

# 全自動エンザイムイムノアッセイシステム AIA-1200 の開発

林		秀	知	佳
鈴	木	英		夫
岩	崎	修		次
光	久	幸		男
中	村	互		志

## Development of Fully Automated Enzyme Immunoassay System AIA-1200

Hidechika HAYASHI  
Hideo SUZUKI  
Shuuji IWASAKI  
Yukio MITSUHISA  
Hiroshi NAKAMURA

We have developed fully automated immunoassay system AIA-1200, which can make 120 assays per hour. Multiple analytes can be assayed in random access fashion.

One step enzyme immunoassay is automated using testpack technology. A testpack is a small black cup with lyophilized material and is sealed with aluminum foil. There are antibody immobilized magnetizable beads, enzyme (alkaline phosphatase) labelled antibody/antigen and bovine serum albumin in the cup. Analyte specific reagent is only the testpack. Antigen-antibody reaction is accelerated with oscillation of magnetizable beads induced by the external magnetic field. Alkaline phosphatase changes non-fluorogenic substrate (4-methylumbelliferyl phosphate) into fluorogenic product (4-methylumbelliferone). Enzyme activity is measured by rate assay using fluorescence detector. Both reaction and detection are held in the testpack itself. Sampling tip is renewed in each sample, which would avoid any carry over between samples.

### 1. はじめに

現代医療において治療は、勘より科学的データにもとづいて行なわれるようになった。その際、重視されるデータが血液成分の分析結果である。血液中に比較的多く含まれている成分は、通常化学反応や酵素反応を用いた全自動生化学分析によって分析される。一方、微量成分の分析は高性能液体クロマトグラフィ (HPLC) あるいは免疫化学測定法 (イムノアッセイ) によって行なわれる。

東洋曹達は高性能液体クロマトグラフを用いたグリコヘモグロビン分析計 HLC-723GHb を上市し、臨床分析市場を開拓してきたが、この程、酵素免疫化学測定法

を用いた全自動エンザイムイムノアッセイシステム AIA-1200 の開発を行なった。

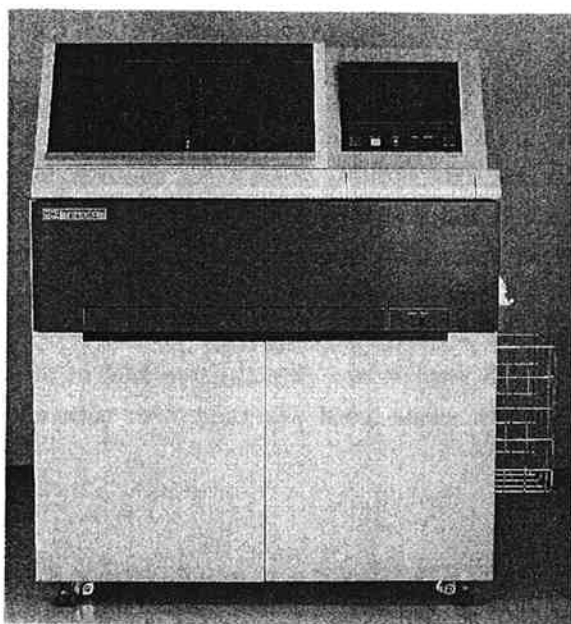
1956年に、R. S. Yalow と S. A. Berson によって放射免疫法が開発されて以来、様々な免疫化学測定法が開発されてきたが、依然として放射性同位元素を用いた二抗体法が最も広く使われている。放射性同位元素を用いることを避けるため、蛍光ラベルや酵素ラベルを用いた方法 (非放射免疫法) が種々開発されてきたが、試薬開発の困難度や検出感度などのため放射性同位元素に取って変わるまでに至っていない。

放射性同位元素をもちいた二抗体法では、遠心分離工程を必要とするなどの理由によって、行程ごとの自動化

は進んでいるが、トータルな自動化が遅れている。しかし、近年、免疫測定に対する全自動化の要望が高まるにつれて、放射免疫法および非放射免疫法の両方法において全自動分析システムの開発が進められるようになった。

我々は、このような状況を鑑み、ハイブリテック社と共同で、全自動エンザイムイムノアッセイシステム AIA-1200 を開発した。東洋曹達が装置開発を担当し、ハイブリテック社が試薬開発を担当した。また、東洋曹達は、日本の臨床診断市場の要望に沿った測定項目の試薬開発を同時に行なってきた。

AIA-1200 は蛍光物質の生成を触媒する酵素をラベルとして用いた蛍光酵素免疫測定法を自動化したランダムアクセスシステム（検体ごとに測定項目が選択可能）である。免疫反応試薬がはいったテストパック（試薬パック）だけが、測定項目に固有であり、他の液体試薬（分注液、洗浄液、基質液）は共通である。AIA-1200 を用いて、一時間に120テストの全自動測定が可能である。



## 2. 免疫測定法

### 〔1〕 測定原理

免疫反応を利用した測定法は多くの人によって数多くの方法が考えられてきた<sup>1)</sup>。免疫測定は一般に次のような手順で行なわれる。①免疫反応に関与する成分（抗原あるいは抗体）を含んだ検体と免疫反応試薬を混合し免疫反応を行なわせ、②免疫反応後、免疫反応複合体と未反応体を分離し、③免疫反応複合体あるいは未反応体に含まれているラベルの量を検出し、④分析成分の濃度

を検量線を用いて求める。

### 〔2〕 反応様式

免疫測定法では検体中の分析対象成分と免疫反応試薬との抗原抗体反応の結果を測定可能な量の変化に置き換えて測定しなければならないが、この点に関して、いろいろな反応様式が開発された。抗原の測定と抗体の測定とで多少異なる部分があるが、ここでは、抗原を例に取って説明する。

サンドイッチ法では固相に固定化した抗体（固定化抗体）と、ラベル抗体（標識抗体）とを免疫反応試薬として用いる。ここで一つの抗原の二つの異なる抗原決定部位に対する二種の抗体を用いる。検体と免疫反応試薬との免疫反応の結果、抗原が二つの抗体ではさまれたサンドイッチ様の複合体ができる。B/F 分離 (Bound/Free separation) によって、固相に連結した標識抗体とフリーな標識抗体を分離した後、分離した一方に含まれているラベルの量を測定すれば、検体に含まれていた抗原の量を知ることができる。

競合法では抗体と、ラベル抗原（標識抗原）を免疫反応試薬として用いる。検体中の抗原と標識抗原とが規定量の抗体との結合において互いに競合して反応する。すなわち、検体中の抗原量が多いと抗体に結合する標識抗原の量が減少し、逆に検体中の抗原量が多いと抗体に結合する標識抗原の量が減少する。B/F 分離後、ラベルの量を測定することによって検体に含まれていた抗原の量を求めることができる。

### 〔3〕 不均一法と均一法

サンドイッチ法や競合法では、B/F 分離（洗浄）を容易に行なうため、一般に抗体あるいは抗原をカップの内面、ビーズ表面、ディスクの表面など不溶性担体に固定化する。これらの表面は通常ガラスあるいはポリスチレン、ナイロンなどのプラスチックで作られており、吸着法や化学結合法によって抗体を結合することができる。

二抗体法では固相への固定化を行なわない。標識抗原と抗体（第一抗体）を含む免疫反応試薬と検体とを混合すると、検体に含まれた抗原と標識抗原とが第一抗体と競合反応する。つぎに第一抗体に対する抗体（第二抗体）を加えて反応させると、抗原—第一抗体複合体および標識抗原—第一抗体複合体が第二抗体と反応して免疫凝集体を生じて沈殿する。遠心分離によって沈殿物と上澄液を分離し、いずれか一方に含まれているラベルの量を測定することによって、検体に含まれていた抗原の量を求めることができる。

以上、B/F 分離を行なう免疫測定法を不均一法と総称するのに対して、B/F 分離を行なわない方法を均一

法という。均一法では、抗原と抗体が結合したことによって生じるミクロな環境の変化を蛍光強度の変化あるいは酵素活性の変化などをつうじて検出することができる<sup>2)</sup>。

#### 〔4〕 抗体の種類

モノクローナル抗体<sup>3)</sup>は大量に増殖した単一起源の抗体生成細胞が生産するため、常に同一品質の抗体が得られる上、用途にあった特性を持つ抗体を選択し、その抗体だけを大量に生産することが可能である。一方、ポリクローナル抗体は多様な抗体生成細胞の集団が生産する抗体の混合物であるため、様々な種類の抗体の集まりである。したがって、同じ品質の抗体を大量に得ることは困難である。

#### 〔5〕 免疫測定の自動化

放射免疫測定を自動化したシステムとしてベクトン・ディッキンソン社から ARIA II<sup>TM</sup> システムが発表されている。しかし、技術的な問題が解決すれば、非放射免疫測定の全自動システムが今後の主流になると考えられ

る。

非放射免疫測定の中でも均一法は B/F 分離が不要であるため、自動化に最も適した方法と言えるが、一般に検出感度は不均一法と比較して劣ることは否定できない。シバ社から EMIT<sup>TM4)</sup> (酵素活性変調法)、Advance<sup>TM5)6)</sup> (蛍光励起転移法)、アボット社から TDX<sup>TM</sup> (蛍光偏光イムノアッセイ)などが上市されている。

不均一法の全自動測定システムとしてオリンパス光学から PK300<sup>TM</sup> が、ベーリンガーマンハイム社から ES600<sup>TM</sup> が発表されている。PK300<sup>TM</sup> ではビーズ法を、ES600<sup>TM</sup> ではチューブ内面コート法を用いている。

### 3. AIA-1200 システム

#### 〔1〕 開発目標

臨床検査の現場の人達の意見を参考に以下のような目標を立て、AIA-1200 を開発した。

1) モノクローナル抗体を用いた高感度酵素免疫化学

Table 1 Specification of AIA-1200

Type	Single line multi analyte analyzer	
	Random select and access of analytes	
Analyte	Component in blood or urine (Tumor marker, hormon, etc.)	
Method	One-step sandwich method or one-step competition method	
Performance	120 assays/hour	
Capacity		
Sample loader	100 samples	
Test pack sortor	420 testpacks	
Sample program	2000 samples/2998 tests	
Reagents and ingredients		
Test pack	Analyte-specific immobilized antibody and labeled antibody/antigen Solid phase Magnetizable small beads Label Phosphatase, Alkaline (E. C. 3. 1. 3. 1)	
Dispense solution	Distilled water with surfactant	
Wash solution	Buffer with surfactant	
Substrate solution	Buffer with 4-methylumbelliferyl phosphate	
Assay procedure		
Testpack sorting		
Seal break		
Sampling	Sample solution	10~125 $\mu$ l
	Dispense solution	25~140 $\mu$ l
The 1st reaction	Immune reaction	37°C 40 min
B/F seperation	Wash by wash solution	11 times
The 2nd reaction	Enzyme reaction	37°C 2 min
Detection	Rate assay with fluorimetric detection	
	Excitation wave length	365 nm
	Emission wave length	450~500 nm

測定法により腫瘍マーカー、ホルモンなどの血中微量成分を測定対象とする。

- 2) 放射免疫測定法で測定できる項目はすべてカバーする。
- 3) 全自動で項目選択が自由である。
- 4) 一時間以内に結果が得られる。
- 5) 試薬の準備からデータ処理まで操作が簡単で時間がかからない。
- 6) 検量線作成の回数を極力減らして省力化、コストダウンをはかる。
- 7) シングルアッセイで信頼性の高い結果が得られる。
- 8) キャリーオーバー、コンタミネーションが起らない。
- 9) 精度管理プログラムを内蔵し、装置内で十分な精度管理ができる。
- 10) 各施設の検査の流れに合わせられるようにコンピュータソフトウェアの柔軟性を確保し、通信機能を充実させる。
- 11) トラブルが少なく、保守管理が容易である。
- 12) 小型、軽量、低価格である。

## (2) 主な仕様

Table 1 に AIA-1200 の主な仕様を示す。

AIA-1200 は Table 1 に示すような、全自動ランダムアクセスエンザイムイムノアッセイシステムである。検体一つ毎に複数の測定項目の中から必要な項目だけを選択して測定することができる。また、検体および試薬は任意追加可能になっている。

本システムは磁性微小ビーズを固相として用いた不均一測定法を採用し、かつ固定化抗体と標識抗体とを検体と同時に反応させる、ワンステップサンドイッチ法およびワンステップ競合法を用いて生体液中の微量成分を分析することが可能である。

B型肝炎ウイルスなどに対する抗体を本装置で検査するためには、標識抗体としてヒト抗体に対する抗体を使ってワンステップサンドイッチ反応系を組み、抗体量を測定することが原理的には可能である。しかし血清中には他の抗体が多く含まれているので、ウイルス抗体と標識抗体を反応させてやるためには、高濃度の標識抗体を用いる必要があり、試薬のコストが上がる。したがって、将来は、中間洗浄後に標識抗体を分注するツーステップ法に対応できるように改良する予定である。

## (3) テストパック

AIA-1200 の免疫反応試薬は一測定分ごとにカップに入れられ、ラミネートアルミ箔でシールされている(テストパック)。テストパックには抗体を固定化した磁性微小ビーズ(直径約 1.5 mm)が10~12個と、酵素(ア

ルカリフォスファターゼ)を結合した標識抗体が入っており、凍結乾燥されている。

テストパックはバーコードラベルが貼られたトレイに20個ずつ並べられている。テストパックの詰まったトレイは乾燥剤と一緒にラミネートアルミ箔の袋に入れられ、外気と遮断されているので、1年以上活性が保持されることが確認されている。

AIA-1200 の分析にはテストパックの他に分注液、洗浄液、基質液を用いるが、測定項目に依存するのは、テストパック自体の内容物と検体および分注液の分注量だけである。

現在、10数種類のテストパックの開発がハイブリテック社と東洋曹達で行なわれている。AFP, IgE, TSH, フェリチン測定用テストパックの厚生省からの医薬品輸入(製造)承認はすでに取得した。CEA, PAP, PSA, PRL, HCG,  $\beta$ -HCG, LH, FSH, T3, T4, CK-MB などについては準備中である。

## (4) 標準的な分析操作

オペレータが次に示す①~③の操作を行なうと AIA-1200 は自動測定を開始し、結果を報告書として印刷する。

- ① 操作パネルを用いて各被検検体ごとに測定項目を登録する。
- ② AIA-1200 によって印刷されたワークシートにしたがって検体、ピペットチップおよび使用するテストパックをセットする。また、試薬量をチェックし、補充する。
- ③ 測定開始を操作パネルから指示すると測定を開始する。
- ④ テストパックに、分注液と被検検体を分注すると、凍結乾燥体がすぐに溶解し、免疫反応が開始する。
- ⑤ 免疫反応中はテストパックの温度が 37°C に保たれる。また振動磁石によって磁性微小ビーズに往復運動が与えられて攪拌が促進される。被検検体に含まれていた抗原は、磁性微小ビーズに固定化された抗体および標識抗体と反応し、免疫反応複合体を形成する。
- ⑥ 40分の反応の後、B/F 洗浄工程で未反応標識抗体を洗い去る。
- ⑦ B/F 洗浄後、酵素の基質(4-メチルウンベリフェリルフォスフェート)を加える。
- ⑧ 酵素反応によって基質は蛍光を発する生成物(4-メチルウンベリフェロン)に変化する。蛍光強度の増加速度から、生成物の生成速度を求めると。
- ⑨ あらかじめ検定試料を分析して作成した検量線を使って被検検体に含まれていた抗原の量を計算し、

報告書を印刷する。

#### 4. AIA-1200 のハードウェア

AIA-1200 の装置構成を Fig. 1 に示す。以下、各モジュールごとに詳細に説明する。

##### (1) テストパックソータ

テストパックソータは、テストパックが入ったトレイを配列するテストパックドロワ（引き出し）、テストパックの在庫状況を検出するためのバーコードセンサおよびカップセンサ、テストパックをトレイから反応ブロックに運ぶ機構および反応ブロックをアナライザ部に移送する機構などから構成されている。

テストパックドロワを手前に引き出し、テストパックをセットし、再びテストパックドロワを閉じると、テストパックソータはトレイに貼られたバーコードラベルからトレイの種別を読み取り、さらにトレイ上のテストパックの有無を検出し、在庫管理表を作成する。オペレータが測定開始を指示すると、メインコントロールモジュールからソータモジュールにテストパックの積み込み指令と積み込むテストパックの種別情報が転送される。ソータモジュールは在庫管理表を参照して指定された項目のテストパックが存在する場所を求め、真空ピンセットを用いてテストパックを一つずつ反応ブロックに並べる。反応ブロックへの積み込みが終了すると、その反応ブロックは上昇用エレベータに乗って、アナライザ部へ送られる。

反応ブロックには縦横 5 列ずつの穴が開けられており、最大 25 個のテストパックを詰めることができる。

##### (2) インキュベータ

反応ブロックはインキュベータの上を 2.5 分に 1 ピッチずつ進む。テストパックは反応ブロックののってシー

ルブレーカ、サンプリングステーション、洗浄ステーション、検出器の下を通過し、その間に一連の免疫化学測定処理が行なわれる。反応ブロックには縦横 5 列ずつのテストパックが並べられているので、1 ピッチ 2.5 分で 5 テストパックずつ処理が行なわれる。

インキュベータの向こう側面には反応ブロックを移送するための機構が組み込まれている。

インキュベータの温度は裏面に貼られた平面ヒータとサーミスタ温度検出器を用いて 38°C に制御されている。冷たい反応ブロックがインキュベータの入口に入ってきた時に生じるインキュベータの他の部分の温度変動が免疫反応速度や酵素反応速度に影響を及ぼすことを防ぐため、インキュベータを左中右と三分割して独立に温度制御した。

インキュベータの内側には円盤状磁石 ( $\phi 5 \times 3$ ) を交互に並べた 5 本の磁石バーが、シールブレーカ位置から蛍光検出位置まで延びている。磁石バーが 1 分間に約 80 回の割合で往復運動することにより、磁性微小ビーズが往復運動し、溶液の攪拌が促進される。

##### (3) シールブレーカ

テストパックソータでテストパックが積み込まれた反応ブロックがシールブレーカの下を通過するとき、Fig. 2 のように四つの平面が一点で交わる形をした刃がテストパックに打ち込まれる。そこでラミネートアルミ箔は四葉に破壊され、カップ内面に押し付けられる。また円錐状の刃や六つの平面が一点で交わる形をした刃も試作し、評価したが、アルミ箔の破れ方が一定に成らず、不規則になった。

##### (4) サンプリングステーション

###### (1) 検体のセット

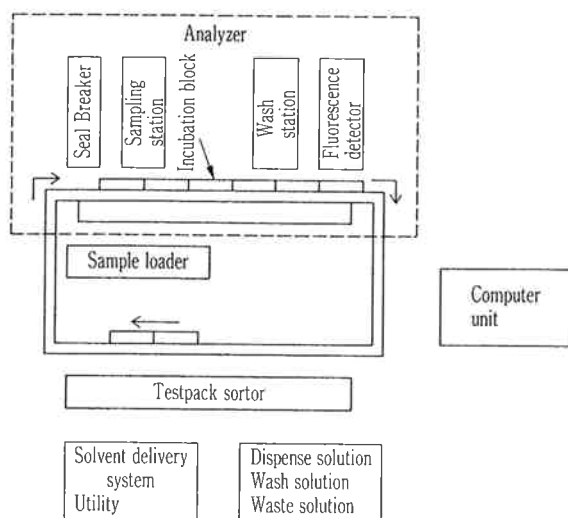


Fig. 1 Block diagram of AIA-1200

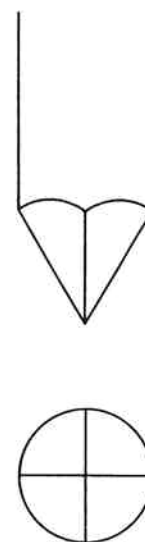


Fig. 2 Edge of Seal Breaker

被検検体は 1.8 ml のサンプルカップにいれ、使い捨てのピペットチップと対でサンプルラックに並べられる。ピペットチップは検体ごとに交換されるので、一本のピペットノズルを洗浄して繰り返し使ったときに起こりがちな検体の持ち越しが完全に回避される。サンプルラックはサンプルローダのセット位置（サンプルローダの左側）に同時に10本までセットできる。測定の進行と共にサンプルローダのサンプルラックセット位置に置かれたサンプルラックは検体液面検出部、検体吸引位置を経由して、排出位置（右側）に送られる。サンプルラックの追加は逐次可能である。

## (2) 検体量の検出

検体量を非接触で測定するために反射光センサーを用いた。反射光の強度はセンサーと物体の距離、反射率、表面形状などに依存する。一般にセンサーと物体間の距離が短くなれば反射光強度が強くなることから、その距離を求めることができる。

しかし、血清検体は着色や濁りを生じていることがある上、サンプルカップに入れた時、その液とカップとの濡れ具合によって表面が傾いていることがあるため、反射光の強度が変化し、センサーと検体間の距離を正確に求めることができない。

我々は、バーコード読みとり用に設計された反射光センサーであるヒューレットパッカー社製 HEDS-1000 の使用を試みた。これはレンズを内蔵し、発光ダイオードの発光点の像がセンサー前方に小さく結び、その像のフォトランジスタ側のレンズによる像が丁度フォトランジスタ上に生じるように作られており、しかも焦点

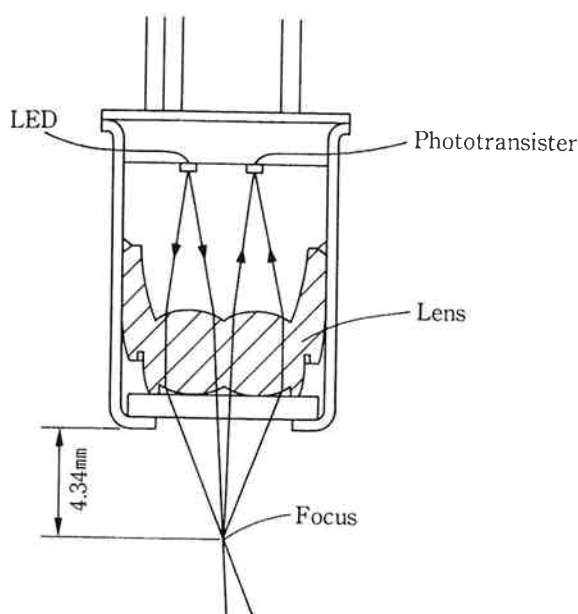


Fig. 3 Photosensor HEDS-1000

深度が非常に浅い。センサーと物体の間の距離を反射光強度から直接求めるのではなく、センサーの位置を近づけながら反射光の強度を測定したとき、反射光強度が最大になる時のセンサーと物体の距離が、物体の反射率や傾きの影響を受けず常に一定であることから、物体までの距離を求めることができる。

センサーからサンプルカップにいれた検体の表面までの距離から、あらかじめコンピュータメモリ上に用意したテーブルを引き、検体量を計算した。Fig. 4 にサンプルカップに血清を入れて、本液面センサーを用いて検体量を測定した結果を示す。血清のカップ内面に対する濡れ具合の差によって、カップ中心軸における液面高さが変化し、その結果、検体量の測定値が  $50 \mu\text{l}$  近く変化することがあった。

## (3) サンプリング

検体量が液面センサーによって測定された後、検体が吸引位置に進むとサンプリングヘッドに新しいピペットチップが付けられる。シリンジポンプを引くことによってピペットチップ内が減圧されると、チップ先端からピペットチップ内に分注液および検体が吸引される。最初に分注液が分注液湧き出し口から吸引され、つぎに検体がサンプルカップから吸引される。分注液量と検体量は分析項目毎に設定することが可能なパラメータになっている。

ピペットチップは、シールブレイカで開封されたテストパックの上に移動した後、下降し、ピペットチップ内に保持されていた分注液と検体を同時に吐出する。ピペットチップがテストパック内の試薬に触れ、異なる種類のテストパック間で凍結乾燥試薬の混合がおこることを避けるため、ピペットチップがテストパックの底から 5 mm 離れた位置で分注液と検体を吐出するようにし

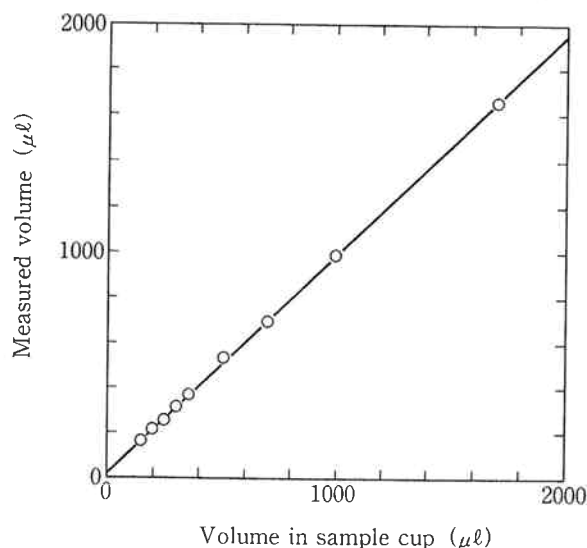


Fig. 4 Measurement of sample volume

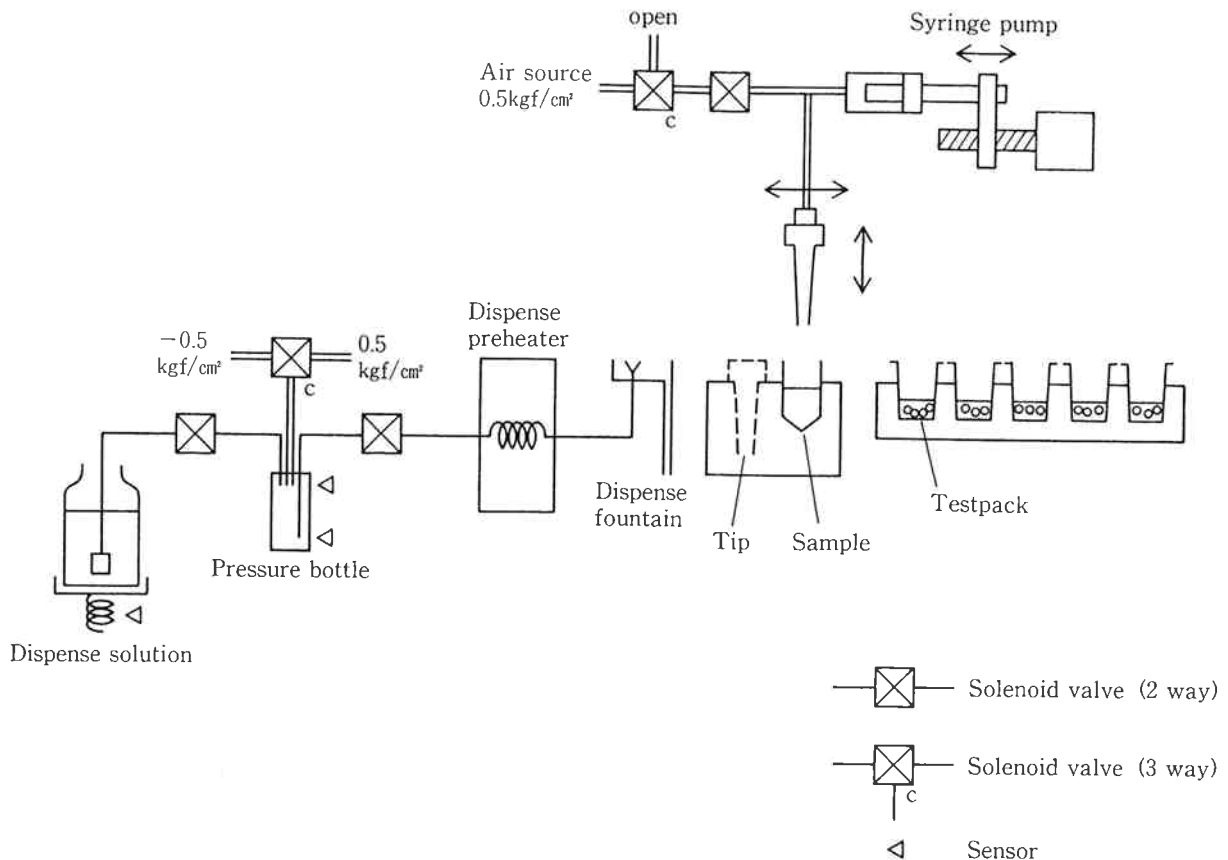


Fig. 5 Block diagram of sampling system

た。したがって、本システムの場合、ピペットチップを壁あるいは底に触れさせないので液がチップの先端に残りがちである。我々は、シリンジポンプを押すことだけによってピペットチップ内の空気を加圧し液を吐出する場合に、①吐出開始時に圧力上昇に遅れが生じるため吐出速度の立ち上がりが遅くなり、ピペットチップの外壁に液が回り込み易いこと、②吐出終了時に再び圧力が減少して液玉がピペットチップの先端に残り易いことを見出した。

我々は、吸引にはシリンジポンプを用いて精度よく分注液と検体を吸引し、吐出にはシリンジポンプによる押し出しと別に用意された空気をピペットチップに送り込むことによる押し出しとを併用して、液が常に一定の範囲内の速度で吐出されるように制御した。即ち、吐出開始時に短時間だけパルス的に空気を送り込むことによって、吐出速度を速やかに上げ、吐出終了時に再び空気を送り込むことによって、液玉がピペットチップの先端に残ることを防いだ。Table 2 に圧縮空気を送り込んだ場合、送り込まない場合の検体の分注精度を示す。

(4) 分注液の供給

チューブの両端に圧力をかけた場合の流量は次式のように書ける。

$$V = \frac{\pi r^4}{8 \ell \eta} \Delta P \quad (\text{Hagen-Poiseuille の公式})$$

$r$  : 半径,  $\ell$  : 長さ,  $\eta$  : 粘性

流量は、粘度の温度依存性のため、温度によって変化する。10°C の温度変化に対して20%程度の流量変化であるが、配管抵抗の約3分の2を温度調整されたプレヒータの中で生じさせることによって、分注量は10%以内の誤差に抑えることができる。

我々は分注液がはいった試薬容器を直接加圧するのではなく、Fig. 5 に示すように試薬容器とノズルの間に中間圧力容器を取り付け、中間圧力容器内の圧力を減少さ

Table 2 Sampling precision (CV%)

A : Without air blow

B : With air blow only after ejection

C : With air blow before and after ejection

Volume ( $\mu\text{l}$ )	A	B	C
100	1.88	1.60	0.35
50	1.53	1.85	0.22
25	5.29	0.85	0.97
10	3.13	1.05	0.96
5	—	0.86	0.78

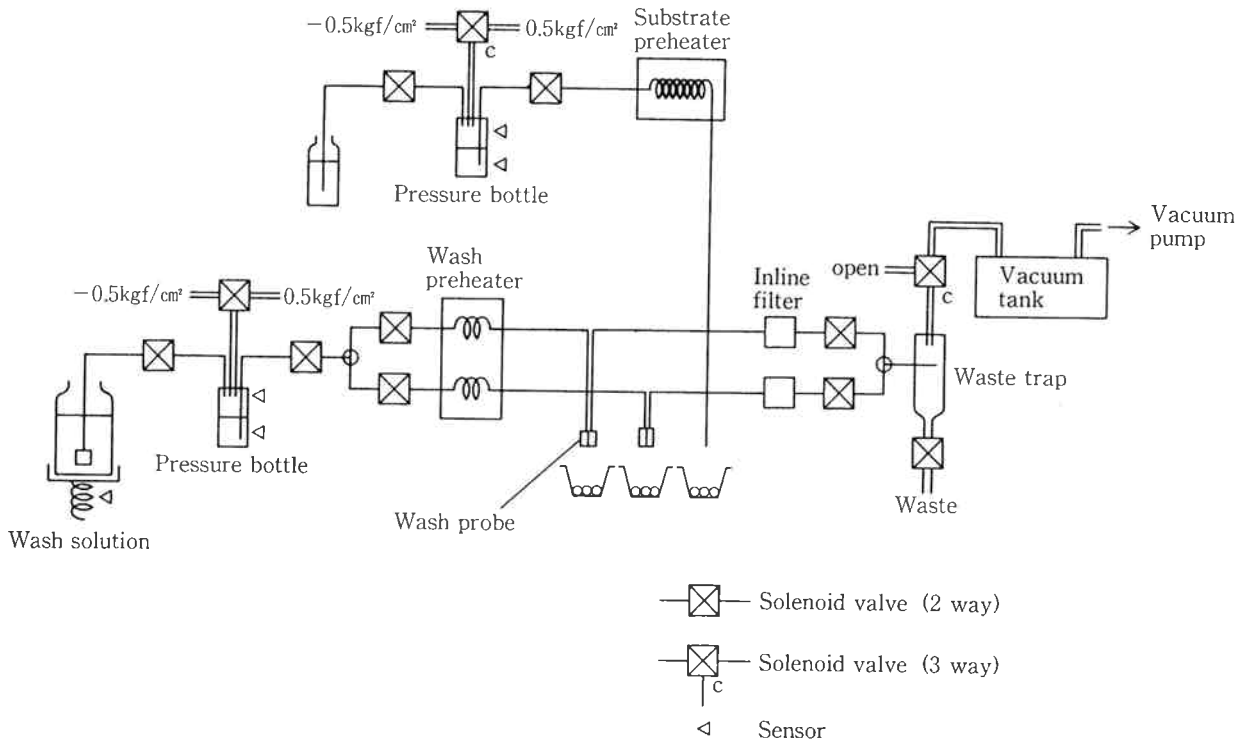


Fig. 6 Block diagram of wash and substrate delivery system

せて (約  $-0.5 \text{ kgf/cm}^2$ ) 試薬容器から中間圧力容器に試薬を吸い込み、つぎに圧力を増加させて (約  $0.5 \text{ kgf/cm}^2$ ) ノズルから試薬を吐出した。中間圧力容器内の液量は中間圧力容器の側面に取り付けた光学式レベルセンサーによっておこなった。また、ノズルから吐出される液量は電磁弁の開時間を制御することによって行なわれた。1~2φ 以下の細いチューブの実際の内径はその製造ロットによって 0.1 mm 程度のばらつきがあるため、流量を実測して、電磁弁の開時間を設定した。

分注液をチップに吸い込ませるとき、分注液を分注液

ポートから湧き出るようにオーバーフローさせ、分注液が盛り上がった部分をチップで吸い取るようにした。その結果、汚染された分注液は直ぐに流れ去り、キャリーオーバを防止することができた。

〔4〕 洗浄ステーション

(1) 洗浄 (B/F 分離)

テストパックの中から未反応の標識抗体を洗い去るためにテストパックに対して洗浄液の分注と吸引廃棄を交互に繰り返した。Fig. 6 に洗浄液の給廃液系および基質液の給液系を示す。洗浄液および基質液の供給には分注液と同じく、空気圧を用いた。

テストパックの中には磁性微小ビーズが入っているので、磁性微小ビーズを吸引することなく、洗浄液だけができるかぎり完全に吸引廃棄する必要がある。

我々は Fig. 7 に示すような形状の洗浄ポートを試作し、評価した。タイプA、タイプB共に磁性微小ビーズを吸引することなく洗浄液を吸引排出することができたが、タイプAでは、洗浄に3ステップ必要となるため、2ステップで済むタイプBを採用した。第一プローブでは 0.65 ml の洗浄液を6回分注し、第二プローブでは 0.45 ml の洗浄液を5回分注して洗浄を行なった。

洗浄プローブから吸引した廃液を真空タンクさらには真空ポンプの中に吸い込むことを防ぐため、中間に廃液トラップを入れ、1ピッチ洗浄するごとに、廃液トラップ内の圧力を大気圧に戻し、廃液を廃液タンクへ排出す

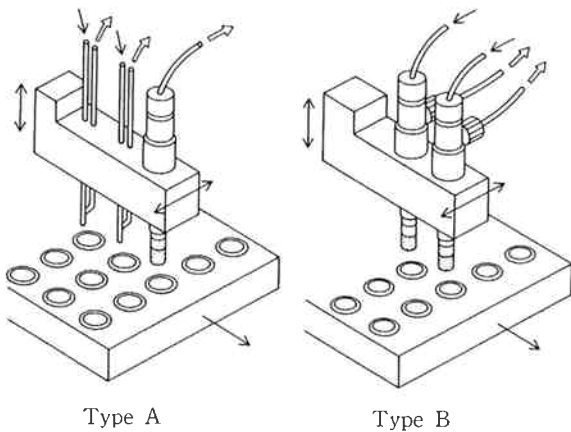


Fig. 7 B/F separation port

→ : Fresh wash solution  
⇨ : Waste aspiration



るようにした。泡が真空タンクにはいることを防ぐために、いくつかの廃液トラップを試作し評価した。その結果、①トラップ内に邪魔板を入れることは多少の効果が認められたが、②トラップの容積を大きく取ることなどが有効であった。しかし、洗浄液の界面活性剤濃度が高い時には、廃液トラップの中に多くの泡が立ち、泡が真空タンクにはいることを完全に防ぐことはできなかった。そこで廃液の吸入口に内径 1φ のテフロンチューブを挿入すると、発生する泡の量の減少に効果があった。

## (2) 基質分注

酵素反応は基質を分注した直後から始まるので、測定できる酵素活性のダイナミックレンジを大きく取るために、一列に並んだ5個のテストパックが蛍光検出器の下に移動する直前に基質液を迅速に分注し、直ちに蛍光検出器の下に送り込んだ。

酵素反応速度の温度依存性は比較的大きく（一般に7%/1°C）、しかも蛍光色素の量子収率は温度によって変化するので、酵素反応の測定中は常に一定温度にテストパックを保つため、インキュベータの温度と分注する基質液の温度を 38°C に制御する必要がある。テストパック当り 220 μl と少ない量の基質液の温度が途中配

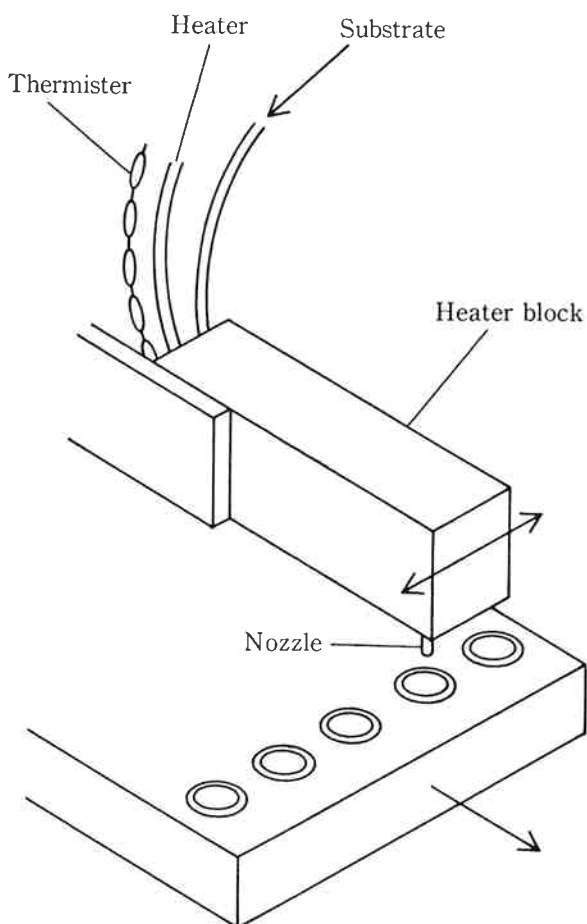


Fig. 8 Substrate heater block

管で変化することを防ぐため、分注ノズルとヒータを一体化した基質液用プレヒータブロックを開発した。Fig. 8 に基質液用プレヒータブロックを示す。

## 〔5〕 蛍光検出器

酵素反応の基質として、酵素反応によって生じる生成物が蛍光を出す基質を使うことによって、酵素反応による増幅作用と蛍光検出の高感度性を合わせて利用できるので、免疫化学測定法の検出感度は大幅な向上が期待される。

ところがアルカリフォスファターゼの基質である4メチルウンベリフェリルフォスフェートは不純物の存在下では自然分解されやすいのでエンドポイント測定法では、反応前後の蛍光強度を測定し、その差を求めることによってバックグラウンドを補正する必要がある。幸い、我々のシステムは、以下に述べるように、テストパック中の蛍光強度を直接検出しているので、酵素活性の検出にレート測定法を採用することができ、バックグラウンドの検出が不要になった。

酵素活性は酵素反応によって生成する蛍光色素の蛍光強度の増加を検出することによって求めた。テストパックに入った反応液の蛍光強度をテストパックに入ったままの状態を検出するために、テストパックの上方向から励起光を照射し、上方向に出てきた蛍光を検出するトップトップの配置を採用した。テストパックの中で直接蛍光を検出することによって、蛍光測定用セルに反応液を吸引して蛍光を測定する場合に起こる反応液の混合による検出誤差を防ぐことができた。また、蛍光検出器は5個の測定チャンネルと1個のレファレンスチャンネルを持っているので、同時に5テストパックの蛍光強度の変化を測定することができる。

トップトップ方式でインキュベータ上に並んだテ

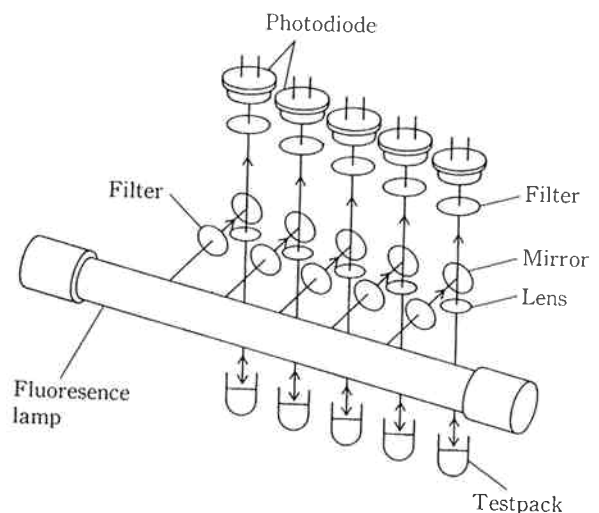


Fig. 9 Optics of fluorescence detector

トパックの蛍光強度を検出する場合に、外乱光を完全に遮断することは困難である。我々は、光源を点滅させ、フォトダイオードの出力信号を同期検波することによって、光源の点滅に同期した蛍光成分だけを取り出し、外乱光を打ち消すことができた。用いた光源は蛍光塗料を内面に塗った冷陰極放電管であり、パルス電源によって、デューティ比50%、165 Hz で点灯した。点灯周波数は商用電源の周波数の整数倍に一致しないように選んだ。Fig. 9 に蛍光検出器の構成図、Fig.10 に信号の波形を模式的に示す。

冷陰極放電管は蛍光塗料の温度が室温に近いので、発光強度が周囲の温度の影響を受け易い。我々は、①光源の発光強度を直接測定したレファレンスチャンネルの値によって、測定チャンネルの値を補正し、さらに②検出器のボディの温度を制御することによって検出器を安定化することができた。Fig. 11 に蛍光検出器でガラスフィルター (HOYA Y44, ダミー蛍光板として使用) の蛍光強度を検出したときの時間変動(レファレンス無補正)を示す。

〔6〕 制御装置

MIA-1200 の制御はメインコントロールモジュールとスレーブコントロールモジュール群によって行なわれる。オペレータはメインコントロールモジュールに接続された操作パネルによって検体ごとに測定項目の指定(サンプルプログラム)を行なう。コントロールモジュールはサンプルプログラムを用いて作成したテストパックの配列情報や測定項目ごとの測定パラメータのリストなどをスレーブコントロールモジュール群に転送する。一

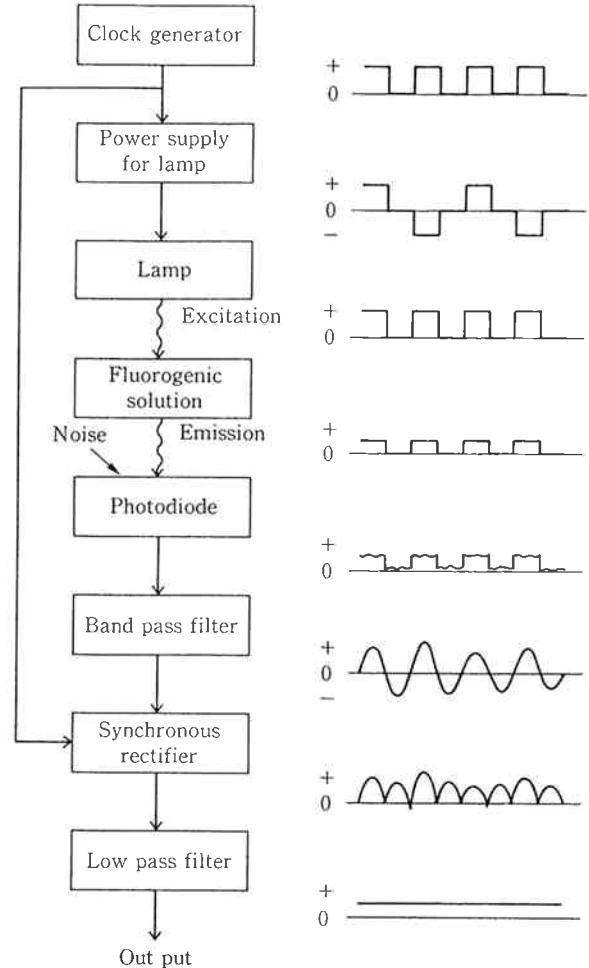


Fig. 10 Wave form fluorescence detector

方スレーブコントロールモジュール群は配列情報にしたがって、各々担当の機構、センサーを管理する。検出結

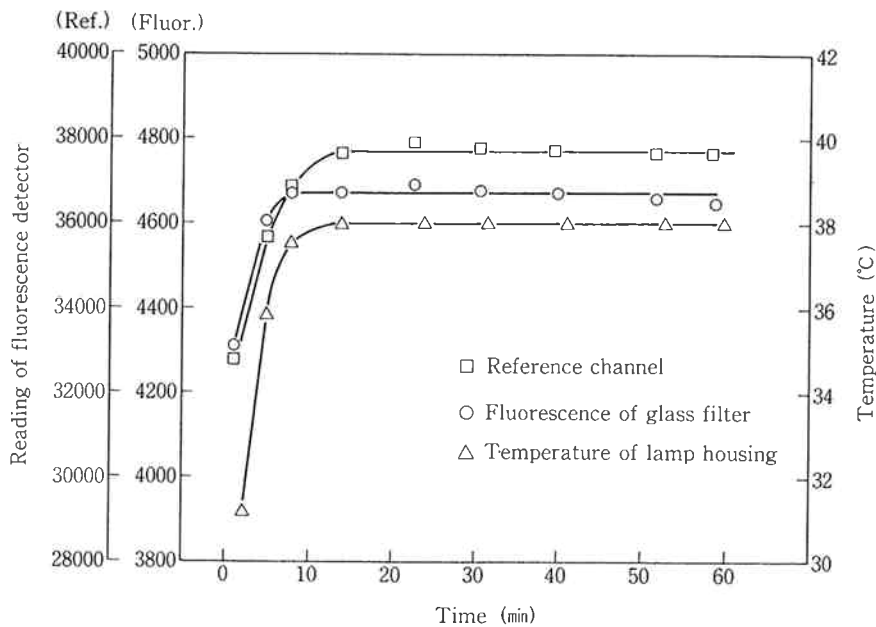


Fig. 11 Variation of readings of fluorescence detector