

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-77301

(P2005-77301A)

(43) 公開日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 8 1 C
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/543	5 2 5 C
	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z
	GO 1 N 33/543	5 7 5
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-309723 (P2003-309723)	(71) 出願人	000000033 旭化成株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 出願日	平成15年9月2日(2003.9.2)	(72) 発明者	仲 真理子 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成株式会社内
		(72) 発明者	山本 裕二郎 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫学的検出担体および測定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 試料中に被検出物質が存在するか否かを判断するために、試料中に被検出物質が存在した場合は、反応により反応媒体上の反応部位に標識粒子が凝集し、逆に、試料中に分析成分が存在しなかった場合は、反応媒体上の反応部位に標識粒子は凝集しないことを、高感度に定性的または定量的に判断する分析技術を提供すること、特に、抗原 - 抗体反応を利用して抗原または抗体を高感度に定性的または定量的に分析するのに適した検出担体およびこの検出担体を用いた分析方法を提供する。

【解決手段】 粒径分布において、2つ以上のピークを有する粒子群からなり、粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定されていることを特徴とする検出担体、および平均粒度が異なる2種以上の粒子群の混合体からなり、粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定化されていることを特徴とする検出担体。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

粒径分布において、2つ以上のピークを有する粒子群からなり、粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定されている検出担体。

**【請求項 2】**

平均粒度が異なる2種以上の粒子群の混合体からなり、粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定化されている検出担体。

**【請求項 3】**

平均粒径が1nm~5 $\mu$ mである2種以上の粒子群の混合体からなる請求項1または2記載の検出担体。

**【請求項 4】**

多分散指数が0.1以下の単分散である2種以上の粒子群の混合体からなる請求項1または2記載の検出担体。

**【請求項 5】**

少なくとも1種の粒子群の重量比率が他の群とは異なる請求項2、3または4記載の検出担体。

**【請求項 6】**

最も重量比率の大きい粒子群が、色素標識、蛍光標識または磁気標識で標識されている請求項5記載の検出担体。

**【請求項 7】**

粒子が、色素標識、蛍光標識および磁気標識のいずれか一種に標識されている請求項1または2記載の検出担体。

**【請求項 8】**

粒子には、生体物質中の抗原と結合可能な抗体が固定されている請求項1または2記載の検出担体。

**【請求項 9】**

粒子には、生体物質中の抗体と結合可能な抗原が固定されている請求項1または2記載の検出担体。

**【請求項 10】**

請求項1または2記載の検出担体を含んだ分析溶液。

**【請求項 11】**

請求項1または2記載の検出担体を用いて光学的測定、蛍光強度測定または磁気センサー測定により試料中の被検出物質を検出する免疫測定法。

**【請求項 12】**

請求項10記載の分析溶液を用いて光学的測定、蛍光強度測定または磁気センサー測定により試料中の被検出物質を検出する免疫測定法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、試料中に被検出物質が存在するか否かを定性的または定量的に分析するために用いられる検出担体およびこれを用いた測定法に関する。特に、本発明は、動物、なかでもヒトの病気の診断、妊婦の診断、便潜血の有無の判定、HBs検査などを目的として、血液、唾液、尿、糞便、汗などの動物由来の物質を検査対象として、これに含有される被検出物を、抗原-抗体反応を利用して検出するのに適した検出担体およびこれを用いた免疫測定法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

酵素、菌体、細胞などの蛋白質から構成された生理活性物質を担体に固定化したものが、食品や医薬品工業における化学反応触媒、生理活性物質の分離、精製用の吸着体、生化学、医学、診断医学などの分野において種々使用されている。

10

20

30

40

50

以下に、診断医学における生理活性物質固定化担体の用途などにおける免疫活性物質を固定化した担体について、以下に説明する。

【0003】

従来より、生体成分の分析法には多数の方法が知られているが、混在する成分中のある特定の微量成分を分析する場合、特異性の高い高感度な方法が求められる。このような観点から、特異的な親和性（抗原 - 抗体、アビジン - ビオチン、ヌクレオチド鎖 - 相補的ヌクレオチド鎖、糖鎖 - レクチン、リガンド - レセプターなど）を使用した多くの分析法が実用に供されている。

特に、抗原とこれに対する抗体による特異的反応を利用して、特定の抗原または抗体よりなる被検出物質を検出する免疫測定法としては、試料中の被検出物質と、感作処理により検出用担体粒子に結合させた抗体または抗原とを免疫反応により結合させ、これによって生ずる検出用担体粒子の凝集状態を測定する凝集法が簡便な方法であり、結果の目視判定が可能である点で、一般的に用いられている（特許文献1）。

10

【0004】

また、標識物質により標識した抗体、抗原またはこれらによって感作された担体を免疫反応により試料中の被検出物質に結合させ、この結合状態にある標識物質を測定する方法も知られている。標識物質として、放射性同位元素を用いる放射免疫測定法、酵素を用いる酵素免疫測定法、蛍光物質を用いる蛍光免疫測定法、磁性物質を用いる磁気免疫測定法なども採用されている。

これらの免疫測定法では、競合型反応またはサンドイッチ反応が広く利用されており、その典型例においては、試料中の抗原よりなる被検出物質を検出するために、以下のような操作が行われる。

20

【0005】

(イ) 被検出物質である抗原に対する抗体を固定化試薬とし、この固定化試薬により感作させたコロイド粒子を反応媒体の所定の部位に所定の形で塗布または結合し、またはその固定化試薬そのものを直接塗布または結合することにより、反応媒体の適宜の位置に反応部位を形成させる。

(ロ) 一方、被検出物質と特異的に結合可能な抗体を、標識された検出用粒子または標識可能な検出用粒子（以下、「標識粒子」と略記する）に感作させ、この感作された標識粒子を添加用または展開用液体媒体中に分散させることにより分散液を調整する。

30

(ハ) 感作された標識粒子の分散液を、試料とともに反応媒体上へ添加または展開する

【0006】

以上の操作により、反応媒体に形成された反応部位において、被検出物質である抗原が、反応部位に固定された固定化試薬である抗体と結合することにより補足されると共に、この抗原と、標識粒子に固定化された検出試薬である抗体とによって抗原 - 抗体反応が生じる。その結果、反応部位においては固定化試薬（抗体） - 被検出物質（抗原） - 検出試薬（抗体が結合した標識粒子）の三者のサンドイッチ型結合体が生成し、結局、試料中に被検出物質が存在するときに反応部位に標識抗体が結合することによって所定のシグナル型が現れ、これによって被検出物質の検出がなされる。

このような免疫測定法においては、検出試薬として標識粒子の分散液が使用される。一般的に、この標識粒子の平均粒径は0.05 ~ 5 μmの範囲内であることが好ましいとされており、より一層、効率のよい測定法が求められている。

40

【0007】

【特許文献1】特開平1 - 214760号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、試料中に被検出物質が存在するか否かを判断するために、試料中に被検出物質が存在した場合は、反応により反応媒体上の反応部位に標識粒子が凝集し、逆に、試料中に分析成分が存在しなかった場合は、反応媒体上の反応部位に標識粒子は凝集しないこ

50

とを、高感度に定性的または定量的に判断する分析技術を提供することを目的とする。

本発明は、特に、抗原 - 抗体反応を利用して生体物質中の抗原または抗体を高感度に定性的または定量的に分析するのに適した検出担体およびこの検出担体を用いた分析方法を提供することを目的とする。

本発明は、また前記の既存技術を向上させ、より反応効率のよい検出担体を提供することおよびその凝集による分析方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 粒径分布において、2つ以上のピークを有する粒子群からなり、粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定されている検出担体。

(2) 平均粒度が異なる2種以上の粒子群の混合体からなり、粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定化されている検出担体。

【0010】

(3) 平均粒径が1nm~5 $\mu$ mである2種以上の粒子群の混合体からなる(1)または(2)に記載の検出担体。

(4) 多分散指数が0.1以下の単分散である2種以上の粒子群の混合体からなる(1)または(2)に記載の検出担体。

(5) 少なくとも1種の粒子群の重量比率が他の群とは異なる(2)、(3)または(4)に記載の検出担体。

【0011】

(6) 最も重量比率の大きい粒子群が、色素標識、蛍光標識または磁気標識で標識されている(5)に記載の検出担体。

(7) 粒子が、色素標識、蛍光標識および磁気標識のいずれか一種に標識されている(1)または(2)に記載の検出担体。

(8) 粒子には、生体物質中の抗原と結合可能な抗体が固定されている(1)または(2)に記載の検出担体。

【0012】

(9) 粒子には、生体物質中の抗体と結合可能な抗原が固定されている(1)または(2)に記載の検出担体。

(10) (1)または(2)に記載の検出担体を含んだ分析溶液。

(11) (1)または(2)に記載の検出担体を用いて光学的測定、蛍光強度測定または磁気センサー測定により試料中の被検出物質を検出する免疫測定法。

(12) (10)に記載の分析溶液を用いて光学的測定、蛍光強度測定または磁気センサー測定により試料中の被検出物質を検出する免疫測定法。

【発明の効果】

【0013】

本発明の検出担体を用いると、反応部位における凝集沈殿を効率よく生じさせ、目視または光学的シグナルの増加、蛍光強度の増加、磁性シグナルの増加およびS/N比が向上する。

その結果、試料中に分析対象成分が存在するか否かを、より高感度に、定性的または定量的に検出することが可能となる。特に、生体物質中に抗原または抗体が存在するか否かを、高感度で定性的または定量的に検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の検出担体は、粒径分布において、2つ以上のピークを有する粒子群、または平均粒度が異なる2種以上の粒子群の混合体からなる。各粒子には、試料中の被検出物質と結合可能な試薬が固定化されている。この粒子上に固定化された試薬が、分析対象成分が

10

20

30

40

50

含まれている疑いのある被分析溶液中の分析成分と反応する。反応したものは、目視または光学顕微鏡による凝集の確認、CCDカメラによる凝集の測定、蛍光強度測定、磁気センサーによる磁気粒子の磁性測定などによって、試料中の被検出物質の定性または定量分析が行われる。

試料中の被検出物質と、それと結合可能な試薬との組み合わせの例として、抗原と抗体、ヌクレオチド鎖と相補的ヌクレオチド鎖、糖とレクチン、リガンドとレセプターなどが挙げられる。中でも、本発明の検出担体は、抗原と抗体の組み合わせに適用するのに特に適している。

#### 【0015】

以下、本発明の検出担体を抗原 - 抗体反応に応用して、生体物質中の抗原または抗体を分析する方法を説明する。しかし、本発明は、この反応例に限定されるものではない。 10

生体物質としては、血液、リンパ液、尿、唾液などの体液内の抗体または抗原、体液内に侵入した微生物、ウイルスやその成分である。その種類は、被測定対象である生体内物質の特定の抗原または抗体に対して、抗体または抗原の関係にあるものであり、分析液中の抗原または抗体に応じて選択される。

抗原および抗体の例としては、以下のものを挙げる事ができる。

抗原類：IgG、IgA、IgM、IgE、アルブミン、hCG、AFP、血液型物質、コンカナバリンA、DNA、プロスタグランジン、CRP、HBs、ヒト成長ホルモン、ステロイドホルモン、CEA、IgDなど。

#### 【0016】

抗体類：抗アルブミン抗体、抗hCG抗体、抗IgG抗体、抗IgA抗体、抗IgM抗体、抗IgE抗体、抗IgD抗体、抗AFP抗体、抗DNA抗体、抗プロスタグランジン抗体、抗ヒト凝固ファクター抗体、抗CRP抗体、抗HBs抗体、抗ヒト成長ホルモン抗体、抗ステロイドホルモン抗体など、およびこれらを含む血清、並びにモノクローナル抗体など。 20

生体物質中の被検出物質が抗原の場合は、粒子には抗体が、被検出物質が抗体の場合は、粒子には抗原が固着される。

本発明の粒子担体は、粒径分布において、2つ以上のピークを有する粒子群、または平均粒度が異なる2種類以上の粒子群の混合体からなるので、分析に際しては、粒径の大きな粒子の隙間に小さな粒子が充填され、その結果、反応物に基づくシグナルが増加する。本発明は、この増大された信号を測定するものである。 30

#### 【0017】

粒径の大きな粒子は、小さな粒子に比べて粒子あたりの目視観察または標識測定効率が高い。しかし、その大きさにより粒子のブラウン運動の低下、粒子に対する外力による抗原抗体結合の剥離などがおきやすく、反応性が低い。一方、小径粒子は反応性は高いが、目視観察または標識測定効率が低いため、シグナルを検出するためにはより多量の粒子の凝集を必要とする。

本発明は、反応性の高い小径粒子を粒径の大きな粒子に混合したものを反応させることにより、反応性の高い小径粒子の隙間に反応性の低い大径粒子が充填されることによりシグナルが増加する。バックグラウンドの要因となる非特異吸着は、小径粒子の方がより生じさせやすいが、その混合量を制御することによりシグナル検出が抑制され、S/N比が向上する。また、イムノクロマトグラフ法に代表されるラテラルフローを利用した反応媒体において、本発明によると、2種類以上の異なる粒径を持つ粒子が反応媒体上で充填して凝集沈殿するため、液流による粒子の脱落が減少すると推定され高感度の分析を行うことができる。 40

#### 【0018】

本発明に用いられる粒子としては、金、銀、白金のようなコロイド状金属粒子、酸化鉄のようなコロイド状金属酸化物粒子、硫黄などのコロイド状非金属粒子、合成高分子よりなるラテックス粒子などが挙げられる。

本発明に用いられる粒子は、色素で染色された色素標識粒子、FITCなどの蛍光物質を含有または表面に蛍光を発する化合物を保持した蛍光標識粒子、蛍光を発する化合物でラベ 50

ルされた試料中の被検出物質と結合可能な試薬を保持した蛍光標識粒子、酸化鉄のような磁性体を含む磁気標識粒子などが好ましく用いられる。

本発明の粒子は、平均粒径が1nm~5 $\mu$ mである、2種以上の粒子群からなることが、抗原抗体反応による凝集を生じやすい点で好ましい。

#### 【0019】

粒子の分散は、動的光散乱法によって得られる自己相関関数から計算される多分散指数が0.1以下のものを単分散、0.1以上のものを多分散と規定される。本発明の粒子は、1つ以上の単分散の粒子群が用いられていることが好ましく、平均粒径の異なる単分散の粒子群で構成されていることがより好ましく、平均粒径が1nm~5 $\mu$ mである2種以上の単分散の粒子群で構成されているのが最も好ましい。

10

本発明において、2つ以上のピークを有する粒子群または平均粒度が異なる2種類以上の粒子群の混合体は、粒子作成時において粒径分布が2つ以上のピークからなり、そのうち1つ以上のピークが単分散の粒子群であるもの、または単分散の粒子群を1つ以上混合し、再分散させて得られたものを用いることができる。

#### 【0020】

検出担体が、2つ以上のピークを有する粒子群からなる場合、粒子が凝集沈殿する際に効率よく充填されるためには、ピークの粒径が100nm以上異なっていることが好ましく、300nm~3 $\mu$ mの範囲で異なっていることがより好ましい。検出担体が、平均粒度が異なる2種類以上の粒子群の混合体からなる場合は、平均粒径がピークの粒径が100nm以上異なる粒子群の混合体が好ましく、300nm~3 $\mu$ mの範囲で異なっていることがより好ましい。

20

平均粒径の異なる粒子群が用いられている場合、少なくとも1種の粒子群の重量比率が他の群とは異なることが好ましく、重量比率が最も大きい粒子群に対して、残りの粒子群の重量比率は、1/5~1/5000であることがより好ましくは、1/10~1/1000であることが最も好ましい。また最も重量比率の大きい粒子群が、色素標識、蛍光標識または磁気標識で標識されていることが好ましい。

#### 【0021】

2種以上の粒子群を用いる場合、粒子の比重や大きさにより凝集速度にばらつきが生じることがある。特に、分散液を移動相として用いる測定法に利用する場合は、移動速度にばらつきが生じやすくなる。したがって、用いられる粒子群は、好ましくは2~10種、より好ましくは2~4種である。混合する各種粒子の材質は同種であることが好ましい。

30

粒子に抗体または抗原を担持させる方法としては、従来からよく知られている方法、例えば、物理吸着法、化学結合法、イオン結合法などを用いることができるが、結合後の抗体または抗原の脱離がなく安定である点から共有結合法が好ましい。また、それぞれの粒径分布をもつ粒子は同一の方法で抗体または抗原を担持させることが好ましい。

#### 【0022】

本発明の検出担体は、通常、分散液の形で使用され、分析対象成分(抗体が担持されている場合は抗原、またはその逆)を捕捉する。反応媒体の反応部位において、両者を反応させることにより、粒子が凝集して沈殿を生じる。

粒子を分散させるのに用いられる緩衝液は、抗原抗体反応を阻害しないpHおよび塩濃度の緩衝液が使用される。検出時の検出担体の濃度は、好ましくは0.005~5重量%、より好ましくは0.01~0.5重量%である。濃度が低すぎると、固定相に結合する粒子数が少なく感度が低下する傾向があり、濃度が高すぎると不経済であり、過剰の粒子が固定化試薬相以外に残留し、バックグラウンドの発生の要因となる場合がある。

40

#### 【0023】

本発明の検出担体を含んだ分散液を用いた免疫測定法を利用して免疫測定を行う方法としては、EIA法、OIA法、免疫学的ラテックス凝集反応による検出方法、イムノクロマトグラフ法などが挙げられる。これらは抗原または抗体の固定化された表面上に被検出物質を捕捉し、さらにこれらに結合した標識粒子の凝集をさせる方法である。またその色素標識、蛍光標識、磁気標識された粒子の凝集を測定する方法としては、目視または光学顕微鏡による凝集の確認、CCDカメラによる凝集の測定、蛍光強度測定、磁気センサーによる磁

50

気粒子の磁性測定などがあげられる。

【実施例】

【0024】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

【0025】

[実施例1]

(反応媒体の準備)

厚さ0.6mmの4インチのシリコンウエハーに対し、分岐構造を持つアミノアルキルポリジメチルシロキサンを被覆したものを4×4mmに切り出し、その表面に反応物として32μg/mLの抗C-Polysaccharide抗体(Statens serum institut、デンマーク)を含む0.1M MES緩衝液(pH6.0)を10μL滴下し、室温で静置した。次いで水洗後風乾し、反応物が固定化された反応媒体を得た。 10

【0026】

(標識粒子の感作処理)

平均粒径0.56μmの蛍光標識ラテックス粒子(Bangs社製)をDLS(Dynamic Light Scattering:大塚電子製)測定した結果、多分散指数が0.032であり単分散であった。この粒子の懸濁液を0.1M MES緩衝液(pH6.0)により固形分濃度が1重量%となるように希釈したラテックス粒子分散液に、抗C-Polysaccharide抗体(Statens serum institut、デンマーク)1mgを添加し、室温にて2時間振盪させた。ついで0.1M MES緩衝液(pH6.0)を用いて3回遠心沈降処理によって洗浄し、最終的に5重量%となるよう標識粒子の分散液を調製した。同様の方法で平均粒径0.07μmラテックス粒子(Bangs社製)(多分散指数0.070)も感作処理を行い、5重量%標識粒子の分散液を調整した。 20

【0027】

(2種の平均粒径からなる標識粒子分散液の調整)

上記感作処理済0.56μmの蛍光ラテックス粒子を0.05重量%になるよう、0.07μmの感作処理済ラテックス粒子を0.05重量%、0.005重量%、0.0005重量%になるよう、0.1重量%BSAを含有する0.1M MOPSO緩衝液(pH7.5)に再懸濁し、各粒子混合分散液を調製した。

【0028】

(反応媒体を用いた分析)

分析対象成分としてC-Polysaccharide(Statens serum institut、デンマーク)100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml、0ng/mlを含むリン酸緩衝生理食塩水5ulを被分析溶液とし、上記反応媒体に5μl添加したのち、5分放置した。その後0.01%Tween20を含む0.1M MES緩衝液(pH6.0)で洗浄し、風乾した。上記粒子混合分散液を5ul添加、10分間放置したのち0.01%Tween20を含む0.1M MES緩衝液(pH6.0)で洗浄、風乾した。上記反応媒体を蛍光測定用96穴プレートに挿入し、蛍光強度分析計(Spectra MAX GEMINIXS、Molecular Devices)にて、吸収波長480nm、放射波長520nmで測定し、表1の結果を得た。 30

【0029】

[比較例1]

(1種の平均粒径からなる標識粒子分散液による分析)

実施例1で調整した平均粒径0.56μmの感作処理済粒子を0.05重量%になるよう0.1重量%BSAを含有する0.1M MOPSO緩衝液(pH7.5)に再懸濁し、分散液とした。実施例1における分析と同様、分析対象成分としてC-Polysaccharide(Statens serum institut、デンマーク)100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml、0ng/mlを含むリン酸緩衝生理食塩水をもちい免疫反応を行い、蛍光強度を測定し、表1の結果を得た。 40

【0030】

表1から、一種類の粒子のみで構成されたNo.4は抗原量が1ng/mlまでしか測定できなかったことと比較して、No.2、No.3は0.1ng/mlまで測定が可能であった。また、No.1は逆に高い抗原濃度までしか測定できておらず、最適粒子混合率が存在することがわかる。つまり、最適な量の粒子を混合することによって、測定すべき大粒径の粒子は、S/N比がより高く測定できることがわかる。したがって、本発明は、粒子を用いて高感度かつ定量的に 50

検出する分析技術分野において有用であることが示された。

【0031】

[実施例2]

(反応媒体の準備)

窒化珪素で表面を被覆した厚さ0.6mmの4インチのシリコンウエハーに対し、分岐構造を持つアミノアルキルポリジメチルシロキサンを被覆したものを8×8mmに切り出し、その表面に反応物として20 $\mu$ g/mLのウサギ抗ヒトトランスフェリン抗体(ロックランド社、米国ギルバーツビル、PA)を含む0.1M HEPES緩衝液(pH8.0)を30 $\mu$ L滴下し、室温で静置した。次いで水洗後、風乾して、反応物が固定化された反応媒体を得た。

【0032】

(標識粒子の感作処理)

平均粒径0.60 $\mu$ m(多分散指数0.047)ラテックス粒子(Bangs社製)の懸濁液を0.1M MES緩衝液(pH6.0)により固形分濃度が1重量%となるように希釈したラテックス粒子分散液に、ウサギ抗ヒトトランスフェリン(ロックランド社、米国ギルバーツビル、PA)1mgを添加し、室温にて2時間振盪させた。ついで0.1M MES緩衝液(pH6.0)を用いて3回遠心沈降処理によって洗浄し、最終的に2重量%となるよう標識粒子の分散液を調製した。同様の方法で平均粒径0.07 $\mu$ m(多分散指数0.070)ラテックス粒子も感作処理を行い、2重量%標識粒子の分散液を調整した。

10

【0033】

(2種の平均粒径からなる標識粒子分散液の調整)

上記感作処理済0.60 $\mu$ mのラテックス粒子を2重量%になるよう、0.07 $\mu$ mの感作処理済ラテックス粒子を0.05重量%、0.005重量%、0.0005重量%になるよう、0.1重量%BSAを含有する0.1M MOPSO緩衝液(pH7.5)に再懸濁し、各粒子混合分散液を調製した。

20

【0034】

(反応媒体を用いた分析)

分析対象成分としてヒトトランスフェリン(OEM社、米国トムスリバー、NJ)1000ng/ml、100ng/ml、10ng/ml、0ng/mlを含むリン酸緩衝生理食塩水20 $\mu$ lを、10mMジスレイトールおよび0.5%のTritonX-100を含む抽出溶液に添加し、1分間放置して被分析溶液とした。被分析溶液を、上記反応媒体に20 $\mu$ l添加し、2分放置した。その後0.01%Tween20を含む0.1M MES緩衝液(pH6.0)で洗浄し、風乾した。上記感作処理済粒子を10 $\mu$ l添加、10分間放置したのち0.01%Tween20を含む0.1M MES緩衝液(pH6.0)で洗浄、風乾したところ、感作処理済粒子の凝集が目視観測された。シグナル強度の結果を表2に示す。

30

【0035】

[比較例2]

(1種の平均粒径からなる標識粒子分散液による分析)

実施例2で調整した平均粒径0.60 $\mu$ mの感作処理済粒子を2重量%になるよう0.1重量%BSAを含有する0.1M MOPSO緩衝液(pH7.5)に再懸濁し、分散液とした。

実施例2における分析と同様、分析対象成分としてヒトトランスフェリン1000ng/ml、100ng/ml、10ng/ml、0ng/mlをもちい免疫反応を測定した。シグナル強度の結果を表2に示す。

40

【0036】

表2から、粒子を混合することにより、より低い抗原濃度まで目視測定できることがわかる。つまり、粒子を混合することによって、目視観察可能な大粒径の粒子は、S/N比がより高く測定できることがわかる。

したがって、本発明は、粒子を用いて高感度かつ定量的に検出する分析技術分野において有用であることが示された。

【0037】

【表 1】

No.	混合粒子量 (重量%)		抗原量 (ng/ml)				
	0.56 $\mu$ m Beads	0.07 $\mu$ m Beads	100	10	1	0.1	0
1	0.05	0.05	1.342	0.955	0.42	0.507	0.769
2	0.05	0.005	12.016	6.955	2.909	1.155	0.746
3	0.05	0.0005	13.757	22.643	1.652	0.842	0.151
4	0.05	0	47.895	12.134	3.205	1.064	1.535

10

【0038】

【表 2】

No.	混合粒子量 (重量%)		抗原量 (ng/ml)			
	0.60 $\mu$ m Beads	0.07 $\mu$ m Beads	1000	100	10	0
1	2.0	0.05	±	±	-	-
2	2.0	0.005	4+	2+	+	-
3	2.0	0.0005	3+	+	±	-
4	2.0	0	+	±	-	-

20

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明は、動物、なかでもヒトの病気の診断、妊婦の診断、便潜血の有無の判定、HBs検査などを目的として、血液、唾液、尿、糞便、汗などの動物由来の物質を検査対象として、これに含有される被検出物を、抗原-抗体反応を利用して検出するのに、特に効果的である。

30

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/543 5 8 1 D

G 0 1 N 33/53 D

专利名称(译)	免疫学检测载体和测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005077301A</a>	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003309723	申请日	2003-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	旭化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
[标]发明人	仲真理子 山本裕二郎		
发明人	仲真理子 山本裕二郎		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.581.C G01N33/543.525.C G01N33/543.541.A G01N33/543.541.Z G01N33/543.575 G01N33/543.581.D G01N33/53.D		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：为了确定样品中是否存在被检测物质，当样品中存在被检测物质时，由于反应，标记的颗粒聚集在反应介质上的反应位点，反之提供一种分析技术，用于高度灵敏地定性或定量地判断当样品中不存在分析成分（尤其是抗原）时，标记颗粒不会聚集在反应介质的反应位点上。-提供一种适合使用抗体反应高灵敏度地定性或定量分析抗原或抗体的检测载体，以及使用该检测载体的分析方法。 解决方案：检测载体的特征在于包括一组在粒度分布中具有两个或多个峰的颗粒，以及一种固定有能够与样品中待检测物质结合的试剂的试剂，将包含两种或更多种平均粒径不同的颗粒的混合物以及能够与样品中的待检测物质结合的试剂的检测载体固定在该颗粒上。 [选择图]无

No.	混合粒子量 (重量%)		抗原量 (ng/ml)				
	0.56μm Beads	0.07μm Beads	100	10	1	0.1	0
1	0.05	0.05	1.342	0.955	0.42	0.507	0.769
2	0.05	0.005	12.016	6.955	2.909	1.155	0.746
3	0.05	0.0005	13.757	22.643	1.652	0.842	0.151
4	0.05	0	47.895	12.134	3.205	1.064	1.535