

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4388693号
(P4388693)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 27/416	(2006.01)	GO 1 N 27/46	U
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z
GO 1 N 33/537	(2006.01)	GO 1 N 33/537	
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 A

請求項の数 6 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-529609 (P2000-529609)
 (86) (22) 出願日 平成11年1月23日 (1999.1.23)
 (65) 公表番号 特表2002-502035 (P2002-502035A)
 (43) 公表日 平成14年1月22日 (2002.1.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/DE1999/000197
 (87) 國際公開番号 WO1999/039206
 (87) 國際公開日 平成11年8月5日 (1999.8.5)
 審査請求日 平成17年11月2日 (2005.11.2)
 (31) 優先権主張番号 198 03 528.4
 (32) 優先日 平成10年1月30日 (1998.1.30)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 591215177
 ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエ
 ムペーハー
 ドイツ連邦共和国 68298 マンハイ
 ム, サンドホファーシュトラーセ 116
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (72) 発明者 エッゲル, マルティン
 ドイツ連邦共和国 ディー-82347
 ベルンリエド, ヴァイルハイマー シュト
 ラーセ 7エー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】電気化学発光結合反応テストを利用したサンプルの分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

電気化学発光結合反応方法を利用して液体サンプルを、前記サンプル中に含まれる物質について分析する方法であって、

少なくとも1つの特異的な生化学的結合反応を含み、化学発光標識物質を含む分析の特徴である複合体を形成させ、さらに前記複合体を磁性微粒子に結合させる反応手順を実施し、

標識された微粒子の濃度を測定するための作用電極(4)を備えた測定セル(2)内で検出サイクルを実施する

ことを含んでなり、前記検出サイクルは、

電気化学的な洗浄を行うのに適した強力な酸化電位(C10)を作用電極(4)に印加する洗浄段階(20)、

一連の還元および酸化電位パルス (C01、CR1、C02、CR2等)を作用電極(4)へ交互に印加する調整段階(22)、

微粒子を含むサンプルを作用電極(4)と接触させ、作用電極(4)のサンプルには面していない側に配置されたマグネットの磁界によって微粒子を引き寄せ、サンプルに面する作用電極の堆積表面(4a)に微粒子を堆積させる捕捉段階(23)、および、

作用電極に酸化電位を印加してECL反応を引き起こし、標識物質から発せられた電気化学発光を測定して作用電極(4)の堆積表面(4a)上に堆積した標識物質の濃度を判定する測定段階(21)、

からなる一連の段階を含むものであり、

ここで洗浄段階(20)の強力な酸化電位(C10)の値がそれ以前の測定段階(21)の酸化電位値を超えるものであり、

微粒子の堆積を安定に向上させるために、酸化もしくは還元電位を有する追加の電位パルス(DIP)を検出サイクルの電圧曲線の調整段階(22)と捕捉段階(23)の間に導入し、前記追加の電位パルス(DIP)を、サンプルを作成電極(4)に接触させる t_p 時点より前に、酸化電位でも還元電位でもない中性の電位に戻すことを特徴とする、前記分析方法。

【請求項2】

追加の電位パルス(DIP)に先立って印加される調整段階(22)の最後の電位パルスが、還元電位パルス(CR3)である、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

追加の電位パルス(DIP)が酸化電位パルスである、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

調整段階(22)において、酸化電位パルス(CO1、CO2等)および還元電位パルス(CR1、CR2等)を作成電極(4)へ交互に印加する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

追加の電位パルス(DIP)が、測定段階(21)においてECL反応を引き起こす電位と同じ極性を有し、前記追加の電位パルス(DIP)の最大値がECL反応を引き起こす電位の最大値よりも低い、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

微粒子の堆積を向上させるために、複数の追加の電位パルスを検出サイクルの電圧曲線の調整段階(22)と捕捉段階(23)の間に導入し、最後の追加の電位パルスを、サンプルを作成電極に接触させる前に、酸化電位でも還元電位でもない中性の電位に戻す、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、サンプル中に含まれる物質についてサンプルを分析する方法に関する。

【0002】

通常、液体サンプルの分析とは、液体に含まれる物質(アナライト)の濃度測定に関するものである(定量分析)。場合によっては、サンプル中にアナライトが(閾値以上の濃度で)存在しているかどうかを測定するだけで充分な場合もある(定性分析)。本発明がとりわけ有用である医療上の用途においては、ホルモン、抗体、抗原または薬剤など、そこに含まれるアナライトに関する体液(主として血液、血清および尿)の分析が、重要な役割を担っている。

30

【0003】

本発明は、ある種の分析手順の改良に関するものであり、この分析手順は、電気化学発光結合反応分析と呼ばれることがある(以下、電気化学発光生化学的結合分析(electrochemical luminescence biochemical binding analysis)を略してECL-BBAと表す)。このような方法は、以下の特徴的な特性を備えている。

【0004】

a)分析選択性は、選択性的に相互結合することのみ可能な生化学的物質を使用する特徴的な生化学的結合反応に基づいている。主な例は、抗体と抗原もしくはハプテン間での免疫学的化学結合反応であり、その際抗体は抗原やハプテンと特異的に結合する。その他の生化学的結合反応としては、タンパク質結合、その中でもアビジンとビオチンの結合、レクチン炭水化物結合、受容体とリガンド間の結合および核酸のハイブリダイゼーションがある。

40

【0005】

こうした特徴的な生化学的結合反応は、かなり長い間、分析目的で使用してきた。異なる1つまたは複数の段階からなる反応工程(テストプロトコール)が複数あり、アナライトと、試薬系(結合試薬)に含まれる少なくとも1つの特異的結合物質とが関係することで、

50

最終的に分析の特徴である複合体が形成される。この複合体には通常アナライトが含まれるが、必ずしも含まれていなくてもよい。

【0006】

b)複合体を検出できるようにしてその濃度から分析結果を求めるためには、一般に、試薬系の結合試薬(例えば、抗体)に結合させた標識物質(標識)を使用する。標識物質と結合試薬を含んでいる化学種は、コンジュゲートと呼ばれる。

【0007】

本発明は、標識物質がECL反応を起こすことができる状態に関するものである。標識物質がボルタメーターの電極で適度な電位に曝されると、その標識物質は測光法的に測定可能な光を発する。前駆物質と呼ばれる電気化学的に活性な第2の物質は、一般にこの結合反応に寄与するものである。実際には、ECL標識としては主にルテニウム錯体(ルテニウム-トリス[ビピリジル])が使用され、前駆物質としてTPA(トリプロピルアミン)が併用される。この2つの電気化学的に活性な物質は、電極上で反応し合い、互いに電子を放出して、強力な還元性もしくは酸化性化学種を形成する。その後の酸化還元反応によってECL標識は励起状態となり、フォトンを放出することによって基底状態に戻る。ECL標識反応は好ましくは循環反応であり、そのため電極に電圧をかけると1個の標識分子から複数のフォトンが放出される。

【0008】

c)本発明に関する方法では、分析の特徴であるECL標識複合体分子を、磁性微粒子(ビーズ)に固定する。具体的には、直径が一般に2~3μmの磁化ポリスチロール球が使用される。固定は1組の特異的な生化学的結合パートナーを用いて行う。ストレプトアビシン-ビオチンの対が特に有用であることがわかっている。ストレプトアビシンポリマーでビーズを被覆する。ビオチンは複合体分子に結合させる。

【0009】

標識複合体を結合させたビーズを、測定機器の測定セルに導入する。セルには各電極(通常は作用電極、対電極、特に電位差測定の場合には参照電極)が備えられており、これらの電極は、ECL反応を引き起こすのに要する電界を生成するために必要である。ビーズは、作用電極の下に配置されたマグネットの磁界内にある作用電極の表面に引きつけられる。通常、このような操作はサンプル液体を連続的に流しながら貫流セル(flow-through cell)中で行うため、ビーズの磁力による堆積は「捕捉(capturing)」と呼ばれる。

【0010】

この捕捉段階の後、通常は洗浄段階を行い、作用電極に洗浄液を流して不要な成分を除去する。次いで作用電極にECL反応を引き起こすのに必要な電位を印加し、発生したルミネセンス光を適切な光学検出器を用いて測定する。ルミネセンス光の強度は、作用電極表面における標識ビーズの濃度の判断基準であると共に、サンプル中のアナライトの濃度の判断基準もある。キャリブレーションを行うことで、測定されたルミネセンスシグナルから目的の濃度を計算することができる。

【0011】

この種のECL-BBA方法に関する異なるいくつかのバリエーションについては、議論がなされ、また文献にも記載がなされてきた。こうしたバリエーションは、上記の個々の態様のそれぞれを示していると思われる。

【0012】

態様a)に関しては、テストは、テストプロトコールの違いによって相互に区別されている(例えば、サンドイッチテスト(sandwich test)や競合テスト(competitive test)の場合には、それぞれ異なるいくつかのサブ・バリエーションがある)。根本的な相違点は、形成された複合体分子と複合体化していないコンジュゲートとを分離する必要のない均一テスト(homogeneous tests)と、結合したものと遊離のものを分離する必要がある不均一テスト(heterogeneous tests)との間にある。テストプロトコールが反応順序を含み、その反応順序が少なくとも1つの特異的化学結合反応を含んでなり、分析の特徴であるECL標識で標識された複合体の形成につながるものである限りは、本発明は様々なテストプロ

10

20

30

40

50

トコールに使用することができる。

【0013】

また態様b)に関しては、本発明は汎用とすることができます。すなわち、使用するECL標識やECL反応用の可能な追加成分に依存しない。本発明は、前述のルテニウム錯体とTPAを併用するテスト方法にとりわけ有用であることが判明している。

【0014】

態様c)に関しては、本発明は、分析の特徴である複合体を磁性微粒子に結合させ、その微粒子をマグネットの磁界中に置かれた作用電極の表面に堆積させるといった類のテストのみに関するものである。本発明はまた、態様c)のバリエーションに依らず、例えば、ビーズの素材や大きさを変えたり、ビーズに複合体を固定する方法を変えて使用することもできる。

10

【0015】

このECL-BBA方法に関するさらに詳細な情報は、多くの文献から入手することが可能である。こうした目的のために、特に以下の文献を引用するが、これらの開示はすべて、引用により本明細書に含まれるものとする：

1) G.F. Blackburn et al. "Electrochemiluminescence Detection for Development of Immunoassays and DNA Probe Assays for Clinical Diagnostics", Clin. Chem. 37 (1991), 1534-1539

2) J.K. Leland and M.J. Powell: "Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative-Reduction Type ECL Reaction Sequence using Triprolyl Amine", J. Electrochem. Soc., 137 (1990), 3127-3131

20

3) J.H. Kenten et al. : "Improved Electrochemiluminescent Label for DNA Probe Assays: Rapid Quantitative Assays of HIV-1 Polymerase Chain Reaction Products", Clin. Chem. 38 (1992), 873-879

4) N.R. Hoyle: "The Application of Electrochemiluminescence to Immunoassay-based Analyte Measurement" in "Bioluminescence and Chemiluminescence"; Proceedings of the 8th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Cambridge, September 1994, A.K. Campbell et al. (edit.), John Wiley & Sons

5) WO89/10551

6) WO90/11511

30

先に述べたように、ECL光の測定は、通常、貫流測定セル中で行なわれる。このセルは、サンプル液体用の狭い流路を含んでなり、流路を規定する壁の1つに作用電極が取り付けられている。同じ測定セルを用いて異なるサンプルを連続して測定することを可能にするために、セル(特に、作用電極)を、測定と測定の間に洗浄し、そこに堆積したビーズや他の不純物を取り除かなければならない。分析器としての高い処理量や、精度の高い分析を保証するため、この洗浄工程は迅速かつ効率よく行なわなければならない。

【0016】

従って洗浄は、物理的に行なうばかりでなく(気泡を通過させる)、化学的にも行う(特に洗剤を含有する洗浄液を通過させる)。また、強力な酸化および/または還元電位を作用電極へ印加して、電気化学的な洗浄を行ってよい。この電位は、通常、作用電極の表面に気泡が形成されるよう十分に高くする。これにより洗浄工程が効果的に維持される。しかしながら、洗浄段階の後は、電極表面の電気化学的平衡が著しく乱されているため、調整段階を実施し、作用電極に使用されている電極素材の作用電位の範囲全体をカバーするだけの一定のパルスを流す必要がある。

40

【0017】

このように、洗浄段階、調整段階、捕捉段階、測定段階からなる一連の検出サイクルをセル内で実施する。洗浄段階および調整段階の際には、洗浄液および調整液をそれぞれセル中へ導入する。ビーズを含有するサンプル液は、捕捉段階の開始時にのみ貫流測定セル内に導入する。不均一テストでは、捕捉段階と測定段階の間に、追加の洗浄段階がある。検出サイクルについては、参考文献の1~6、特にWO89/10551に詳細に記載されている。

50

【0018】

ECL-BBA方法は、生化学的結合パートナーとの特異的な結合に基づく他の分析方法と比較すると、対応する分析器を利用した場合、操作が容易である点、感度が高い点、測定可能な濃度の範囲が極めて広い点、経済的な分析である点、および自動化の可能性が高い点などの理由から傑出した方法である。

【0019】

上記の種類のECL-BBA方法の分析精度をさらに高めるためには、本発明によれば、酸化および／または還元電位を有する追加の電位パルスを、検出サイクルの電圧曲線の調整段階と捕捉段階の間に導入し、微粒子の堆積を向上させる。その際、追加の電位パルスを、作用電極がサンプルに触れる前の(酸化または還元のいずれでもない)中性の電位に戻す。

10

【0020】

分析の質が、検出サイクル時に作用電極に印加される電圧曲線に依存している点については、WO89/10511(参考文献5)で議論されている。この参考文献によれば、分析結果の再現性を向上させるためには、「操作前電位 (preoperative potential)」と呼ばれる一定の電位値を調整段階の完了時に印加しなければならない。この操作前電位は、作用電極をサンプル液体と接触させてECL測定を行うまで、一定に維持しなければならない。作用電極の素材と使用される電解質に応じて、酸化電位または還元電位のいずれかにすべきである。

【0021】

本発明では、参考文献5の教示とは対照的に、追加の電位パルスを検出サイクルの電圧曲線に導入すれば、作用電極の表面にビーズを堆積させることに関する実質的な改良と、それによる分析の再現性や精度に関する改良を成し得ることが判明した。このパルスが一方では酸化もしくは還元電位値に到達し、他方ではサンプルを測定セルへ導入して作用電極と接触させる前の(酸化または還元のいずれでもない)中性の電位に戻されるという点が重要である。

20

【0022】

WO89/10551に記載されている操作前電位はECLシグナルの発生に関するサンプル成分に作用することを意図したものであるが、本発明では、電極に追加の電気化学的前処理を施すことにより実質的な改良を達成する。従来、ビーズの分布は磁界の特性に依るものであるのに対し、電気化学的な調整および洗浄処置はシグナル発生の向上に役立つと考えられていたため、本発明で講じた改良がビーズの堆積の向上につながるという事実は予想外のことである。

30

【0023】

本発明で使用される電位パルスとは、作用電極に印加される電圧の一過性の変化のことであり、パルスが発生している間は酸化もしくは還元電位値が達成されるが、電位パルスの前後では電位は中性の範囲にある。電位曲線は、詳細には様々な形をとることができる。電位曲線が、特定の幾何学的な形状(長方形、三角形、もしくはステップ関数など)を示す必要は特にならない。

【0024】

酸化電位は、調整液に接触している作用電極の表面が酸化された際の作用電極の電位である。電位は、調整液と接触している作用電極の金属表面が電気化学的に還元されると還元電位となる。清浄な金属表面上に酸化層や水素化物層が形成されない場合の電位は中性である。この状態は、対応する金属の電気二重層領域とも呼ばれる。

40

【0025】

こうした電位値は、作用電極の素材、電位の基準となる参照電極、および(やや程度は低くなるものの)調整液の組成などに依るものであるため、追加パルスの最大電位値やこの電位が戻るべき値に対しては一般に妥当な数値というものは存在しない。当業者であれば、この点に関して、刊行されているデータ、特に電極に使用される素材のサイクロボルタモグラム(cyclovoltamograms)からより詳細な情報を得ることができるであろう。いずれにしても、酸化、還元もしくは中性の電位値は実験により決定することができる。

50

【0026】

以下、図面に概略を示した実施形態について、本発明をより詳細に説明する。

【0027】

図1の検出ユニット(1)は、自動的に検出サイクルを実施する分析器の一部を構成するものである。また、こうした分析器は、ECL標識で標識された複合体の形成(その濃度が分析の特徴となる)を導き、その複合体を磁性微粒子に結合させる反応順序を実施するためのユニットを備えている。これらの構成要素については図1には示していない。

【0028】

検出ユニット(1)の中心は、電気化学的な貫流セル(2)であり、このセル内には、作用電極(4)と対電極(5)が、狭い貫流チャネル(3)を通過する液体に接触するように前記貫流チャネルに配置されている。対電極(5)は、図からもわかるように、好ましくは作用電極(4)と差し向かいに配置する(即ち、貫流チャネル(3)を挟んだ向い側)。参照電極(7)は、通常検出ユニット(1)の液体導管(その全体を8で表す)に配置し、貫流チャネル(3)の外側に置く。液体の吸引には精密な往復ポンプ(9)を通常使用し、貫流セルの下流側の液体導管(8)に設置する。

10

【0029】

複数の液体容器を貫流セル(2)の上流側の導管(8)に連結し、そこから液体を、例えば、多方向(multiple way)バルブ(10)によって制御しながら貫流セル(2)へ選択的に吸引させることができる。例示では、洗浄液を貯留する容器(12)、調整液を貯留する容器(13)、およびサンプル液を貯留する容器(14)がある。サンプル液容器(14)は、通常、試験管(反応管)として構成されており、プロセッシングローター(15)内に配置する。また、このプロセッシングローター内では、結合反応を行うのに必要な段階を実施する。ここでは理解しやすいように、複数の反応管のうちの1つだけをプロセッシングローター(15)内に配置した様子を示している。

20

【0030】

マグネット(17)は、貫流測定セル(2)内で作用電極(4)の貫流チャネル(3)には面していない側に配置する。例示では永久磁石を使用しており、可動機構(18)の作用によって、捕捉位置(少なくとも磁極片の1つが作用電極(4)に可能な限り接近している)から、作用電極(4)から離れた中立の位置へ動かすことができる。スイッチを入れたり切ったりできる電磁石を代わりに使用することも可能である。

30

【0031】

光検出器(19)としては光電子増倍管を使用し、貫流チャネル(3)の捕捉表面(4a)と向かい合う側に、作用電極(4)の貫通チャネル(3)に面する(マグネット(17)には面していない)捕捉表面(4a)に対して光電子増倍管の感光表面が並行になるように配置する。

【0032】

検出ユニット(1)の構成要素は電子ユニット(16)に接続している。電子ユニットは、これらの機器を制御したり、光検出器(19)からのシグナルを処理したりするためのものである(接続ケーブルについては一部だけを示す)。

【0033】

検出サイクルにおける個々の処理段階時に作用電極(4)に印加する電位の時間依存性(各々、作用電極に接触している液体および参照電極を基準とする)が特定の特徴を有することは、検出ユニット(1)の機能にとって重要なことである。これについて、図2に示す電位曲線のグラフに基づいて、より詳細に述べることにする。図2は、白金作用電極を用いる実施形態に関するものである。縦座標の電圧値UはAg/AgCl参照電極を基準として測定し、時間tに対して秒単位でプロットする。検出サイクルは、各分析ごとに同様に繰返す。以下、洗浄段階から説明を始める。

40

【0034】

洗浄段階(20)は、作用電極(4)の堆積表面(4a)に付着したビーズやその他の不純物を取り除いたり、もしくは電極表面を取りかえるために、毎回、その前に行なった測定に続けて実施する。それぞれ強力な酸化および/または還元電位であるClOもしくはClRを、洗浄工程

50

を電気化学的に補助するために印加する。その電位値は、一般に、検出サイクルにおける他のあらゆる電位よりも高い(酸化電位、還元電位の双方とも)。図からも明らかなように、酸化電位C10については、その値がそれ以前の測定段階(21)における同様の酸化電位値を超えていことが望ましい。例示のように、洗浄段階には、2つの低い還元電位CIR1およびCIR2が含まれているが、これは必須ではない。本発明は、洗浄段階時に酸化もしくは還元電位を作用電極に印加する検出サイクルの全てに適しているが、この電位はきわめて高いため、後続の調整段階時に電気化学的平衡を再度確立する必要がある。洗浄段階時全般において、ポンプ(9)は、容器(12)から導管(8)を通じて、また貫流チャネル(3)を通じて洗浄液を供給する。

【0035】

10

続く調整段階(22)は、洗浄段階(20)後の電極表面に、必要とされる電気化学的平衡を再び確立するのに役立つ。このためには、一連の酸化および還元電位パルスC01、CR1、C02、CR2、C03およびCR3を図2に示すように交互に作用電極に印加する。

【0036】

こうした一連の調整パルスは、図示したように、好ましくは酸化および還元パルスを交互に印加することからなり、酸化および還元パルスの総数が等しいことが特に好ましい。各調整パルスの持続時間は、実際には1秒未満である。0.7秒未満かつ0.1秒を超える値が好ましく、約0.3秒～約0.5秒の範囲が特に有用であることが判明している。

【0037】

20

本発明の特徴は、図2における「堆積向上パルス(deposition improvement pulse)」すなわちDIPのように、検出サイクルの電圧曲線に追加の電位パルスを導入することである。この追加の電位パルスは、調整段階(22)の後かつ、図2中 t_p で表わした時点より前に導入する。時点 t_p では、サンプルを容器(14)から吸出し、バルブ(10)を経由して貫流チャネル(3)へ送る(その結果、サンプル液に含まれているビーズは、作用電極(4)に接触するようになる)。この追加のパルスは、きわめて短い持続時間中に(好ましくは少なくとも約0.05秒、特に好ましくは少なくとも0.1秒)酸化もしくは還元電位値を達成できるほど高いものであるが、電極表面に電気化学的に影響を及ぼすものではない。電位が t_p の時点より前に(酸化電位でも還元電位でもない)中性の電位に戻ることはさらに重要である。図示した酸化DIPの例は、その前の調整段階(22)の還元電位パルスCRに続くものであり、特に好ましい。

30

【0038】

本発明の観点では、DIPのおかげで電極表面が捕捉段階に最適な状態に準備されることが判明した。同時に、電極表面はビーズの性質に適したものとなる(例えば、表面の特性、ゼータ電位、粘着性など)。DIPを実験によって最適化すれば、ECL検出手順の要件に最もよく合うように堆積パターンを調整することが可能である。

【0039】

マグネット(17)は、時点 t_p では図1に示す捕捉位置にいる。サンプル液と共に貫通チャネル(3)を流れる微粒子は、磁界に引きつけられて作用電極の表面に堆積する。捕捉段階(23)およびそれに続く洗浄段階(24)では、作用電極電位は、図示したように、中性の範囲にいるのが好ましい。従来の方法では、作用電極は、通常これらの段階ではポテンシオスタットから切り離されているため、電位が一定ではない。WO89/10551によれば、検出サイクルのこうした段階では、記載されているように「操作前電位」、すなわち一定の酸化もしくは還元電位を作用電極(4)に印加しなければならない。

40

【0040】

作用電極の電位を除けば、捕捉段階(23)、洗浄段階(24)およびそれに続く測定段階(21)は常法で実施する。多方向バルブ(10)は t_w の時点でスイッチが入るため、サンプル液の代わりに、洗浄液としても同時に作用する調整液を、結合したものと遊離のものとを分離するために容器(13)から導管(8)へ吸引する。

【0041】

追加の電位パルスDIPを1つ導入する代わりに、複数の追加の電位パルスを、検出サイク

50

ルの電圧曲線の調整段階(22)と捕捉段階(23)の間に導入することもできる。その場合、DIPはすべて、酸化電位もしくは還元電位のいずれかであることが好ましい。1つのDIPもしくは複数のDIPが酸化もしくは還元領域に維持される持続時間の合計は、各検出サイクルごとに少なくとも0.05秒、好ましくは少なくとも0.1秒であり、かつ最大で1秒、好ましくは最大で0.3秒である。

【0042】

図3は、白金電極の循環ボルタモグラム(cyclic voltamogram)を示している。通常、こうした種類の測定は、参照電極を基準として、白金電極に印加する電位を三角形を描くように変化させることによって行い、図のような電流／電圧曲線が得られる。この循環ボルタモグラムは、白金電極を1Mの硫酸溶液に接触させた際の測定結果を示している。横座標の電圧値は標準水素電極を基準としている。mA/cm²で表した電流Iを縦座標に示す。

10

【0043】

A点から出発して矢印の方向へ向かって電流電圧依存性を追うと、電位は当初、ほとんど測定不可能な電流がわずかに流れる領域に存在し、電気二重層の帶電に関与する。この領域は、英語で言うところの「電気二重層領域(double-layer region)」のことである。電流は曲線領域Bで急激に増加する。ここでは、本発明で使用される酸化電位値に到達する。すなわち、白金表面が電気化学的に酸化される。曲線下面積は、酸化に要した電荷の量に相当している。

【0044】

最大値(ここでは約1.5V)に達した後、電極に印加する電圧を下げるとき、最初、電流は少ないが、その後酸化層が除去された領域(曲線領域C)で再び増加する。酸化層の除去が完了した後では、電流は再び減少して電気二重層領域ではゼロ近くまで落ち込み、白金の還元が起こる電圧値に達するまでこの状態が続く(白金はそれまでに実質的に純粋な状態になる)。曲線領域Dにおける値の上昇は、本発明で言うところの還元電位値を示している。酸化電位と還元電位の間の電圧領域は、中性領域Nとして表す。約0.1Vで電位が再び反転した後、曲線領域Eにおいて白金表面の還元層が除去される。

20

【0045】

実施例

Boehringer Mannheim GmbH社製のElecsys 2010装置を使用して比較テストを実施し、DIPを追加した場合としない場合の結果を比較した。検出サイクルは図2のとおりである。DIPを追加した実験には、パルス高+0.9Vかつパルス持続時間0.2秒の長方形の追加酸化パルスを導入した。PSAテスト(PSA=前立腺特異抗原(prostrate specific antigen))に対して、DIPなしでは以下のようないずれかが得られた。

30

【0046】

【表1】

No.	Conc.	N	MW	VK
	ng/ml			%
1	0.00	11	1020.94	2.66
2	0.75	4	4957.80	2.00
3	2.97	2	16698.81	1.75
4	16.20	2	84445.07	2.10
5	75.10	2	398381.77	0.99
6	142.00	2	741512.39	1.62

40

50

一方、DIPを追加すると以下のような値が得られた。

【0047】

【表2】

No.	Conc.	N	MW	VK	
	ng/ml			%	
1	0.00	11	1045.33	1.12	10
2	0.75	4	5874.34	0.63	
3	2.97	2	2093.29	1.06	
4	16.20	2	107626.88	1.26	
5	75.10	2	497223.62	0.09	
6	142.00	2	950228.61	0.26	

【0048】

表中、縦の欄の表題を次のように定義する。Conc. : 使用したキャリブレーションサンプルの公称濃度、N : 実施した測定の数、MW : 任意単位で表した測定シグナルの平均値、VK : シグナルの変動係数(%)。 20

【0049】

DIPがシグナルの動力学(最大MW値と最小MW値の比率)に実質的な向上をもたらすことがわかる。DIPを導入すると値は909となり、これはDIPを用いなかった場合(726)に比べて約25%も高い値である。さらに、変動係数VKの大きさを考慮すると、精度も実質的に改善されている。

【0050】

分析サイクル時に、目視観察やビデオレコーダーを使用して、ビーズが実質的に安定に堆積するかどうかを判定した。DIPなしでは、ビーズは洗浄段階で移動した。これでは、特にそれまでに作用電極に堆積しているビーズが失われてしまう可能性があるため、測定の精度の点では不都合である。 30

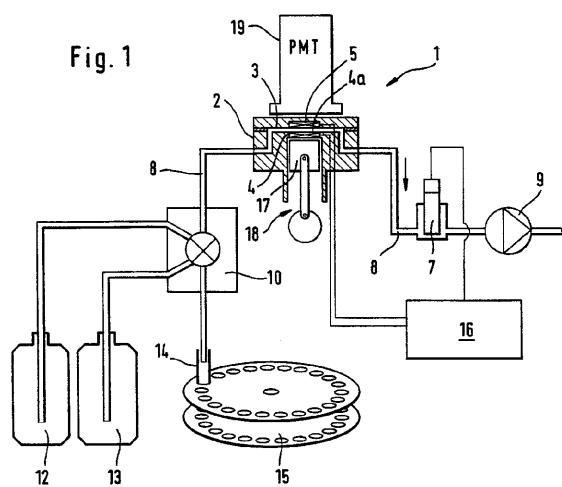
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ECL-BBA分析器の検出ユニットの概略を示すものである。

【図2】 図2は、検出サイクルにおいて作用電極に印加される電位の時間依存性をグラフに示したものである。

【図3】 図3は、白金電極のサイクロボルタモグラムを示すものである。

【図1】



【図2】

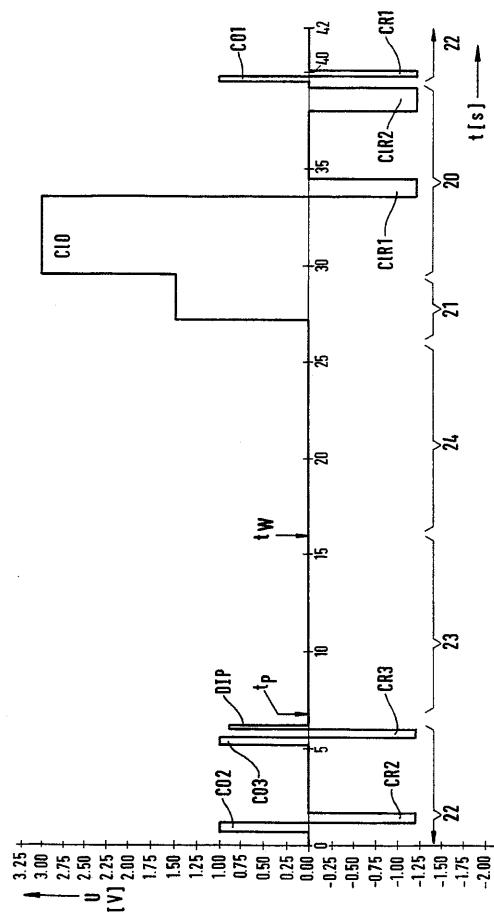


Fig. 2

【図3】

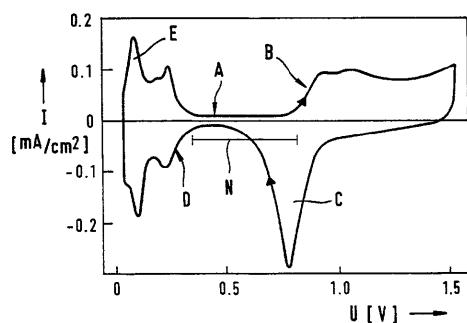


Fig. 3

フロントページの続き

(72)発明者 プンツマン , ガブリエル
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 1 5 4 7 ミュンヘン , ゴッツベルトシュトラーセ 8 / 1 0

(72)発明者 ミューラー , グンター
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 8 0 バイセンベルグ , ファラー - シュナイダー - ヴェグ 1
7

(72)発明者 パウセリウス - フッフス , ユルスラ
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 1 9 スターンベルグ , カイサー - ヴィルヘルム - シュトラー
セ 5 シー

審査官 柏木 一浩

(56)参考文献 特開平07-209189 (JP, A)
特表平03-503451 (JP, A)
特表平06-508203 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 27/416
G01N 33/53
G01N 33/537
G01N 33/543