

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4045314号
(P4045314)

(45) 発行日 平成20年2月13日(2008.2.13)

(24) 登録日 平成19年11月30日(2007.11.30)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)
 GO 1 N 33/543 5 8 1 F
 GO 1 N 33/543 5 8 1 C
 GO 1 N 33/543 5 8 1 Z

請求項の数 9 (全 21 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-362964 (22) 出願日 平成9年12月12日(1997.12.12) (65) 公開番号 特開平10-227794 (43) 公開日 平成10年8月25日(1998.8.25) 審査請求日 平成16年12月13日(2004.12.13) (31) 優先権主張番号 特願平8-352691 (32) 優先日 平成8年12月12日(1996.12.12) (33) 優先権主張国 日本国(JP)</p>	<p>(73) 特許権者 000131474 株式会社シノテスト 東京都千代田区神田神保町一丁目56番地 (72) 発明者 内藤 正宏 神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト相模原事業所内 (72) 発明者 天田 武志 神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト相模原事業所内 審査官 宮澤 浩</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 粒子を使用する被検物質の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の被検物質に対する特異的結合物質が固定されて該特異的結合物質により部分的に被覆された面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体の該面に試料を接触させる工程、前記面に接触させた試料を前記面の特異的結合物質により被覆されている部分の上を移動するように除去する工程、被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子を試料を除去した前記面に接触させる工程、及び前記粒子を前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる工程を含んでなり、前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分における粒子の分布状態から被検物質の有無を判定することを特徴とする、試料中の被検物質の測定方法。

【請求項2】

試料中の被検物質に対する特異的結合物質が固定されて該特異的結合物質により部分的に被覆された面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体の該面に、被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子及び試料を混合した後の混合物を接触させる工程、前記面に接触させた粒子及び試料の混合物を前記面の特異的結合物質により被覆されている部分の上を移動するように除去する工程、更に被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と

同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子を前記面に接触させる工程、及び前記粒子を前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる工程を含んでなり、前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分における粒子の分布状態から被検物質の有無を判定することを特徴とする、試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 3】

担体が平底面を有する凹部を少なくとも一つ備えた容器であって、該平底面が特異的結合物質により部分的に被覆されている、請求項 1 又は 2 に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 4】

担体が板状体であって、その表面が特異的結合物質により部分的に被覆されている、請求項 1 又は 2 に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 5】

前記被検物質が抗原であり、前記特異的結合物質が抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 6】

前記被検物質が抗体であり、前記特異的結合物質が抗原又は前記抗体に対する抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 7】

吸水性材料よりなる試料吸収体を前記面に接触させた試料に接触させて該試料を除去する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 8】

磁石を作用させることにより前記粒子を前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 9】

担体を傾けることにより前記粒子を前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試料中の被検物質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、被検物質に対する特異的結合物質を固定した粒子を用いて試料中の被検物質を測定する方法に関し、特に血液試料等の試料中に含まれる微量の被検物質までも妨害物質の影響を受けずに短時間且つ簡便に測定を行うことが可能な被検物質の測定方法に関する。

本発明は、臨床検査分野等の生命科学分野において有用である。

【0002】

【従来の技術】

抗原と抗体、糖とレクチン、ヌクレオチド鎖とそれに相補的なヌクレオチド鎖、リガンドとレセプター等の特異的な親和性を有する物質間の反応を利用した試料中に含まれる微量の被検物質の測定方法は種々のものが知られている。

【0003】

中でも、抗原と抗体の間の抗原抗体反応（免疫反応）を利用した免疫学的測定方法は広く実施されている。この免疫学的測定方法のうち間接凝集反応測定法は簡易かつ安価な方法であることから汎用されている。

【0004】

この間接凝集反応測定法は、被検物質に対する抗体（被検物質が抗体の場合は抗原を使用することも可能）を結合した粒子（ラテックス粒子若しくはゼラチン粒子等の高分子粒子又は赤血球等）と被検物質を含むと推定される試料を、マイクロタイタープレート等の底

10

20

30

40

50

面がU字状又はV字状になった測定容器内で混合し、反応させて、生じた被検物質を介した粒子間の凝集像を観察することにより、試料中の被検物質の存在の有無を判定するものである。

【0005】

図6は、この間接凝集反応測定法により試料中の被検物質の測定を行なった場合の凝集像を示したものである。試料中に被検物質が存在しない（陰性）場合、抗体（又は抗原）を結合した粒子は凝集を起こさないので重力によりそのまま沈降し、U字状又はV字状等の測定容器の内壁面に沿って転がり落ちて（滑り落ちて）測定容器の底面中央部に集まる。従って、陰性の場合、測定容器の上方から見ると、測定容器の底面中央部に粒子が収束した像が観察される（図6のA）。

10

一方、試料中に被検物質が存在する（陽性）場合、抗体（又は抗原）が結合した粒子は被検物質を介して三次元的な凝集を起こして凝集塊を生成する。この凝集塊は、凝集を起こしていない粒子に比べると測定容器の内壁面上を転がり難く（滑り落ち難く）、転がり速度（滑り落ち速度）が小さいので、測定容器の内壁面に広がった状態で止まる。従って、陽性の場合、測定容器の上方から見ると、粒子が測定容器底面に広がった状態、即ち「ボタン」状の凝集像が観察でき（図6のB）、試料中に被検物質が存在することが確認できる。

【0006】

しかしながら、この間接凝集反応測定法は、試料中の被検物質の存在の有無、つまり陽性又は陰性かを測定容器底面の粒子による円形の像の大小によって判定するものである。

20

したがって、被検物質の濃度が低い試料の場合、測定容器底面中央部には被検物質を介して凝集した粒子と被検物質とは結合していない粒子の両方が混在していて、且つ凝集像の円が小さいので、陰性の場合との判別が困難であった。

そして、この被検物質の濃度が低い試料の場合の判定の困難さゆえ、低濃度の被検物質を測定することができず、また時間をかけて凝集像を十分形成させてから判定しようとするため測定に要する時間が長くなり、通常測定時間は1時間以上であった。

【0007】

また、間接凝集反応測定法では、被検物質以外の試料中の成分を介して、抗体（又は抗原）を結合した粒子が凝集したり、或いは抗体（又は抗原）を結合した粒子が測定容器の内壁面に結合して、試料中に被検物質が存在しない（陰性）にもかかわらずあたかも被検物質が存在する（陽性）ような凝集像を示す場合があった（非特異的凝集反応）。このように陰性の試料を陽性と誤って判定する可能性があるということは、臨床検査による疾病の診断においては重大な問題となっていた。

30

【0008】

これに対し、特開昭64-69954号公報には、検体試料中の被検物質である抗原又は抗体に対応する抗体又は抗原を内壁に固定させた測定容器に検体試料を加え、同時に又は次いでこの検体試料を洗浄することなく測定容器に固定させたものと同じの抗体又は抗原或いは特異的結合の類縁体を固定させた不溶性担体粒子を測定容器に加え、発現する凝集反応の有無により検体試料中の被検物質である抗原又は抗体の有無を判定する免疫学的測定方法が開示されている。この測定方法において検体試料中に被検物質である抗原（又は抗体）が存在しない（陰性）場合の測定容器内の状態を上方から見ると、図6のAに示した凝集像と同様の像が観察される。また、検体試料中に被検物質である抗原（又は抗体）が存在する（陽性）場合に測定容器内の状態を上方から見ると、図6のBに示した凝集像と同様の像が観察される。

40

【0009】

上記特開昭64-69954号公報に記載の測定方法は、低濃度の被検物質を測定することができ、地帯現象を抑制でき、かつ短時間で明瞭な凝集像が得られる方法であるが、試料中の被検物質の存在の有無を測定容器底面の粒子による円形の像の大小によって判定するものであるので、被検物質の濃度が著しく低い試料の場合には陰性の場合との判別が困難であるとの問題は避け得ないものであった。

50

【 0 0 1 0 】

また、特開平2-124464号公報には、被測定物質（被検物質）に特異的に結合するか又はこれと競合する物質（抗体又は抗原等）を磁性粒子に固定化した磁性マーカー粒子とサンプル溶液（試料）とを混合し、この反応溶液に対し測定容器の所定の壁面領域の外側に配置した磁石を作用させ、これにより所定の壁面領域に集められた磁性マーカー粒子の分布状態に基づいてサンプル中の被測定物質を測定する免疫学的測定方法が開示されている。この測定方法においてサンプル中に被測定物質が存在しない（陰性）場合に測定容器内の状態を上方から見ると、図6のAに示した凝集像と同様の像が観察され、サンプル中に被測定物質が存在する（陽性）場合に測定容器内の状態を上方から見ると図6のBに示した凝集像と同様の像が観察される。

10

【 0 0 1 1 】

この特開平2-124464号公報に記載の測定方法によれば、磁性粒子を磁石により測定容器底面に引き寄せて磁性粒子の沈降速度を増大させることにより、測定容器底面の凝集像の形成を短時間で行わせ、判定に要する時間を短縮することができる。しかし、やはり試料中の被検物質の存在の有無を測定容器底面の粒子による円形の像の大小によって判定するものであるため、被検物質の濃度が低い試料の場合には陰性の場合との判別が困難であるとの点では変わりのないものであった。

【 0 0 1 2 】

また、従来の間接凝集反応測定法、特開昭64-69954号公報に記載の測定方法及び特開平2-124464号公報に記載の測定方法は、いずれも試料中の被検物質の存在の有無を測定容器底面の粒子による円形の像の大小によって判定するものであるため、試料が血液（全血試料）である場合、血液試料中の赤血球も粒子と共に重力により測定容器の内壁上を転がり落ちて（滑り落ちて）しまい、その血液試料中の被検物質の測定を行なうと、粒子の分布状態がその試料中に含まれる赤血球により遮られて確認できず、陽性、陰性の判定が困難になるという問題が存在した。

20

【 0 0 1 3 】

【 発明が解決しようとする課題 】

従って、本発明の課題は、特異的結合反応を利用して試料中の被検物質を目視又は機器を用いて測定する際に、赤血球などの判定を妨げる物質を含む血液試料や糞便等の試料においても、被検物質の存在の有無の判定を妨害を受けることなく短時間に行うことが可能であり、しかもその判定の信頼性が高い測定方法を提供することである。

30

【 0 0 1 4 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明は、試料中の被検物質に対する特異的結合物質が固定されて該特異的結合物質により部分的に被覆された面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体の該面に試料を接触させる工程、前記面に接触させた試料を前記面の特異的結合物質により被覆されている部分の上を移動するように除去する工程、被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子を試料を除去した前記面に接触させる工程、及び前記粒子を前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる工程を含んでなり、前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分における粒子の分布状態から被検物質の有無を判定することを特徴とする、試料中の被検物質の測定方法（第1の測定方法）である。

40

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、試料中の被検物質に対する特異的結合物質が固定されて該特異的結合物質により部分的に被覆された面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体の該面に、被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子及び試料を混合した後の混合物を接触させる工程、前記面に接触させた粒子及び試料の混合物を前記面の特異的結合物質により被覆されている部分の上を移動するよ

50

うに除去する工程、更に被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子を前記面に接触させる工程、及び前記粒子を前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる工程を含んでなり、前記面の特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分における粒子の分布状態から被検物質の有無を判定することを特徴とする、試料中の被検物質の測定方法（第2の測定方法）である。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明において測定を行う被検物質としては、タンパク質、糖質、脂質、核酸のような有機物質、無機物質等の生体関連物質であればいずれのものでよい。具体的には、HBs抗原、抗HBs抗体、HBe抗原、抗HBe抗体、抗HBc抗体、抗HCV抗体、抗HIV抗体、抗ATLV抗体等のウイルス関連の抗原又は抗体；大腸菌O157抗原、抗トレポネマ・パリダム（TP）抗体、抗マイコプラズマ抗体、抗ストレプトリジンO抗体（ASO）等の細菌関連の抗原又は抗体；免疫グロブリンG（IgG）、免疫グロブリンA（IgA）、免疫グロブリンM（IgM）、若しくは免疫グロブリンE（IgE）等の免疫グロブリン；C反応性タンパク質（CRP）、 α -1-酸性糖タンパク質、ハプトグロビン、補体C3、補体C4、リウマトイド因子等の炎症マーカー； α -フェトプロテイン、CEA、CA19-9等の腫瘍マーカー；ヒト胎盤絨毛性ゴナドトロピン等のホルモン；アレルゲン、アレルゲン特異IgE抗体等のアレルギー関連の抗原又は抗体；抗トロンピンIII（ATIII）等の血液凝固系関連物質；フィブリン体分解物（FDP）、Dダイマー等の線溶系関連物質；ABO式血液型抗体、不規則抗体等の血液型関連の抗原又は抗体；ウイルスのDNA又はRNA；細菌のDNA又はRNA；ヒト等の動物若しくは植物のDNA又はRNA；リポタンパク質（a）等の他の疾病に関連した物質又は薬物等を例示することができる。

【0017】

本発明において、試料とは、前記の被検物質が存在する可能性があり、且つその被検物質の存在の有無の確認又は場合によっては定量を行おうとする液状のものをいう。

例えば、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、精液、髄液、唾液、汗、涙、腹水、羊水等の体液；ヒト若しくは動物の脳等の臓器、毛髪、皮膚、爪、筋肉、又は神経組織等の抽出液；ヒト又は動物の糞便の抽出液又は懸濁液；細胞或いは菌体の抽出液；植物の抽出液等が挙げられる。

【0018】

本発明において、被検物質に対する特異的結合物質（以下、単に特異的結合物質という。）とは被検物質に対し親和性を有する物質をいい、被検物質との特異的な相互作用により該被検物質に非共有結合的に安定に結合する物質をいう。

例えば、特異的結合物質は、被検物質が抗原の場合にはその抗体であり、被検物質が抗体の場合にはその抗原又はその抗体に対する抗体であり、被検物質がヌクレオチド鎖の場合にはそれと相補的なヌクレオチド鎖である。

また、被検物質がリガンドの場合にはそのレセプターである。

粒子に固定する特異的結合物質と、担体に固定する特異的結合物質は、被検物質を介しての結合が可能であれば、それぞれ同一でも異なってもよい。

【0019】

本発明に用いられる粒子としては、一般に間接凝集反応に用いられる粒子でよい。例えば、リポソーム、ラテックス粒子、ゼラチン粒子、ポリアクリルアミド粒子、マイクロカプセル、エマルジョン等の有機高分子粒子、ガラスビーズ、シリカビーズ、ベントナイト等の無機高分子粒子、他の人工粒子、及び赤血球等を挙げることができる。

【0020】

また、粒子として磁性粒子を用いることもできる。この磁性粒子は、少なくとも外部から磁石を作用させている間は磁化する粒子であればよい。この磁性粒子としては、例えば、鉄、コバルト、ニッケル等の強磁性金属、これらの強磁性金属を含む合金、非磁性体中に強磁性金属又は強磁性金属を含む合金を含有するもの、強磁性金属中又は強磁性金属を含

10

20

30

40

50

む合金中に非磁性体を含有するもの等の強磁性体を単独で粒子状に成形した粒子、強磁性体を核としてその表面をポリスチレン、シリカゲル、ゼラチン、ポリアクリルアミド等の高分子物質で被覆した粒子、ポリスチレン、シリカゲル、ゼラチン、ポリアクリルアミド等の高分子物質の粒子を核として強磁性体を被覆した粒子、赤血球、リポソーム又はマイクロカプセル等の閉じた袋状の物質に強磁性体を封入した粒子等を挙げることができる。なお、この磁性粒子は、外部から磁石を作用させている間は磁化し、外部からの磁石の遮断により速やかに減磁する性質を持つものであることが特に好ましく、そのような磁性粒子としては、例えば、強磁性体である酸化鉄(III) (Fe₂O₃) を粒子内に分散させた磁性粒子である「Dynabeads M-450 uncoated (商品名) (ダイナル社製)」が挙げられる。

【0021】

更に、粒子としては、色素を被覆するか又は色素を粒子中に分散若しくは封入させることにより着色したものを使用してもよい。

【0022】

粒子の粒子径は、好ましくは0.01~100 μmであり、特に好ましくは0.5~10 μmである。また、粒子の比重は、分散媒中で沈降する比重であれば良く、例えば比重1~10のものが好ましい。

【0023】

本発明においては、特異的結合物質を固定した粒子を用いるが、特異的結合物質を粒子に固定するには、特異的結合物質を前記の粒子の表面に、疎水結合、親水吸着等の物理的吸着法、共有結合等の化学的結合法又はこれらの方法の併用などにより行うことができる。

【0024】

特異的結合物質の粒子への固定を物理的吸着法により行う場合は、公知の方法に従って、該特異的結合物質と粒子とを緩衝液等の溶液中で混合し接触させることにより行うことができる。

例えば、特異的結合物質と粒子を緩衝液等の溶液中で混合し攪拌することにより接触させ、約2~約40で約10分~約1日間吸着反応を行わせた後、得られた粒子を緩衝液等で洗浄すればよい。

【0025】

また、特異的結合物質の粒子への固定を架橋試薬による化学的結合法によって行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」, 臨床病理刊行会, 1983年、日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」, 東京化学同人, 1991年等に記載の公知の方法に従い、特異的結合物質と粒子をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、特異的結合物質と粒子のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、水酸基等の官能基を架橋試薬と反応させることにより固定することができる。

例えば、粒子を含む緩衝液等にグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬を加え、攪拌し反応させる。次にこれに特異的結合物質を加え、攪拌して反応させる。場合によっては、その後これに透析、ゲルろ過などの処理により架橋試薬を除くか若しくは架橋反応の反応停止剤を添加すること等により反応を停止させる。そして、得られた粒子を緩衝液等で洗浄すればよい。

【0026】

また、特異的結合物質の粒子への固定量を変更することにより、試料中の被検物質の濃度の高低に応じて容易に感度を変更することができる。

例えば、粒子に特異的結合物質を固定する際に、高濃度の特異的結合物質を用いれば固定量が多くなって感度を高めることができる。

【0027】

必要があれば非特異的反応を抑制するため、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、カゼイン又はその塩などの各種タンパク質、脱脂粉乳等を特異的結合物質を固定した粒子に接触させること等の公知の方法により、該粒子をマスキングしてもよい。

10

20

30

40

50

例えば、マスキングは特異的結合物質を固定した粒子をウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、カゼイン又はその塩などの各種タンパク質などを含む緩衝液等に加え静置し、該粒子の表面を各種タンパク質等でコーティングすることにより行うことができる。

【0028】

本発明において、担体としては、特異的結合物質を固定することにより該特異的結合物質により部分的に被覆された面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体を使用する。担体としては特異的結合物質により部分的に被覆された面を有しており、該面に試料等の溶液（液体）を接触させることができる限りいずれの形状、構造でもよく、例えば、容器や、板状体などが挙げられる。

10

【0029】

担体として容器を用いる場合、溶液収納部分である凹部の形状は半球状、円筒形状、直方体形状等いずれの形状でもよく、その凹部の内壁面を特異的結合物質により部分的に被覆すればよい。凹部の形状が円筒形状、直方体形状等の平底面を有する形状である場合には、その平底面を特異的結合物質により部分的に被覆するのが好ましい。容器は凹部が複数存在していてもよい。容器としては、平底面を有する凹部を少なくとも一つ備えた容器であって、その平底面が特異的結合物質により部分的に被覆されているのが好ましい。平底面を有する凹部を少なくとも一つ備えた容器としては、例えば、平底マイクロプレート、トレイ等が挙げられる。

【0030】

担体として板状体を使用する場合、板状体の表面形状は円形、長方形、正方形等いずれの形状であってもよく、その表面を特異的結合物質により部分的に被覆すればよい。また、板状体の表面に溝を作って該溝に試料等の溶液を導入することにより溶液が表面から流れ落ちるのを防ぐこともできる。

20

【0031】

担体の材質は、特異的結合物質を物理的又は化学的に固定できるものであれば何ら制限されず、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアクリレート、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリメタクリレート等が挙げられる。

【0032】

本発明においては、担体の面に特異的結合物質を固定する場合、該面が部分的に該特異的結合物質により被覆されるように固定する。これは、試料中に被検物質が存在する場合、即ち陽性の場合に特異的結合物質で被覆した部分と被覆していない部分の像の比較によって陽性であることの判断がより明確となり、陽性と陰性の判別、つまり試料中の被検物質の有無の判別が容易になるからである。ここで、「部分的」とは、特異的結合物質が偏在しており、面全体にわたって特異的結合物質により被覆されていないことをいう。特異的結合物質により被覆された部分の形状及び面積は、試料中の被検物質の存在の有無を判定することができる限り特に制限はない。部分的被覆の例としては、担体の面の片側半分を被覆したり、担体の面に帯状に被覆したりする場合が挙げられる。

30

【0033】

また、担体の面の特異的結合物質による被覆部分は複数存在していてもよく、例えば、試料中の複数の被検物質を測定するために、担体の面にそれぞれの被検物質に対する特異的結合物質による被覆部分を設けることができる。

40

【0034】

図1は、本発明において担体として用いる平底マイクロプレートであって、各ウェルの平底面の片側半分が特異的結合物質により被覆されているものを示したものである。

図1のAは平底マイクロプレートの斜視図であり（斜線部は前記特異的結合物質により被覆された部分である。）、図1のBは平底マイクロプレートの平面図である（斜線部は前記特異的結合物質により被覆された部分である。）。

【0035】

50

図2は、底面が長方形の直方体型透明容器であって、特異的結合物質により帯状に被覆されている部分（以下、帯状被覆部分という。）を有する底面を有するものを示したものである。

図2のAは該容器の斜視図であり（斜線部は前記特異的結合物質により被覆された部分である。）、図2のBは該容器の平面図である（斜線部は前記特異的結合物質により被覆された部分である。）。

【0036】

図3は、表面形状が長方形の板状体であって、異なる2種類の特異的結合物質による帯状被覆部分を有する表面を有するものを示したものである。

図3のAは、該板状体の斜視図（斜線部は、それぞれ異なる特異的結合物質により被覆された部分である。）であり、図3のBは該板状体の平面図である（斜線部は、それぞれ異なる特異的結合物質により被覆された部分である。）。 10

【0037】

図4は、表面形状が長方形の板状体であって該表面に断面形状が矩形の溝が設けられており、該溝の底面に異なる2種類の特異的結合物質による帯状被覆部分を形成したものを示したものである。

図4のAは、そのような板状体の斜視図（斜線部は、それぞれ異なる特異的結合物質により被覆された部分である。）であり、図4のBはそのような板状体の平面図である（斜線部は、それぞれ異なる特異的結合物質により被覆された部分である。）。 20

また、溝の帯状被覆部分側に板を載せること等によりカバーすると（図4のA参照）、カバーされていない側の溝に滴下された試料は毛細管現象で帯状被覆部分の方向に移動するので好ましい。 20

【0038】

特異的結合物質の担体の面への固定化は、疎水結合、親水吸着等の物理的吸着法又は架橋試薬による化学的結合法によって行うことができる。

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、緩衝液等に溶解した特異的結合物質と担体の面とを接触させることにより行うことができる。

例えば、担体が容器の場合、緩衝液等に溶解した特異的結合物質を該容器の凹部に入れて静置することにより接触させ、約2～約40で約10分～約1日間吸着反応を行わせた後、凹部の液を吸引除去し、緩衝液等で洗浄すればよい。 30

【0039】

また、架橋試薬による化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」，臨床病理刊行会，1983年、日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」，東京化学同人，1991年等に記載の公知の方法に従い、被検物質に対する特異的結合物質と担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、特異的結合物質と担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、水酸基等と反応させることにより固定することができる。

例えば、担体が容器の場合、該容器の凹部にグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬を加え、静置して反応させる。次いでこれに特異的結合物質を加えて静置することにより反応させる。場合によっては、その後これに架橋反応の反応停止剤を添加すること等により反応を停止させる。そして、緩衝液等で洗浄を行う。 40

【0040】

また、本発明において、担体の面を部分的に被覆する方法としては、例えば、面の特異的結合物質により被覆したい部分にのみ特異的結合物質及び/又は架橋試薬を滴下して上記方法により固定化を行なう方法、面の特異的結合物質により被覆したい部分の周囲をプラスチック板等で囲ってこの囲まれた部分に特異的結合物質及び/又は架橋試薬を滴下して上記固定化を行なう方法、或いはスポンジ等の吸収体に特異的結合物質及び/又は架橋試薬を吸収させ、面の特異的結合物質により被覆したい部分に置いて接触させたり又は塗布 50

して上記固定化を行なう方法などが挙げられる。

【0041】

また、特異的結合物質の担体の面への固定量を変更することにより、試料中の被検物質の濃度の高低に応じて容易に感度を変更することができる。

例えば、担体に特異的結合物質を固定する際に、高濃度の特異的結合物質を用いれば固定量が多くなって感度を高めることができる。

【0042】

更に、必要があれば非特異的反応を抑制するため、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、カゼイン若しくはその塩などの各種タンパク質、脱脂粉乳等の特異的結合物質を固定した担体に接触させること等の公知の方法により、特異的結合物質を固定した担体をマスキングしてもよい。

例えば、担体が容器である場合には、特異的結合物質を固定した該容器の凹部にウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、カゼイン又はその塩などの各種タンパク質などを含む緩衝液等を加えて静置し、特異的結合物質を固定した容器の凹部の表面を各種タンパク質等でコーティングした後、凹部の液を吸引除去することにより行うことができる。

【0043】

本発明による第1の測定方法においては、まず、上記のように特異的結合物質を固定して該特異的結合物質により部分的に被覆した面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体の該面に、被検物質の存在が疑われる試料を接触させる。

【0044】

担体が例えば上記したような容器の場合には、該容器の凹部に試料を添加することにより容器の内壁面と試料とを接触させることができる。

また、担体が例えば上記したような板状体の場合には、該板状体の表面に試料を滴下したりすることにより接触させればよい。

【0045】

試料は、例えば希釈液により希釈して担体に接触させることができる。

試料の希釈液としては、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等の各種緩衝液又は生理食塩水等を用いることができる。なお、この緩衝液のpHについては、pH4~12の範囲内にあることが好ましい。

【0046】

また、試料の希釈液には、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、カゼイン、又はその塩などの各種タンパク質、塩化ナトリウムなどの各種塩類、各種糖類、脱脂粉乳、正常ウサギ血清などの各種動物血清、アジ化ナトリウムなどの各種防腐剤、非イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等の添加剤を適宜加えて用いることができる。

【0047】

そして、これらの添加剤を加える際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001~10%(w/v)が好ましく、特に0.01~5%(w/v)が好ましい。

【0048】

また、界面活性剤としては、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、デカグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステロール、ポリオキシエチレンフィトスタノール、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンラノリン等の非イオン性界面活性剤、酢酸ベタインなどの両性界面活性剤又はポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩若しくはポリオキシエチレンアルキルエーテル酢酸塩などの陰イオン性界面活性剤等を挙げることができる。

【0049】

上記のように、担体の面に試料を接触させた後、この面に接触させた試料を除去する。この担体の特異的結合物質が被覆された面に接触させた試料の除去は、吸水性材料よりなる試料吸収体を担体の面上の試料に接触させて試料を吸収させたり、ピペットなどで担体の面上の試料を吸い取ったり、又は担体を裏返して試料を下に落とすこと等により行うことができる。

【0050】

なお、吸水性材料よりなる試料吸収体を担体の面上の試料に接触させて試料を吸収させたり、ピペットなどで担体の面上の試料を吸い取って面に接触させた試料の除去を行う場合には、試料が特異的結合物質が被覆された部分の上を移動するように、面の特異的結合物質が被覆された部分の水平方向から試料を吸収させたり、吸い取ることが好ましい。このようにした場合には、より高感度に被検物質を測定することができる。

10

【0051】

この吸水性材料よりなる試料吸収体としては、ろ紙、ペーパータオル若しくはティッシュペーパーなどの紙類、レーヨン若しくはポリエステルなどの化学繊維、布、不織布又は綿等の液体を吸収する性質を持つ材料よりなるものを用いることができる。なお、この試料吸収体の形状、大きさについては特に制限はない。このように面に接触させた試料を除去すると、試料が血液試料（全血試料）の場合、除去により血液試料中の赤血球は担体の面における特異的結合物質による被覆部分上より除去される。これに対して、血液試料中の被検物質は担体の面に固定された特異的結合物質に結合して残る。そして更にこの結合した被検物質に特異的結合物質が固定された粒子が結合するので、この結合した粒子の分布状態を赤血球に遮られずに明確に確認することができるものである。

20

【0052】

なお、面に接触させた試料を除去した後、上記の試料の希釈液又は緩衝液等でこの担体の面を洗浄しても良い。

【0053】

上記のように、面に接触させた試料を除去した後、被検物質に対する特異的結合物質であって前記担体に固定された特異的結合物質と同一又は異なる特異的結合物質が固定された粒子を試料を除去した担体の面に接触させる。

なお、試料中の複数の被検物質を測定する場合には、それぞれの被検物質に対する特異的結合物質を固定した粒子を接触させる。

30

【0054】

また、特異的結合物質を固定した粒子のかわりに、被検物質又はその類縁体を固定させた粒子を用いても良い。ここで、被検物質の類縁体とは、被検物質の一部分、被検物質に別の物質が結合したもの、被検物質の構造の一部分が置換されたもの等であって、被検物質の特異的結合物質と結合する部分の構造を有し、特異的結合物質に結合することができる物質のことである。

【0055】

また、粒子は、例えば適当な分散媒に分散して担体に接触させることができる。

粒子の分散媒としては、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等の各種緩衝液又は生理食塩水等を用いることができる。なお、この緩衝液のpHについては、pH4～12の範囲内にあることが好ましい。

40

【0056】

また、この粒子の分散媒には、上記の試料の希釈液の項で記載した添加剤をそれぞれ適宜加えて用いることができる。

そして、これらの添加剤を加える際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001～10% (w/v) が好ましく、特に0.01～5% (w/v) が好ましい。

【0057】

上記のように、担体の面に粒子を接触させた後、粒子を担体の特異的結合物質により部分的に被覆された面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる。この面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されてい

50

る部分に粒子を移動させることは、磁石を作用させることにより行ったり、担体を傾けること等により行うことができる。

【 0 0 5 8 】

磁石を作用させることにより粒子を移動させる場合、粒子は上記の磁性粒子を使用する。そして、この磁性粒子が特異的結合物質により部分的に被覆された面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動するように磁石を作用させる。

【 0 0 5 9 】

なお、担体の面上の磁性粒子の分布状態により陽性又は陰性の判定を行なうことができる限り、担体の面に磁性粒子を接触させる前又は接触させている間に磁石を作用させてもよい。

10

【 0 0 6 1 】

担体の面が部分的に特異的結合物質により被覆されている場合には、磁性粒子を移動させたい方向に移動させることができる位置であればどこに磁石を配置してもよく、例えば、移動させたい方向やその周辺に配置すればよい。より具体的には、例えば、面の片側半分を特異的結合物質により被覆した担体を用いた場合、面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分（図1の矢印方向）に磁性粒子が移動するように磁石を配置するのが好ましい。

【 0 0 6 2 】

また、面が特異的結合物質により帯状に被覆されている担体を用いた場合は、面の特異的結合物質により被覆されていない部分からその帯状被覆部分を通して特異的結合物質により被覆されていない部分（図2～4の矢印方向）に磁性粒子が移動するように磁石を配置するのが好ましい。

20

【 0 0 6 3 】

磁石としては、磁場を発生して磁性粒子を磁化するものであればいずれのものでもよく、永久磁石、電磁石等を用いればよい。

また、磁束密度は、用いる磁性粒子と担体の面との相互作用に依存するが、通常、5～100 Gaussである。

【 0 0 6 4 】

試料に被検物質が存在する場合、該被検物質は担体に固定された特異的結合物質に結合する。

30

この場合磁性粒子に磁石を作用させると、該磁性粒子は磁石に吸引されて担体の面に沿って該磁石の方向に移動するが、その過程で面に固定された特異的結合物質に結合した被検物質に出会うと、該磁性粒子は被検物質及びこれに結合している特異的結合物質を介して担体に結合して移動を停止するか又は移動が著しく遅くなる。

【 0 0 6 5 】

面の特異的結合物質が固定されていない領域では、磁性粒子の移動は該粒子と面との相互作用及び磁場の強さに依存して磁石の方向にすみやかに移動する。

一方、面の特異的結合物質が固定されている領域では、該面に固定されている特異的結合物質に被検物質が結合している場合と結合していない場合とでは磁性粒子の移動速度に大きな差を生じる。

40

【 0 0 6 6 】

即ち、試料中に被検物質が存在しない場合、面に固定されている特異的結合物質は被検物質を結合しないので、磁性粒子は親和性を示さず、特異的結合物質が固定されていない領域と同様にすみやかに磁石の方向に移動する。従って、試料中に被検物質が存在しない場合、磁性粒子は磁石に近い位置、即ち担体の面の端部に集まる。

【 0 0 6 7 】

一方、試料中に被検物質が存在する場合、面に固定されている特異的結合物質は被検物質を結合するので、磁性粒子は被検物質及び特異的結合物質を介して担体に結合して移動が停止又は著しく遅くなる。従って、試料中に被検物質が存在する場合、磁性粒子はその面

50

の特異的結合物質で被覆された部分に集まる。

【0068】

なお、担体として容器を使用した場合、容器に添加された磁性粒子はその比重により容器の凹部の下方に沈降する。この際、容器の上部から底面方向に磁石を作用させることにより磁性粒子の沈降を促進してもよい。

【0069】

担体の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動するように磁性粒子に磁石を作用させる場合、磁性粒子と被検物質が結合していない該面との相互作用は弱く、その移動速度はほぼ磁場の強さに依存する。従って、大きな移動速度を必要とする場合、すなわち短時間で測定結果を求めるときには強い磁場を発生する磁石を使用すればよい。また、電磁石を用いて磁場の強さを調節しながら測定を行うことも可能である。

10

【0070】

担体を傾けることにより移動させる場合、粒子が担体の特異的結合物質により部分的に被覆された面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動するように担体を傾ける。なお、担体を傾ける角度は、粒子が重力によって担体の特異的結合物質により被覆された面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動するような角度であればよく、90°以下の角度を適宜選択すればよいが、25°から90°の間の角度が好ましく、特に45°から65°の間の角度が好ましい。

20

【0071】

また、担体の面上の粒子の分布状態により陽性又は陰性の判定を行なうことができる限り、担体の面に粒子を接触させる前又は接触させている間に担体を傾けてもよい。

【0073】

担体の面が部分的に特異的結合物質により被覆されている場合には、粒子が担体の特異的結合物質により被覆されている部分の上を移動するような方向に担体を傾けて、重力により粒子を移動させればよい。例えば、移動させたい方向を下にして担体を配置すればよい。より具体的には、例えば、面の片側半分を特異的結合物質により被覆した担体を用いた場合、面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分（図1の矢印方向）に粒子が移動するよう担体を傾ける（この場合図1の矢印方向に傾ければよい）。

30

【0074】

また、面が特異的結合物質により帯状に被覆されている担体を用いた場合は、面の特異的結合物質により被覆されていない部分からその帯状被覆部分を通して特異的結合物質により被覆されていない部分（図2～4の矢印方向）に粒子が移動するように担体を傾ける（この場合図2～4の矢印方向に傾ければよい）。

【0075】

試料に被検物質が存在する場合、該被検物質は担体に固定された特異的結合物質に結合する。

この場合に粒子が担体の特異的結合物質により被覆された面に沿って移動するように担体を傾けると、該粒子は重力により担体の面に沿って傾きの下方向に移動するが、その過程で面に固定された特異的結合物質に結合した被検物質に出会うと、該粒子は被検物質及びこれに結合している特異的結合物質を介して担体に結合して移動を停止するか又は移動が著しく遅くなる。

40

【0076】

面の特異的結合物質が固定されていない領域では、粒子の移動は該粒子と面との相互作用及び担体を傾ける角度に依存し、該粒子は傾きの下方向にすみやかに移動する。

一方、面の特異的結合物質が固定されている領域では、該面に固定されている特異的結合物質に被検物質が結合している場合と結合していない場合とでは粒子の移動速度に大きな差を生じる。

50

【 0 0 7 7 】

即ち、試料中に被検物質が存在しない場合、面に固定されている特異的結合物質は被検物質を結合しないので、粒子は親和性を示さず、特異的結合物質が固定されていない領域と同様にすみやかに傾きの下方向に移動する。従って、試料中に被検物質が存在しない場合、粒子は担体の下方向の端部に集まる。

一方、試料中に被検物質が存在する場合、面に固定されている特異的結合物質は被検物質を結合するので、粒子は被検物質及び特異的結合物質を介して担体に結合して移動が停止又は著しく遅くなる。従って、試料中に被検物質が存在する場合、粒子はその面の特異的結合物質で被覆された部分に集まる。

【 0 0 7 8 】

担体を傾けて粒子を担体の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させる場合、粒子と被検物質が結合していない該面との相互作用は弱く、その移動速度は担体を傾ける角度にほぼ依存する。従って、大きな移動速度を必要とする場合、すなわち短時間で測定結果を求めるときには担体を傾ける角度を大きくすればよい。また、担体を傾ける角度を経時的に変化させても良い。更に、板状体の担体を用いる場合、その板状体を湾曲させ板状体の角度を変化させることにより、粒子が移動する速度を変化させても良い。

【 0 0 7 9 】

上記のように、粒子を担体の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させた後、この面における粒子の分布状態から被検物質の有無を判定する。この担体の面上の粒子の分布状態、即ち像は、容易に肉眼により、あるいは吸光度測定やパターン認識によるマイクロプレートリーダー等の光学的読み取り装置により確認することができる。

【 0 0 8 0 】

図1のCは、平底マイクロプレートを用いて被検物質が存在する試料（陽性の試料）について測定を行なった場合のウェルを上方からみた図であり、図1のDは、平底マイクロプレートを用いて被検物質が存在しない試料（陰性の試料）について測定を行なった場合のウェルを上方からみた図である。

陽性の場合、ウェルの平底面の特異的結合物質で被覆されていない部分から移動してきた粒子は特異的結合物質被覆部分にトラップされる。

【 0 0 8 1 】

図2のCは、底面が長方形の直方体型の透明容器を用いて被検物質が存在する試料（陽性の試料）について測定を行なった場合の該容器を上方からみた図であり、図2のDは、底面が長方形の直方体型の透明容器を用いて被検物質が存在しない試料（陰性の試料）について測定を行なった場合の該容器を上方からみた図である。

陽性の場合、底面の特異的結合物質で被覆されていない部分から移動してきた粒子は帯状被覆部分にトラップされる。

【 0 0 8 2 】

図3のCは、長方形の板状体を用いて2種類の被検物質が存在する試料（それぞれの被検物質が陽性の試料）について測定を行なった場合の該板状体を上方からみた図であり、図3のDは、長方形の板状体を用いて被検物質が存在しない試料（陰性の試料）について測定を行なった場合の該板状体を上方からみた図である。

陽性の場合、表面の特異的結合物質で被覆されていない部分から移動してきた粒子はそれぞれの被検物質に対応する帯状被覆部分にトラップされる。

【 0 0 8 3 】

図4のCは、表面に溝が設けられた長方形の板状体を用いて2種類の被検物質が存在する試料（それぞれの被検物質が陽性の試料）について測定を行なった場合の該板状体を上方からみた図であり、図4のDは、かかる板状体を用いて被検物質が存在しない試料（陰性の試料）について測定を行なった場合の該板状体を上方からみた図である。

陽性の場合、溝の底面の特異的結合物質で被覆されていない部分から移動してきた粒子は

10

20

30

40

50

それぞれの被検物質に対応する帯状被覆部分にトラップされる。

【0084】

また、特異的結合物質のかわりに、被検物質又はその類縁体を固定した粒子を用いる場合、第1の測定方法により得られる陽性又は陰性の粒子の分布状態と逆の結果が得られる。

【0085】

本発明による第2の測定方法においては、特異的結合物質を固定して該特異的結合物質により部分的に被覆した面、すなわち特異的結合物質により被覆されていない部分と被覆されている部分を併せ持つ面を有する担体の該面に、特異的結合物質が固定された粒子及び試料を混合した後の混合物をこの担体の面に接触させる。その後、この面に接触させた粒子及び試料の混合物を前記面の特異的結合物質により被覆されている部分の上を移動するように除去する。そして、更に特異的結合物質が固定された粒子をこの面に接触させる。次に、この粒子を面の特異的結合物質により被覆されていない部分から被覆されている部分に移動させ、この面における粒子の分布状態から被検物質の有無を判定する。

10

【0086】

この第2の測定方法によれば、試料中に被検物質が存在する即ち陽性の場合においては、粒子は試料中の被検物質と結合するので、粒子及び試料の混合物を担体の面に接触させた時に、粒子は被検物質を介してこの面に固定された特異的結合物質と結合する。そして、粒子及び試料の混合物をこの面から除去し、更に粒子をこの面に接触させて面に沿って移動させると、この粒子は先に担体の面に被検物質を介して結合した粒子に遮られて移動が停止又は著しく遅くなり、粒子はその面の特異的結合物質で被覆された部分に集まることとなる。

20

【0087】

一方、試料中に被検物質が存在しない即ち陰性の場合においては、粒子は被検物質を結合しないので、粒子及び試料の混合物を担体の面に接触させた時に、粒子はこの面に予め固定されていた特異的結合物質とは結合しない。よって、粒子及び試料の混合物をこの面から除去し、更に粒子をこの面に接触させて面に沿って移動させても、粒子はこの面の上を素通りしてしまい速やかに磁石の方向又は傾きの下方向に移動して、磁石に近い位置即ち担体の面の端部又は担体の下方向の担部に集まることとなる。

従って、この第2の測定方法によれば、第1の測定方法により得られる陽性又は陰性の粒子の分布状態と同じ結果が得られる。

30

【0088】

なお、本測定方法は、確認試験に使用することができる。確認試験とは、即ち測定で陽性像が得られた場合に、それが真に被検物質の存在によるものか、又は非特異的凝集反応によるものかを確認する方法である。

【0089】

【実施例】

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0090】

〔実施例1〕

(血液試料中のHBs抗原の測定)

(1) 抗HBs抗体固定板状体の作製

アクリル樹脂押出板(幅25mm、奥行き40mm、厚さ1mm)〔アクリサンデー社製〕の上に2枚のアクリル押出板(幅10mm、奥行き40mm、厚さ0.5mm)〔アクリサンデー社製〕を5mmの間隔をおいて溶剤で貼り合わせて、図5に示された表面に溝(幅5mm、奥行き40mm、高さ0.5mm)が設けられた板状体を作製した。

この板状体の溝の底面の左端から5mmより10mmの部分に抗HBs抗体溶液(シノテスト社製、5µg/mlの濃度でpH7の10mMリン酸緩衝液に溶解したもの)20µlをピペットを用いて載せて接触させ、37℃で3時間静置した。

次いで、この溶液をピペットで吸引除去後、0.5%(W/V)カゼインを含むトリス緩衝液(pH7

40

50

.5,50mM) (以下、これを希釈液 A という) 0.3ml をここに加えて、4 で一晩放置し、これをピペットで吸引除去した。

そして、この板状体の左端の上にアクリル樹脂押出板 (幅 25 mm、奥行き 25 mm、厚さ 1 mm) [アクリサンデー社製] を溶剤で貼り合わせることににより、図 5 に示したように板状体にカバーをした。

このようにして、溝の底面に特異的結合物質 (抗 H B s 抗体) による帯状被覆部分が形成された板状体を作製した。

【 0 0 9 1 】

(2) 抗 H B s 抗体固定粒子の作製

粒子 (磁性粒子) [Dynabeads M-450 uncoated、ダイナル社製、粒径: 4.5 μ m、粒径の C.V. 5% 以下、比重 1.5、濃度 3% (w/v)] 1ml と抗 H B s 抗体溶液 (シノテスト社製、pH7.0 の 10mM リン酸緩衝液に濃度 0.1mg/ml で溶解したもの) 1ml を混合し、37 で 30 分間反応させた。ここに希釈液 A を約 20 倍量加えてマスキングを行なった。次いで、得られた粒子を希釈液 A にて洗浄し、粒子を濃度が約 0.1% (w/v) となるように希釈液 A に再分散させた。このようにして、抗 H B s 抗体固定粒子分散液を調製した。

【 0 0 9 2 】

(3) H B s 抗原の測定

H B s 抗原陽性血液 100 μ l を上記 (1) で作製した抗 H B s 抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

ティッシュペーパー (商品名: キムワイプ、十條キンパリー社製) を 3 cm \times 3 cm \times 4 mm (厚さ) に折り畳んで作製した試料吸収体を抗 H B s 抗体固定板状体の帯状被覆部分が形成された側の端部 (図 5 の A における板状体の左端側面) に接触させ、この帯状被覆部分に接触させた H B s 抗原陽性血液を吸収させて除去した。

次に、上記 (2) で作製した抗 H B s 抗体固定粒子分散液をこの抗 H B s 抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

その後、この板状体の帯状被覆部分が形成された側面方向に磁石を設置することにより、抗 H B s 抗体固定粒子が移動するように板状体の溝の底面の抗 H B s 抗体が固定されていない部分から溝の底面の抗 H B s 抗体が固定されている部分方向 (図 5 の矢印方向) に磁束密度 40 ~ 60 ガウスの磁場を発生させた。

磁場を発生させてから 3 分間以内に図 5 の C に示すような粒子の像が認められた。

陰性血液を試料として用いて測定した場合には粒子の像は認められなかった。

【 0 0 9 3 】

〔実施例 2〕

(血液試料中の抗 H B s 抗体の測定)

(1) H B s 抗原固定板状体の作製

アクリル樹脂押出板 (幅 25 mm、奥行き 40 mm、厚さ 1 mm) [アクリサンデー社製] の上に 2 枚のアクリル押出板 (幅 10 mm、奥行き 40 mm、厚さ 0.5 mm) [アクリサンデー社製] を 5 mm の間隔をおいて溶剤で貼り合わせて、図 5 に示された表面に溝 (幅 5 mm、奥行き 40 mm、高さ 0.5 mm) が設けられた板状体を作製した。

この板状体の溝の底面の左端から 5 mm より 10 mm の部分に H B s 抗原溶液 (明治乳業社製、5 μ g/ml の濃度で pH 7 の 10mM リン酸緩衝液に溶解したもの) 20 μ l をピペットを用いて載せて接触させ、37 で 3 時間静置した。

次いで、この溶液をピペットで吸引除去後、前記の希釈液 A 0.3ml をここに加えて、4 で一晩放置し、これをピペットで吸引除去した。

そして、この板状体の左端の上にアクリル樹脂押出板 (幅 25 mm、奥行き 25 mm、厚さ 1 mm) [アクリサンデー社製] を溶剤で貼り合わせることににより、図 5 に示したように板状体にカバーをした。

このようにして、溝の底面に特異的結合物質 (H B s 抗原) による帯状被覆部分が形成さ

10

20

30

40

50

れた板状体を作製した。

【 0 0 9 4 】

(2) H B s 抗原固定粒子の作製

粒子 (Dynabeads M-450 uncoated 、ダイナル社製、粒径 : 4.5 μ m 、粒径の C . V . 5 % 以下、比重 1.5、濃度 3 % (w/v)) 1 ml と H B s 抗原溶液 (明治乳業社製、pH7.2 の 10mM リン酸緩衝液に 40 μ g / ml の濃度で溶解したもの) 1 ml を混合し、37 ° で 30 分間反応させた。ここに希釈液 A を約 20 倍量加えてマスキングを行なった。次いで、得られた粒子を希釈液 A にて洗浄し、粒子を濃度が約 0.1 % (w/v) となるように希釈液 A に再分散させた。このようにして、H B s 抗原固定粒子分散液を調製した。

【 0 0 9 5 】

(3) 抗 H B s 抗体の測定

抗 H B s 抗体陽性血液 100 μ l を上記 (1) で作製した H B s 抗原固定板状体の溝のカバ - された部分とカバ - されていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

ティッシュペーパー (商品名 : キムワイブ、十條キンバリー社製) を 3 c m \times 3 c m \times 4 m m (厚さ) に折り畳んで作製した試料吸収体を H B s 抗原固定板状体の帯状被覆部分が形成された側の端部 (図 5 の A における板状体の左端側面) に接触させ、この帯状被覆部分に接触させた抗 H B s 抗体陽性血液を吸収させて除去した。

次に、上記 (2) で作製した H B s 抗原固定粒子分散液をこの H B s 抗原固定板状体の溝のカバ - された部分とカバ - されていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

その後、これを板状体の帯状被覆部分が形成された側面方向を下にして (図 5 の矢印方向が下になるようにして)、板状体の溝の底面の H B s 抗原が固定されていない部分から溝の底面の H B s 抗原が固定されている部分方向 (図 5 の矢印方向) に H B s 抗原固定粒子が移動するように、約 60 ° の角度で H B s 抗原固定板状体を傾けた。

斜めに傾けてから 3 分間以内に図 5 の C に示すような粒子の像が認められた。陰性血液を試料として用いて測定した場合には粒子の像は認められなかった。

【 0 0 9 6 】

〔 実施例 3 〕

(大腸菌 O 1 5 7 の測定)

(1) 抗大腸菌 O 1 5 7 抗体固定板状体の作製

アクリル樹脂押出板 (幅 2 5 m m 、奥行き 4 0 m m 、厚さ 1 m m) [アクリサンデー社製] の上に 2 枚のアクリル押出板 (幅 1 0 m m 、奥行き 4 0 m m 、厚さ 0 . 5 m m) [アクリサンデー社製] を 5 m m の間隔をおいて溶剤で貼り合わせて、図 5 に示された表面に溝 (幅 5 m m 、奥行き 4 0 m m 、高さ 0 . 5 m m) が設けられた板状体を作製した。

この板状体の溝の底面の左端から 5 m m より 1 0 m m の部分に抗大腸菌 O 1 5 7 : H 7 抗体溶液 [Kirkegaard & Perry Laboratories 社製、5 μ g / ml の濃度で pH 7 の 10mM リン酸緩衝液に溶解したもの] 20 μ l をピペットを用いて載せて接触させ、37 ° で 3 時間静置した。

次いで、この溶液をピペットで吸引除去後、前記の希釈液 A 0.3ml をここに加えて、4

で一晩放置し、これをピペットで吸引除去した。そして、この板状体の左端の上にアクリル樹脂押出板 (幅 2 5 m m 、奥行き 2 5 m m 、厚さ 1 m m) [アクリサンデー社製] を溶剤で貼り合わせるにより、図 5 に示したように板状体にカバ - をした。

このようにして、溝の底面に特異的結合物質 (抗大腸菌 O 1 5 7 : H 7 抗体) による帯状被覆部分が形成された板状体を作製した。

【 0 0 9 7 】

(2) 抗大腸菌 O 1 5 7 抗体固定粒子の作製

粒子 (磁性粒子) (Dynabeads M-450 uncoated 、ダイナル社製、粒径 : 4.5 μ m 、粒径の C . V . 5 % 以下、比重 1.5、濃度 3 % (w/v)) 1 ml と抗大腸菌 O 1 5 7 : H 7 抗体溶

10

20

30

40

50

液〔Kirkegaard & Perry Laboratories社製、pH7.0の10mMリン酸緩衝液に濃度0.1mg/mlで溶解したもの〕1mlを混合し、37℃で30分間反応させた。ここに希釈液Aを約20倍量加えてマスキングを行なった。次いで、得られた粒子を希釈液Aにて洗浄し、粒子を濃度が約0.1% (w/v) となるように希釈液Aに再分散させた。このようにして、抗大腸菌O157抗体固定粒子分散液を調製した。

【0098】

(3) 大腸菌O157の測定

大腸菌O157:H7〔Kirkegaard & Perry Laboratories社製〕を糞便懸濁液に添加し調製した試料100 μ lを上記(1)で作製した抗大腸菌O157抗体固定板状体の溝のカバ

10
- された部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

ティッシュペーパー（商品名：キムワイプ、十條キンバリー社製）を3cm \times 3cm \times 4mm（厚さ）に折り畳んで作製した試料吸収体を抗大腸菌O157抗体固定板状体の帯状被覆部分が形成された側の端部（図5のAにおける板状体の左端側面）に接触させ、この帯状被覆部分に接触させた前記の試料を吸収させて除去した。

次に、上記(2)で作製した抗大腸菌O157抗体固定粒子分散液をこの抗大腸菌O157抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

その後、この板状体の帯状被覆部分が形成された側面方向に磁石を設置することにより、抗大腸菌O157抗体固定粒子が移動するように板状体の溝の底面の抗大腸菌O157抗体が固定されてい

20
ない部分から溝の底面の抗大腸菌O157抗体が固定されている部分方向（図5の矢印方向）に磁束密度40~60ガウスの磁場を発生させた。

磁場を発生させてから3分間以内に図5のCに示すような粒子の像が認められた。

大腸菌O157:H7を添加していない糞便懸濁液を試料として用いて測定した場合には粒子の像は認められなかった。

【0099】

〔実施例4〕

（血液試料中のHBs抗原の確認試験(1)）

HBs抗原陽性血液100 μ lを実施例1の(1)で作製した抗HBs抗体固定板状体の溝のカバ

30
- された部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

ティッシュペーパー（商品名：キムワイプ、十條キンバリー社製）を3cm \times 3cm \times 4mm（厚さ）に折り畳んで作製した試料吸収体を抗HBs抗体固定板状体の帯状被覆部分が形成された側の端部（図5のAにおける板状体の左端側面）に接触させ、この帯状被覆部分に接触させたHBs抗原陽性血液を吸収させて除去した。

次に、抗HBs抗体液（シノテスト社製、希釈液Aに濃度0.1mg/mlで溶解したもの）を前記のHBs抗原陽性血液を吸収除去した抗HBs抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

ティッシュペーパー（商品名：キムワイプ、十條キンバリー社製）を3cm \times 3cm \times 4mm（厚さ）に折り畳んで作製した試料吸収体を抗HBs抗体固定板状体の帯状被覆部分が形成された側の端部（図5のAにおける板状体の左端側面）に接触させ、この帯状被覆部分に接触させた抗HBs抗体液を吸収させて除去した。

40

更に、実施例1の(2)で作製した抗HBs抗体固定粒子分散液をこの抗HBs抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

その後、この板状体の帯状被覆部分が形成された側面方向に磁石を設置することにより、抗HBs抗体固定粒子が移動するように板状体の溝の底面の抗HBs抗体が固定されてい

40
ない部分から溝の底面の抗HBs抗体が固定されている部分方向（図5の矢印方向）に磁束密度40~60ガウスの磁場を発生させた。

磁場を発生させてから3分後に、この板状体の面上の粒子の分布状態を確認したところ、図5のCに示すような粒子の像は認められなかった。これにより、試料中に真にHBs抗原が存在することが確認できた。

【0100】

〔実施例5〕

(血液試料中のHBs抗原の確認試験(2))

HBs抗原陽性血液100 μ lを実施例1の(1)で作製した抗HBs抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

ティッシュペーパー(商品名:キムワイブ、十條キンバリー社製)を3cm \times 3cm \times 4mm(厚さ)に折り畳んで作製した試料吸収体を抗HBs抗体固定板状体の帯状被覆部分が形成された側の端部(図5のAにおける板状体の左端側面)に接触させ、この帯状被覆部分に接触させたHBs抗原陽性血液を吸収させて除去した。

次に、実施例1の(2)で作製した抗HBs抗体固定粒子分散液に抗HBs抗体を0.1mg/mlになるように添加し、前記抗HBs抗体添加抗HBs抗体固定粒子分散液を前記のHBs抗原陽性血液を吸収除去した抗HBs抗体固定板状体の溝のカバーされた部分とカバーされていない部分の境目付近にピペットを用いて載せて帯状被覆部分に接触させた。

その後、この板状体の帯状被覆部分が形成された側面方向に磁石を設置することにより、抗HBs抗体固定粒子が移動するように板状体の溝の底面の抗HBs抗体が固定されていない部分から溝の底面の抗HBs抗体が固定されている部分方向(図5の矢印方向)に磁束密度40~60ガウスの磁場を発生させた。

磁場を発生させてから3分後に、この板状体の面上の粒子の分布状態を確認したところ、図5のCに示すような粒子の像は認められなかった。これにより、試料中に真にHBs抗原が存在することが確認できた。

【0101】

【発明の効果】

本発明の測定方法によれば、特異的結合反応を利用して試料中の被検物質を目視又は機器を用いて測定する際に、赤血球などの判定を妨げる物質を含む血液試料等の試料においても、妨害を受けることなく確実に被検物質の存在の有無を判定することができる。

また、本発明の測定方法によれば、試料中の被検物質の有無を、従来のように容器底面に集まった粒子の円形の像の大小ではなく、粒子が担体の面の端部に集まるか或いは担体の面の特異的結合物質で被覆された部分に集まるかにより判定することから、被検物質濃度が低い場合であってもその判定が容易である。したがって高感度に試料中の被検物質の測定をすることができる。しかも非特異的凝集反応が生じた場合においても誤った判定を与えることはない。

そして、本発明の測定方法によれば、粒子及び/又は担体の面への特異的結合物質の固定量を変更することにより感度を容易に変更することができるので効率がよい。従って、被検物質の濃度が低い場合においても被検物質の有無を容易に判定することができる。

更に、本発明の測定方法によれば、短時間で、具体的には被検物質の種類にもよるが、通常、20秒~10分程度で試料中の被検物質の有無の判定を行なうことができ、例えば、HBs抗原の場合、1ng/ml程度の濃度であっても3分間以内で測定が可能である。

更に、本発明の測定方法によれば、試料中の複数の被検物質の測定を同時に行なうことができる。

また、本発明の測定方法によれば、確認試験を簡便に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】各ウェルの平底面の片側半分が特異的結合物質により被覆された平底マイクロプレートを示す図である。

【図2】底面が特異的結合物質により帯状に被覆されている直方体型の透明容器を示す図である。

【図3】表面が特異的結合物質により帯状に被覆されている板状体を示す図である。

10

20

30

40

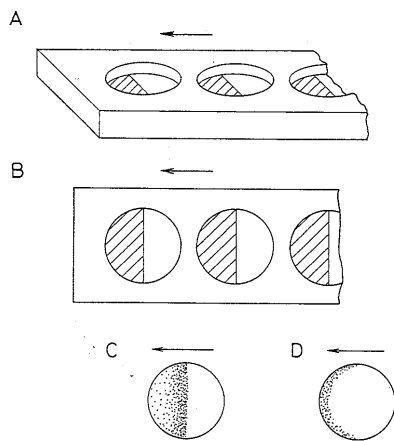
50

【図4】表面に溝が設けられ、該溝の底面が特異的結合物質により帯状に被覆されている板状体を示す図である。

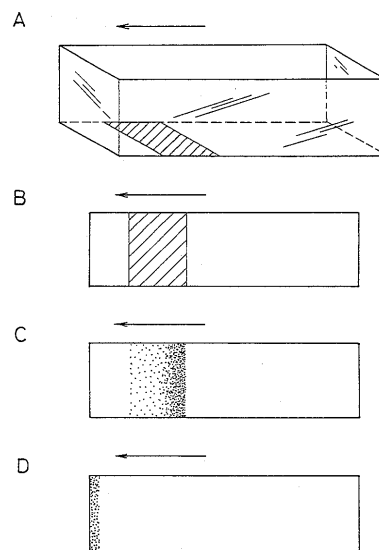
【図5】表面に溝が設けられ、該溝の底面が特異的結合物質により帯状に被覆されている板状体を示す図である。

【図6】間接凝集反応測定法により試料中の被検物質の測定を行った場合の凝集像を示す図である。

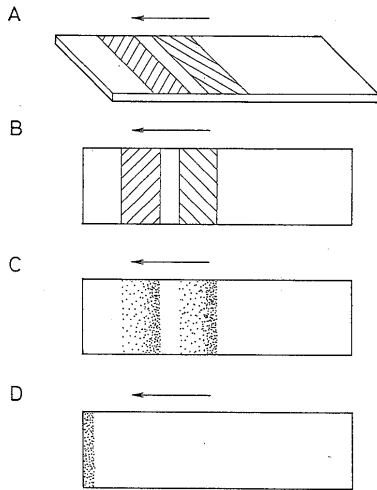
【図1】



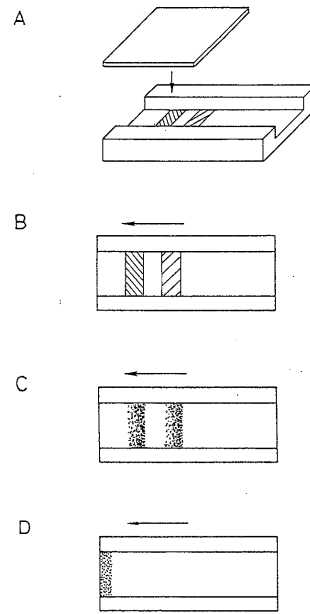
【図2】



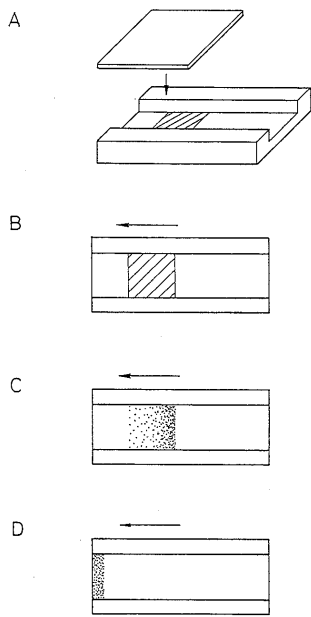
【 3 】



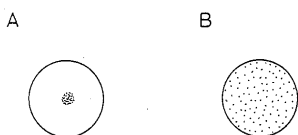
【 4 】



【 5 】



【 6 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平04 - 208836 (JP, A)
特開平07 - 191031 (JP, A)
特開平04 - 369477 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/543