

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-522170

(P2008-522170A)

(43) 公表日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 F	
GO 1 N 33/552 (2006.01)	GO 1 N 33/545 A	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/552	
GO 1 N 33/544 (2006.01)	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-543736 (P2007-543736)	(71) 出願人	506005237
(86) (22) 出願日	平成17年11月23日 (2005.11.23)		オリオン ダイアグノスティカ オーワイ
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月17日 (2007.7.17)		フィンランド国 エスポー コイヴ-マン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/012523		カーン ティエ 6 ビー
(87) 国際公開番号	W02006/058645	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成18年6月8日 (2006.6.8)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	0426592.2	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成16年12月3日 (2004.12.3)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ルオトラ ヨハニ
			フィンランド共和国 エスポー マーンテ
			イカリヨンティエ 12 デイ
		(72) 発明者	ニクラ ハンヌ
			フィンランド共和国 エスポー ケスキヨ
			ーンティエ 15 エイ 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 粒子に基づく結合アッセイ法

## (57) 【要約】

本発明は試料中の分析物の存在または量を検出する方法を提供し、該方法は以下を含む：結合物質が付着している粒子、分析物、および結合物質でコーティングされた標識粒子が加えられる多孔性表面。分析物が試料中に存在する場合、液相で免疫反応または化学反応が起きる。結合した複合体と非結合材料との分離は、多孔性表面（たとえば格子）の表面上で分離が主に二次元的に起きるような表面を利用することで達成される。興味深いことに、開示される表面は、複合体は多孔性表面（たとえば格子）で二次元的に分布するが、非結合材料は三次元的に分布する分離を可能にする。従って、該表面は二次元および三次元的分離の両方を可能にする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 分析物に特異的に結合する結合物質が付着している粒子を含む第一の結合成分を、多孔性表面に加える工程；

(b) 試料を該多孔性表面に加える工程；

(c) 検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を、該多孔性表面に加える工程；ならびに

(d) 該多孔性表面上の検出できるように標識された粒子によって生成される、該試料中にある分析物の存在および/または量を示す信号を検出する工程

を含む、試料中の分析物の存在または量を検出するための方法であって、

ここで、該多孔性表面は、該第二の結合成分の該表面の通過を許すが、該第一の結合成分は通過させず、

該第一の結合成分と該分析物は互いに結合して第一の結合複合体を形成し、

該第二の結合成分と該第一の結合複合体が互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、該検出できるように標識された粒子には、該第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着しており、かつ

第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は多孔性表面上に保持される、方法

。

## 【請求項 2】

試料と第一の結合成分を表面に加える前に互いに接触させる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

工程(a)が工程(b)の前に行われる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 4】

試料、第一の結合成分、および第二の結合成分を、多孔性表面に加える前に互いに接触させる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 5】

多孔性表面を通過することができる洗浄液を、工程(d)の前に該表面に加える工程をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

第二の結合成分が、分析物に特異的に結合する結合物質が付着している、検出できるように標識された粒子を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 7】

多孔性表面が、金属、プラスチック、セラミック、ガラスまたはシリコンである材料を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 8】

多孔性表面が分離装置を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 9】

多孔性表面が、二次元および三次元形式の両方を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 10】

多孔性表面が格子である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 11】

第一の結合成分または第二の結合成分の粒子が、

(a) 合成ポリマー、プラスチック、ガラス、金属もしくはセルロースを含むか；または

(b) リポゾーム、細胞もしくは微生物である、

前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 12】

第一の結合成分の粒子が第二の結合成分の粒子よりも大きな平均直径をもつ、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

第一の結合成分の粒子が0.1 μmから200 μmの平均直径をもつ、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 14】

第二の結合成分の粒子が1nmから1000nmの平均直径をもつ、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 15】

多孔性表面が、二つの平行な側面をもち、平行な側面間の距離が第一の結合成分の粒子の平均直径よりも小さな、開口/孔を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 16】

粒子を実質的にコーティングするのに十分な量の結合物質が、吸着または共有結合によって該粒子に結合している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 17】

結合物質が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはそのF(ab')もしくはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 18】

粒子が、発光性、放射標識性、発色性、または磁性の材料を用いて検出できるように標識される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 19】

分析物が抗原である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 20】

抗原がC反応性タンパク質(CRP)または性ホルモン結合グロブリン(SHBG)である、請求項19記載の方法。

## 【請求項 21】

(a) 多孔性表面；

(b) 分析物に特異的に結合して第一の結合複合体を形成する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分；および

(c) 第二の結合成分と該第一の結合複合体が互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、該第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着している、検出できるように標識された粒子を含む、第二の結合成分

を含む、試料中の分析物の存在および/または量を検出するためのキットであって、第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は、多孔性表面上に保持されうる、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は、形成された免疫複合体または任意の生体分子複合体を、結合されていない物質から、使用する粒子と互いに適合性のある孔、開口からなる多孔性の表面(例えば格子)上で分離することに関する。本発明は、試料中の分析物の検出と定量化のための、粒子の大きさや異なる性質を利用する二粒子アッセイ形式で実施される不均一系の免疫アッセイを開示する。本方法では、試料のなかから分析物を捕らえ、体液からその分析物を分離し、区別するために大きい粒子を使用する一方、標識手段として小さな粒子を使用する。

## 【背景技術】

## 【0002】

## 発明の背景

標本に含まれる抗原を検出し定量化するために、幾つかの方法が、免疫アッセイ技術を用いる。現在、二種類の免疫アッセイ系が使われている。均一系では、アッセイは一段階で行われる。不均一系では、免疫アッセイは二段階で行われる。追加の一段階は、結合された物質を結合されなかった物質から分離するために必要である。一般に、抗体または抗

10

20

30

40

50

原が吸着または化学結合により結合している固体の支持体表面が、結合相として使われる。免疫反応の性能と分離段階の効率を向上させるために多くの固体支持体表面が開発されている。

【0003】

抗原と抗体との免疫反応の効率を向上させるために、凝集アッセイにおいて移動固相として粒子が使われている。前記の系では、可溶性の抗原/抗体が粒子に結合された特定の抗体/抗原と結合し、その結果、粒子の表面に不溶性の抗原抗体免疫複合体が析出する。固相免疫アッセイでは、固相に結合した免疫複合体を洗浄することにより、結合していない物質との分離がより完全に行われ、従って信号対雑音比が向上し、アッセイの感度を向上させることができる。さらに、固体支持体の表面積を増大させるために、さまざまな組成の微粒子も使用されている。

10

【0004】

粒子に基づく凝集アッセイは当業者に周知である。もともとの凝集アッセイは単一の大きさの粒子を、ポリスチレン粒子、すなわちラテックス粒子としてとして利用した。米国特許第4,279,617号には、特に少量の分析物をアッセイするときの凝集アッセイの低い感度を克服する方法が開示されており、その方法では二種類の異なるコーティングをした粒子状試薬が使われる。該粒子は異なる大きさでもよい。この方法は、濾過工程を用いることにより、凝集体から結合していない物質を分離することは含まない。

【0005】

先行技術文献には、膜、フィルターや他の基質のような多孔性の部材の使用に依存するアッセイ技術を開示する刊行物が幾つか認められる。米国特許第4,632,901号、欧州特許第180638号、および米国特許第4,727,019号では、目的の分析物の受容体が結合している部材、およびその第一の部材に加える液体を汲み出すための第二の部材が開示されている。液体状の試料を加えると、液体は流れて通過し、部材内の受容体が試料中に存在する分析物と結合する。試料の添加後、前記分析物の、標識された別の受容体が、検出を可能にするために加えられる。適切な標識は、酵素、放射性核種、蛍光標識である。酵素標識を使用した場合の欠点は、色を生成する物質を膜に加えなければならないことである。

20

【0006】

欧州特許第253579号は上記部材に基づく技術のさらなる態様を開示する。この態様では、多孔性の部材に受容体または抗受容体を固定する手段を含めるために、多孔性の膜の隙間に閉じ込められているマイクロスフェアを利用する。

30

【0007】

米国特許第4,916,056号、欧州特許第389003号、米国特許第5,008,080号、および米国特許第5,149,622号は、抗原や抗体が保持された粒子を利用する、膜に基づくフロースルーアッセイを開示する。粒子の大きさは重要ではないが、繊維状基質の平均的な孔の大きさよりも小さいことが好ましい。

【0008】

結合していない物質と免疫複合体との分離には三次元膜が通常使用される。米国特許第5,501,949号は、第一の結合成分(物質)のための固相として細かく分割された粒子を使う免疫アッセイを開示する。可溶性の第二の結合成分は信号を発生する物質で標識されている。この方法で使用される、粒子に結合していない、標識された可溶性の結合成分は、粒子に結合した標識により標識されている結合成分と比較して、より低い特異的な活性をもつ。その結果として、アッセイの感度が失われる。本方法は免疫複合体を濾過し、結合していない物質を分離するために三次元膜を使用する。

40

【0009】

米国特許第4,853,335号は、生物学的標本、金コロイドにより標識されたりガンドまたは抗リガンドおよびリガンドまたは抗リガンドでコーティングされた固相の捕捉粒子を、多孔性のフィルムに加える、免疫アッセイを開示する。膜に捕捉された粒子は視覚的に色を検査される。

【0010】

50

英国特許出願第2123146号は、二重チャンネル光学-電気セルカウンターまたは蛍光顕微鏡でなされるアッセイ法を説明している。開示は、該アッセイ法を用いることにより、異なる検出可能な性質を持つ第一の微小粒子と第二の微小粒子を含む。該出願は、濾過工程を使用する、結合していない物質と凝集体とのいかなる分離をも開示していない。生体液が粒子と混ぜられ、その後それらの異なる性質が測定される。

【0011】

米国特許第5,565,366号は、リガンドに特異的な受容体を表面に担う色のついた粒子と試料を接触させることにより試験混合物が形成される方法を含む。試験混合物を、粒子よりも大きい、凝集物よりは小さな開口を持つフィルターに通すと、凝集物は濾液から除かれ、濾液とフィルターの色が分析される。この文献は、先行技術で用いられていたより大きい粒子に比べて、ここで使用される小さな粒子の方が凝集物の生成に関してより有利であることを開示している。しかしながら、粒子が小さくなるほど、粒子上でのリガンドや抗リガンドの消費が多くなることから、小さな粒子の使用は不利である。

10

【0012】

米国特許第6,268,222号は、蛍光塗料で標識されたナノ粒子に微粒子が付着する、異なるアプローチを開示する。粒子はその表面の官能基によって互いに付着している。この発明は、その表面に複数のより小さなポリマー粒子をもったコア粒子または担体粒子を含む。異なる蛍光塗料を用いると、光源による励起により、複数の蛍光発光が得られる。異なるナノ粒子分布の量と比率を変えることにより、特有の発光のスペクトルをもった担体粒子の、数多くの異なる別個の集団を確立し、区別することが可能である。このアプローチは試料中の複数の分析物の複合分析に有用である。

20

【0013】

上記の先行技術の概説で明らかのように、粒子は単独で、または三次元膜のさまざま適用とともに、所望の分析物を試料から分離するために用いられている。しかしながら、膜の多孔性のために、しばしば標識された結合物質の非特異的な結合が起きる。従って、三次元膜を使用した場合、高い背景信号のために、信号対雑音比が低くなる。従って、三次元膜は、非特異的な結合を少なくするために、かなりの洗浄を必要とする。

【0014】

上記で開示された方法の他に、例えば磁気ビーズを利用したアッセイ法が当業者には周知である。

30

【0015】

上記先行技術で開示されている方法は、主に分析物の視覚的検出に依存するものであり、従って低濃度の分析物を測定するのに十分な感度をもっていない。さらに、標識によって発せられる信号のレベルは、あらゆる場合に十分であるほど強力ではない。

【0016】

当技術分野でより精巧な方法は、試料中の分析物の存在を示すために、電流の変化を応用する。たとえば、米国特許第4,238,757号で、ゲート領域において抗体の層でコーティングされている電界効果トランジスターが、トランジションの電荷密度の変化により抗原抗体反応を検出するために使用されている。

40

【0017】

分析物-試薬複合体または試薬と反応して表面の電気リアクタンスを変化させる、標識された試薬が、米国特許第4,219,335号で加えられている。

【0018】

米国特許第4,233,144号に開示されているように、免疫反応は、一方の免疫反応物が電場活性物質によって標識されている、ボルタメリックな免疫アッセイによっても測定されうる。

【0019】

米国特許第4,054,646号では、抗原-抗体層が二つの伝導層の間に挟まれていて、その結果形成される積層物の静電容量が測定される方法が開示されている。

【0020】

50

基質でコーティングされ、基質と特異的に結合する物質を含む媒体に浸漬される電極対を利用する、別の種類の静電容量測定技術が米国特許第4,072,576号に開示されている。

【0021】

米国特許第4,287,300号に記載されているように、変化効果の信号検出と酵素免疫アッセイ技術を組み合わせることも可能である。

【0022】

しかしながら、上記の電気的方法は、免疫診断アッセイを、簡単に、速く、感度よく、安価で使いやすく行うという要求を満たすものではなかった。

【0023】

上記の問題点を解決することを意図した方法が米国特許第5,284,748号に開示されている。そこでは、抗原または抗体で標識された金コロイド粒子が、新たな免疫診断方法において、任意で銀強化とともに使用される。このようにして生成された複合体は、基本的には開いている電気回路の完全な、または部分的な完了（閉鎖）を引き起こす。更なる態様は、離れておかれた一对の電気伝導体、特に実質的には電気を伝導しない基盤におかれた伝導層を含む。伝導体の間にはパスまたはチャンネルと定義される隙間がある。チャンネルが回路内で切断を構成するように、各伝導体には電気回路を形成する手段が接続されている。一对の物質の間の結合反応が、回路の切断の完全または部分的な橋絡を担う。そのような方法の一つは、物質の一つを電気伝導性の粒子の表面に付着させることを含む。

【発明の開示】

【0024】

本発明は試料中の分析物の存在または量を検出する方法に関する。本発明は第一の結合物質（すなわち、第一の結合成分）でコーティングされた移動性捕捉粒子と第二の結合物質（すなわち、第二の結合成分）でコーティングされた、検出できるように標識された粒子を用いる。両結合物質とも、特異的なリガンドまたは抗リガンドであり、分析物（リガンドまたは抗リガンド）分子は、もし試料中に存在するのであれば、それに結合する。

【0025】

本発明は前記粒子を利用し、多孔性の表面、すなわち分離手段の使用に依存する。先行技術とは異なり、本発明は試料中の分析物に特異的な結合物質が結合している捕捉粒子の使用を利用する。生成される複合体は、多孔性の表面に加えられたとき、そこに保持される。よって、第一の結合成分-分析物-第二の結合成分からなる複合体や第一の結合成分-分析物からなる複合体は、分離手段の表面上で、非結合材料から分離される。従って、この過程は分析物の分離と濃縮にも使用できる。このように濃縮された分析物はそれから、更なる工程や研究に使用され得る。

【0026】

多孔性表面はさらに、フレーム、ホルダー、または他の支持体、例えばアッセイケーシング（カートリッジ）を含み得る装置の基本部分を形成し得る。

【0027】

非結合材料を除くための増強された液流を発生させるためには、ウィッキング膜および/または陰圧もしくは陽圧もしくは外部からの力（例えば超音波）が使用され得る。

【0028】

本発明は、免疫反応や化学反応の後に形成された、免疫複合体/生体分子複合体を非結合材料から分離するために、二次元的または三次元的分離方法を利用するものである。そのような分離方法では、免疫複合体/生体分子複合体の分離は分離手段の表面上で起こる。興味深いことに、開示される多孔性表面は前記複合体の分離を表面上で二次元的に可能にするのに対して、小さな標識粒子や他の非結合材料は表面を浸透することにより、三次元的に分布される。従って、二次元および三次元的な分離の両方が、前記多孔性表面を使用することにより可能となる。従って、もし必要なら、生成された免疫複合体/生体分子複合体を表面から解離し、更なる必要性に応じて、移すことも可能である。分析物自体や他の細胞成分は、例えばPCRや他の当業者に周知である生化学的または分子生物学的手法により、さらに特徴づけられることができる。

10

20

30

40

50

## 【0029】

本発明は、標識されていない、または標識されている、異なる大きさの粒子と多孔性の表面を利用することにより、先行技術の感度不足を克服している。先行技術で利用されている標識に関する共通の問題点は、不適切な信号強度と信号対雑音比を有することである。本発明では、捕捉粒子の標識粒子に対する大きさが、小さな粒子と比較して、より少量の、しかしながらそれでいて最適な量のリガンドまたは抗リガンドを消費するように最適化されている。本発明によれば、大きな非特異的標識結合による大きなバックグラウンド標識カウントは、非特異的標識結合性の低い多孔性の表面を、免疫複合体を非結合材料から分離するために使用することにより減少させることができる。その上、標識粒子に付着した結合物質を使用し、標識された結合物質の特異的な活性を向上させることにより、アッセイの感度を向上させることができる。

10

## 【0030】

特に本発明は、以下の工程を含む、試料中の分析物の存在または量を検出する方法を提供する：a) 多孔性の表面に、分析物に特異的に結合する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分を加える工程；b) 該試料を該多孔性表面に加える工程；c) 検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を該多孔性表面に加える工程；および d) 該試料中の該分析物の存在および/または量を示す、該多孔性表面上の検出できるように標識された該粒子より生成される信号を検出する工程であって、ここで該多孔性表面は、該第二の結合成分は通過させるが、該第一の結合成分は通過させず；該第一の結合成分および該分析物は互いに結合して第一の結合複合体を形成し；検出できるように標識された該粒子には、該第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着しており、該第二の結合成分と該第一の結合複合体は互いに結合して、第二の結合複合体を形成し；第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は、多孔性表面上に保持される。一つの様態では、試料と第一の結合成分は、表面に加えられる前に、互いに接触させられる。別の様態では工程a)が工程b)の前に実施される。さらに別の様態では、試料、第一の結合成分、および第二の結合成分は、表面に加えられる前に、互いに接触させられる。さらに別の様態では、工程b)が工程a)の前に実施される。

20

## 【0031】

本発明はまた、

a) 多孔性表面；

30

b) 該分析物と特異的に結合して第一の結合複合体を形成する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分；および

c) 第二の結合成分と該第一の結合複合体が互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、該第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着している、検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を含む、試料に含まれる分析物の存在および/または量を検出するためのキットをも提供し、ここで第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は多孔性表面上に保持される。

## 【0032】

図面の詳細な説明

40

図1は免疫複合体形成の例示的な方法を開示している。図は第一の結合成分が第二の結合成分とともに該免疫複合体をいかに形成するかを説明する。まず通常はリガンドまたは抗リガンドである結合物質(2)でコーティングされた捕捉粒子(1)が第一の結合成分を形成する。トレーサー粒子(3)と、通常はリガンドまたは抗リガンドである結合物質(2)が第二の結合成分を形成する。次に、これらの結合成分は、試料中に存在する、通常はリガンドまたは抗リガンドである分析物(4)と接触すると凝集し、該免疫複合体(5)が結果として形成される。

## 【0033】

図2は免疫複合体(5)を格子(6)に加えた後、いかに二次元的濾過がおきるかの前面図を示す。二次の孔パターン(7)が格子の基本構造を形成する。

50

## 【 0 0 3 4 】

図3は格子(6)上に保持された免疫複合体(5)、濾過されたトレーサー粒子(3)と不必要な非特異的材料(8)の三次元的な濾過方向の側面図を示す。

## 【 0 0 3 5 】

図4はhCRPを分析物とし、免疫複合体の形成して該複合体を格子上で分離するために、ポリクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントでコーティングされた捕捉粒子と標識粒子を用いるアッセイの結果を示すグラフを開示している。hCRPに対する測定の範囲は0.08~10 mg/lである。

## 【 0 0 3 6 】

図5はhSHBGを分析物とし、免疫複合体の形成して該複合体を格子上で分離するために、二つの異なるモノクローナル抗体でコーティングされた捕捉粒子と標識粒子を用いるアッセイの結果を示すグラフを開示している。hSHBGに対する測定の範囲は6~200 nmol/lである。

10

## 【 0 0 3 7 】

図6は、グリル構造を用いる、非結合の第二の結合成分と、第一の結合成分に結合した第二の結合成分との分離を示している。第二と第一の結合成分を含む複合体(C)はグリル(A)を通過することができない。非結合の第二の結合成分(B)はグリルを通過することができる。理想的なケースでは、グリルと第一の結合成分(D)の捕捉粒子の正接点は0に近づく。

## 【 0 0 3 8 】

使用語句の定義

20

本発明で使用され、本明細書において説明される概念は以下のような応用された意味を持つ：

- ・ 結合物質

特定の分子の独特な部位(例えばエピトープや抗原決定基)を認識し、そこに結合することができる任意の分子、リガンドもしくは抗リガンド、化合物、またはそれらの組み合わせ；

- ・ リガンドまたは抗リガンド

免疫アッセイで使用される抗原や抗体のような、他の分子と複合体を形成する分子；

- ・ 第一の結合物質

捕捉粒子にコーティングされている、またはコーティングされる結合物質；

30

- ・ 第二の結合物質

標識粒子にコーティングされている、またはコーティングされる結合物質；

- ・ 捕捉粒子

高分子、プラスチック、ガラス、金属、セルロースなどからなる、結合物質の担体や固相として使われる固体粒子であって、不溶性にされているもの；または、リボゾーム、細胞、ウイルスを含む微生物のような、異なる非固体(弾性の)材料も捕捉粒子として機能することができる；

- ・ 標識

視覚または機器により検出または測定され得る信号を発生する、または発生するようにさせることができる物質；

40

- ・ 標識粒子

検出できるように標識された、任意の種類の高分子、プラスチック、ガラス、金属、セルロースなどからなる固体の粒子；またはリボゾーム、細胞、ウイルスを含む微生物のような、異なる非固体(弾性の)材料も標識粒子として機能することができる；

- ・ 第一の結合成分

第一の結合物質でコーティングされた捕捉粒子を含む成分；

- ・ 第二の結合成分

第二の結合物質でコーティングされた標識粒子を含む成分；

- ・ 結合成分

50

第一の結合成分および/または第二の結合成分を意味する；

- ・ 第一の結合複合体  
分析物と第一の結合成分との複合体を意味する；
- ・ 第二の結合複合体  
第一の結合複合体（第一の結合成分と分析物）と第二の結合成分の複合体を意味する；
- ・ 第三の結合複合体  
分析物と第二の結合成分との複合体を意味する；
- ・ 免疫複合体または他の生体分子複合体  
第一の、第二の、または第三の結合複合体を意味する；
- ・ 分析物

10

試料溶液中の存在が定量的または定性的に評価される化合物や物質であって、結合物質によって認識されて結合され得る、特異的な空間的または極性的配置を少なくとも一つは含むもの；分析物は溶液中で遊離（分離）していてもよく、または例えば細胞膜に結合していてもよい；

- ・ 分離装置  
多孔性の表面が装備された、多孔性表面を囲む装置；
- ・ 多孔性表面  
第二の結合成分や他の結合していない材料は通過させるが、第一の結合成分は通過させない、非結合材料から免疫複合体または他の生体分子複合体を分離するために使用される表面；多孔性表面は第一の結合複合体も第二の結合複合体も通過させない；多孔性表面は孔や開口を含む；

20

- ・ 孔または開口  
これらの用語は本明細書において互換的に使用される；孔/開口は、第二の結合成分や他の非結合材料が多孔性表面を通過する手段である；

- ・ 孔/開口の大きさ  
粒子や材料が通過する能力を制限する孔/開口の寸法を意味する；大きさとは、例えば孔/開口の平均直径を意味することもあれば、孔/開口の平行する側面間の距離を意味することもある；

- ・ 粒子の大きさ  
孔/開口を通過する能力を制限する粒子の寸法を意味する；大きさとは、例えば球状の粒子の平均直径を指し得る；

30

- ・ 分離手段または台  
多孔性表面と同じ意で使用される；
- ・ 格子、グリル  
粒子の大きさに比例した寸法の孔や開口のある多孔性表面の具体的な例である；

- ・ 二次元形式  
物質は、表面を通過できないために、多孔性表面上を水平に移動する；多孔性表面の孔/開口よりも大きな粒子は二次元的に分離される；第一の結合成分、第一の結合複合体および第二の結合複合体は二次元分離される；

40

- ・ 三次元形式  
物質は、表面を通過できるので、多孔性表面上を水平に移動し、かつ多孔性表面を通して垂直に移動する；多孔性表面の孔/開口よりも小さな粒子は三次元的に分離される；第二の結合成分は三次元分離される。

【0039】

発明の詳細な説明

本発明は免疫複合体、または他の生体分子複合体を、該複合体が生成された後、非結合材料から分離する手段として、多孔性表面を使用する。複合体の分離は厳密に、多孔性表面（分離手段）上で起こる。

【0040】

捕捉粒子の使用により、第一の結合成分、第一の結合複合体および第二の結合複合体を

50

多孔性表面上に保持するが、第二の結合成分と他の不要な材料は表面を通過させる大きさの孔/開口をもった多孔性表面を使用できるようになる。第三の結合複合体は多孔性表面上に保持されるか、または多孔性表面を通過する。どちらの選択が適用されるかは孔/開口の形と大きさに依存する。

【0041】

多孔性表面上での複合体と非結合材料との分離は、第二の結合成分（結合物質でコーティングされた標識粒子）のみが使用される場合に比べて、より大きな孔を持った多孔性表面の使用を可能にする、捕捉粒子を使用することで可能になる。多孔性表面の孔/開口の大きさと形は重要である。これについては、以下でより詳細に論じる。当業者は、粒子に、偽陽性結果をもたらすような自己凝集の傾向があることを認識している。従って、孔の大きさは自己凝集した第二の結合成分が多孔性表面を通過でき、試料中の分析物の存在を示す第二の結合複合体からの特定の信号のみを調べることができるように十分な大きさであるべきである。従って、孔の大きさは自己凝集した粒子が孔を詰まらせないようなものであるべきである。その上、孔の形は、使用される捕捉粒子が孔をふさがらないようなものであるべきである。

10

【0042】

多孔性表面および特にその孔/開口は捕捉粒子の大きさおよび形状と適合性があるべきである。孔と捕捉粒子は一つの機能体を形成しており、これは結合物質でコーティングされた捕捉粒子（第一の結合成分）を、孔を詰まらせることなく、多孔性表面上に保持できるように最適化されているべきである。多孔性表面の孔は、あらゆる状況において、結合していない第二の結合成分や他の不要な材料の、該表面の通過を可能にする能力を維持すべきである。これは、捕捉粒子と孔の縁の間の正接点が数量的にも接触面積に關してもできるだけ小さな、機能性の孔-捕捉粒子対を設計することにより達成される。

20

【0043】

本発明は特に試料中の低い濃度の分析物を測定するのに適している。分析物を低濃度で含む試料に曝された結合物質に少量の分析物が付着した場合、従来の方法によってこの少量の凝集を測定することは不可能である。本発明により、標識粒子の強い強度の信号を利用することで、分析物を測定することが可能である。記述されているように、少量の凝集は正確で信頼できる結果を得るには不十分であるが、凝集は本発明の方法を適用することにより測定することができる。本発明は形成される凝集そのものに頼るのではなく、生成される凝集の量に比例して強さが増す標識信号に依存する。このことは、本発明と従来の免疫比濁アッセイとを比較すれば明らかになる。

30

【0044】

典型的な凝集試験は、0.1~1.0 μmの大きさの粒子と、それにコーティングされた、非常に正確な量の結合物質を利用する。結合物質がコーティングされた粒子の最適化された濃度が、目に見える凝集がおきることを可能にする。本発明は、捕捉粒子または標識粒子をコーティングするために使用される結合物質の濃度を有意に削減できる方法を開示する。このような削減が可能な理由は、標識粒子に組み込まれた、強い信号を発する標識の使用に基づく。強い信号が発生することにより、少量の分析物が、捕捉粒子の表面上で削減された量の結合物質により捕捉された場合でも、信号が得られる。従って、強い信号発生能力により、結合物質がコーティングされた少量の標識粒子でも、信頼できる測定には十分である。

40

【0045】

本発明は、高濃度の信号発生標識（従来の低閾値反応装置では信号のオーバーフローのために測定不可能）と高閾値反応装置を利用する。使用される標識分子の量が多すぎると、従来装置では信号のオーバーフローがおこる一方、本発明に従ってアッセイを行った場合には、その量が測定可能制限内にあることから、その結果は予想されないものであった。

【0046】

通常、抗原または抗体に少量の標識分子を結合させることができる。本発明は、標識粒

50

子が多数の標識分子の担体として機能し、その結果、非常に強い信号とより高い感度が得られる方法を開示する。例えば、ポイントオブケア検査に適した装置を使用した場合、感度の向上が結果として得られた。本出願に開示されている蛍光測定アッセイは、この種のアッセイを粒子増強なしで行う場合に通常使用される、高価格の実験室クラスの機器と比較して、中程度の感度を持った低価格の装置を使うことを行うことができる。さらに、このアッセイ形式は、多数の電子-光学設計を低価格の装置に、特にポイントオブケア型のアッセイのために、組み込むことを可能にする。

【0047】

本発明により、a) 分析物に特異的に結合する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分を多孔性表面に加える工程；b) 該試料を該多孔性表面に加える工程；c) 該多孔性表面に、検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を加える工程；および d) 該多孔性表面上の、検出できるように標識された該粒子によって生成される、試料中の分析物の存在および/または量を示す信号を検出する工程、を含む、試料中の分析物の存在または量を検出する方法が提供され、ここで多孔性表面は、第二の結合成分の、該表面の通過は許すが、第一の結合成分は通過させず；該第一の結合成分と該分析物は互いに結合して、第一の結合複合体を形成し；該第二の結合成分と該第一の結合複合体は互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、検出できるように標識された粒子に、該第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着しており；かつ第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は多孔性表面上に保持される。

10

【0048】

アッセイ法は、管またはキュベット内で反応が完了した後、すべての反応成分を一気に多孔性表面に加えることを行うことができる。または、第一の結合複合体を表面に加えた後、第二の結合成分を加えることによって行うことができる。好ましくは、すべての反応成分が一気に加えられる。

20

【0049】

アッセイ法は、最初に試料または第一の結合成分を表面に加え、次に第二の結合成分を加えることによっても行うことができる。この順序で行うには、多孔性表面の疎水性と孔の大きさに関して特別な要求が生じる。このように加えた場合、試料と第二の結合成分は、試料中の分析物の存在下で反応を完了する前に、孔を通過できるべきではない。その後、非結合材料は表面を任意の手段により、自由に通過すべきである。多孔性表面の孔/開口を通過するのに十分小さな試料または任意の他の成分が該表面に加えられた場合には、アッセイの実施に関して更なる要求が生じる。試料や他の小さな成分の、孔/開口を通じたの漏れは、機械的または物理化学的な遮断により、一時的に防ぐことができる。

30

【0050】

反応物がすべて混合されるアッセイは、分析物と第二の結合成分との反応により第三の結合複合体が生じるために、より複雑である。そのようなアッセイでは、分析物と第二の結合成分との反応が、分析物と第一の結合成分との反応と同時に起こる。しかしながら、第三の結合複合体は分析物を通して、第一の結合成分と結合する能力を保持する。

【0051】

本発明の方法の固相免疫アッセイでは、結合のための表面積を増すために、粒子を捕捉表面として使用している。反応溶液に懸濁されている、検出できるように標識された小さな粒子を材料することにより、ブラウン運動の増加によって好適な反応速度が達成される。従って、結合のための表面積がより少ない系に比べて、より早く平衡が確立される。

40

【0052】

固相過程で免疫アッセイを行う場合、材料は液相から除かれる。続いて洗浄が固相で行われると、より完全な分離が得られ、全体としてアッセイの感度は向上する。

【0053】

本発明は結合物質が付着している微粒子またはナノ粒子を利用する。粒子は、一方では移動固相として機能し、他方では不均一な免疫アッセイ過程において標識として機能する。特に、多孔性表面を利用する場合には、粒子は結果として生じる複合体の分離を手助け

50

する。

【0054】

第一の結合成分の捕捉粒子は、好ましくは大きい（典型的にはマイクロメートルの大きさ）。第二の結合成分の、検出できるように標識された粒子は、好ましくは小さい（典型的にはナノメートルの大きさ）。しかしながら、捕捉粒子と標識粒子の大きさの比率が維持されると想定した場合、粒子と孔/開口の寸法は小さくすることができる。第一の結合成分の粒子は、好ましくは、第二の結合成分の粒子より大きな平均直径をもつ。該結合成分と試料中の分析物から形成される複合体と、非結合材料との分離は、多孔性表面を利用することでなされる。分離されると、粒子表面の大半は分離手段の表面上にある。

【0055】

捕捉粒子は、結合物質と一緒にコーティングできる、任意の固体材料（例えばプラスチック、ガラス、金属）または非固体材料（即ち弾性様のリボゾーム、細胞、ウイルスを含む微生物）から作ることができる。標識粒子は、標識または標識を生成する材料を組み込ませる、または付着させることができ、標識された、または標識されていない結合物質でコーティングされうる、任意の固体材料または非固体材料から作ることができる。捕捉粒子の大きさは分離される材料とその性質により制限される。結合物質でコーティングされた捕捉粒子は、多孔性表面上での免疫反応または化学反応によって生じる、第一および/または第二の結合複合体が形成される前および後のいずれも、多孔性表面上に保持されるのに十分な大きさであるべきである。一方、捕捉粒子も標識粒子も、その大きさは、溶液中で懸濁されて表面積を増すのに十分小さくしなければならない。

【0056】

すでに述べられているように、捕捉粒子の大きさを制限する要因は多孔性表面の開口または孔の大きさである。捕捉粒子は、孔/開口を通過しないように十分小さくしなければならない一方で、標識粒子は孔/開口を通過するのに十分小さくしなければならない。適切な粒子の大きさとしては平均直径が0.1 μmから200 μmの範囲である。捕捉粒子のもっとも好ましい大きさは平均直径が1~10 μmである。標識粒子の大きさは、捕捉粒子の大きさよりも明らかに小さく、これらの標識粒子は、捕捉粒子-分析物（第一の結合）複合体に結合していない場合は、多孔性表面（例えば格子）を通過する。標識粒子の大きさは平均直径1~1000nmの間で変化することが可能であり、もっとも好ましい平均直径は50~150nmの間である。捕捉粒子の好ましい平均直径はマイクロメートルの大きさであるが、標識粒子により適した平均直径はナノメートルの大きさである。

【0057】

例として、本発明で、平均直径が10 μmの捕捉微粒子が使用された場合、これら粒子の好ましい量は、一試験につき $4 \times 10^3 \sim 3 \times 10^6$ の範囲内であり、もっとも好ましくは $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ の間である。このような量の範囲内で捕捉粒子が使用された場合、平均直径100nmの標識粒子の好ましい量は、一試験あたり $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ の間である。

【0058】

信号または信号を発生する材料と第二の結合物質を含む標識粒子は、標識材料の比活性を向上させるために使用される。従って、これらの標識粒子の使用はアッセイの感度を向上させる。発光性、放射標識、磁性または発色性物質を粒子に組み込むまたは付着させることができ、標識または信号を発生する材料として使用することができる。希土類キレートを含む安定化された蛍光標識を含む粒子は、米国特許第4,283,382号、米国特許第4,259,313号、および米国特許第4,735,907号に記載されているように、免疫試薬を標識するために使用されている。これらの標識は蛍光の効率を向上させ、免疫アッセイで特に有用である。これらの標識はまた、蛍光分光法での使用に伴い、高感度を示す。ユーロピウム、テルビウム、サマリウム、イッテルビウムのようなランタニドに加え、蛍光性（例えば、フルオレセインとローダミン）、リン光性（例えば、ポルフィリン）、化学発光性（例えば、アクリジニウムエステル、ルミノール）、電気化学発光性、生物発光性のような他の発光性標識、ならびに放射性標識、不水溶性または水溶性染料のような色素原、または磁気標識（フェライト、マグネタイト）が、本発明に従い、特定の標識材料の生成に使用され

10

20

30

40

50

得るが、これらに限定されない。

【0059】

さらに本発明は、同一の、または異なる捕捉粒子にコーティングされた、異なる特異性をもった結合物質および異なる性質を持った標識を利用する、多重パラメータアッセイ形式を含むように広げることができる。

【0060】

第二の結合複合体中の標識粒子からの信号の存在は、試料中の分析物の存在と相関する。得られる信号の大きさは、生成された免疫/生体分子(第二の結合)複合体の量と相関し、従って試料中に存在する分析物の量に相関する。本発明は、分子または任意の固体形状での標識の使用をも保持する。信号のレベルは蛍光光度計、ルミノメーター、放射活性カウンター、磁力計、および分光光度計のような、適切な装置で測定され得る。検出できるように標識された粒子には、第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着している。結合物質は、他の複合体や物質と比較して、優先的な親和性を有する第一の結合複合体に結合する場合、第一の結合複合体に「特異的に結合する」。結合物質は、第一の結合複合体の任意の部位に特異的に結合し得る。結合物質は分析物、第一の結合成分、またはその両方に特異的に結合し得る。結合物質は好ましくは分析物に特異的に結合する。

10

【0061】

本発明で開示されるような、粒子によって補助される免疫反応では、捕捉粒子の表面に第一の結合物質が結合し、第二の結合物質が、信号または信号を発する物質が組み込まれたまたは付着した粒子に結合している。捕捉粒子も標識粒子も結合物質を不溶性にする。典型的には、結合物質は抗体またはフラグメントであり、例えばF(ab')とF(ab')<sub>2</sub>またはその誘導体であり、試料中の分析物を認識して結合する。本発明では、結合物質として、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方が使用できる。CRPが分析物として決定された場合、使用した第一および第二の結合物質は、ポリクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントであった。SHBGが分析物として決定された場合、異なる特異性を持った二つのモノクローナル抗体を、それぞれ第一および第二の結合物質として使用した。SHBG抗体は、異なるクローン由来の全IgG分子を代表例とする。捕捉粒子と標識粒子の両方の表面上にある、粒子に結合した結合物質としてのモノクローナル抗体は、そのような抗体に付随する高度の特異性と感度を付与する。結合物質は、当業者に周知であるカップリング方法を用いた、吸着または化学共有結合を通じて、捕捉粒子の表面上および標識粒子上に付着させることができる。

20

30

【0062】

粒子を実質的にコーティングするのに十分な量の結合物質が、粒子に結合していることが好ましい。「実質的にコーティングする」とは、粒子の表面積の一部はコーティングされているが、すべてはコーティングされてはいないことを意味する。これにより、結合物質の空間的な運動が保持される。粒子のコーティングされている表面積の最小パーセンテージは、使用される標識の強さと種類に部分的に依存する。標識が強ければ強いほど、捕捉粒子に必要とされる結合物質の量は少なくなる。異なる量の結合物質でコーティングされた粒子に関する本出願のアッセイは、低閾値反応装置を使用することで実施された。

【0063】

本出願の分離アッセイは時間分解蛍光測定のための高閾値反応装置を使用して実施された。より感度の低い簡単な装置を使用した場合、標識粒子は、より高性能の低閾値反応装置を使用した場合の粒子量に比べて、約100倍高い濃度で使用されなければならなかった。コーティングされた粒子の挙動は(捕捉粒子、標識粒子の両方に関する)反応中の標識粒子の量が、例えば100倍の場合、(基本的には)変わらない。

40

【0064】

上で既に述べられているように、本発明は、免疫反応または化学反応がおきた後、免疫/生体分子複合体を非結合材料から分離する手段としての、多孔性表面の使用に関する。免疫/生体分子複合体の分離は厳密に多孔性表面(分離手段)上でおきる。

【0065】

50

本発明で開示されるアッセイの原理は、多孔性表面上での捕捉粒子と標識粒子の分離に依存する。この分離は一般的には粒子の形および大きさ、ならびに多孔性表面中の孔/開口の形および大きさに依存する。

【0066】

孔/開口は任意の形、例えば正方形、長方形、円形、三角、六角形、または八角形でもよい。孔/開口は好ましくは二つの平行な側面を持つ。孔/開口は、二つの平行な側面を、任意の長さのまっすぐな一側面から形成される二つの末端でつなげることにより形成されうる。これらの末端は、平行な側面に対して直角でもよく、例えば孔/開口は正方形または長方形であったり、または末端は別の角度でもよく、例えば孔/開口は平行四辺形または菱形である。または、孔/開口は、二つの平行な側面を、それぞれ二つ以上のまっすぐな側面を含む末端でつなげることにより形成されうる。これらの末端のまっすぐな側面は、二つのまっすぐな側面（例えば、孔/開口は六角形である）、三つのまっすぐな側面（例えば、孔/開口は八角形である）、四つのまっすぐな側面（例えば、孔/開口は十角形である）、またはそれ以上の側面を含みうる。これらの末端を形成する複数のまっすぐな側面は同じまたは異なる長さでありえる。孔/開口は従って、規則的な形または不規則的な形でありえる。末端は平行な側面に対して直角であってよく、例えば孔/開口は正方形もしくは長方形であるか、または末端は別の角度であってよく、例えば孔/開口は平行四辺形または菱形である。二つの平行な側面は、任意の長さの二つまたはそれ以上の側面をつなげられうる。または、孔/開口は、二つの平行な側面を、円の一部、例えば半円を形成する側面をそれぞれ含む、二つの末端でつなぐことにより形成されうる。または、孔/開口は、二つの平行な側面を、任意の形の不規則な側面をそれぞれ含む、二つの平行な末端でつなげることによって形成されうる。

【0067】

一つの態様では、平行な側面を持った孔/開口は多孔性表面のほぼ全体を横切る形で広がり、例えば多孔性表面はグリルである。別の態様では、孔/開口は表面のほぼ全面を覆い、例えば多孔性表面は格子である。このような様態は、材料が通過しうる通路の数が増すので、非結合材料の表面の通過にもっとも効率がよい。

【0068】

捕捉粒子の大きさは多孔性表面の孔/開口よりも、一般的には大きい。さらに、該表面の孔/開口は、一般的には、アッセイにおいて任意の形状で使用される標識粒子の大きさよりも大きい。一つの様態では、多孔性表面は二つの平行な側面を持った孔/開口を含み、これら側面間の距離は、第一の結合成分の捕捉粒子の大きさよりも小さく、第二の結合成分の標識粒子の大きさよりも大きい。

【0069】

孔の形と適合性のある捕捉粒子の好ましい形は、上で述べたように孔/開口の形が二つの平行な側面を持つ場合には、球形である。球状の捕捉粒子の平均直径は好ましくは、二つの平行する側面間の距離よりも大きい。同様に、孔の形と適合性のある標識粒子の好ましい形は、上で述べたように孔/開口の形が二つの平行な側面を持つ場合には、球形である。標識粒子の平均直径は好ましくは、二つの平行する側面間の距離よりも小さい。棒状の捕捉粒子が使用される場合には、粒子の幅は常に孔/開口の大きさ（例えば平均直径または二つの平行な側面間の距離）よりも大きくなければならない。棒状の標識粒子が使用される場合には、粒子の幅は常に孔/開口の大きさ（例えば平均直径または二つの平行な側面間の距離）よりも小さくなければならない。

【0070】

表面の開口または孔/開口に好ましい大きさは、標識粒子の少なくとも2倍の大きさである。捕捉粒子が多孔性表面（例えば格子）を通過するのを防ぐため、表面の孔/開口の大きさが、捕捉粒子の大きさに関連付けられていることが重要である。典型的な平均の孔/開口の大きさ（例えば、平均直径または二つの平行な側面間の距離）は0.05~100 μmの間であり、より好ましくは1~20 μmの間である。孔/開口の大きさ（例えば平均直径または二つの平行な側面間の距離）は捕捉粒子の直径の10~90%、好ましくは50~70%である

べきである。標識粒子の大きさは、孔の大きさ（例えば、平均直径または二つの平行な側面間の距離）の最大で50%、好ましくは0.1~10%であるべきである。例えば、捕捉粒子の大きさが最大で200 μmのとき、孔/開口の最大の大きさは180 μmである。

【0071】

第一の結合成分の大半は多孔性表面の上に突出し、ごく一部のみが多孔性表面の孔で接線方向に整列する。その結果、第二の結合成分は、受動的または能動的な手段で、自由に表面を通して動くことができる。

【0072】

第二の結合複合体中の捕捉粒子に結合している標識だけが、このアッセイで測定される。標識粒子と捕捉粒子の結合を補助する免疫反応または化学反応は、管、キュベットなどの中で、または多孔性表面上で起こりうる。

10

【0073】

表面の構造と使用される材料は、表面の中での結合を可能にしない。すべての第一の結合成分とそれに結合している第二の結合成分は表面上に保持される一方、すべての非結合標識材料は表面を貫流する。分離される材料はすべて、標識の定量的な分析のために、表面上に保持されるか、または表面から放出されうる。通常、表面は複合体すなわち免疫複合体または生体分子複合体の回収に関しては受動的な性質を持つ。しかしながら、多孔性表面（例えば格子）は信号の発生および/または伝達ならびに非結合標識の除去において能動的な役割をもちうる。信号の発生に適して方法とは、例えば蛍光、電磁気学的放射と磁気測定などである。さらに、多孔性表面材料に、第一の結合成分に結合した第二の結合成分からの信号を電氣的、電磁氣的、または磁氣的手段により反映または伝えさせることができる。選ばれる多孔性表面材料の性質は、低いバックグラウンドと高い信号雑音比を呈すべきである。上記条件を満たす、好ましい材料としては、金属、シリコン化合物、および低バックグラウンドポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。「低バックグラウンドポリマー」とは、（特異的な）標識によって発生する信号と比較して、非常に低い（非特異的）信号比を持った、任意のポリマー材料を意味する。低バックグラウンドポリマーは標識（信号）の測定に干渉しないポリマーである。一方、やはり低バックグラウンドであるが、特異的な信号の発生にかかわることで、測定に積極的な役割を果たす材料も使用することができる。そのような材料は、蛍光測定用膜底マイクロタイタープレートで好ましく使用される材料、例えばAcrowell GHP (Pall-Gelman Laboratory)やMultiscreen-FL、ポリカルボネート(Millipore)を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0074】

適した多孔性の材料は当業者に周知である。例えば、光励起や発光に適用した場合、多孔性表面は光導体として作用することが好ましい。さらに、電気信号の発生と回収には伝導性と半導体特性が好まれるのに対して、磁気測定アッセイには磁気測定的な性質が適切である。

【0075】

多孔性表面は好ましくは格子である。適した格子は、例えば試料支持体（ホルダー）として電子顕微鏡で用いられるものである。電子顕微鏡格子は例えば、銅、ニッケル、アルミニウム、モリブデン、チタン、銀および/または金のような金属から調製できる。これらの金属に加えて、セラミック、ガラス、または異なる種類のプラスチックおよび/もしくはシリコンのようなより可とう性のある材料からも調製できる。

40

【0076】

格子の構造は、簡単な平面、管の壁、または閉鎖空間の壁、例えばゲートの形状で表すことができる。従って、異なる格子構造が存在するさまざまな構築物を設計し、作製することが可能である。微量注入成形、熱エンボス加工、またはシリコン微細機械加工のような最新の微細機械加工技術は、非常に複雑な格子の実現を可能にする。これらの最新的手法により作製され、完成された格子は、本発明の開示に従い、最新の分析診断装置の格子構造に適用できる。

【0077】

50

免疫複合体の分離に先行して、第一の結合成分と分析物との最初の免疫反応後の洗浄工程を行ってもよい。洗浄工程は、例えば複合体を表面に加える前に、管の中で行うことができる。洗浄工程は緩衝液の添加を含んでもよい。ペレット状の粒子の遠心分離と再懸濁は、特に高濃度の分析物を試験する場合、非結合の試料材料と、遊離の非結合の分析物を除去する。第一の結合成分-分析物複合体と第二の結合成分との第二の免疫反応後、反応成分は多孔性表面（例えば格子）上へ移してもよい。または、分離手段の構造によっては、両免疫反応とも、多孔性表面（例えば格子）上で直接行われうる。洗浄はまた、多孔性表面（例えば格子）上に緩衝液を加えることを行うことができる。洗浄液（または緩衝液）は、好ましくは、多孔性表面を通過することができる。緩衝液は、複合体、多孔性表面（例えば格子）、およびその孔を洗い流し、非結合の標識粒子を除去し、それによりバックグラウンド信号を減少させる。アッセイ技術の効率は、部分的に結合材料と非結合材料との分離の完全性に依存するので、より多くの洗浄液が結合成分と接触するほど、洗浄段階の効率がよい。洗浄の完全性は、非結合の信号発生材料が測定領域に残る場合、存在するバックグラウンド信号を減少させる。多孔性表面として金属性の格子を使用する利点は、材料が本質的に、非常に低いバックグラウンドの蛍光性をもっており、標識粒子および試料の構成要素の格子への非特異的な結合が少ないことである。

10

20

30

40

50

**【0078】**

本発明は特有の分離方法を達成するための包括的な方法を含む。この分離方法は、実際には、二次元および三次元の両方の分離方法からなる。第一の結合成分と第一および第二の結合複合体のような、その大きさ故に多孔性表面（例えば格子）の開口（孔）を通過しない材料は、平らな平面上を移動する、例えば二次元的に分離される。過剰な第二の結合成分や非特異的な結合を引き起こしうる不要な材料のような、開口を通過するのに十分小さな他の物質は、三次元的な経路を利用する。これにより、純粋な免疫/生体分子（第一および第二の結合）複合体の多孔性表面上での生成が可能になる。

**【0079】**

従って、結合した免疫/生体分子複合体と非結合材料との分離は、分離が主に二次元的に起こる表面を利用することにより達成される。興味深いことに、開示される表面は、該複合体が表面上に二次元的に分布する一方、非結合材料は三次元的に分布するような分離を可能にする。従って、該方法は、二次元および三次元的分離の両方を可能にする。この特徴は、本発明を公知の先行技術から明確に区別する。この特徴は、必要なときには、多孔性表面（例えば格子）の表面から複合体の放出および移動を可能にする。この分離方法のもう一つの重要な利点は、例えば磁気ビーズを使用する際に利用される磁石のような、更なる手段を分離に必要としないことである。本発明によれば、分離は表面上でおこる、即ちそれ自体はすでにアッセイを行うのに基礎的な道具とみなされる、試験またはアッセイの台上で起こる。該表面を免疫/生体分子複合体の分離に使用する利点は、低い非特異的な標識結合であり、即ち高い信号雑音比である。標識や標識粒子に非特異的に結合しない表面材料を選ぶことも有利である。

**【0080】**

さらに、多孔性表面を使用する三次元的分離は、多孔性表面をウィキング基質または任意の他の膜もしくはフィルターの表面に適用することにより、より速く、より効率的にすることができる。その目的は、非結合の材料を含む液体が、多孔性表面（例えば格子）を通過して流れるようにすることである。非結合材料を回収するために、多孔性表面の下にあるゲル層を含む材料もまた、多孔性表面の特徴を改善するために使用できる。

**【0081】**

従来の三次元膜を利用するアッセイは、結合材料の一部が膜の内部に結合し、一部が膜の表面に結合するような、結合材料と非結合材料との分離に依存する。本発明は、結合材料が多孔性表面に結合するような、結合材料と非結合材料との分離に依存する。実際には、第一の結合成分の大半は多孔性表面よりも上に伸び、あるとしても、ほんの一部が多孔性表面の開口または孔にある。このような分布は孔の直径と粒子の大きさに大きく依存する。本発明の方法では、粒子は多孔性表面（例えば格子）に単層、二重層、または多層

として加えることができる。

【0082】

典型的には、使用されるアッセイ法は非競合的なアッセイである。使用されるアッセイ法は、競合的なアッセイ手法にも適用されうる。非競合的なアッセイでは、信号の強度が、競合的なアッセイでは信号強度の減少が、測定される。

【0083】

本発明の方法によれば、免疫反応はすべて、連続的にまたは同時に管の中、キュベットの中、または直接格子の表面上で行われうる。典型的には、全インキュベーション（アッセイ）時間は、すべての免疫反応が同時に行われるときには1分から5分であり、免疫反応が連続的に行われる時には、それぞれ3分から15分である。しかしながら、アッセイ法は

10

【0084】

本発明の方法は、一般的には試料、典型的には感染症、臨床化学、衛星モニタリングの分野における生物学的試料に適用される。典型的には、試料はヒトのような個体由来の身体試料であると知られている、または思われるものである。好ましくは、試料は体液、例えば血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、創傷治癒液、腹水、胸膜液、滑液、皮膚の吸引水泡液、または羊水を含む。さらに、本方法は水溶性の固体、半固体、または糞便、痰、咽頭、膿などのような糊状の試料の試験にも適している。さらに、本方法は食品産業

20

【0085】

記載される方法は、免疫複合体の分離に使用することができ、従って細菌、ウイルス、菌類、寄生虫（原生動物）のような微生物およびそれらの抗原、ならびに真核細胞およびそれらの抗原の検出に使用できる。さらに、次のような種類の分析物も測定できる：ホルモン、薬物、毒素、ビタミン、環境化学品、酵素、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、脂質、ハプテン、アレルゲン、および核酸。記載される方法はまた、例えば核酸間の複合体（DNA-DNAおよびDNA-RNA）および核酸とタンパク質との複合体（例えば遺伝発現を制御する調節複合体）のような、他の種類の生体分子複合体の分離にも使用できる。生体分子複合体は、リガンドと受容体（全細胞膜に結合した受容体、または分離された細胞膜に結合した受容体）との複合体、多酵素複合体（異なる酵素サブユニットを含む）のような、異なるタンパク質間（糖タンパク質およびリポタンパク質を含む）の複合体、ならびに酵素とその基質との複合体のような、タンパク質と他の種類の生体分子との複合体を含む。分析物は細胞性抗原を含まないもの（例えば、核酸や細胞質タンパク質）でも、または原核もしくは真核細胞膜に結合したもの（例えば受容体）でもよい。

30

【0086】

本発明は試料中の分析物の存在および/または量を検出するキットも提供する。多孔性表面、第一と第二の結合成分に加え、本発明のキットは、適切な緩衝液、適したキャリブレーション試薬、ウィキング膜、サンプリング装置、使用説明書、およびその他の一般的な成分を含む。

【0087】

実施例

以下の実施例は本発明を説明する。特に示さない限り、使用される方法は標準的な生化学的、分子生物学的技術である。実施例は単に例として提示されるものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

40

【0088】

本発明で、免疫複合体の分離とアッセイのマウンティングに使用される金属性格子の材料は銅であった。使用された格子の厚さは約10 $\mu$ m、棒の厚さは5 $\mu$ m、孔の大きさは7.5 $\mu$ m（2000メッシュ）であった。本発明で使用された格子は電子顕微鏡で試料の支持体（ホルダー）として使用されるものに類似している。

【0089】

50

## 実施例1

ポリクロールF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを利用して、免疫複合体の分離に使用される格子上の該複合体の形成を測定する、第一および第二の粒子に結合した結合物質を用いるhCRPの連続的アッセイの手順(図4)

ヒトC反応性タンパク(hCRP)アッセイは炎症の指標として使用される。本実施例ではhCRPはキャリブレーター試料の中で測定された。まず、hCRPを0~10mg/lの濃度で含む試料と緩衝液(trisベース)0.1mlを小さな遠心分離管に加える。その後10μlの抗CRP F(ab')<sub>2</sub>フラグメントでコーティングされた0.25%ラテックス粒子(直径10μm)を加え、管を5分間、混ぜながらインキュベートする。インキュベーションの後、管を0.5~3分遠心分離(約16000×g)し、上清は廃棄する。CRPが結合したラテックス粒子は、次に遠心分離と吸引により非結合のCRPを除くために洗浄する。粒子は0.1mlの緩衝液に再び懸濁され、標識を含む結合物質でコーティングされたラテックス粒子(0.125%懸濁液、ラテックス粒子直径0.1μm)10μlを加える。5分間インキュベートした後、形成された免疫複合体、すなわち第一の結合物質を有する捕捉ラテックス-CRP-第二の結合物質を有する標識ラテックスが、反応成分を7.5μm(孔の直径)格子に移すことにより分離され、該格子(直径3mm)に通して濾過される。濾過工程は図2と図3に示されている。洗浄の後、格子に結合した免疫複合体の蛍光信号がカウントされる。信号は格子の免疫複合体の量に相関し、従って該複合体中のCRPの量、ゆえに試料中の分析物の量に相関する。

【0090】

## 実施例2

モノクローナル抗体を利用して、免疫複合体の分離に使用される格子上の該複合体の形成を測定する、第一および第二の粒子に結合した結合物質を用いるhSHBGの連続的アッセイの手順(図5)

ヒト性ホルモン結合グロブリン(hSHBG)アッセイは、ホルモン状態の一つの指標として使用される。本実施例では、細胞培養液の試料中の組換えhSHBGを測定した。まず、hSHBGを0~200nmol/lの濃度で含む試料と緩衝液0.1mlを小さな遠心分離管に加える。その後モノクローナル抗SHBG抗体でコーティングされた0.25%ラテックス粒子(直径10μm)10μlを加え、管を5分間、混ぜながらインキュベートする。インキュベーション後、管を0.5~3分遠心分離(約16000×g)し、上清は廃棄する。SHBGが結合したラテックス粒子は、次に遠心分離と吸引により非結合のSHBGを除くために洗浄する。粒子を0.1mlの緩衝液に再び懸濁し、標識を含む結合物質でコーティングされたラテックス粒子(0.125%懸濁液、ラテックス粒子直径0.1μm)10μlを加える。結合物質はモノクローナル抗体であり、第一の結合物質とは異なるSHBGへの特異性をもつ。5分間インキュベートした後、形成された免疫複合体、すなわち第一の結合物質を有する捕捉ラテックス-SHBG-第二の結合物質を含む標識ラテックスは、反応成分を7.5μm(孔の直径)格子に移すことにより分離され、該格子(直径3mm)に通して濾過される。濾過工程は図2と図3に示されている。洗浄の後、格子に結合した免疫複合体の蛍光信号がカウントされる。信号は格子上の免疫複合体の量に相関し、従って該複合体中のSHBGの量、ゆえに試料中の分析物の量に相関する。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】免疫複合体形成のアッセイの原理を開示する。

【図2】複合体の格子上での二次元的分離を開示する。

【図3】結合していない非特異的材料の、格子を通しての該材料の濾過による三次元的な分離を開示する。

【図4】試料中のhCRPの濃度を示すグラフを記載する。

【図5】試料中のhSHBGの濃度を示すグラフを記載する。

【図6】グリル構造(A)を用いた、結合していない第二の結合成分(B)と、第一の結合成分に結合した第二の結合成分(C)との分離を示す。

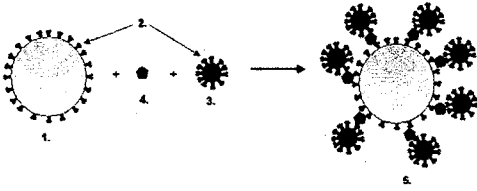
10

20

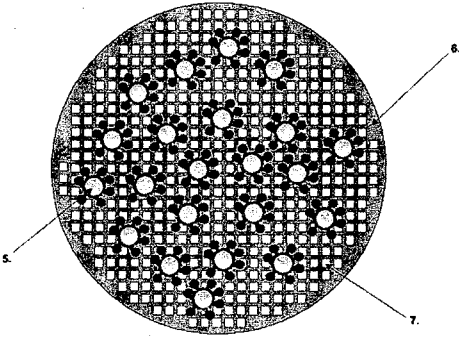
30

40

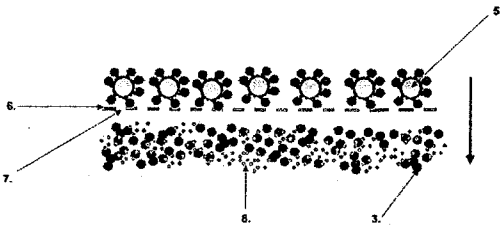
【 図 1 】



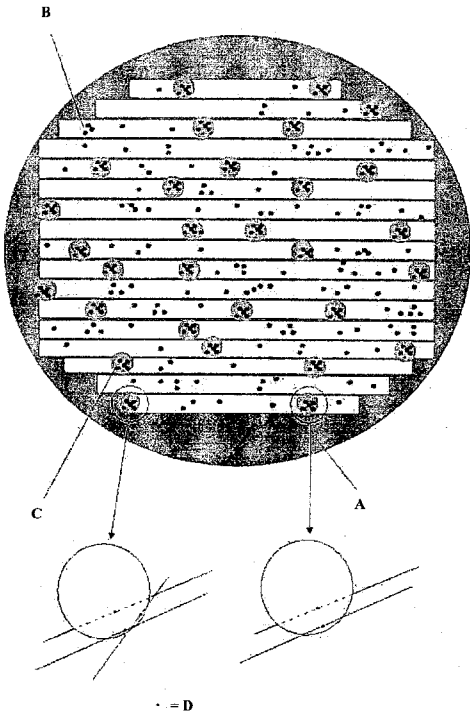
【 図 2 】



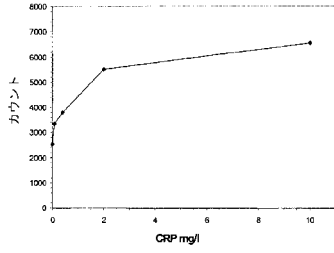
【 図 3 】



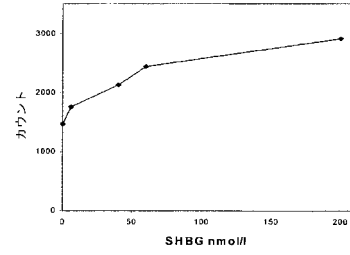
【 図 6 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No EP/2005/012523
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/569 G01N33/543 G01N33/58		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 096 563 A (HAJIZADEH ET AL) 1 August 2000 (2000-08-01) abstract figures 4,5 column 1, lines 8-10 column 6, line 26 - column 7, line 35 column 10, lines 49-58 column 11, lines 13-15 column 12, lines 29-65 column 15, line 42 - column 16, line 30 column 17, line 23 - column 18, line 30 claims 1,8 ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  2 February 2006		Date of mailing of the international search report  20/02/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 spo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Boiangiu, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 EP2005/012523

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 501 949 A (MARSHALL ET AL) 26 March 1996 (1996-03-26) abstract column 1, lines 19-25 column 3, lines 19-43 column 4, lines 29-57 column 6, lines 52-67 claims 1,14	1-21
A	US 6 632 603 B1 (HUBSCHER THOMAS T ET AL) 14 October 2003 (2003-10-14) abstract figures 1-4 claim 16	1-21
A	US 5 236 826 A (MARSHALL ET AL) 17 August 1993 (1993-08-17) abstract	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

EP/EP2005/012523

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6096563	A	01-08-2000	NONE
US 5501949	A	26-03-1996	NONE
US 6632603	B1	14-10-2003	AU 2121497 A 10-09-1997 EP 0882224 A1 09-12-1998 NO 983854 A 21-10-1998 WO 9731259 A1 28-08-1997
US 5236826	A	17-08-1993	NONE

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/554 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/544	A
<b>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/554	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543	5 2 5 C
	G 0 1 N 33/577	B
	G 0 1 N 33/543	5 7 5
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 Z
	G 0 1 N 33/53	X
	G 0 1 N 33/53	N

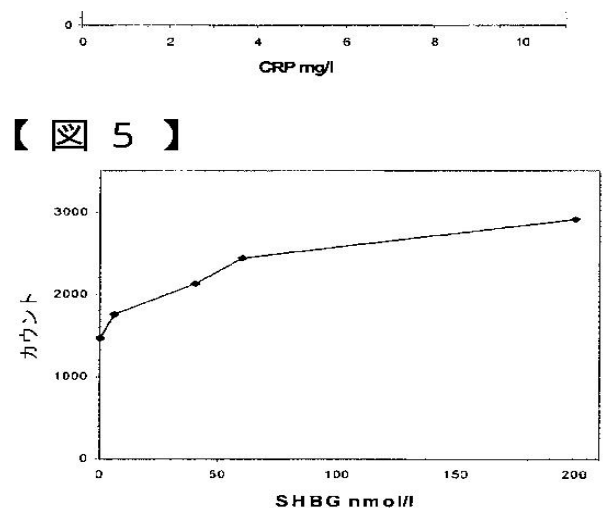
(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マートブオリ ミラ  
フィンランド共和国 エスポー タカヴィトサンクジャ 6 エイ 1

专利名称(译)	基于粒子的结合测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008522170A</a>	公开(公告)日	2008-06-26
申请号	JP2007543736	申请日	2005-11-23
申请(专利权)人(译)	猎户座Diagnostica公司Owai		
[标]发明人	ルオトラヨハニ ニクラハンヌ マートブオリミラ		
发明人	ルオトラ ヨハニ ニクラ ハンヌ マートブオリ ミラ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/544 G01N33/554 G01N33/577 G01N33/53 G01N33/538		
CPC分类号	G01N33/538 Y10S435/971 Y10S435/975 Y10S436/824		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.501.F G01N33/545.A G01N33/552 G01N33/553 G01N33/544.A G01N33/554 G01N33/543.525.C G01N33/577.B G01N33/543.575 G01N33/543.541.A G01N33/543.541.B G01N33/543.541.Z G01N33/53.X G01N33/53.N		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2004026592 2004-12-03 GB		
其他公开文献	JP2008522170A5 JP4482035B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测样品中分析物的存在或量的方法，所述方法包括：多孔表面，其上附着有结合物质的颗粒，分析物和涂有结合物质的标记颗粒。如果所述分析物存在于样品中，则在液相中发生免疫或化学反应。通过使用所述表面实现结合的复合物与未结合的材料分离，其中分离主要多孔表面（例如网格）的表面上二维地发生。有趣的是，所公开的表面能够实现分离，其中所述复合物在多孔表面（例如网格）上二维分布，而未结合的材料是三维分布的。因此，所述表面能够实现二维和三维分离。



【 図 5 】