

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4657084号
(P4657084)

(45) 発行日 平成23年3月23日(2011.3.23)

(24) 登録日 平成23年1月7日(2011.1.7)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 35/02	(2006.01)	GO 1 N 35/02	A	
GO 1 N 35/00	(2006.01)	GO 1 N 35/00	C	
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 1	

請求項の数 9 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2005-319717 (P2005-319717)	(73) 特許権者	000005821
(22) 出願日	平成17年11月2日(2005.11.2)		パナソニック株式会社
(65) 公開番号	特開2007-127495 (P2007-127495A)		大阪府門真市大字門真1006番地
(43) 公開日	平成19年5月24日(2007.5.24)	(74) 代理人	100072431
審査請求日	平成20年1月10日(2008.1.10)		弁理士 石井 和郎
		(74) 代理人	100117972
			弁理士 河崎 真一
		(72) 発明者	山本 智浩
			大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
		審査官	福田 裕司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料分析用ディスク

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

上基板と下基板との間にスペーサを介して設けられた空隙からなるチャンバーと、前記チャンバーに設けられた少なくとも2個の開口部とを有し、

前記チャンバーが、前記下基板に設けられた複数個の下側凹状部分と、液体分析試料との反応に必要な物質を含み、かつ前記液体分析試料に溶解する固体状試薬とを具備し、

前記下側凹状部分のうち少なくとも1箇所において、前記下側凹状部分と、前記上基板の前記下側凹状部分と対向する部分とにより、前記固体状試薬が把持されていること、を特徴とする試料分析用ディスク。

【請求項2】

前記チャンバーが、前記下側凹状部分に対応して前記上基板に設けられた複数個の上側凹状部分を具備し、

前記下側凹状部分と前記上側凹状部分との組合せにより形成される部分のうち少なくとも1箇所において、前記下側凹状部分と前記上側凹状部分とにより前記固体状試薬が把持されていること、を特徴とする請求項1記載の試料分析用ディスク。

【請求項3】

前記下側凹状部分が、球面の一部を構成する曲面を有する、請求項1または2記載の試料分析用ディスク。

【請求項4】

前記上側凹状部分が、球面の一部を構成する曲面を有する、請求項2記載の試料分析用

ディスク。

【請求項 5】

前記固体状試薬が略球状に固形化されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の試料分析用ディスク。

【請求項 6】

前記固体状試薬が、単一の前記物質または複数の前記物質の混合物を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の試料分析用ディスク。

【請求項 7】

前記物質が混合忌避の複数の物質を含み、前記混合忌避の複数の物質が別々に固形化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の試料分析用ディスク。

10

【請求項 8】

前記固体状試薬が、前記物質の水溶液を凍結した後、減圧下で加熱し、水分を昇華させることによって得られたものであること、を特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試料分析用ディスク。

【請求項 9】

前記固体状試薬が、前記物質の粉末を圧縮成型することによって形成されたものであること、を特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の試料分析用ディスク。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、主として臨床検査分野において試料と試薬との化学反応を検出するために用いるデバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、分析・解析・検査技術の進歩により、様々な物質を測定することが可能となってきた。特に、臨床検査分野においては、生化学反応、酵素反応、もしくは、免疫反応等の特異反応に基づく測定原理の開発により、病態に反映する体液中の物質を測定できるようになった。

その中で、ポイント・オブ・ケアテストング（POCT）と呼ばれる臨床検査分野が注目されている。POCTでは、簡易迅速測定を第一とし、検体を採取してから検査結果が出るまでの時間の短縮を目的とした取組が行われている。したがって、POCTに要求される測定原理及び測定装置は、簡易な測定原理に基づき、小型で携帯性があり、操作性が良い測定装置である。

30

【0003】

今日、POCT対応測定機器は、簡易測定原理の構築、それに伴う生体成分の固相化技術、センサデバイス化技術、センサシステム化技術、微細加工技術、及びマイクロ流体制御技術の進歩により、実用性が高くなってきている。

このような、POCT対応測定機器として用いることが可能な分析装置として、従来、ディスク上に展開した試料の定性・定量分析を行う装置が、例えば特許文献 1 において提案されている。

40

【0004】

上記特許文献 1 記載の技術を用いた測定装置は、血液等の試料を分析することで病気の診断などを行うことができる。ここで、図 3 は上記従来の液体試料分析装置で使用される分析用ディスクを示す構成図である。図 3 に示すように、ディスク 101 に試料注入孔 104、流路 105 が設けられ、流路中には試料と反応して光学特性（透過率・色など）が変化する試薬 106 が塗布されている。

分析は、前記試料注入孔 104 からディスク 101 内に試料を注入して分析装置に装着して行う。

【0005】

図 4 は上記特許文献 1 における分析装置を示す構成図である。装置の構成はいわゆる光

50

ディスク装置に類似しており、ディスク101を回転させるためのスピンドルモータ201、ディスク101内に展開された試料または試料900と反応した試薬106に光ビームを照射するための光ピックアップ212、光ピックアップ212をディスク101の半径方向に移動させるための送りモータ213等から構成されている。

装置に装着されたディスク101は、スピンドルモータ201により回転し、その遠心力により試料900はディスク101の流路105内に展開され、同時に流路105内に塗布された試薬106と反応する。反応の終了後、ディスクを回転させながら光ピックアップ212を用いて流路105内の試料900もしくは試薬106に光ビームを照射し、その反射光もしくは透過光を検出することで試薬の反応状態を検出して分析を行う。

【0006】

また、上記のようなディスクの構成に、更に、例えば血液中の血漿成分のみを試薬と反応させるために、血球を遠心分離により除去したり、複数の試薬を順次溶解、反応させたりするために、試薬を塗布する複数のチャンパー部分とチャンパー部分間を結ぶ流路を設けることにより、試料液を自由に移動、停止させる機能を付加した構造も提案されている（例えば、特許文献2）。

特許文献2記載の発明においては、上記特許文献1記載の構造によりもたらされる試料液の移動と停止は下述する基本的なメカニズムに基づく。図5は、特許文献2において提案されている技術を説明するための図である。

【0007】

図5に示すように、流路302は、試料液流動の上流側チャンパー301の遠心力の方向を基準に見た場合の下側301aから出て、同チャンパーの遠心力方向を基準に見た場合の上側壁面より水準以上の位置302aまで持ち上がり、続いて、遠心力方向を基準に見た場合の下方に続いていき、その先に配置された下流側チャンパー303に連結している。同様の流路304によって、透過光測定チャンパー305にまで連結されている。

ここで留意すべき点は、チャンパーの深さが流路の深さより大であることである。これにより、流路を毛細管現象で移動してきた試料液は、流路がチャンパーに連結している部分で毛細管現象による移動が妨げられ、結果、チャンパーの手前で試料液を停止させることが出来る。この状態からディスクを回転させるなどして、遠心力を与えることで、停止していた試料液はチャンパー（下方側チャンパー303）に流入する。

【0008】

ここで更に留意すべき構造として、上述したような、同チャンパーの遠心力方向を基準に見た場合の上側壁面より水準以上の位置302aまで持ち上がり、続いて、遠心力方向を基準に見た場合の下方に続いていくという、流路の配置上の特色である。

この特色のため、遠心力を加えた際に、上流側チャンパー301に溜まり、流路302の下方側チャンパー手前部分まで満たした試料液に、サイフォン効果が働き、流路302を経由して、上流側チャンパーに溜まった試料液のほぼ全量が下方側チャンパー303に流入するのである。

【0009】

然るに、遠心力が作用している間は、下方側チャンパー303に流入した試料液は、流路304にも浸入するが、チャンパー303の液面と、遠心力方向を基準に見た場合の同じ水準までしか液面は到達しない。したがって、流路304を上述した流路302と同様、下方側チャンパーの上側側面より上方まで持ち上げた構造にしておけば、遠心力が作用している間は、次のチャンパー手前まで試料液が移動することはない。

そして、回転を停止するなどして、遠心力の作用を除去したときに、直ちに毛細管現象で試料液は流路304を移動して次のチャンパー、図5では透過光測定チャンパー305の手間まで到達する。この状態から遠心力を作用させることで透過光測定チャンパー305に試料液が流入する。この状態で遠心力の作用を中止すると、透過光測定チャンパー305内の試料液が毛細管現象により前記流路304を逆流し、透過光測定チャンパー内の試料液量が不足する場合があること等の理由により、透過光測定時にも遠心力を作用させる。

10

20

30

40

50

【0010】

各チャンパー間の試料液の流入を円滑にするために、各チャンパー上部には試料液が到達し得ない部分に空気穴306、307、308が設けられている。このような構造により、試料液に十分溶解、反応させ、流路を移動させることが可能である。

上記チャンパー302に試料液中の特定成分の測定に必要な反応試薬を乾燥担持する場合、反応に必要な濃度以上の試薬濃度の水溶液をチャンパー302の容積量、滴下乾燥するか、チャンパー302の容積量の試料液に反応試薬が溶解した際に、反応に必要な試薬濃度足りうる量の試薬をチャンパー302内に担持できるような濃度と滴下量の試薬溶液を滴下乾燥することで反応試薬層を得ることができる。

【0011】

しかし、チャンパー302に試薬層を形成する構成では、試料液が流入した際に、特に攪拌の効果を得ることができないので、試薬層の溶解が十分ではなくなる場合があった。

また、チャンパー302の底面と側面の接続部分が直角または鋭角であると、乾燥された試薬層が底面中央付近に比して、この部分に特に重厚に堆積される傾向があり、これが原因で試料液流入時の試薬層の溶解が十分になされない場合もあった。いずれの場合も、試料液中の試薬濃度が十分ではなく、結果的に測定に必要な化学反応が十分に進行しないという問題が生じる懸念があった。

【0012】

さらにまた、試薬溶液の風乾によって試薬層を得た場合、試薬層表面が稠密になることも、試料液による溶解を妨げる要因となっていた。加えて、試薬溶液の風乾過程で、水分の蒸発により試薬溶液が非常に濃縮されるので、試薬層の組成によっては、変性するおそれがあった。

【特許文献1】国際公開第00/026677号パンフレット

【特許文献2】特開2000-580007号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、上記従来の問題点を解決し、前記試料と試薬の混合溶液の化学反応を検出する手段を有する分析用ディスクに関し、特に前記試料と前記試薬の反応を迅速かつ正確たらしめ、もって前記化学変化検出の正確性を確保することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

上記の課題を解決すべく、本発明は、

上基板と下基板との間にスペーサを介して設けられた空隙からなるチャンパーと、前記チャンパーに設けられた少なくとも2個の開口部とを有し、

前記チャンパーが、前記下基板に設けられた複数個の下側凹状部分と、液体分析試料との反応に必要な物質を含み、かつ前記液体分析試料に溶解する固体状試薬とを具備し、前記下側凹状部分のうちの少なくとも1箇所において、前記下側凹状部分と、前記上基板の前記下側凹状部分と対向する部分とにより、前記固体状試薬が把持されていること、を特徴とする試料分析用ディスクを提供する。

【0015】

上記試料分析用ディスクにおいては、前記チャンパーが、前記下側凹状部分に対応して前記上基板に設けられた複数個の上側凹状部分を具備し、

前記下側凹状部分と前記上側凹状部分との組合せにより形成される部分のうちの少なくとも1箇所において、前記下側凹状部分と前記上側凹状部分とにより前記固体状試薬が把持されていること、が好ましい。

【0016】

また、前記固体状試薬は、前記物質の水溶液を凍結した後、減圧下で加熱し、水分を昇華させることによって得られたもの、または、前記物質の粉末を圧縮成型することによって形成されたもの、であることが好ましい。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、試料とチャンバー内に担持された固体状試薬の化学反応を検出することにより試料の分析を行うための分析用ディスクにおいて、前記固体状試薬が水分を含むことによって変性することを防ぐことができ、また、固体状試薬の表面および内部に試料液が浸透する空隙が形成されることにより試薬層の溶解性が向上し、反応時間の短縮が可能になり、化学反応検出による試料液中の特定成分の検出の正確性と迅速性の確保が可能になる。更に、固体状試薬を分析用ディスクと独立して作製できるので製造工程上の柔軟性の向上が期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

図1は、本発明の試料分析用ディスクに含まれるチャンバーの一実施の形態を示す概略上面図である。図1において、試料分析用ディスクは一点鎖線で示し、回転中心をCで示した。また、図2は、図1に示す試料分析用ディスクのチャンバー10の部分のa-a線断面図である。

図1および2に示すように、本実施の形態の試料分析用ディスクのチャンバー10は、上基板6と下基板8との間にスペーサ7を介して設けられた空隙からなり、少なくとも2個の開口部1、2とを有する。また、チャンバー10は、下基板6に設けられた複数個の下側凹状部分3aを具備し、下側凹状部分3aのうちの少なくとも1箇所に固体状試薬が担持されている。

【0019】

上基板6と下基板8とで構成されているチャンバー10は、別の部材で構成されたディスク上に搭載されていてもよく、また、チャンバー10が上基板6と下基板8とで構成されているとともに、ディスクそのものが上基板6と下基板8とで構成されていてもよい。また、上基板6と下基板8とで構成されているチャンバー10は、ディスクに内蔵されていてもよい。ただし、図1および2においては、チャンバー10は上基板6と下基板8とで構成されており、ディスクは図1に一点鎖線で仮想的に示されている。

【0020】

チャンバー10は、上基板6、スペーサ7および下基板8を貼り合わせて形成されており、下基板8にはチャンバー10の側面の一部と底面を形成する曲面状の凹状部分3aが設けられ、スペーサ7には流路の側壁とチャンバー10の側壁の一部に相当する切り抜き部が設けられている。

上基板6は流路とチャンバー10の天井面を形成する。チャンバー10の底面と、これに対向する位置の天井面には、等間隔で曲面状の凹状部分3a、3bが設けられている。

【0021】

凹状部分3a、3bは、球面の一部に対応した曲面状を有するように構成されている。

本発明のチャンバー10においては、凹状部分3aの曲面と対応する凹状部分3bの曲面とから仮想的に構成される球の直径が、凹状部分3a、3bの最深部間の距離と同じであるか、または大きくなるように、上基板6および下基板8にそれぞれ凹状部分3a、3bが設けられていることが好ましい。これにより凹状部分3a、3bによって固形状試薬5を把持することができるからである。

この凹状部分3a、3bのうちの少なくとも1箇所には、略球状（球状を含む）に成型された固体状試薬5が挟み込まれる。

【0022】

さらに具体的には、固体状試薬5の直径は、凹状部分3a、3bにおけるチャンバー10の深さ D_1 以下で、かつチャンバー10の底面側の下基板8および天井面側の上基板6において、凹状部分3a、3bがない平面領域での深さ D_2 以上であるのが好ましい。この条件を満たすことで、固体状試薬5をチャンバー10内に物理的に確実に固定することができるからである。

10

20

30

40

50

また、凹状部分 3 a、3 b は、それぞれ固体状試薬 5 の数だけ成型されているが、凹状部分 3 a、3 b の中心間距離は、固体状試薬 5 の直径以上であるのが好ましい。

【0023】

固体状試薬 5 は、反応に必要な試薬を固形化したもので、試薬の粉体を所望する固体状試薬 5 の直径を有する球形の鑄型に封入、圧縮したり、試薬の水溶液の液滴を所望する固体状試薬 5 の直径に制御して凍結、乾燥したりして得ることができる。このような方法により作製した固体状試薬 5 は、チャンバー 10 内に流入した試料で容易に溶解し、反応に必要な濃度を確保し易い。

ただし、チャンバー 10 内に流入した試料で溶解した際に反応に必要な濃度が確保できるだけの試薬量をチャンバー 10 内に実包できる固体状試薬 5 が得られるのであれば、上記の方法に限られるものではない。

10

【0024】

また、固体状試薬 5 は、単一または複数の物質の混合物であってもよい。しかも、1 つのチャンバー 10 内に実包される固体状試薬 5 は、必ずしも 1 種類でなくてもよく複数種類であってもよい。

例えば、試料中の特定成分の検出のための化学反応に本来 10 種類の物質が必要である場合があるとすると、本来、10 種類の物質すべてを含む 1 個の固体状試薬 5 を用いれば、試料で固体状試薬 5 が溶解した後に直ちに前記の化学反応が進行して都合がよい。ただし、前記 10 種類の物質のうち、接触することで互いに干渉し、徐々に変性する混合忌避を伴う試薬が含まれる場合には、すべての物質を含む 1 つの固体状試薬 5 にするのは好ましくないため、前記 10 種類の物質を例えば 2 群に分けて、各物質群を含む 2 種の固体状試薬 5 を 1 つのチャンバー 10 に実包すれば、混合忌避の物質を分離することができ、しかも反応時には一度に混合できる。

20

【0025】

また、一種類の固体状試薬 5 を 1 つのチャンバー 10 内に複数個実包することもできる。この場合、固体状試薬 5 の直径を小さくできるとともに、凹状部分 3 a、3 b でのチャンバー 10 深さやディスクの厚みも小さくすることができる。

また、固体状試薬 5 の球面の質量あたりの表面積が増加し、チャンバー 10 に試料が浸入した際の試料に対する溶解がより迅速に進行する効果が期待できる。

【0026】

ディスク回転中心 C に近い開口部 1 に接続する流路から試料は流入し、ディスク回転中心 C から最も遠い位置の開口部 2 から流出する。

さらに、チャンバー 10 の底面および天井部のいずれか一方に凹状部分 3 a または凹状部分 3 b が形成されている場合でも、上述した効果を得ることができる。この場合には、上下に凹状部分がある場合よりも固体状試薬 5 の物理的な固定効果が若干弱くなるが、固体状試薬 5 がチャンバー 10 の内壁（凹状部分と対向する天井面または底面）に接触する面積が小さくなり、その分だけ試料による溶解性は向上する。

30

【0027】

上述した構造のチャンバー 10 に、ディスク回転中心 C に近い開口部 1 に接続する流路から試料は流入し、チャンバー 10 内で固体状試薬 5 を溶解し、ディスク回転中心 C から最も遠い位置の開口部 2 から流出し、次のチャンバー（図示せず）に移送される。

以下において、実施例によりさらに詳細に本発明を説明する。なお、本発明をより具体的に説明する為に、具体的な測定対象物、部材の材質等を具体的に記載しているが、本発明がそれらの記載によって制限を受けるものではない。

40

【実施例】

【0028】

血漿中の総コレステロール濃度を測定するために、図 1 および図 2 に示す構造を有する液体試料分析用ディスクに搭載されるチャンバー 10 を作製した。

ポリカーボネート製の基板 6 および下基板 8 と、両面に粘着剤を塗布したポリエチレンテレフタレート製の厚み 100 μm のスペーサ 7 を用意した。下基板 8 を成型によって

50

作製する際に、凹状部分 3 a を設けた。また、上基板 6 を成型によって作製する際に、凹状部分 3 b を設けた。また、凹状部分 3 a、3 b は、上基板 6、スペーサ 7 および下基板 8 を貼り合わせた際に、互いに対向して位置するように設けた。

【0029】

ディスクの回転時に遠心力が加わる向き（図 1 における矢印の向き）を「縦方向」とした場合、上基板 6 および下基板 8 のうちチャンバー 10 に面する部分が、ディスクの面の法線方向からみて、縦 D_t が 1.5 mm で、横 D_w が 4 mm の長方形の平面形状を有するように、構成した。

より具体的には、上記長方形のうち、ディスクの回転時に外側になる側の辺から t ($= 0.5 \text{ mm}$) の位置に、上記長方形の左側から 0.5 mm、1.5 mm、2.5 mm、および 3.5 mm の位置に、直径 0.8 mm および深さ 0.2 mm を有する曲面状の凹状部分 3 a、3 b を、それぞれ 4 個ずつ上基板 6 および下基板 8 に設けた。

【0030】

また、下基板 8 がチャンバー 10 に面する部分には、0.5 mm の深さを持たせた。したがって、上基板 6、厚み $100 \mu\text{m}$ のスペーサ 7 および下基板 8 を貼り合わせると、チャンバー 10 の底面の平面部分から天井の平面部分までの距離、即ちチャンバー 10 の深さは 0.6 mm になった。

この場合、凹状部分 3 a、3 b は、直径 1.0 mm の仮想的な球体の表面を形成する曲面形状および位置関係を構成する。また、チャンバー 10 の容積は、凹状部分 3 a、3 b 部分の容積を含めて約 $4.03 \mu\text{l}$ であったが、後述するように、凹状部分 3 a、3 b の位置に直径 1.0 mm の固体状試薬 5 を実包したとき、試料がおよそ $2.83 \mu\text{l}$ 以上流入すれば、この固体状試薬 5 を完全に試料中に浸漬させることができる。従って、チャンバー 10 に流入する試料量を $3.0 \mu\text{l}$ に制御するようにディスクのチャンバー 10 と流路を構成した。

【0031】

固体状試薬 5 は、後述するように、反応に必要な試薬群を水あるいは pH 緩衝液に溶解させた溶液を凍結乾燥法で形成したが、コレステロールを検出する試薬系では、すべての試薬を 1 つの層にすると、試薬同士の相互作用による変性のため、期待する反応が生じにくくなる。

そこで、3 種に分割した固体状試薬 5 を、後述するように 2 個のチャンバーに分けて配置した。また、図 5 に示す従来の試薬分析用ディスクにおいて、チャンバー 301、303 および 305 として、上述したチャンバー 10 を用いた。なお、透過光測定用のチャンバー 305 には固体状試薬 5 を配置する必要はなく、図 5 中の上流側のチャンバー 301 が第 1 のチャンバーに相当し、下流側のチャンバー 303 が第 2 のチャンバーに相当する。

【0032】

試料移送の機構は従来の試料分析用ディスクの試料液移送の機構と同様である。

第 1 のチャンバー 301 および第 2 のチャンバー 303 は、上述した形態の流路で連結されている。2 つのチャンバー 301、303 に続いて、試料の化学変化を検出するための測定用のチャンバー 305 が連結されている。

本実施例では、化学変化の検出は、コレステロールの化学反応に起因する、固体状試薬 5 に含まれる色素の特定波長の吸光度変化の検出により実施した。従って、測定用のチャンバーの底面部および天井部は平面とし、光学的に前記波長に対して、略透明とした。

【0033】

測定チャンバーの深さは、試薬として後述するものを用いる場合は $200 \mu\text{m}$ が適切であるが、一般的には、透過光測定時の光路長に相当するので、測定時に透過光量または吸光度が変化することにより測定対象物質の濃度を示す物質の透過光量または吸光度が適切な数値になるように適切に設定すればよい。

固体状試薬 5 を実包するチャンバー 301、303 は、上述したように約 $4 \mu\text{l}$ の容積を有し、流入する試料量を $3 \mu\text{l}$ に制御すれば固体状試薬 5 が完全に溶解する。一方、測

10

20

30

40

50

定用のチャンバー 305 は、直径 2 mm で深さが 200 μ m の平面形状を有する。

この場合、測定用のチャンバー 305 の容積は約 0.6 μ l になるため、流路移送中に流路に残留する試料が生じて、測定に必要な試料液量の確保が可能である。

【0034】

血漿中のコレステロール濃度を測定するために、以下の反応機構を用いる。

(1) E-Chol Chol (酵素: ChE)

(2) Chol+NAD コレステノン+NADH (酵素: ChDH)

(3) NADH + WST-9 NAD+ホルマザン (酵素: DI)

上記式(3)中のホルマザンの生成による波長 650 nm の透過光に対する吸光度が濃度に対応する変化量を測定し、総コレステロール濃度を算出する。なお、上記の式(1)~(3)において、E-Chol はコレステロールエステルを示す。血漿中のコレステロールの大半はエステル化している。Chol はコレステロールを示す。ChE は E-Chol を Chol に変化させる反応を触媒する酵素であるコレステロールエステラーゼ (EC 3.1.1.13) を示す。

10

【0035】

ChDH は、コレステロールデヒドロゲナーゼ (EC は不明、アマノエンザイム (株) より購入)、NAD は ChDH の補酵素であるニコチンアデニンジヌクレオチド、NADH は NAD の還元状態を示す。WST-9 は「水溶性テトラゾリウム-9」の英語の頭文字をとった略称で、(株) 同仁化学研究所より入手できるテトラゾリウム塩の 1 種である。DI はジアホラーゼ (EC 1.6.99.2) を示す。DI は NADH の NAD への酸化反応とそれに共役する還元反応を触媒する酵素である。

20

【0036】

上記の反応を行わせるために、前記チャンバー 301、303 に下記の 3 種の固体状試薬 5 を分けて配置する。第 1 のチャンバー 301 には、ChE と、ChDH を含む酵素固体と、NAD および界面活性剤を含む NAD 固体とを含め、第 2 のチャンバー 303 には、WST-9 と DI を含む WST 固体とを含める。

更に、ChDH の好適な pH は 8 以上 (アルカリ性領域) であることから、pH 緩衝剤を反応系に用いることが好ましい。ただし、反応時の pH を調整するための pH 緩衝剤であるトリス塩酸塩は、凍結乾燥した場合、酵素や界面活性剤との混合溶液では凍結乾燥固体が通常の大気中に暴露すると直ちに空気中の水分を吸収して潮解する傾向がある。そのため、反応系を活性化するための添加剤の 1 つであるコール酸ナトリウムとの混合溶液を第 1 のチャンバー 301 の凹状部分 3b に滴下乾燥した。

30

【0037】

酵素固体は、ChE と、ChDH と、凍結乾燥後の固体の形状保持のために加えたシュクロースとからなる。形状保持のための添加物は反応系に影響を与えない限り、シュクロース以外の糖や、蛋白などを適宜用いることができる。

NAD 固体は ChE の触媒活性を活性化するための界面活性剤である n-オクチル-D-チオグルコシドと NAD からなる。特にこれ以外に添加剤を加えなくても形状保持は可能だが、より堅固にするために添加物を加えることもできる。

WST 固体は WST-9 と DI とシュクロースとからなる。シュクロースは上述したように形状保持のために加えている。

40

【0038】

反応性や測定時間の観点からは固体状試薬 5 の設置数はなるべく少ない方が好適であるが、本実施例での反応系の場合、ChDH と NAD の混合水溶液は溶液の安定性がよくないのでこれら 2 種の物質は別の固体にする必要がある。そこで、これら 2 種の試薬を分離するために酵素を含む固体状試薬 5 と NAD を含む固体状試薬を作製した。

これら 2 種の固体状試薬 5 は、試料液に両方が溶解して初めて試料中のコレステロールの酸化反応と、それに共役する NAD の還元反応が進行するので、1 つのチャンバーに配置した。

【0039】

50

更にWST-9について、ChDHの触媒活性を阻害する傾向が認められるので、WST-9を含む固体状試薬5も独立して作製し、これは前記の2種の固体状試薬による反応が進行してから試料に溶解する必要があるため、別のチャンバー303に配置する必要がある。

WST-9とともに、WST-9の還元反応を触媒するためにDIも同じ試薬固体に添加した。

【0040】

上記の式(1)および(2)の反応を、WST-9が含まれていない条件で行い、その後WST-9を混合し、呈色反応を誘導する必要があるため、試料の流れる順に、酵素を含む固体状試薬およびNADを含む固体状試薬を第1のチャンバー301に配置し、WST-9を含む固体状試薬を第2のチャンバー303に配置した。

10

各々の固体状試薬は直径1mmになるように凍結乾燥によって形成し、酵素を含む固体状試薬およびNADを含む固体状試薬は第1のチャンバー301にそれぞれ2個ずつ、WSTを含む固体状試薬は第2のチャンバー303に4個配置した。

【0041】

それぞれの固体状試薬を得るための試薬水溶液の濃度は、3 μ lの試料で反応に必要な濃度になるように調整している。すなわち、直径1mmの体積が約0.52 μ lで、酵素を含む固体状試薬およびNADを含む固体状試薬はそれぞれ2個ずつ配置されるので、それぞれの試薬水溶液は試料中での反応に必要な濃度の3/(2 \times 0.52)倍、WSTを含む固体状試薬は3/(4 \times 0.52)倍になるように調整した。これらの濃度調整は、チャンバー301、303の形状を勘案して適宜定める必要がある。

20

【0042】

上述した方法で作製した固体状試薬5を包含する液体試料分析用ディスクに標準血清またはこれを生理食塩水で希釈した試料を点着し、図3に示す構造を有する測定装置で吸光度を測定したところ、試料液中の総コレステロール濃度に依存した吸光度変化(即ち応答性)を観測することができた。図6にその結果を示す。

図6において、縦軸は波長650nmのレーザー光を照射したときの吸光度を示しており、横軸は試料液中のコレステロール濃度(フリー型換算)を示している。そして、この結果から、吸光度変化がコレステロール濃度に依存しているということがわかる。

【0043】

なお、本実施例では、色素たるWST-9の吸光度変化を検出することで、血漿中の総コレステロール濃度を測定する例を示したが、WST-9のかわりに、水溶液になった際、フェリシアン化物イオンを生成するフェリシアン化カリウムを固体状試薬に含有させ、測定用のチャンバー内に少なくとも対極と作用極の役割を果たすことができる電極を設けてもよい。

30

【0044】

この場合、更に、図3の分析装置に、前記電極にディスク外部から接触することができる端子を設けることにより、血漿中のコレステロールの酸化によってフェリシアン化物イオンが還元されて生じるフェロシアン化物イオンを、前記電極間に電圧を印加することで再度酸化させる際に生じる酸化電流値を計測して測定することもできる。この場合、フェリシアン化カリウムのかわりに、NADHとの間で電子授受が可能なレドックス化合物を任意に用いることができる。

40

また、更に、本実施例中で示した、血漿中のコレステロール以外にも、目的の成分に対する化学反応により生じた変化を光学的あるいは電気化学的に検出可能な反応系の確立が可能なる場合には任意の測定対象について本発明を用いることが可能である。

【産業上の利用可能性】

【0045】

本発明にかかる液体試料分析用ディスクは、試料と反応した試薬の化学変化を検出することにより試料の分析を行う際、より少ない試料量で速やかにかつ均一に試薬が溶解し、前記化学反応を空間的な偏りなく進行させることができ、もって、化学反応検出による

50

試料液中の特定成分の検出の正確性を確保することが可能となり、血液成分測定装置などに有用である。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】本発明の試料分析用ディスクの一実施の形態の概略上面図である。

【図2】図1に示す試料分析用ディスクのa-a線断面図である。

【図3】従来の液体試料分析装置で使用される分析用ディスクの構成を示す図である。

【図4】従来の分析装置の構成を示す図である。

【図5】従来の試料分析用ディスクおよび本発明の試料分析用ディスクにおける試料移送の機構を説明するための模式図である。

10

【図6】実施例における応答性を示すグラフである。

【符号の説明】

【0047】

1、2 開口部

3 a、3 b 凹状部分

5 固体状試薬

6 上基板

7 スペーサ

8 下基板

101 液体試料分析用ディスク

20

104 試料注入口

105 流路

106 試薬

201 スピンドルモーター

900 試料

212 光ピックアップ

213 送りモーター

302、304 流路

301 上流側チャンバー

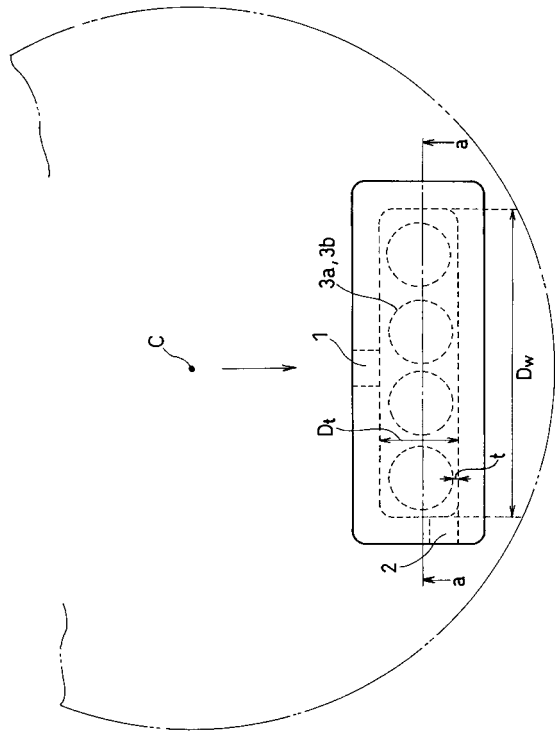
303 下流側チャンバー

30

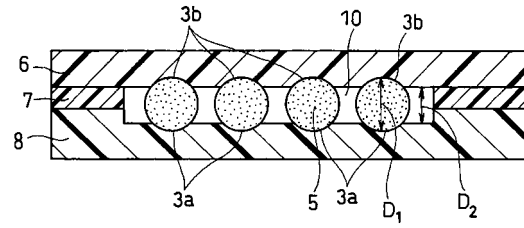
305 透過光測定チャンバー

306、307、308 空気口

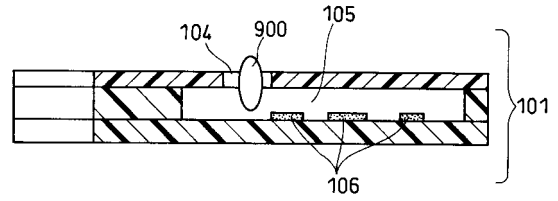
【図1】



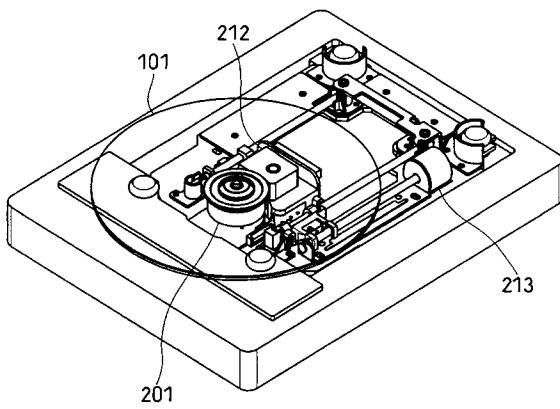
【図2】



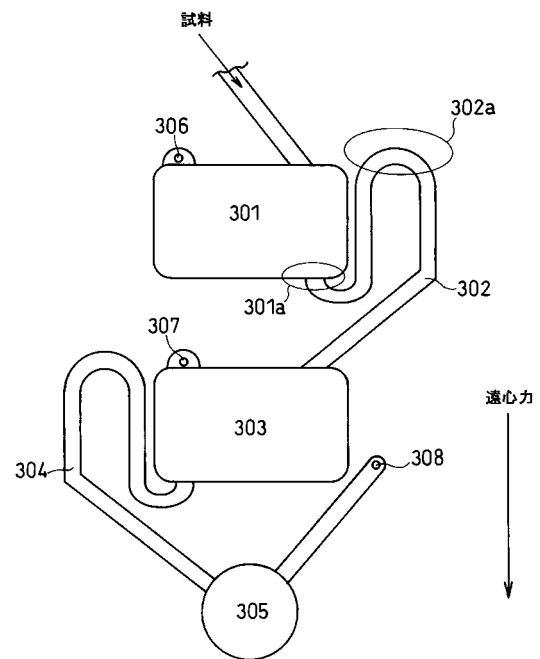
【図3】



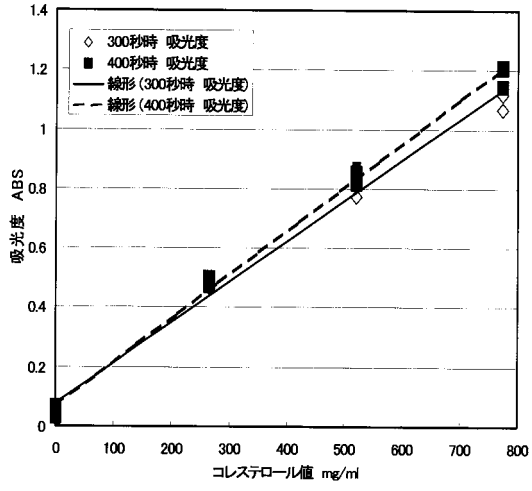
【図4】



【図5】



【 図 6 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2004-529323(JP,A)
国際公開第2004/086055(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 35/00 - 37/00
G01N 33/48 - 33/98