

(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2013-101092

(P2013-101092A)

(43) 公開日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.

GO1N 21/69 (2006.01)
GO1N 21/71 (2006.01)
GO1N 33/536 (2006.01)

F 1

GO1N 21/69
 GO1N 21/71
 GO1N 33/536

テーマコード(参考)

2 GO 4 3

E

審査請求 未請求 請求項の数 5 書面 (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願2011-256791 (P2011-256791)

(22) 出願日

平成23年11月7日 (2011.11.7)

(71) 出願人 597005598

高村 禅

石川県石川郡野々市町末松1-68

(71) 出願人 511285679

近江 みゆき

石川県能美市緑が丘10-154

(71) 出願人 506314841

株式会社マイクロエミッション

石川県能美市旭台2-13 いしかわクリ

エイトラボ

高村 禅

石川県石川郡野々市町末松1-68

(72) 発明者 浮田 芳昭

石川県能美市旭台1-50

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】金属標識物質を用いた被検物質の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 医療の進歩や環境計測への社会的ニーズにより、稀釈を必要としないより広い検出範囲や、高い検出感度、オンラインでの迅速分析などの特性が必要とされる被検物質の測定が要求されてきている。

【解決手段】 前述の目的を達成するために、本発明者らが検討を重ねた結果、金属微粒子を標識物質として用いた免疫測定法等において、被検物質の量に対応した金属微粒子の量を、従来試料溶液中の金属元素の測定のみを行っていた液体電極プラズマ発光分析法を用いて測定することによって、被検物質の高感度で広い検出範囲を有するオンラインでの測定が実現されるとの知見を得、本発明を完成させるに至った。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

金属微粒子を標識物質として用いる被検物質の測定法であって、試料溶液中の被検物質の濃度に対応した金属微粒子の量を、液体電極プラズマ発光分析法により測定し、前記金属元素の発光強度に基づいて被検物質の濃度をしらべることを特徴とする被検物質の測定方法。

【請求項 2】

金属微粒子の量を測定する際に、あらかじめ金属微粒子をイオン化することを特徴とする請求項 1 に記載の被検物質の測定方法。

【請求項 3】

前記金属微粒子のイオン化を、硝酸で行うことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の被検物質の測定方法。

【請求項 4】

標識物質である金属微粒子が銀微粒子であることを特徴とする請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の被検物質の測定方法。

【請求項 5】

銀微粒子の直径が 20 から 60 nm であることを特徴とする請求項 4 に記載の被検物質の測定方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、液体電極プラズマによる、金属微粒子を標識物質として用いた被検物質の測定方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

タンパク質、核酸などの生物化学的物質を簡便かつ高感度に測定する方法として、抗体や相補的な核酸など被検物質に特異的に結合する物質に酵素や金属ナノ粒子などを標識し、その標識体を測定する方法が知られている。そのひとつは抗原抗体反応を利用する免疫測定法で、免疫学、臨床、組織学、生化学等の分野で多用されている。用いられているのは主に酵素を標識物質とする E L I S A 法で、酵素反応に由来する発色は発光などの信号を得ることにより被検物質の検知や濃度測定を行うものである。しかしながら E L I S A 法では、検出の濃度範囲が一桁から二桁で、測定の際に試料の希釈を繰り返す必要があるものがあった。また、発色や発光の信号検出時に光学系の装置を必要とするため、大型の装置が必要であった。

【0003】

また、免疫測定法のひとつとして、イムノクロマト片を用いたイムノクロマト法がある。イムノクロマト法は、操作の簡便さや検出時間の短さから、特にオンラインでの検出が望まれる病院での検査などに広く利用されるようになってきた。しかしながら、検出ラインの目視判定が主に行われていて、定量的な測定は不十分であった。

【0004】

これに対し、下記非特許文献 1 のように、金属ナノ粒子で標識した抗体を用いた電気化学的検出が検出装置の小型化や操作の簡便化などの観点から注目されている。

【0005】

また、下記非特許文献 2 のように、金ナノ粒子やランタノイド系元素をラベル物質に用いた、誘導結合プラズマ質量分析装置による検出が試みられている。しかしながら、プラズマ発生のためにアルゴンガスや大容量の電源が必要で、小型化が困難であった。そのため、オンラインでの免疫測定には不向きである。

【0006】

一方、液体電極プラズマと名付けたプラズマ発生手法を利用して、液体試料中の金属元素を分析する小型の元素分析装置が下記特許文献 1 のように提案され、実用化されている

10

20

30

40

50

。

【先行技術文献】

【0007】

【特許文献】

【特許文献】 1) 特許 第3932368号

【0008】

【非特許文献】

【非特許文献】 1) Electroanalysis 20, (2008) 14 - 21
. 2) Tr and in Analytical Chemistry 29, (201
0) 399 - 408

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

医療の進歩や環境計測への社会的ニーズにより、稀釀操作を必要としないより広い検出範囲や、高い検出感度、オンラインでの迅速分析などの特性が必要とされる被検物質の測定が要求されてきている。

本発明は上記事情を鑑みて提案されたものであり、被検物質の定量的分析を行ううえで、より広い検出範囲、より高い検出感度を有する、移動や携帯が可能な測定方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前述の目的を達成するために、本発明者らが検討を重ねた結果、金属微粒子を標識物質として用いた免疫測定法等において、被検物質の量に対応した金属微粒子の量を、従来試料溶液中の金属元素の測定のみを行っていた液体電極プラズマ発光分析法を用いて測定することによって、被検物質の高感度で広い検出範囲を有するオンラインでの測定が実現されるとの知見を得、本発明を完成させるに至った。

【発明の効果】

【0011】

液体電極プラズマ(LEP)と名付けたプラズマ発生手法を利用して、イムノアッセイを行った。本法は、試料溶液に電圧をかけてプラズマを発生させるため、アルゴンガスや大容量の電源が不要で、小型化が可能である。しかし、通常用いられる抗体へのラベル分子である金ナノ粒子では、高い感度を得るのに十分なスペクトル強度が得られず、ランタノイド系元素は高価なため、実用的ではない。高いスペクトル強度が得られ、免疫反応に安定的に利用できる新たな金属標識物質をスクリーニングした結果、銀ナノ粒子をラベル物質とし、硝酸で酸化した銀イオンを測定することで、広い検出範囲を有する高感度な検出が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明を適用して銀微粒子を標識物質として被検物質の濃度を測定する場合の、サンドイッチ型免疫反応をモデルとした概略図

【図2】本発明に利用する、カラムチップの構造図

【図3】銀微粒子を直接測定した場合とイオン化してから測定した場合のスペクトルのシグナル強度比較図

【図4】本発明を適用した場合の、銀微粒子の直径とシグナル強度との関係図

【図5】本発明を適用した測定方法による、マイクロウェルを使用した場合の被検物質濃度とシグナル強度との相関図

【図6】本発明を適用した測定方法による、イムノクロマトストリップを使用した場合の被検物質濃度とシグナル強度との相関図

【図7】本発明を適用した測定方法による、カラムチップを使用した場合の被検物質濃度とシグナル強度との相関図

【発明を実施するための形態】

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

本発明の液体電極プラズマによる金属微粒子を標識物質として用いた被検物質の測定法において、被検物質とは、生体物質、合成物質などのあらゆる物質であり、金属微粒子を標識するために用いるものは、被検物質と特異的に結合する物質で、特に抗体、抗原、ホルモン、受容体、レクチン、糖、たんぱく質、核酸などである。

【 0 0 1 3 】

本発明の液体電極プラズマによる金属微粒子を標識物質として用いた被検物質の測定法においては、被検物質を含む試料を特異的結合反応用デバイスに添加する試料添加工程と、被検物質が特異的に結合する第1の物質が固定された担体に被検物質が捕捉される工程と、担体に捕捉された被検査物質に第2の特異的結合反応により金属微粒子が標識される金属微粒子標識工程と、被検物質に標識された金属微粒子をイオン化し液体電極プラズマ元素分析用チップに導入する行程と、液体電極プラズマによりスペクトルを発生させそのシグナル強度を読み取る行程と、読み取られたシグナル強度から被検物質の濃度を換算する濃度換算工程とを有している。10

【 0 0 1 4 】

前記の被検物質が特異的に結合する第1の物質を固定する担体は、マイクロウエルのように試料を添加する際の容器であってもよいし、磁気微粒子、メンブレン、カラムへの充填用材であってもよい。

【 0 0 1 5 】

標識物質である金属微粒子としては、銀コロイド粒子のほか、標識物質として利用される金属微粒子を任意に用いることができる。たとえば金、白金、銅などの微粒子やそれらのコロイド粒子などである。なかでも粒径 20 nm ~ 60 nm の銀コロイド粒子、特に粒径 40 nm 程度の銀コロイド粒子を用いることが好ましい。20

【 0 0 1 6 】**< 第1の実施形態 >**

第1の実施形態では、特異的結合反応デバイスがマイクロウエルであり、特異的結合反応がサンドイッチ型免疫反応である場合の濃度測定法について、図1を参照しながら解説する。

【 0 0 1 7 】

先ず、担体であるマイクロウエルデバイス1内に1次抗体2を固定する。マイクロウエル内部は非特異吸着を防ぐためにブロッキングをする。また、被検物質3の異なる部位を認識する2次抗体4を用意し、これに金属微粒子5として例えば銀ナノ粒子を標識することにより標識抗体を用意しておく。30

【 0 0 1 8 】

次に、未知量の被検物質3を含む溶液をマイクロウエルに供給し、1次抗体2と接触させて免疫反応により被検物質を捕捉する。さらに、金属微粒子の標識2次抗体を含む溶液を供給し被検物質を介して結合することにより、被検物質の濃度に応じた量の金属微粒子がマイクロウエル内に捕捉される。次に、マイクロウエル内に酸化性の溶液を供給して金属微粒子をイオン化し、その金属イオンを含む溶液6を液体電極プラズマ元素分析用のチップ7に導入し、金属イオン濃度を液体電極プラズマ元素分析にて測定する。既知濃度の被検物質の濃度と金属イオン濃度の関係をあらかじめ求めておき、測定された金属イオン濃度の値と比較することにより被検物質の濃度を求めることができる。40

【 0 0 1 9 】

前記酸化性の溶液としては、金属をイオン化できるものであれば何でもよいが、例えば硝酸溶液を用いることができる。金属微粒子の酸化のしやすさを考慮すれば、0.1M~2Mの硝酸水溶液を用いることが好ましい。

【 0 0 2 0 】**< 第2の実施形態 >**

第2の実施形態では、特異的反応デバイスがイムノストリップであり、特異的結合反応がサンドイッチ型免疫反応である場合の濃度測定法を解説する。50

【0021】

先ず、前記1次抗体を固定したイムノストリップを用意する。イムノストリップは非特異吸着を防ぐためにブロッキングをする。また、被検物質の異なる部位を認識する前記2次抗体を用意し、これに金属微粒子として例えば銀ナノ粒子を標識することにより標識抗体を用意しておく。

【0022】

次に、未知量の被検物質を含む溶液と前記金属微粒子の標識2次抗体を含む溶液の混合液をイムノストリップに展開し、免疫反応により金属微粒子の標識2次抗体と特異的に結合した被検物質を捕捉する。その結果、被検物質の濃度に応じた量の金属微粒子がイムノストリップ上に捕捉される。補足部位の金属微粒子を前記第2の実施形態で用いたと同様の酸化性の溶液でイオン化し、その金属イオンを含む溶液の金属濃度を液体電極プラズマ元素分析にて測定する。既知濃度の被検物質の濃度と金属イオン濃度の関係をあらかじめ求めておき、測定された金属イオン濃度の値と比較することにより被検物質の濃度を求めることができる。

10

【0023】

<第3の実施形態>

第3の実施形態では、特異的反応デバイスがカラムチップであり、特異的結合反応がサンドイッチ型免疫反応である場合の濃度測定法について図2をもとに解説する。使用するカラムチップは、試料溶液の移動ができるものであればどのようなものでも良いが、特にマイクロピペットなどに装填して簡単に液の吸い上げや吐き出しのできるものが好ましい。

20

【0024】

先ず、先端部8にあらかじめ前記金属微粒子の標識2次抗体を滴下・乾燥などにより配置しておく。被検物質の1次抗体を固定した担体9をチップ内に充填し、その前後はグラスウール10などを用いて液の流れを妨げず充填担体の核酸を防ぐための栓をする。担体は非特異吸着を防ぐためにブロッキングをする。

30

【0025】

次に、未知量の被検物質を含む溶液をカラムチップ先端Aから吸い上げ、免疫反応により金属微粒子の標識2次抗体と特異的に結合した被検物質をカラムチップ内の担体に捕捉する。その結果、被検物質の濃度に応じた量の金属微粒子がカラムチップ内に捕捉される。次いで、前記第2の実施形態と同様の酸化性の溶液を吸い上げ、補足部位の金属微粒子をイオン化し、その金属イオンを含む溶液の金属濃度を液体電極プラズマ元素分析にて測定する。既知濃度の被検物質の濃度と金属イオン濃度の関係をあらかじめ求めておき、測定された金属イオン濃度の値と比較することにより被検物質の濃度を求めることができる。

40

【0026】

本カラムチップにおいては、前記0013で述べた行程のうち、被検物質を含む試料を特異的結合反応用デバイスに添加する試料添加工程と、被検物質が特異的に結合する第1の物質が固定された担体に被検物質が捕捉される工程と、担体に捕捉された被検物質に第2の特異的結合反応により金属微粒子が標識される金属微粒子標識工程と、被検物質に標識された金属微粒子をイオン化し液体電極プラズマ元素分析用チップに導入する行程までを、カラムチップからの溶液の吸い上げと吐き出しの一連の操作のみで行うことができる。

50

【実施例】**【0027】**

以下に、本発明を実施例に基づいて解説する。

【0028】**実施例1**

図3には、銀コロイド溶液(British Biocell International社製)をそのまま液体電極プラズマ発光分析法にて測定したスペクトルを図3に示

50

す。Aは銀微粒子をイオン化してから測定したもの、Bは銀微粒子をイオンにすることなくそのまま測定したものである。このように、銀微粒子はそのまま測定することが可能であったが、そのシグナル強度は銀イオン溶液に比べて小さかった。

【0029】

実施例2

標識物質を使った被検物質の検出法の例として、マイクロウエルを使ったサンドイッチ型免疫反応を選び、被検物質の例として、ヒト総毛性ゴナドトロピン（hCG）をあげ、解説する。

【0030】

一次抗体の固定

マイクロウエルへhCGの一次抗体（抗-hCGサブユニット抗体）を固定する。50mMのリン酸バッファー+生理食塩水（PBS）中に溶解した100μg/mLの一次抗体50μLをマイクロウエルに入れ、4℃で12時間静置する。その後、ウエルを0.05%のTween20を含むPBSで3回洗浄し、非特異吸着を防ぐために1%のBSAを含むPBS（PBST）100μLをウエルに入れ、4℃で12時間以上静置する。

10

【0031】

二次抗体への銀微粒子の標識

hCGの二次抗体の5mMリン酸バッファー溶液（50μg/mL）100μLを900μLの銀コロイド溶液（British Biocell International社製）に添加し、室温で10分間静置する。その後、非特異吸着を防ぐために、1%のポリエチレングリコールの50mMリン酸バッファー溶液を100μL、さらに10%のBSAを100μL添加する。生成した銀微粒子標識二次抗体は、遠心分離（8000g、15分、4℃）により集める。300μLの保存溶液（1%のBSA、0.1%のNaN₃、150mMのNaClを含む50mMのリン酸バッファー）中に懸濁して、4℃で保存する。

20

【0032】

サンドイッチ型免疫反応

一次抗体を固定したマイクロウエル内をPBSTで3回洗浄し、50μLの試料を供給し室温でゆっくりと震盪した。30分後、ウエル内をPBSTで3回洗浄し、5倍に稀釀した銀微粒子保存液を50μL添加し、室温でゆっくりと震盪した。30分後、ウエルをPBSTで3回洗浄し、ウエル内に一次抗体-被検物質-二次抗体-銀微粒子の複合体を得た。

30

【0033】

銀微粒子量の測定

60μLの0.1M硝酸をマイクロウエル内に供給し、銀微粒子を溶解した後、測定用の石英チップ（Lepricuve-C cuvette）内に導入した。銀イオン量の測定は、MH-5000の超小型元素分析装置で行った。測定条件は、印加電圧が850V、パルス時間が30ms、パルス間隔が270ms、パルス20回で1クール、5クールの累積強度を1測定の強度とした。

40

【0034】

まず、銀微粒子の粒子径が及ぼす影響について検討した。直径が20nm、40nm、60nmの銀微粒子を標識した抗体を用いて、サンドイッチ型免疫反応を実施した。hCGの濃度が1ng/mLの場合で比較した結果、図4に示すように、直径40nmの銀微粒子を標識物質として用いた場合に最も高い強度がえられた。

【0035】

直径40nmの銀微粒子を標識物質に用いて、各種濃度のhCG溶液を試料に免疫反応を実施し、得られたシグナル強度と濃度との相関を示したのが図5である。被検物質の濃度1pg/mLから1ng/mLにかけての対数と、シグナル強度の対数との間に良好な直線性がえられた。また、被検物質の検出限界は1.3pg/mLと算出された。これより、本発明を適用した測定法により、3桁にわたる広い濃度範囲で測定ができ、かつ高感

50

度の測定ができることが示された。

【0036】

実施例3

標識物質を用いた被検物質の測定法の例としてイムノストリップを用いたサンドイッチ型免疫反応を選び、被検物質の例として、ヒト総毛性ゴナドトロピン（hCG）をあげ、解説する。

【0037】

一次抗体の固定

イムノストリップへhCGの一次抗体（抗－サブユニット抗体）を固定する。1mg/mLの一次抗体溶液650μLに、20%のスクロース液（50mMのリン酸バッファー）300μLと100μLの2-プロパノールを加えて混合する。この混合液をディスペンサー（XYZ 3200, Biidot Inc.）に充填し、ニトロセルロースメンブレン上に、ライン状になるように噴霧する。室温で1時間静置して乾燥させた後、非特異吸着を防ぐために0.5%のカゼインを含む50mMのホウ酸溶液にメンブレンを浸し、室温で30分間静置する。その後、0.05%のドデシル硫酸ナトリウムを含むPBSにメンブレンを室温で浸し、洗浄する。30分後メンブレンを引き上げて乾燥させ、メンブレンの片側に吸収パッドを貼付けて、5mm幅の短冊状にカットする。

10

【0038】

サンドイッチ型免疫反応

30μLの試料を容器にとり、実施例2と同様に作成した銀微粒子標識抗体保存液6μLを添加し、良く混合した。混合液にメンブレンの吸収パッドと反対側を浸すと、毛細管現象により混合液がメンブレン上を移動し、吸収パッドに到達した。これに伴って、試料中の被検物質と銀微粒子標識抗体との複合体は、メンブレン上にライン状に固定された一次抗体に補足される。

20

【0039】

銀微粒子量の測定

メンブレンの一次抗体が固定されたライン部分を切り出し、当該部分の銀微粒子を60μLの0.1M硝酸で溶解した。溶解後の溶液は実施例2と同様に測定した。

【0040】

直径40nmの銀微粒子を標識物質に用いて、各種濃度のhCG溶液を試料に免疫反応を実施し、得られたシグナル強度と濃度との相関を示したのが図6である。被検物質の濃度の対数と、シグナル強度の対数との間に良好な直線性がえられた。

30

【0041】

実施例4

標識物質を用いた被検物質の測定法の例としてカラムチップを用いたサンドイッチ型免疫反応を選び、被検物質の例として、ヒト総毛性ゴナドトロピン（hCG）をあげ、解説する。

【0042】

カラムチップの作成

マイクロピペットの管状チップを利用して、図2の構造を有するチップを作成した。先端部分には実施例2と同様に作成した銀微粒子標識抗体溶液を、6μL吸収後乾燥させて固定した。その後グラスワールではさむように実施例3と同様に作成した一次抗体が固定されたニトロセルロースメンブレンを粉碎し充填した。

40

【0043】

サンプル中hCGの測定

前記チップをマイクロピペットに装填し、容器にとった30μLの試料をゆっくり吸い上げた後押し出す。これを2回繰り返した。次いでリン酸バッファー10μLを吸い上げて押し出した。最後に、10μLの1M硝酸で吸い上げ、押し出しを2回繰り返し、さらに最終濃度が0.1M硝酸となるように蒸留水90μLを吸い上げてから、その溶液をそのまま測定用の石英チップへ導入し、実施例2と同様に測定した。

50

【0044】

直径40nmの銀微粒子を標識物質に用いて、各種濃度のhCG溶液を試料に免疫反応を実施し、得られたシグナル強度と濃度との相関を示したのが図7である。被検物質の濃度の対数と、シグナル強度との間に良好な直線性がえられた。

【産業上の利用の可能性】

【0045】

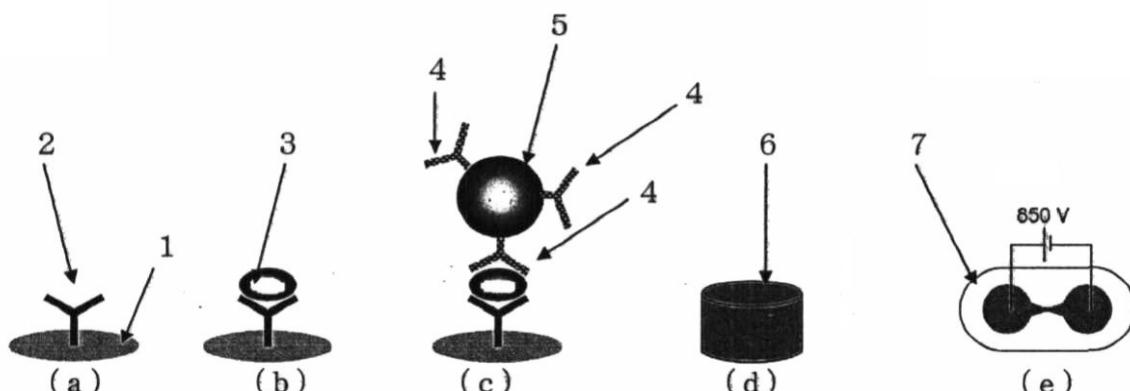
本発明によれば、試料中に含まれている未知量の被検物質濃度を、被検物質と特異的に結合する物質の金属微粒子による標識体を用いて、液体電極プラズマ元素分析法により測定することができる。本法によれば、広い検出範囲を有するため試料の稀釈操作を減らすことができ、高い検出感度を有し、オンラインでの迅速分析が可能である。従って今後、診断や環境計測、食品産業など幅広い分野での各種計測に使用することができる。10

【符号の説明】

1 マイクロウエル、2 1次抗体、3 被検物質、4 2次抗体、5 金属微粒子、6 被検物質の濃度に応じた金属イオンを含む溶液、7 液体電極プラズマ元素分析用チップ、8 標識2次抗体を配置する部位、10 1次抗体固定担体、11栓

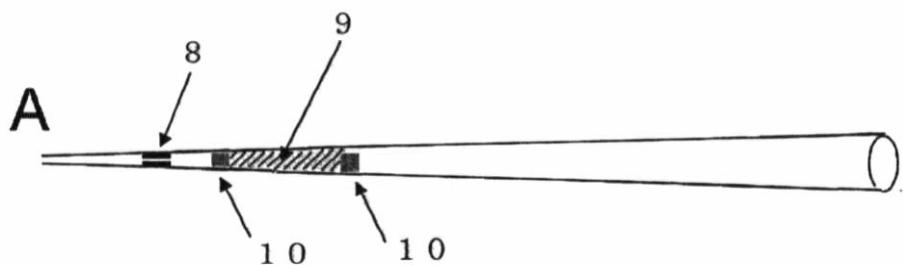
【図1】

図面代用写真(カラー)



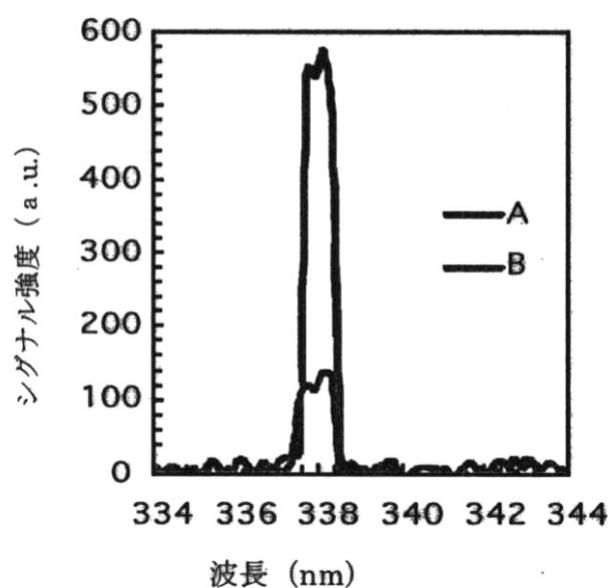
【図2】

図面代用写真(カラー)



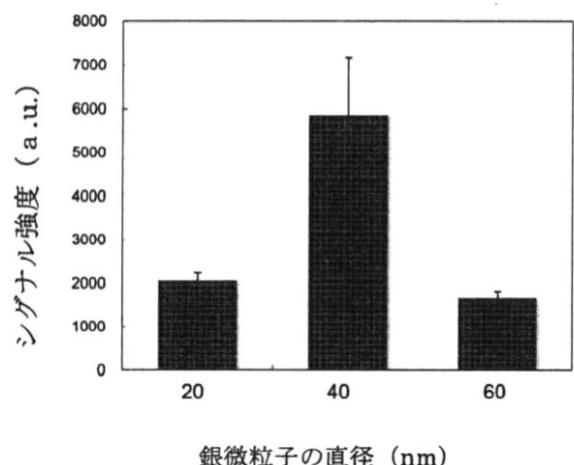
【図3】

図面代用写真(カラー)

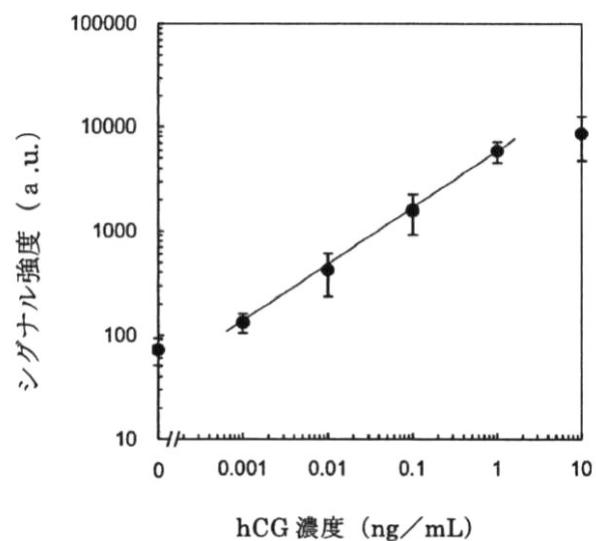


【図4】

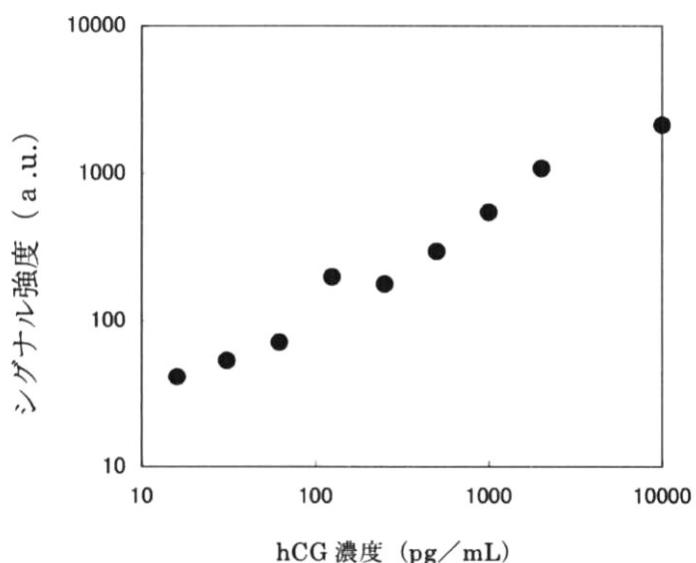
図面代用写真(カラー)



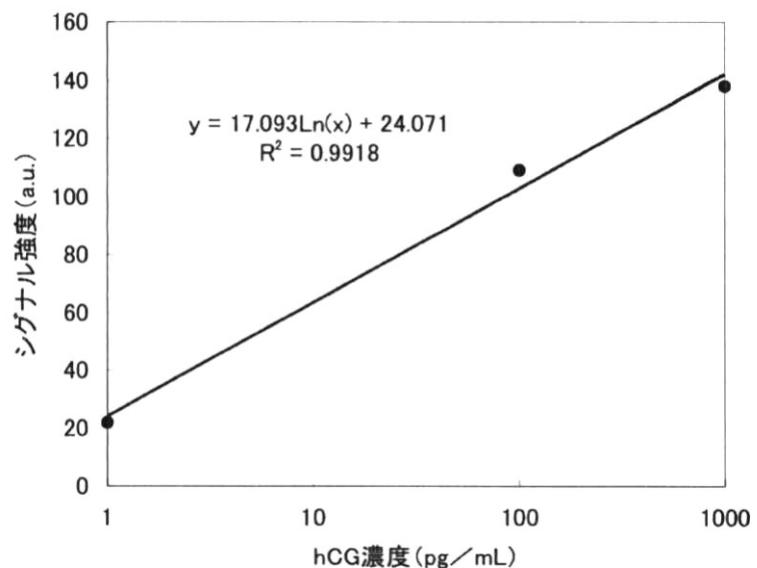
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 ゲエン ホアン トン
石川県能美市旭台1 - 1

(72)発明者 近江 みゆき
石川県能美市緑が丘10 - 154

(72)発明者 山本 保
石川県能美市旭台2丁目13番地 いしかわクリエイトラボ株式会社マイクロエミッション内
Fターム(参考) 2G043 AA01 BA01 BA16 CA04 DA01 DA02 DA05 EA06 KA03 KA05
NA11

专利名称(译)	使用金属标记物质测量测试物质的方法		
公开(公告)号	JP2013101092A	公开(公告)日	2013-05-23
申请号	JP2011256791	申请日	2011-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	高村禅 近江美雪 微型发射		
申请(专利权)人(译)	高村禅 近江美雪 有限公司微发射		
[标]发明人	高村禅 浮田芳昭 グエンホアントン 近江みゆき 山本保		
发明人	高村 禅 浮田 芳昭 グエン ホアントン 近江 みゆき 山本 保		
IPC分类号	G01N21/69 G01N21/71 G01N33/536		
FI分类号	G01N21/69 G01N21/71 G01N33/536.E		
F-Term分类号	2G043/AA01 2G043/BA01 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA01 2G043/DA02 2G043/DA05 2G043 /EA06 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/NA11		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：由于医疗保健和社会的进步，要求测量需要测量不需要稀释，检测灵敏度高和现场快速分析等特征的测试物质的问题需要进行环境测量。解决方案：为了达到上述目的，作为发明人反复研究的结果，在使用金属微粒作为标记物质的免疫测量方法等中，发现具有高灵敏度的现场测量通过使用液体电极等离子体发射光谱法测量与测试物质的量相对应的金属微粒的量来获得测试物质的宽检测范围，所述液体电极等离子体发射光谱法通常仅测量样品溶液中的金属元素的量完成本发明。

図面代用写真(カラー)

