施例 10

(1) 実施例 1 の (9) ~ (11) の処理を施し、NK 1160 で修飾されたアビジンの溶液を得た。

(2) 前記 (1) の溶液と、実施例 1 の (8) と同様にして得られた抗 I g G 結合のキトサン溶液を混合して、グルタルアルデヒドを加え、カルボジイミドの

存在下、50℃で加温することにより、アビジンのアミノ基とキットサンのアミノ基をグルタルアルデヒドで架橋して、NK1160-アビジン-(グルタルアルデヒド)-キットサン-抗IgGの溶液を得た。

(3) ポリスチレン製光ファイバーに、塩化アルミニウムの存在下、ギ酸無水物を反応させ、ポリスチレンのフェニル基にホルミル基を導入し、次いで、1,6-ヘキサンジアミンをカルボジイミドの存在下にて反応させた後、1%のNaHB₄で還元した。

次いで、マウスIgGをカルボジイミドの存在下で脱水縮合させ、検出部5を作成した。

(4) 前記(2)の溶液と、前記(3)の検出部を用いて、実施例2と同様に、競合法にて測定した。

検量線から検出限界を測定し、これを第1表に示した。

第 1 表

実施例	検出限界 (mg/ml)		
1	1.2	×	10^{-4}
2	2.0	×	10^{-4}
3	2.3	×	10^{-4}
4	3.1	×	10^{-6}
5	1.0	×	10^{-4}
6	1.1	×	10^{-4}
7	1.3	×	10^{-4}
8	1.0	×	10^{-1}
9	1.1	×	10^{-1}
10	2.1	×	10^{-4}

実施例 1 1

本発明の装置の実施例を第 1 図から第 5 図に示す。

第 1 図は、光ファイバー 1 の表層部のクラッド層 2 を排除し、露出したコア部表面 3 に抗原 4 を結合させるとともに、前記コア表面部 3 をフローセル 5 で囲んだ構造を有する検出部である。

第 2 図は、反射型の検出部であり、先端にミラー 1 2 が設けられている。

第 3 図は、対向型蛍光検出器の構造を示したもので

ある。蛍光検出部（センシングチップ）9が光軸合わせのためのガイド11でとめられており、接着されていないので蛍光検出部9を自由に着脱でき、実用上非常に都合がよい。この蛍光検出部9は、測定の度に交換することから、コスト面から考えて、樹脂製光ファイバーであることが望ましい。前記樹脂製光ファイバーには、種々の方法にて反応活性基を導入する。前記樹脂製光ファイバーは、ポリアクリル酸エステルなどのエステル構造を持つものが好ましく、前記蛍光検出部を樹脂製光ファイバーで作成する場合には、このエステル基に $>CH-CHO$ 構造をもつ化合物を塩基性条件下で反応させ、ホルミル基を導入し、このホルミル基に抗原あるいは抗体などの蛋白質を結合させる。

励起光は、検出面に対向しているファイバーから放射される。

第4図に示す装置では、プレート側10から蛍光検出部9へレーザー光が入射し、入射光と蛍光が光軸合わせのためのガイド11を有するプラスチックファイバーへ入射し、フィルター7にて、蛍光のみが取り出され、分光光度計8で測定が行われる。

第5図は、フローセル型の検出器を用いた場合の装置を示す。

〔産業上の利用可能性〕

本発明の生体活性物質測定試薬は、医療診断において血液又は体液中に極微量含まれている抗原、抗体、酵素などの生体活性物質の免疫測定法に用いることができ、生体活性物質1個当たりの蛍光色素量が多いため、検出感度を大幅に向上させることができる。

また、本発明の生体活性物質測定用光ファイバーは、小型、低価格、高感度を実現できる。

これら、生体活性物質測定試薬と装置を使用した本発明の測定方法により、短時間で、簡便な測定を実現できるため、医療分野における疾病診断などに利用できる。

〔図面の簡単な説明〕

第1～3図は蛍光標識法による蛍光検出部を示す。

第4、5図はHe-Neレーザ又は半導体レーザを使用する蛍光測定系を示す。

第1～3図中、実線の矢印はレーザ光、点線の矢印は蛍光を示す。

第6図(a)は、処理温度とポリメタクリル酸メチル製光ファイバーの光伝送率の関係を示す。

第6図(b)は、処理温度と結合可能な酵素量との関係を示す。(a)及び(b)図の横軸は処理温度

(c°)、(a) 図の縦軸はファイバーの光伝送率(%)、(b) 図の縦軸は面積当りの酵素固定化量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、(c) 図の横軸はビオチン化抗マウス抗体濃度(mg/ml)、縦軸はカウント数を示す。

第6図(c)は、ビオチン化抗マウス抗体濃度と蛍光強度の検量線を示す。

第7図はポリメタクリル酸メチル製光ファイバーの光伝送率とホルミル基の密度の関係を示す。横軸はホルミル基の数($\text{個}/\text{cm}^2$)、縦軸はファイバーの光伝送減少率(%)を示す。

第8図(a)はサンドイッチ法、(b)は競合法の検量線を示す。横軸は抗マウスIgG(mg/ml)、縦軸はカウント数を示す。

第9図は、センサーの応答性を示す。横軸は抗マウスIgG($10^{-3}\text{mg}/\text{ml}$)への浸漬時間(分)、縦軸はカウント数を示す。

1は光ファイバー、2はクラッド層、3はコア表面、4は抗原、5はフローセル、**Y**は本発明の蛍光標識抗体、Yは試料中の抗体、6はHe-Neレーザー発生装置又は半導体レーザーとSHG素子を組み合わせたレーザー発生装置、7はフィルター、8は分光蛍光光度計、9はセンシングチップ、10はプレート、11は光軸合わせのためのガイドレール、12はミラー、

13 はハーフミラー。

請 求 の 範 囲

1. 生体活性物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合していることを特徴とする生体活性物質測定試薬。
2. 前記複数の蛍光色素で修飾される化合物が、アビジン、プロテイン A 又は抗体である請求項 1 に記載の試薬。
3. 生体活性物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基にはビオチンが結合し、該ビオチンには複数の蛍光色素で修飾されたアビジンが結合している請求項 1 に記載の試薬。
4. 前記反応活性基が、アミノ基である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。
5. 前記複数の反応活性基を有する化合物が、1 分子あたり反応活性基を 20 ~ 100000 個有する高分子物質である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。
6. 前記複数の反応活性基を有する化合物が、アミノグルカンである請求項 1 又は 3 に記載の試薬。
7. 前記複数の反応活性基を有する化合物が、キトサンである請求項 1 又は 3 に記載の試薬。
8. 前記蛍光色素が、レーザ光により励起される色素で

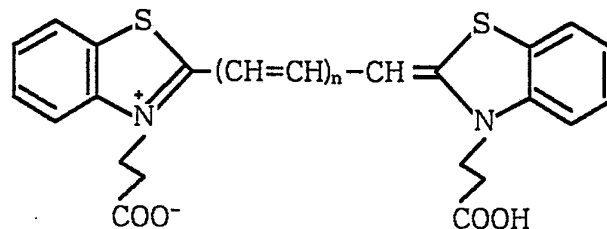
ある請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

9. 前記蛍光色素が、200 nm～800 nmのレーザ光で励起される蛍光色素である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

10. 前記蛍光色素が、クマリン誘導体、多環芳香族誘導体、ダンシル誘導体、フィコビリタンパク、ローダミン、フルオレセイン又はオ-フタルアルデヒドである請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

11. 前記蛍光色素が、シアニン色素である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

12. 前記蛍光色素が、
式



(式中、nは0、1、2又は3を表す)

で表されるシアニン色素である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

13. 前記生体活性物質が、蛋白質である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

14. 前記生体活性物質が、抗原、抗体、酵素、ハプテ

ン又は酵素阻害剤である請求項 1 又は 3 に記載の試薬。

15. 蛍光色素と蛋白質とを反応させて蛍光色素で修飾された蛋白質を製造する方法において、反応生成物から溶媒を除去した残留物を pH が 2 ~ 7 の緩衝液に懸濁させ、未反応色素を分離除去することを特徴とする蛍光色素で修飾された蛋白質の製造方法。

16. 蛋白質と特異的に結合する化合物を複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基に反応させ、複数の反応活性基を有する化合物と、蛋白質と特異的に結合する化合物を結合させた後、生体活性物質を反応させ、蛋白質と特異的に結合する化合物 - 複数の反応活性基を有する化合物 - 生体活性物質の複合体とした後、複数の蛍光色素で修飾された蛋白質を反応させることを特徴とする蛍光色素 - 蛋白質 - 蛋白質と特異的に結合する化合物 - 複数の反応活性基を有する化合物 - 生体活性物質の複合体である生体活性物質測定試薬の製造方法。

17. 前記蛍光色素が、レーザ光により励起される色素である請求項 15 又は 16 に記載の製造方法。

18. 前記蛍光色素が、シアニン色素又はフルオレセインである請求項 15 又は 16 に記載の製造方法。

19. 前記蛋白質が、塩基性蛋白質である請求項 15 又は 16 に記載の製造方法。

20. 前記蛋白質が、アビジンである請求項15又は16に記載の製造方法。
21. 前記蛋白質-蛋白質と特異的に結合する化合物が、アビジン-ビオチンである請求項16に記載の製造方法。
22. 樹脂製光ファイバーのコア表面に、生体活性物質測定試薬を特異的に結合する物質を共有結合させることのできる反応活性基を有することを特徴とする生体活性物質測定用樹脂製光ファイバー。
23. 前記反応活性基の密度が、 $1.0 \times 10^{10} \sim 6.0 \times 10^{13}$ 個/cm²である請求項22に記載の光ファイバー。
24. 前記反応活性基が、ホルミル基である請求項22に記載の光ファイバー。
25. 前記樹脂製光ファイバーがエステル構造を有する樹脂を主成分とする樹脂である請求項22に記載の光ファイバー。
26. 前記樹脂製光ファイバーが、(メタ)アクリル酸エステル樹脂を主成分とする光ファイバーのコア表面にホルミル基を有する請求項22に記載の光ファイバー。
27. 樹脂製光ファイバーの反応活性基に被測定物質と特異的に結合する物質が共有結合していることを特徴と

する生体活性物質測定用検出部。

28. 蛍光色素-アビジン-ビオチン-被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質からなる複合体を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に反応する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする生体活性物質の測定方法。

29. ビオチンが結合した被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と、特異的に反応させた後、蛍光色素で修飾されたアビジンを反応させ、光ファイバー上にアビジン-ビオチン結合により複合体を形成させた後、光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする生体活性物質の測定方法。

30. 被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該複数の反応活性基を有する化合物の反応活性基には、複数の蛍光色素で修飾された化合物が結合している試薬を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と特異的に反応させた後、光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする生体活性物質の測定方法。

31. 前記蛍光色素で修飾された化合物が、アビジンで

ある請求項 30 に記載の測定方法。

32. 前記アビジンが、ビオチンを介して反応活性基に結合している請求項 31 に記載の測定方法。

33. 互いに特異的に結合する 2 種類の物質を化合物 A、化合物 B とするとき、被測定物質又は被測定物質と特異的に反応する物質が、複数の反応活性基を有する化合物に結合し、該反応基には化合物 B が結合している試薬を、光ファイバー上の被測定物質と特異的に結合する物質又は被測定物質と、特異的に結合させた後、蛍光色素で修飾された化合物 A を反応させ、光ファイバー上に化合物 A - 化合物 B の結合により複合体を形成させた後、蛍光色素を光にて励起し、蛍光を測定することを特徴とする生体活性物質の測定方法。

34. 前記化合物 A 及び化合物 B の組合わせが、それぞれ、アビジンとビオチン、抗体とプロテイン A、プロテイン A と抗体の組み合わせである請求項 33 に記載の測定方法。

35. 前記複数の反応活性基を有する化合物が、アミノグルカンである請求項 30 又は 33 に記載の測定方法。

36. 前記複数の反応活性基を有する化合物が、キトサンである請求項 30 又は 33 に記載の測定方法。

37. 前記蛍光色素が、シアニン色素である請求項 28

ないし 33 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

38. 前記光が、レーザ光である請求項 28 ないし 33 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

39. 光源及び励起光又は蛍光を伝播するための光ファイバーと、その一方の端面のコア表面を露出させ、その表面に被測定物質と特異的に結合する物質を固定化した検出部；検出部で励起された蛍光のみを取り出す機構；並びに検出部で励起された蛍光の強度を測定するためのフォトカウンターからなることを特徴とする生体活性物質測定装置。

40. 前記光ファイバーが、樹脂製である請求項 39 に記載の装置。

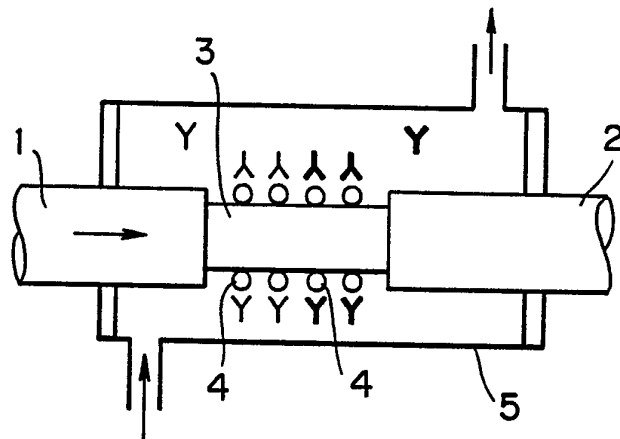
41. 前記光源が、半導体レーザである請求項 39 に記載の装置。

42. 前記検出部が、連結器により着脱可能である請求項 39 に記載の装置。

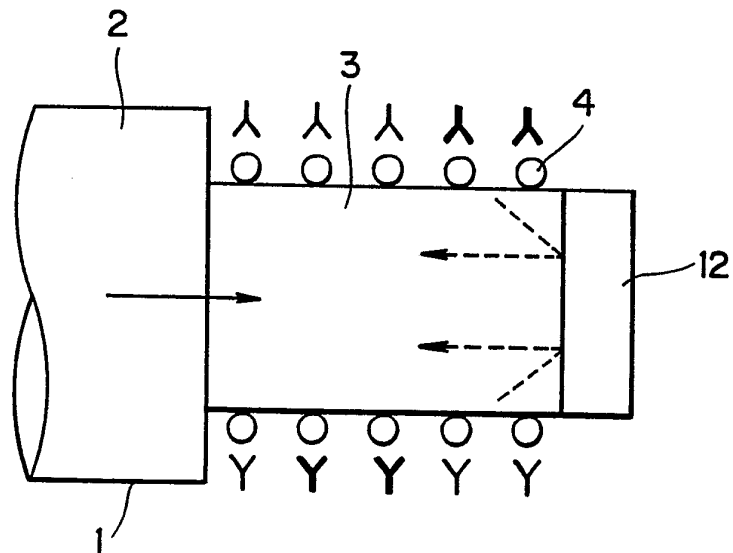
43. 前記検出部が、対向型である請求項 39 に記載の装置。

44. 前記蛍光のみを取り出す機構が、フィルターである請求項 39 に記載の装置。

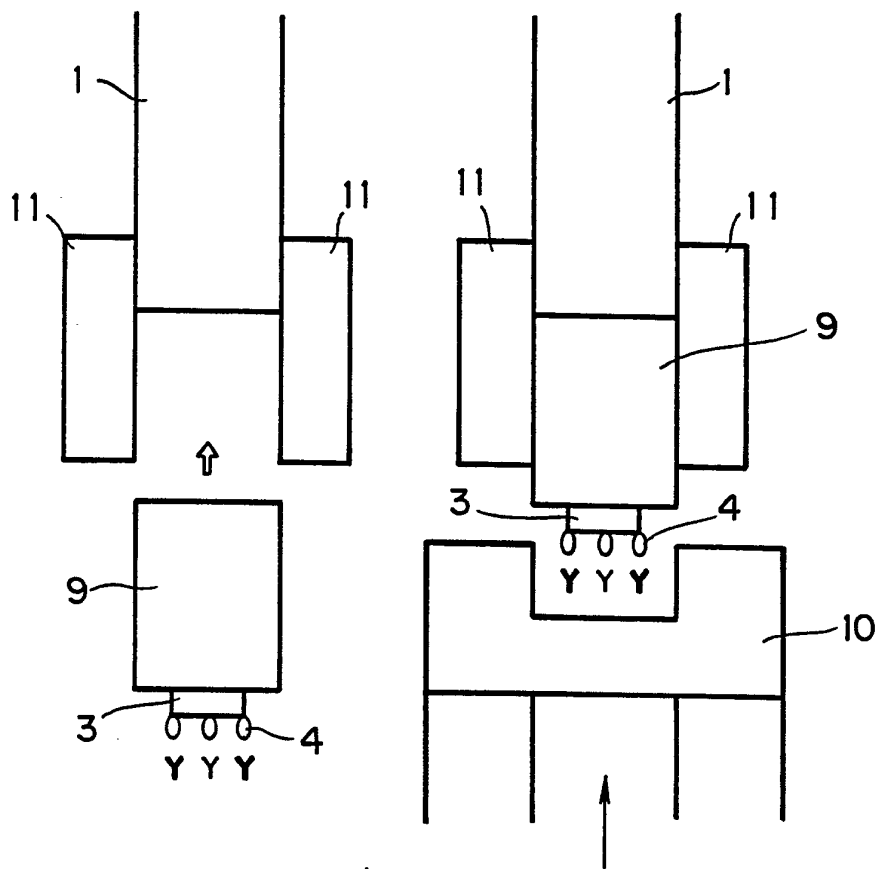
1/6



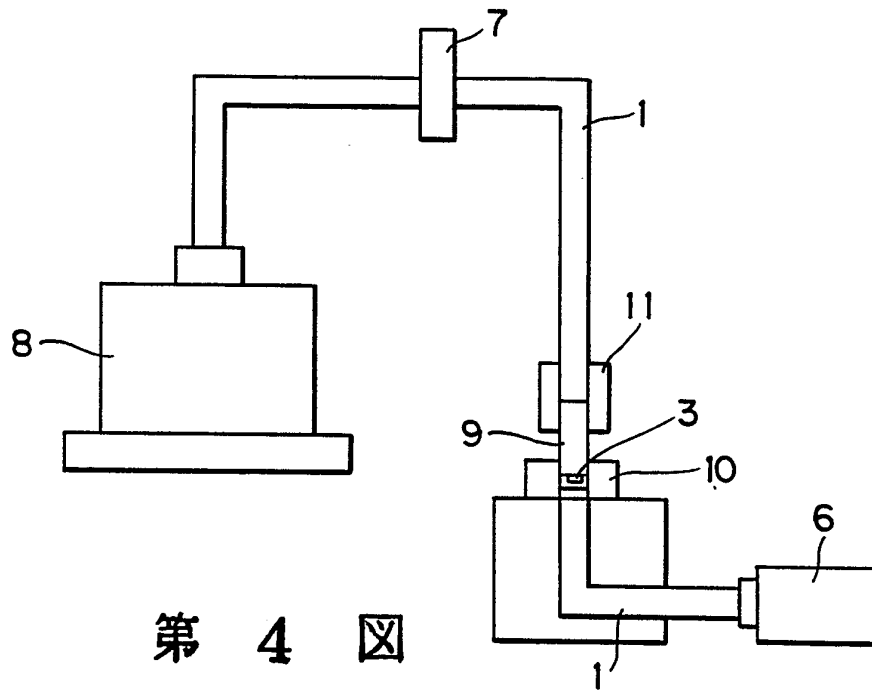
第 1 図 ✓



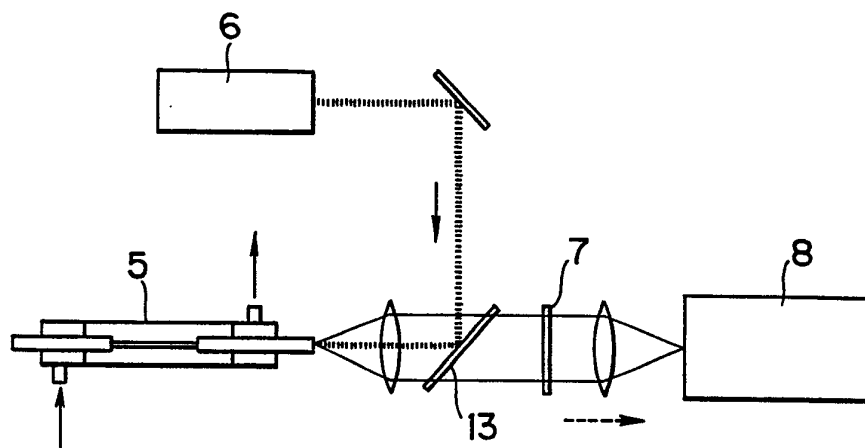
第 2 図



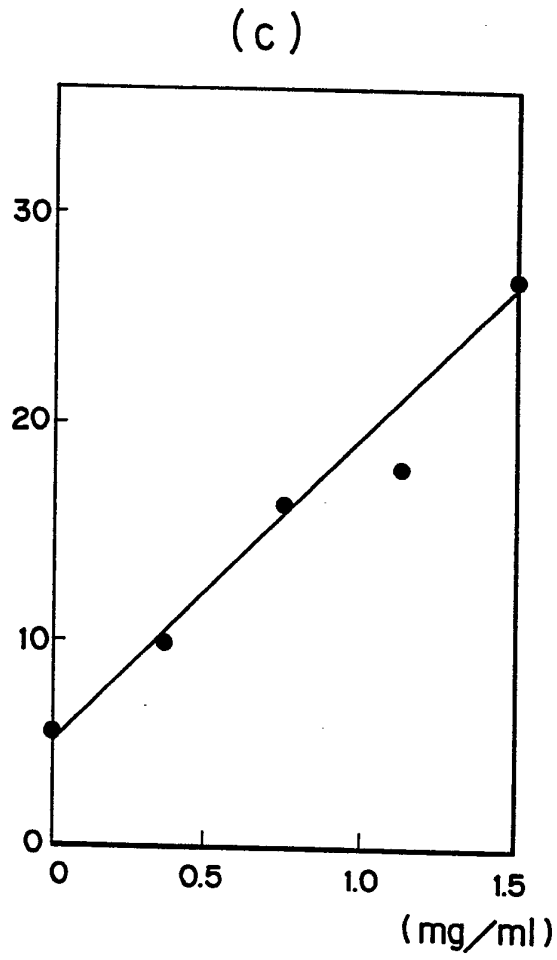
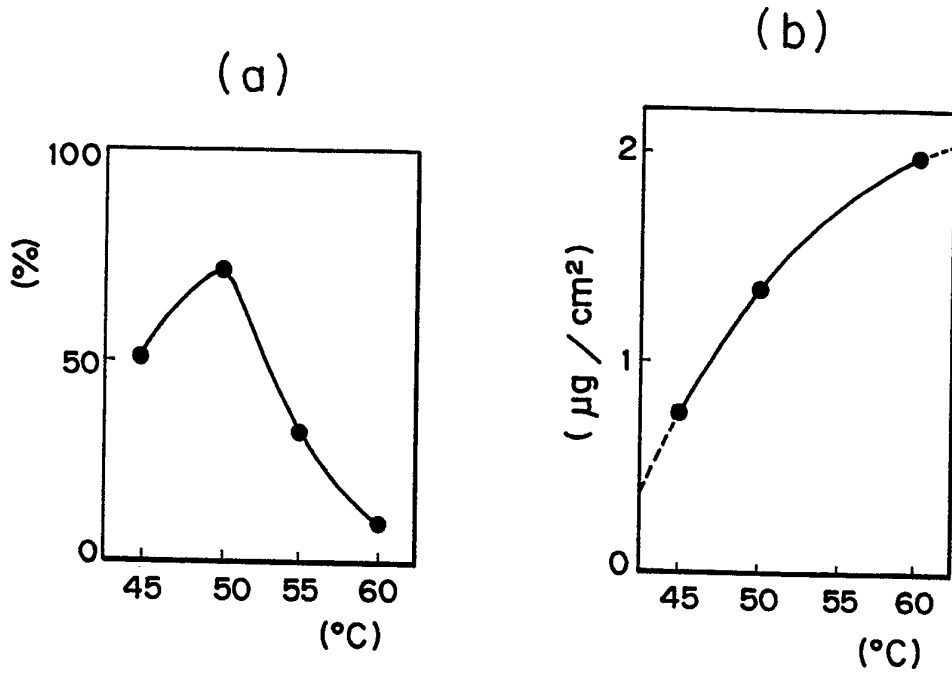
第 3 図



第 4 図

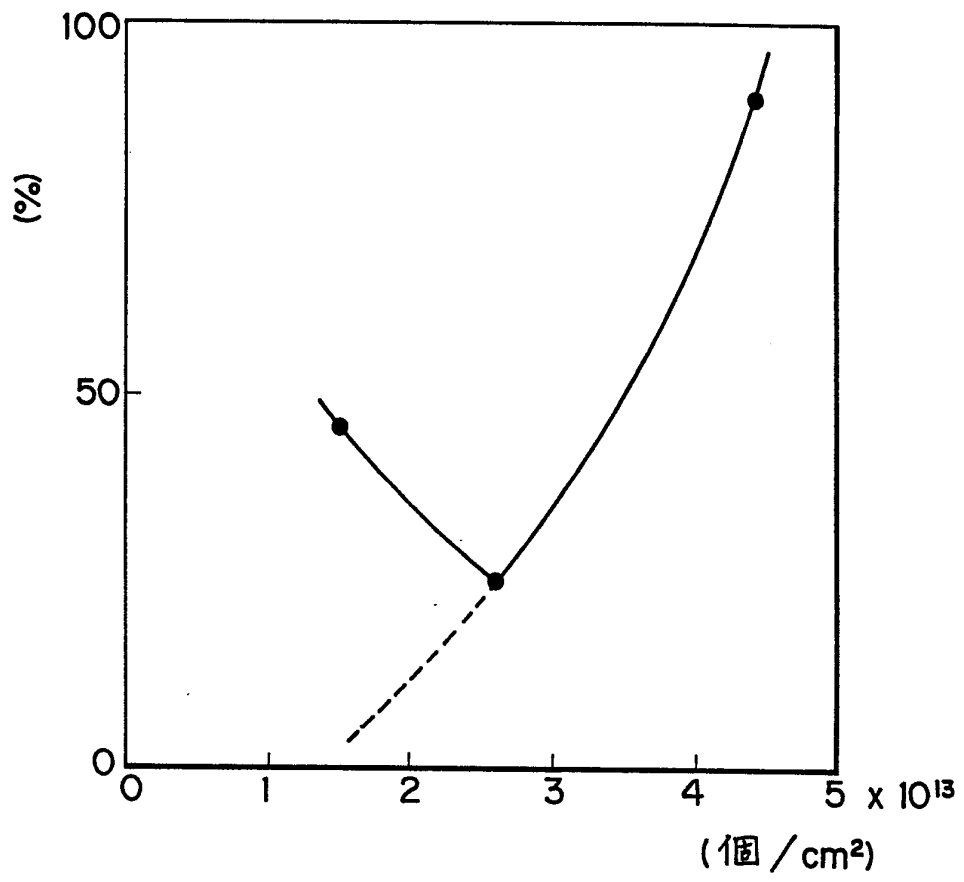


第 5 図

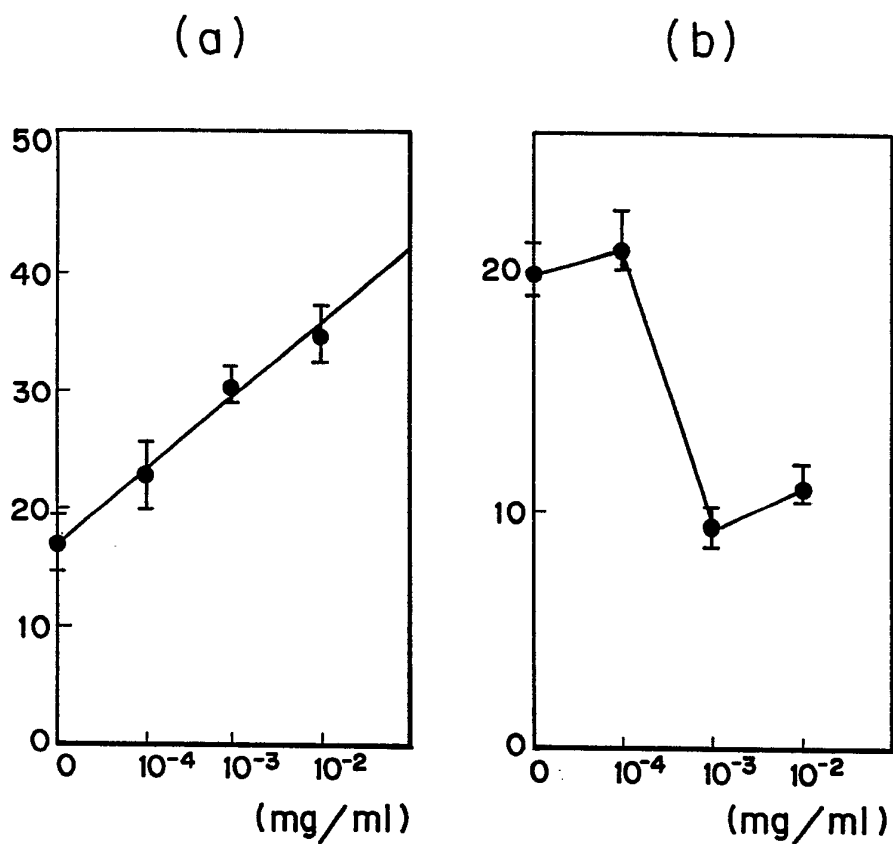


第 6 図

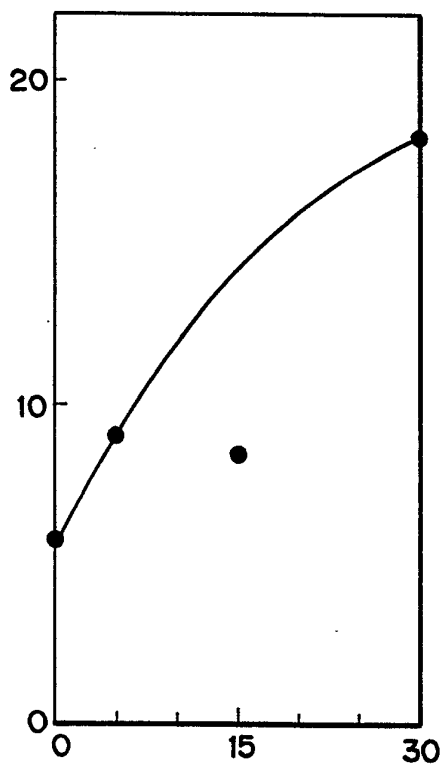
5/6



第 7 図



第 8 图



第 9 图

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/JP90/00514**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl. ⁵ G01N33/533, G01N33/543, G01N33/58, G01N21/78				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁷				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	G01N33/533, G01N33/543, G01N33/58, G01N21/78			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸				
Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1990 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1990				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹				
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³		
X	JP, A, 63-289001 (Scarbo Inc.) 25 November 1988 (25. 11. 88) (Family: none)	1 - 21		
X	JP, A, 64-47952 (Cyberflur Inc.) 22 February 1989 (22. 02. 89) (Family:none)	1 - 21		
X	JP, A, 61-88155 (Ortho Diagnostic Systems Inc.) 6 May 1986 (06. 05. 86) &US, A, 4666862	1 - 21		
Y	JP, A, 62-79334 (Ord Inc.) 11 April 1987 (11.04.87) & US, A, 4716121	22 - 44		
Y	JP, A, 62-79333 (Ord Inc.) 11 April 1987 (11. 04. 87) & US, A, 4844869 & DE, A, 3630353	22 - 44		
X	JP, A, 59-81560 (Myron J. Block) 11 May 1984 (11. 05. 84) & US, A, 4447546 & EP, A, 103426	22 - 44		
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
July 4, 1990 (04. 07. 90)	July 30, 1990 (30. 07. 90)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
Y	JP, A, 62-6-6143 (Corning Glass Works) 25 March 1987 (25. 03. 87) & EP, A, 223352 & US, A, 4671938	22 - 44
X	JP, A, 62-123358 (Sumitomo Electric Industry Co., Ltd.), 4 June 1987 (04. 06. 87) (Family: none)	22 - 44
Y	JP, A, 61-292044 (Plessey Overseas Ltd.), 22 December 1986 (22. 12. 86), &GB, A, 8509491	22 - 44

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y	JP, A, 61-191965 (Battelle Memorial Institute), 26 August 1986 (26. 08. 86), & EP, A, 184600	22 - 44
X	JP, A, 60-36963 (Myron J. Block), 26 February 1985 (26. 02. 85), & EP, A, 128723 & US, A, 4558014	22 - 44

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim numbers, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim numbers, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:


1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP90/00514

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁵ G01N33/533, G01N33/543, G01N33/58, G01N21/78		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	G01N33/533, G01N33/543, G01N33/58, G01N21/78	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
日本国実用新案公報 1971-1990年 日本国公開実用新案公報 1971-1990年		
III. 関連する技術に関する文献		
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	請求の範囲の番号
X	JP, A, 63-289001 (スカルボ・インコーポレイテッド・ ウエスト コースト), 25. 11月. 1988 (25. 11. 88), (ファミリーなし)	1-21
X	JP, A, 64-47952 (サイバーフルーア・インコーポレー テッド), 22. 2月. 1989 (22. 02. 89), (ファミリーなし)	1-21
X	JP, A, 61-88155 (オーソ・ダイアグノスティック・ システムズ・インコーポレーテッド), 6. 5月. 1986 (06. 05. 86), &US, A, 4666862	1-21
Y	JP, A, 62-79334 (オールド・インコーポレーテッド), 11. 4月. 1987 (11. 04. 87), &US, A, 4716121	22-44
<p>*引用文献のカテゴリー</p> <p>「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」 先行文献ではあるが、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</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の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の文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
04. 07. 90		
国際調査機関	権限のある職員	2 G 7 9 0 6
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	秋 月 美 紀 子 

第2ページから続く情報		
	(III欄の続き)	
Y	JP, A, 62-79333 (オールド・インコーポレーテッド), 11. 4月. 1987 (11. 04. 87), &US, A, 4844869 & DE, A, 3630353	22-44
X	JP, A, 59-81560 (マイロン・ジエイ・ブロック), 11. 5月. 1984 (11. 05. 84), &US, A, 4447546 & EP, A, 103426	22-44
Y	JP, A, 62-66143 (コーニング・グラス・ワークス), 25. 3月. 1987 (25. 03. 87), &EP, A, 223352 & US, A, 4671938	22-44
V. <input type="checkbox"/> 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見		
<p>次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。</p>		
VI. <input type="checkbox"/> 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見		
<p>次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。 請求の範囲 _____</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。 請求の範囲 _____</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。</p> <p>追加手数料異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。</p>		

Ⅲ. 関連する技術に関する文献 (第2ページからの続き)		
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	請求の範囲の番号
X	JP, A, 62-123358 (住友電気工業株式会社), 4. 6月. 1987 (04. 06. 87), (ファミリーなし)	22-44
Y	JP, A, 61-292044 (プレツシー・オーバーシーズ・ リミテッド), 22. 12月. 1986 (22. 12. 86), &GB, A, 8509491	22-44
Y	JP, A, 61-191965 (パテル メモリアル インスティ テュート), 26. 8月. 1986 (26. 08. 86), &EP, A, 184600	22-44
X	JP, A, 60-36963 (マイロン・ジエイ・ブロック), 26. 2月. 1985 (26. 02. 85), &EP, A, 128723 & US, A, 4558014	22-44