

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-168243

(P2023-168243A)

(43)公開日 令和5年11月24日(2023.11.24)

(51)国際特許分類

G 0 1 N 33/545 (2006.01)

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/545 A

G 0 1 N 33/545 B

G 0 1 N 33/543 5 8 3

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全26頁)

(21)出願番号 特願2023-66556(P2023-66556)
 (22)出願日 令和5年4月14日(2023.4.14)
 (31)優先権主張番号 特願2022-79605(P2022-79605)
 (32)優先日 令和4年5月13日(2022.5.13)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(71)出願人 000001007
 キヤノン株式会社
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
 (71)出願人 594164542
 キヤノンメディカルシステムズ株式会社
 栃木県大田原市下石上1385番地
 (74)代理人 100094112
 弁理士 岡部 譲
 (74)代理人 100101498
 弁理士 越智 隆夫
 (74)代理人 100106183
 弁理士 吉澤 弘司
 (74)代理人 100136799
 弁理士 本田 亜希
 (72)発明者 掛川 法重

最終頁に続く

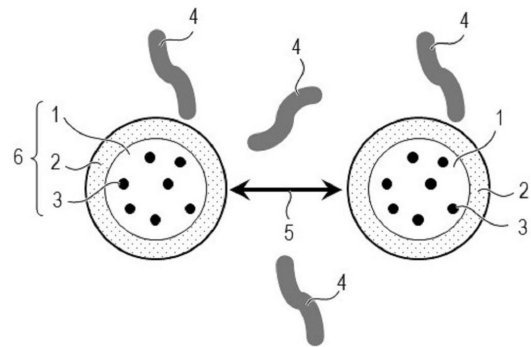
(54)【発明の名称】 偏光異方に基づく測定による解析方法、検査キット及び検査試薬

(57)【要約】

【課題】偏光異方に基づいて高感度かつ短時間で検体検査を可能とする試薬、および測定方法を提供すること。

【解決手段】標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値(R)を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析方法であって、前記標的物質を含む試料、前記発光試薬、および増感剤を混合して反応させ、反応液を得る反応工程、および前記反応液の前記Rを測定する測定工程、を有し、さらに、前記該発光試薬は発光粒子基質、および該発光粒子基質の外側の親水層、を含み、前記増感剤は親水性ポリマーを含む、ことを特徴とする解析方法を提供する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値（R）を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析方法であって、

前記標的物質を含む試料、前記発光試薬、および増感剤を混合して反応させ、反応液を得る反応工程、および

前記反応液の前記 R を測定する測定工程、

を有し、さらに、

前記発光試薬は発光粒子基質、および該発光粒子基質の外側の親水層、を含み、

前記増感剤は親水性ポリマーを含む、

ことを特徴とする解析方法。

10

【請求項 2】

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 3】

前記親水性ポリマーは分子量が 200,000 以上、2,000,000 以下であることを特徴とする請求項 1 に記載の解析方法。

20

【請求項 4】

前記発光粒子基質がユウロピウム錯体を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 5】

前記発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有することを特徴とする請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 6】

前記標的物質と反応していない前記発光試薬について測定される前記 R を R₀ としたとき、R₀ = 0.001 であることを特徴とする請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 7】

前記 R が下記式（1）の r で定められることを特徴とする請求項 1 に記載の解析方法。

30

【数 1】

$$r = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2 * G * I_{VH}} \quad (1)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

（式（1）中、

I_{VV}・・・第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度

40

I_{VH}・・・第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度

I_{HV}・・・第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度

I_{HH}・・・第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度

G・・・補正值

である。）

【請求項 8】

50

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値（R）を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査キットであって、

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

を含む発光試薬を含む第1の試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤を含む第2の試薬、
を含む検査キット。

【請求項9】

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも1つであることを特徴とする請求項8に記載の検査キット。

10

【請求項10】

前記発光粒子基質がユウロピウム錯体を含むことを特徴とする請求項8に記載の検査キット。

【請求項11】

前記発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有することを特徴とする請求項8に記載の検査キット。

【請求項12】

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値（R）を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査試薬であって、

20

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

を含む発光試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤、
を含む検査試薬。

【請求項13】

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも1つであることを特徴とする請求項12に記載の検査試薬。

30

【請求項14】

前記発光粒子基質がユウロピウム錯体を含むことを特徴とする請求項12に記載の検査試薬。

【請求項15】

前記発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有することを特徴とする請求項12に記載の検査試薬。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、偏光異方に基づく測定による解析方法、検査キット及び検査試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

医学、臨床検査の分野において、血液や採取された臓器の一部等から微量な生体成分を高感度で検出または定量することは、病気の原因、有無等を追究するために必要である。生体成分の検査手法の中でも、免疫分析は広く利用されている。多くの免疫分析においては、B/F（Bound/Free）分離と呼ばれる洗浄工程が必要である。B/F分離を必要としない免疫分析の一つに、抗原抗体反応を利用したラテックス凝集法がある。ラ

50

テックス凝集法では、標的物質に特異的に結合する抗体等を担持させたラテックス粒子と、標的物質を含み得る液体とを混合して、ラテックス粒子の凝集の程度を測定する。

【0003】

ラテックス凝集法では、標的物質がラテックス粒子に結合した標的物質に特異的な抗体に捕捉され、捕捉した標的物質を介して複数のラテックス粒子が架橋し、その結果、ラテックス粒子の凝集が起きる。つまり、生体試料等の液体試料中の標的物質の量を、ラテックス粒子の凝集の程度を評価することで定量できる。この凝集の程度は、液体試料を透過、あるいは散乱する光の量の変化を測定し、評価することで定量できる。

【0004】

ラテックス凝集法は、簡便かつ迅速に、標的物質である抗原の検出・定量評価ができる一方、生体試料等の液体試料中における抗原の量が少ないと、検出できないという検出程度の課題があった。

【0005】

標的物質の検出感度を向上させるためには、凝集の程度をより高感度に測定することが求められる。すなわち、液体試料を透過、あるいは散乱する光の量の変化を測定するシステムをより感度の高い発光特性を利用して検出・定量する方法に置き換えることが考えられる。具体的には蛍光偏光解消法を利用した検体検査方法が提案されている（特許文献1、2）。

【0006】

特許文献1では、蛍光偏光解消法の装置を臨床に用いるために改良する提案がされている。

蛍光偏光解消法では、一般的な蛍光測定法で必要とされるB/F分離を必要としない。したがって、蛍光偏光解消法を用いると、ラテックス凝集法と同様に簡便な検体検査が可能である。さらに、蛍光偏光解消法を用いると、測定プロセスが、標的物質と特異的に反応する発光物質を混合するだけで、ラテックス凝集法と同検査システムで測定することが可能であると考えられる。一方、特許文献1では、フルオレセイン等の単分子を発光材料に用いることを提案していて、原理的に薬物や低分子の抗原等にしか適用ができなかった。

【0007】

特許文献2は、特許文献1の課題であった、薬物や低分子の抗原等にしか蛍光偏光解消法が適用されないという点を解消した。すなわち、特許文献2では、タンパク質等の高分子に蛍光偏光解消法を適用することを目的とし、発光材料としてラテックス粒子に長寿命の発光特性を有する色素を吸着した材料を用いることを提案する。特許文献2では、蛍光偏光解消法の原理から、粒径が大きくなることに伴う液中の物質の回転ブラウン運動の低下と、発光寿命の長さのバランスをとることで、高分子の物質の定量を提案している。しかし、特許文献2では、蛍光物質をラテックス粒子合成後に粒子に担持させるため、粒子表面近傍に吸着した蛍光物質同士の相互作用等により、検査用粒子の偏光異方性を安定して決定することが難しい。さらに特許文献2では、非特異吸着を抑制するために、粒子は表面に生体分子であるウシ血清アルブミン(BSA)を担持するため、粒度分布が広いことや、タンパク質であるBSAによって、ロット間にばらつきが生じる可能性があった。そのため、標的物質の濃度が $\mu\text{g}/\text{mL}$ オーダーでの測定となり、測定感度の上でラテックス法と大きな差がない。

【0008】

また、偏光蛍光解消法で高感度測定を行う場合は、標的物質の量に応じて反応させる蛍光試薬の量を調整する必要がある。標的物質との反応の後、未反応の蛍光試薬が多く含まれると、全体として蛍光異方に関する値の変化が小さく観察されてしまうためである。一方、標的物質とリガンドの反応の結合速度は限界があり、凝集反応は蛍光試薬と抗体の拡散速度に依存する。つまり、反応液中の標的物質または蛍光試薬の濃度が低い場合、反応に要する時間がかかり、一定時間内で標的物質を高感度で検出することが難しい。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特公平3-52575号公報

【特許文献2】特許第2893772号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、このような背景技術に鑑みてなされたものであり、偏光異方に基づいて短時間かつ高感度な検体検査を可能とする、粒子を用いた試薬と解析方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は一実施形態として、標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値(R)を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析方法であって、

前記標的物質を含む試料、前記発光試薬、および増感剤を混合して反応させ、反応液を得る反応工程、および

前記反応液の前記Rを測定する測定工程、

を有し、さらに、

前記発光試薬は発光粒子基質、および該発光粒子基質の外側の親水層、を含み、

20

前記増感剤は親水性ポリマーを含む、

ことを特徴とする解析方法を提供する。

【0012】

また、本発明は一実施形態として、標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値(R)を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査キットであって、

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

を含む発光試薬を含む第1の試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤を含む第2の試薬、

30

を含む検査キットを提供する。

【0013】

また、本発明は一実施形態として、標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値(R)を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査試薬であって、

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

を含む発光試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤、

を含む検査試薬を提供する。

40

【発明の効果】

【0014】

本発明に係る解析方法によると、粒子の凝集・分散の挙動に対応し、偏光発光の異方性的変化を高感度に検出することができ、更に増感剤の効果で短時間での解析が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の実施形態に係る解析方法を説明する概略図である。

【図2】CRP抗原濃度を、本発明の実施形態に係る解析方法を用いて定量した結果を説明する図である。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 1 6 】

以下、本発明の好適な実施形態について、詳細に説明するが、本発明の範囲を限定するものではない。

本発明は実施形態の一として以下の解析方法を提供する。

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値（R）を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析方法であって、

前記標的物質を含む試料、前記発光試薬、および増感剤を混合して反応させ、反応液を得る反応工程、および

前記反応液の前記Rを測定する測定工程、

10

を有し、さらに、

前記発光試薬は発光粒子基質、および該発光粒子基質の外側の親水層、を含み、

前記増感剤は親水性ポリマーを含む、

ことを特徴とする解析方法。

【 0 0 1 7 】

（偏光異方に関する値）

本実施形態において、偏光異方に関する値（Rと示すことがある）は以下のように定められる。すなわち、発光物質に偏光を照射して励起して生じた発光について、照射した偏光に対して平行方向の偏光成分の発光強度と、垂直方向の偏光成分の発光強度の関係を示す値である。より具体的には、Rとは、発光物質を、ある偏光で励起したとき、その偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度を求め、これに由来して算出される値である。さらには、第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度と、第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度の差と、これらの和との割合を示す値である。ただし、Rは第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度と第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度の割合、及びその他定数で補正されてもよい。偏光異方に関する値は、偏光異方性、偏光度等と称される値を含む。

20

【 0 0 1 8 】

より具体的には、例えば、Rは、下記式（1）のrとすることができる。

30

【数1】

$$r = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2 * G * I_{VH}} \quad (1)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

（式（1）中、

I_{VV} ・・・第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度

I_{VH} ・・・第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度

40

I_{HV} ・・・第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度

I_{HH} ・・・第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度

G・・・補正值

である。）

【 0 0 1 9 】

また、Rは、下記式（2）のr'とすることができる。

【数2】

50

$$r' = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + G * I_{VH}} \quad (2)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

各記号については式(1)に同じである。

【0020】

Rの測定の場合は、例えば、温度0以上50以下の液中で、該液体の粘度は0.5 mPa・s以上50 mPa・s以下であることが好ましい。発光試薬がユウロピウム錯体を含む粒子である場合、発光試薬の濃度を0.001 mg/ml以上0.1 mg/ml以下として測定することが好ましく、また、励起波長が500 nm以上700 nm以下であることが好ましい。

【0021】

(標的物質)

標的物質の例として、抗原、抗体、低分子化合物、各種レセプター、酵素、基質、核酸、サイトカイン、ホルモン、神経伝達物質、情報伝達物質、膜タンパク質等を挙げることができる。抗原として、アレルゲン、細菌、ウイルス、細胞、細胞膜構成成分、がんマーカー、各種疾病マーカー、抗体、血液由来物質、食品由来物質、天然物由来物質、低分子化合物を挙げられる。核酸として、細菌、ウイルス、細胞等由来のDNA、RNA、cDNA、それらの一部または断片、合成核酸、プライマー、プローブ等を挙げられる。低分子化合物としては、サイトカイン、ホルモン、神経伝達物質、情報伝達物質、膜タンパク質等とそれらのレセプター等を挙げられる。抗原としてCRP抗原、HBs抗原など、ホルモンとしてTSH抗原などが挙げられる。

本実施形態に係る解析方法によってこれらの標的物質の有無及び標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定することができる。標的物質の有無は、標的物質の濃度を所定の閾値と比較して決定できる。例えば、標的物質の濃度が所定の閾値以上である場合に標的物質がある、所定の閾値未満である場合に標的物質がない、のように決定することができる。

【0022】

(反応工程について)

反応工程において、標的物質を含む試料、発光試薬、および増感剤を混合して、反応させる。反応工程では、代表的には、標的物質とリガンドの結合が起こる。反応液は、発光試薬、標的物質、および増感剤を含んだ液であり、さらに、それ以外の添加剤などを含んでもよい。反応は、pH3.0以上pH11.0以下、温度は20以上50以下の範囲であり、反応時間は標的物質の検出濃度に応じて自由に決めて良い。標的物質、発光試薬については、後述する。

【0023】

(測定工程について)

測定工程において、反応液のRを測定する。測定の条件は、例えば、温度0以上50以下の液中で、該液体の粘度は0.5 mPa・s以上50 mPa・s以下であることが好ましい。発光試薬の濃度は0.001 mg/ml以上0.1 mg/ml以下で測定することが好ましく、また、励起波長が500 nm以上700 nm以下であることが好ましい。

【0024】

(増感剤)

本実施形態に係る増感剤は、親水性ポリマーを含む。親水性ポリマーは、好ましくは、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれ、少なくとも一種である。

【0025】

親水性ポリマーは枯渇凝集と呼ばれる物理現象によって、粒子の凝集を促進し、標的物質とリガンドの反応の反応速度を早くする効果がある。図1を用いて説明する。発光試薬間の距離5が親水性ポリマー4のコイル直径よりも広い場合は粒子の間に親水性ポリマー4は存在することができる。一方、標的物質とリガンドの反応により、発光試薬6同士が接近し、発光試薬間の距離5が親水性ポリマー4のコイル直径よりも狭くなると、発光試薬6の間に親水性ポリマー4は存在しにくくなる。その結果、発光試薬間と周辺の溶媒で濃度勾配が発生し、浸透圧の差が生まれる。この浸透圧の差によって発光試薬6同士を凝集する方向に力が働く。この力による凝集のことを枯渇凝集と呼ぶ。

【0026】

枯渇凝集を起こし、凝集反応を促進させる条件は、発光試薬6と親水性ポリマー4の間で相互作用がないことが好ましく、例えば抗原抗体反応の場合、増感剤は、発光試薬6の表面と同様に親水性であることが好ましい。また、親水性ポリマー4の分子量が大きい方が発光試薬間の距離5が広くても枯渇凝集を引き起こし易いので有利になる。

10

【0027】

枯渇凝集の現象は、親水性ポリマー4の分子量、濃度および発光試薬の大きさに依存する。発光試薬が粒子ではない、分子レベルの大きさであった、従来の偏光異方に基づく測定の場合は、枯渇凝集現象を起こすことができず、標的物質とリガンドの反応を促進することができない。また、偏光異方に基づく測定では、ブラウン回転運動が液の粘度に比例するため、親水性ポリマー4の液粘性が高すぎる、分子量が大きすぎる、添加量が多すぎるような場合、標的物質と反応（結合）していない発光試薬のRが高くなってしまふ。

20

【0028】

増感剤は、親水性であり、発光試薬と相互作用がないことが好ましく、親水性ポリマーであることが好ましい。親水性ポリマーとして、ポリビニルピロリドン、アルギン酸塩、ポリオキサゾリンが好適に用いることができる。また上記の理由から、増感剤の重量平均分子量は、10,000以上100,000,000以下程度であれば好適に用いることができる。特に好ましくは、分子量は100,000以上、5,000,000以下が好ましく、200,000以上、2,000,000以下がより好適である。

【0029】

分子量が小さ過ぎると増感作用が低下する。分子量が大き過ぎると、溶液の粘度が高くなり、標的物質とリガンドの反応が起こらなくてもRが高くなるので好ましくない。親水性ポリマーの重量平均分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）や粘度測定に基づいて、求められる。親水性ポリマーと発光試薬との相互作用は、発光試薬の親水層の成分によって親水性ポリマーを選択することで調整する。増感剤と発光試薬との相互作用を確認するために、増感剤と発光試薬のみを混合してRを測定することができる。増感剤の添加による粘性の増加の効果により、Rが高くなることが予想されるが、粘性増加の効果以上にRが高くなる、或いはRが安定しない場合は、増感剤と発光試薬そのものに、相互作用がある可能性があり、そのような場合は増感剤の種類を変更することが好ましい。

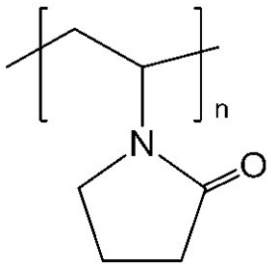
30

【0030】

本実施形態に用いられるポリビニルピロリドン（PVP）は、化学式（1）で示される繰り返し単位を有するものであれば、ホモポリマーでもコポリマーでもよい。該コポリマーとしては、具体的には、例えばポリビニルピロリドンとポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドンとポリ乳酸、ポリビニルピロリドンとポリアクリル酸などのコポリマーが挙げられる。

40

【化 1】



(式中、 n は100以上の整数である。)

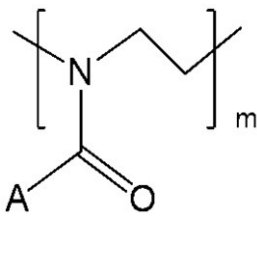
10

増感剤として用いられるPVPの分子量は100000以上、500000以下が好ましく、200000以上、200000以下がより好適である。好ましい例として、PVP-K90、PVP-130K等を挙げられるがこれらに限定されない。

【0031】

本実施形態に用いられるポリオキサゾリンは、化学式(II)で示される繰り返し単位を有するものであれば、ホモポリマーでもコポリマーでもよい。コポリマーとしては、具体的には、例えばポリオキサゾリンとポリエチレングリコール、ポリオキサゾリンとポリ乳酸、ポリオキサゾリンとポリアクリル酸などのコポリマーが挙げられる。

【化 2】



20

(化学式(II)中、 A はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基、エチル基、プロピル基を表す。 m は100以上の整数である。)

【0032】

30

本実施形態に用いられるアルギン酸、あるいは、アルギン酸塩については、より好ましくは、アルギン酸塩であり、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、などを好適に用いることができる。

【0033】

また、検査試薬と標的物質の反応後の R の測定時の濃度が0.01w/v%以上2.0w/v%以下であることが好ましい。この範囲の濃度であれば、溶液の粘度も低く、溶液の取り扱いが容易になる。増感剤の濃度が低すぎると十分な増感効果が得られにくい。増感剤の濃度が高すぎると、反応液が増粘して R が増加してしまう。具体的には溶液の粘度は0.5mPa·s以上15.0mPa·s以下であることが好ましい。この粘度範囲ならば、発光試薬の R が増粘の効果で上昇しても飽和することが無く、測定することができる。また、液の粘度が15.0mPa·sを超えてしまうと、測定プロセスにおいて、試薬の混合時に気泡が試料中に混入する可能性が高くなる。よって試薬のハンドリングの観点からも、液の粘度は15.0mPa·s以下であることが好ましい。

40

また、該濃度は、測定対象の標的物質や不溶性担体の種類により設定を変えることができる。

【0034】

(発光試薬)

本実施形態において、発光試薬は標的物質と結合し、また、発光粒子基質、および該発光粒子基質の外側(すなわち、発光試薬の表面)の親水層、を有する。

発光粒子基質は発光分子を含み、該発光分子は、特に、光の照射により励起され発光す

50

る分子であることが好ましく、ルミノールのように化学反応により発光するものは好ましくない。発光は、燐光、蛍光を含み、好ましくは燐光である。

より好ましくは、本実施形態において発光粒子基質は、ユウロピウム錯体を含む。

発光試薬の表面の親水層は、好ましくは、親水性のポリマーを含む。

【0035】

発光試薬は好ましくは標的物質と結合するリガンドを有する。リガンドとは、特定の標的物質に特異的に結合する化合物のことである。リガンドは特定の物質にアフィニティーを示すものであれば、あらゆるものを用いることができる。リガンドと標的物質あるいは標的物質とリガンドの組み合わせの例として以下を挙げることができる。すなわち、抗原と抗体、低分子化合物とそのレセプター、酵素と基質、相補的核酸同士を挙げることができる。さらに、抗体と、それに特異的な、アレルゲン、細菌、ウイルス、細胞、細胞膜構成成分、がんマーカー、各種疾病マーカー、抗体、血液由来物質、食品由来物質、天然物由来物質、あらゆる低分子化合物等を挙げることができる。さらには、レセプターと、それに特異的な、低分子化合物、サイトカイン、ホルモン、神経伝達物質、情報伝達物質、膜タンパク質等を挙げることができる。さらには、細菌、ウイルス、細胞等由来のDNA、RNA、cDNA、それらの一部または断片、合成核酸、プライマー、プローブ等と、それらに相補性を有する核酸等を挙げることができる。上記以外においても、アフィニティーを有することが知られる組合せであれば、あらゆるものが、標的物質とリガンドの組合せとして用いられる。本実施形態におけるリガンドは典型的には、抗体、抗原、および核酸のいずれかを挙げられる。

10

20

【0036】

発光試薬は図1で、発光試薬6で示され、ユウロピウム錯体3を含む粒子基質1、粒子基質の外側の親水層2、および標的物質と結合するリガンド(不図示)を有する。図1中の発光試薬は粒子の形状をしており、当該粒子の直径は25nm以上500nm以下である。

【0037】

本実施形態に用いられる発光試薬は、粒度分布が小さく、粒子の表面が親水性に被覆されていることが好ましい。該粒子内部には、ユウロピウム錯体3が存在する。

【0038】

粒子の直径は動的光散乱法により求めることができる。溶液中に分散している粒子にレーザー光を照射し、その散乱光を光子検出器で観測すると、粒子はブラウン運動によりその位置を絶えず移動しているため、散乱光の干渉による強度分布は絶えず揺らいでいる。動的光散乱法は、このブラウン運動の様子を散乱光強度の揺らぎとして観測する測定法である。時間に対する散乱光の揺らぎを自己相関関数で表し、並進拡散係数を決定する。決定した拡散係数からストークス径を求めて、溶液中に分散している粒子サイズを導き出せる。

30

【0039】

発光試薬は、粒子の均一性と単分散性を保つという観点からは、粒子の表面に何も付与しないことが望ましい。しかし、本実施形態に係る解析方法に用いるためには、目的以外の物質が粒子に非特異吸着することを防ぐ必要があるため、発光試薬の表面を親水性に保つため、表面に親水層を有する。

40

【0040】

表面の親水層としては、親水性を保つ手法として、粒子の表面にBSAを担持する方法が汎用されるが、この方法はロットばらつきを生じる場合がある。そこで、発光試薬は、親水性のポリマーを有する親水層を含むことが好ましい。発光試薬の濃度は、反応液中、好ましくは0.000001質量%以上1質量%以下、より好ましくは0.00001質量%以上0.001質量%以下である。

【0041】

本実施形態に用いられる発光試薬は、ユウロピウム錯体を含むことで、長寿命のりん光を発光することができる。本実施形態に用いられる発光試薬が粒子の形状をしている場合

50

、好ましくは、粒子の直径の平均である平均粒子径が 25 nm 以上 500 nm 以下であり、より好ましくは、平均粒子径は 50 nm 以上 300 nm 以下である。平均粒子径が 500 nm を超えると、凝集前の偏光異方性が高くなり、凝集反応後の偏光異方性との差が小さくなってしまふ。また、平均粒子径が 25 nm 未満では、凝集前後の大きさの変化が小さくなり、りん光の発光偏光解消では R の変化を捉えることが難しくなる。

【0042】

発光試薬の粒度分布を小さくすることと、発光分子としてユウロピウム錯体を導入することで、粒子の液中での分散状態にわずかな変化が起きたとしても、偏光発光特性の変化を捉えることができる。具体的には、溶液中の標的物質の濃度が 1 mL 当たりナノグラム～ピコグラム程度であったとしても、標的物質を介して発光試薬が凝集したときに、発光試薬の回転ブラウン運動の変化を偏光異方の変化として捉えることができる。

10

【0043】

偏光発光とは、遷移モーメント（遷移双極子モーメント）に異方性がある発光材料において、その遷移モーメントに沿った偏光を励起光とすると、発光も同様に遷移モーメントに沿った偏光となることをいう。ユウロピウム錯体は、配位子から中心金属イオンへのエネルギー移動に基づいた蛍光発光を示すため、遷移モーメントは複雑になるが、最低励起状態 5D0 から 7F2 への電子遷移に由来する 610 nm 付近における赤色発光は偏光発光する。

【0044】

偏光異方の原理は偏光発光が起きている時間内における発光材料の回転運動による遷移モーメントのズレを計測するものである。発光材料の回転運動は式（3）で表せる。

20

$$Q = 3V / kT \cdots (3)$$

ここで、

Q：材料の回転緩和時間

V：材料の体積

：溶媒の粘度

k：ボルツマン定数

T：絶対温度

である。

材料の回転緩和時間は、 $\cos = 1/e$ となる角度（ 68.5° ）を分子が回転するのに要する時間である。

30

【0045】

式（3）より、発光材料の回転緩和時間は材料の体積、つまり発光材料が粒子形状である場合、粒径の 3 乗に比例することがわかる。一方、発光材料の発光寿命と偏光異方に関する値である偏光度の関係は式（4）で表せる。

$$p_0 / p = 1 + A (/ Q) \cdots (4)$$

ここで、

p_0 ：材料が停止しているとき（ $Q =$ ）の偏光度

p：偏光度

A：定数

：材料の発光寿命

Q：回転緩和時間

である。

40

【0046】

式（3）および式（4）より、偏光度には発光材料の発光寿命と回転緩和時間、すなわち発光材料の体積（粒径）が影響し、すなわち、発光材料の粒径と発光寿命のバランスが影響することが分かる。

【0047】

式（4）で示した発光材料の偏光度を実験から求める場合、発光材料に偏光を入射し、励起光の進行方向および振動方向と 90 度方向に発光を検出すればよい。この時、検出光

50

を入射光の偏光と平行と垂直方向の偏光成分に分けて検出し、例えば式(5)に示す偏光異方性を偏光異方に関する値とすればよい。

$$R(t) = (I_{\parallel}(t) - G I_{\perp}(t)) / (I_{\parallel}(t) + 2 G I_{\perp}(t)) \quad (5)$$

ここで、

$R(t)$: 時間 t における偏光異方性

$I_{\parallel}(t)$: 時間 t における励起光と平行な発光成分の発光強度

$I_{\perp}(t)$: 時間 t における励起光と垂直な発光成分の発光強度

G : 補正值、サンプル測定に使用した励起光と振動方向が 90 度異なる励起光で計測した $I_{\parallel} / I_{\perp}$ の比

である。

【0048】

つまり、適切な粒子サイズと発光寿命の範囲で有れば、標的物質との反応等による発光材料のサイズの変化を鋭敏に偏光異方性の変化として読み取ることが可能となる。すなわち、凝集していない発光材料の $r(t)$ は低く、凝集した発光材料の $r(t)$ は高く観察される。これが偏光異方の原理である。

なお、偏光異方に関する値は、 G および $2G$ で補正をしてもよいし、あるいは、 G および $2G$ を外した値としてもよい。

【0049】

(粒子基質1)

図1は、粒子形状(球状)の発光試薬6の例を示し、発光試薬6は粒子基質1を含む。図1では、発光試薬6、粒子基質1が共に球状の例を示すが、本実施形態の発光試薬6および粒子基質1の形状は限定されるものではない。粒子基質1は、ユウロピウム錯体を安定に取り込める材料であれば特に指定はないが、スチレンユニットと有機シランユニットを含む重合体であることが好ましく、特にスチレンを主成分にラジカル重合性有機シランを含む組成物を重合した重合体等が好適に用いられる。組成物中、スチレンを主成分に含むことで、後述する乳化重合法で非常に粒度分布が揃った粒子を作製することが可能であり、また、有機シランユニットを含む重合体とすることで、水溶媒中で重合体にシラノール基($Si-OH$)が生じ、粒子基質表面で互いにシロキサン結合($Si-O-Si$)を形成し、これを介して後述する親水層やリガンドを付与することができる。本実施形態に係る粒子は、粒子基質の外側にリガンドを結合できるリガンド結合官能基を有していることが好ましい。

【0050】

(親水層2)

親水層2は、粒子基質1の外側に、親水性ポリマーまたは親水性分子を含み構成されることができる。親水性ポリマーまたは親水性分子とは、親水基を含むポリマーあるいは分子であり、親水基としては、具体的には水酸基、エーテル、ピロリドン、ペタイン構造等を有する分子、ポリマーを挙げられる。親水性ポリマーとして、具体的にはポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、スルホペタインのポリマー、ホスホペタインのポリマー、グリシジル基を開環し水酸基を分子の末端に修飾したポリグリシジルメタクリル酸等を挙げられ、これらを親水層2の主成分とすることができる。あるいは、親水基を有する単分子を粒子基質1の表面にシランカップリング剤等を用いて直接付与することで親水層2としてもよい。親水層2の厚さに限定はないが、親水性を発揮できる厚さ以上に厚くする必要はない。親水層2が厚すぎるとヒドロゲルの様になり、溶媒中のイオンの影響で水和して親水層の厚さが不安定となる可能性がある。親水層2の厚さは 1 nm 以上 15 nm 以下が好適である。

【0051】

(ユウロピウム錯体3)

ユウロピウム錯体3は、発光の波長や強度が周囲の影響を受けにくく、発光が長寿命であるという特徴を有する。ユウロピウム錯体3はユウロピウム元素と配位子より構成され

10

20

30

40

50

る。発光寿命や可視の発光波長領域等を考慮し、発光色素は、ユウロピウム錯体が好ましい。ユウロピウムは一般的に0.1ms以上1.0ms以下の発光寿命を有する。この発光寿命と、式(1)より得られる回転緩和時間を適度に調整する必要がある。水分散液中のユウロピウムの場合、発光試薬の直径が50nm以上300nm以下だと、凝集前後においてRが大きく変化する。

【0052】

ユウロピウム錯体3を構成する配位子のうち、少なくとも一つは光集光機能を有した配位子である。光集光機能とは、特定の波長で励起し、エネルギー移動によって錯体の中心金属を励起する作用のことである。また、ユウロピウム錯体3を構成する配位子に - ジケトン等の配位子が存在し、水分子の配位を防いでいることが好ましい。ユウロピウムイオンに配位している - ジケトン等の配位子が、溶媒分子等へのエネルギーの移動による失活過程を抑制し、強い発光が得られる。

10

【0053】

ユウロピウム錯体3は、多核錯体であっても構わない。

また、ユウロピウム錯体の具体例として、[トリス(2-テノイルトリフルオロアセトン)ビス(トリフェニルホスフィンオキシド)ユウロピウム(III)]([Tris(2-thenoyltrifluoroacetone)(Bis(triphenylphosphineoxide))europium(III)])、[トリス(2-テノイルトリフルオロアセトン)(トリフェニルホスフィンオキシド)(ジベンジルスルホオキシド)ユウロピウム(III)]([Tris(2-thenoyltrifluoroacetone)(triphenylphosphineoxide)(dibenzylsulfoxide)europium(III)])、[トリス(2-テノイルトリフルオロアセトン)(フェナントロリン)ユウロピウム(III)]([Tris(2-thenoyltrifluoroacetone)(phenanthroline)europium(III)])が挙げられる。

20

【0054】

媒体中でユウロピウム錯体3のブラウン回転運動が停止しているとみなせる状態の時、式(3)で表される偏光異方性が0.08以上あることが望ましい。ブラウン回転運動が停止しているとみなせる状態とは、粒子の回転緩和時間がユウロピウム錯体3の発光寿命よりも十分に長い状態のことを示す。

30

【0055】

ユウロピウム錯体3は粒子基質1に多く取り込まれた方が一粒子当たりの発光強度が強くなるので好ましい。一方で、粒子基質1中でユウロピウム錯体3が凝集すると、配位子同士の相互作用によりユウロピウム錯体3の励起効率等に影響を及し、再現性を保って偏光異方性の測定することが難しくなる。粒子基質1中で非凝集的な発光挙動をユウロピウム錯体3が示しているかどうかは、試料の励起スペクトルから判断することができる。

【0056】

強い発光を有する粒子は、単に高感度計測を可能にするだけでなく、粒子径を小さくしても発光を保つので、生化学的な反応速度を早くすることを可能にする。粒径が小さいほうが液中のブラウン運動の拡散係数が大きくなるため、より短時間で反応を検出することが可能となる。

40

【0057】

(発光試薬の製造方法)

次に、本実施形態に用いられる発光試薬の製造方法の一例を説明する。

発光試薬の製造方法は、少なくともスチレンおよびラジカル重合性有機シランを含むラジカル重合性モノマー、ラジカル重合開始剤、偏光発光性ユウロピウム錯体、および、親水性ポリマーを水系媒体と混合して乳濁液を調製する工程(第一の工程)を有する。

【0058】

さらに、発光試薬の製造方法は、乳濁液を加熱し、ラジカル重合性モノマーを重合する工程(第二の工程)を有する。

50

【 0 0 5 9 】

発光試薬の製造方法は、後述するリガンド結合官能基を発光試薬表面に付与する工程（第三の工程）を有することができる。ここで、リガンド結合官能基とは、リガンドを結合できる官能基であって、具体的には、カルボキシ基、アミノ基、チオール基、エポキシ基、マレイミド基、スクシニミジル基、または、アルコキシシリル基（シリコンアルコキシド構造）のいずれかを用いることができる。

【 0 0 6 0 】

（ラジカル重合性モノマー）

発光試薬の製造は、ラジカル重合性モノマーを重合して行い、ラジカル重合性モノマーは少なくとも、スチレンおよびラジカル重合性有機シランを含む。ラジカル重合性モノマーはさらに、アクリレート系モノマー、メタクリレート系モノマーからなる群より選択される少なくとも1種のモノマーを含むことができる。モノマーとして、例えば、ブタジエン、酢酸ビニル、塩化ビニル、アクリロニトリル、メタクリル酸メチル、メタクリロニトリル、アクリル酸メチル、これらの混合物等を挙げることができる。すなわち、これらのモノマーのうち、1種であるいは複数種を、スチレンおよびラジカル重合性有機シランに加えて使用できる。また一つの分子内に二重結合を2つ以上有するモノマー、例えばジビニルベンゼンを架橋剤として用いてもよい。

【 0 0 6 1 】

ラジカル重合性モノマーが、ラジカル重合性有機シランを含むことで、粒子基質1には、シロキサン結合が付与される。ラジカル重合性有機シランの例として、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、p-スチリルトリメトキシシラン、3-メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、3-メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、3-メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、あるいはこれらの組合せを挙げることができる。ラジカル重合性有機シランを用いることで、粒子基質1内に無機酸化物の骨格が形成され、発光試薬の物理、化学的安定性を向上する役割がある。さらに、ラジカル重合性有機シランを用いることで、粒子基質1と、親水層2やリガンド結合官能基との親和性が高まる。

【 0 0 6 2 】

さらに、ラジカル重合性モノマーが、ラジカル重合性有機シランを含むことで、粒子基質1の表面にシラノール基が付与される。シラノール基と親水性ポリマー、例えばPVPは水素結合を形成する。これによって、PVP等の親水性ポリマーはより強固に粒子基質1の表面に吸着する。

【 0 0 6 3 】

（ラジカル重合開始剤）

ラジカル重合開始剤としては、アゾ化合物、有機過酸化物等から広く使用することができる。具体的には、2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオン酸)ジメチル、tert-ブチルヒドロペルオキシド、過酸化ベンゾイル、過硫酸アンモニウム(APS)、過硫酸ナトリウム(NPS)、過硫酸カリウム(KPS)等を挙げることができる。

【 0 0 6 4 】

（親水性ポリマー）

発光試薬は親水層として、親水性ポリマーを含むことができる。親水性ポリマーは、非特異吸着を抑制することが好ましい。親水性ポリマーの例として、エーテル、ペタイン、ピロリドン環等を有するユニットを含む親水性ポリマーを挙げられる。親水層は、合成した発光試薬に含まれ、主に粒子基質の外側の粒子表面に存在することが好ましい。本明細書中において、ピロリドン環を有するポリマーを、「PVP」と略す場合がある。発光試薬の合成時にPVPを投入することにより、発光試薬に非特異吸着抑制能と、リガンド結

10

20

30

40

50

合能を一度に付与することが可能となる。合成時に投入されるPVPは、ラジカル重合性モノマーよりも親水性が高いので、合成時に溶媒と重合中の粒子基質との界面に存在する。粒子基質1は、重合時にPVPを一部巻き込むことや、ピロリドン環とスチレン（ラジカル重合性モノマー）との相互作用等の物理・化学吸着によって、その外側にPVPを吸着する。

【0065】

PVPの分子量は10000以上100000以下が好ましく、40000以上70000以下がより好適である。分子量が10000未満だと、発光試薬の表面の親水性が弱く、非特異吸着を起こし易くなる。分子量が100000より大きいと、親水層が厚くなりすぎて、ゲル化して扱いにくくなる。

10

【0066】

PVPに加えて、粒子基質合成時に保護コロイドとして親水性ポリマーを添加しても構わない。

【0067】

また、発光試薬は、好ましくはA2 - A1 0.1を満たす。

A1、A2は次のように定義される。すなわち、15倍希釈したヒト血清16μLを混合した60μLの緩衝液に、0.1重量%の発光試薬の分散液30μLを添加した混合物の、添加の直後の吸光度をA1とし、前記添加後37℃にて5分間放置した後の吸光度をA2とする。吸光度は光路10mm、波長572nmで測定される。

A2 - A1が0.1以下となる粒子は、血清中の夾雑物の非特異吸着が小さいため、好ましい。

20

【0068】

（水系媒体）

上述の発光試薬の製造方法に用いられる水系媒体（水溶液）は、媒体中に含まれる水が80重量%以上100重量%以下であることが好ましい。水系溶媒は、水や、水に可溶な有機溶媒が好ましく、例としてメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン水を水に混合した溶液を挙げられる。水以外の有機溶媒を20重量%より多く含有させると、粒子製造時に重合性モノマーの溶解が生じるおそれがある。

【0069】

また上記水系媒体は、pHが6以上9以下に予め調整されていることが好ましい。pHが6未満または9より大きい値であると、ラジカル重合性有機シランのアルコキシド基やシラノール基が重合体の形成前に縮重合や他の官能基と反応してしまい、得られる粒子が凝集するおそれがある。本実施形態においては、重合前にアルコキシドを意図的に縮重合することは行わない。

30

【0070】

上記pHの調整は、pH緩衝剤を用いて行うことが好ましいが、酸、塩基で調製しても構わない。

【0071】

そのほかに、界面活性剤、消泡剤、塩、増粘剤等を水系媒体に対して10%以下の割合で添加して用いても構わない。

40

【0072】

発光試薬の製造の際には、はじめにpHが6以上9以下に調整された水系媒体にPVPを溶解することが好ましい。PVPの含有量は水系媒体に対して0.01重量%以上10重量%以下が好ましく、より好ましくは、0.03重量%以上5重量%以下である。0.01重量%未満だと、粒子基質への吸着量が少なくその効果が発現されにくい。また10重量%より多いと水系媒体の粘度が上昇し、攪拌が十分に行えない可能性がある。

【0073】

続いて、スチレン（A）およびラジカル重合性有機シラン（B）を含むラジカル重合性モノマーを上記水系媒体中に添加し乳濁液とする。スチレン（A）とラジカル重合性有機シラン（B）の重量比は、6：4から100：1である。さらに、調製した乳濁液にコウ

50

ロピウム錯体を混合する。この時、ユウロピウム錯体の溶解度が低い場合は非水溶性の有機溶媒を加えてもよい。ユウロピウム錯体とラジカル重合性モノマーの重量比は 1 : 1 0 0 0 から 1 : 1 0 である。

【 0 0 7 4 】

スチレン (A) とラジカル重合性有機シラン (B) の重量比が 6 : 4 より小さいと、粒子全体の比重が上がり、粒子の沈降が顕著となるおそれがある。また、PVP と発光粒子の密着性を上げるためには、スチレン (A) とラジカル重合性有機シラン (B) の重量比を 1 0 0 : 1 以上とすることが望ましい。

【 0 0 7 5 】

水系媒体の重量とラジカル重合性モノマーの合計量の重量比は、5 : 5 から 9 . 5 : 0 . 5 が好ましい。水系媒体の重量とラジカル重合性モノマーの合計量の重量比が 5 : 5 より小さいと生成される粒子の凝集が顕著となるおそれがある。また、水系媒体の重量とラジカル重合性モノマーの合計量の重量比が 9 . 5 : 0 . 5 より大きいと、粒子の生成には問題ないが、生成量が少なくなるおそれがある。

【 0 0 7 6 】

ラジカル重合開始剤は、水、緩衝剤等に溶解させて用いる。スチレン (A) 、ラジカル重合性有機シラン (B) の合計の重量に対するラジカル重合開始剤は、乳濁液において 0 . 5 質量 % 以上 1 0 質量 % 以下の間で用いることができる。

【 0 0 7 7 】

上記乳濁液を加熱する工程は、乳濁液全体が均一に加熱されればよい。加熱温度は、5 0 以上 8 0 以下、加熱時間は 2 時間以上 2 4 時間以下の間で任意に設定できる。乳濁液を加熱することにより、ラジカル重合性モノマーが重合される。

【 0 0 7 8 】

発光試薬は、リガンド結合官能基を表面に有することができる。リガンド結合官能基は、抗体、抗原、酵素等を結合できる官能基であれば特に限定はないが、例えば、カルボキシ基、アミノ基、チオール基、エポキシ基、マレイミド基、スクシニミジル基、シリコンアルコキシド基等であること、あるいはこれらの官能基を含むことができる。例えば、リガンド結合官能基を有するシランカップリング剤と、合成した粒子を混合することで、官能基を粒子表面に付与することが可能である。具体的には、カルボキシ基を有するシランカップリング剤の水溶液を用意して、合成した粒子分散液に混合することで、粒子表面にカルボキシ基を付与することができる。この時、反応溶液に Tween 2 0 等の分散剤を添加してもよい。反応温度は、0 以上 8 0 以下、反応時間は 1 時間以上 2 4 時間以下の間で任意に設定できる。急激なシランカップリング剤の縮合反応を抑えるために、2 5 程度の室温からそれ以下の温度で、3 時間以上 1 4 時間以下の反応時間で設定することが好適である。リガンド結合官能基によっては酸、またはアルカリの触媒を添加して、粒子表面への反応を促進させることもできる。

【 0 0 7 9 】

発光試薬に各種の抗体等のリガンドを結合させることで、検体検査用粒子として利用することができる。親水層 2 に存在する官能基を利用して目的の抗体等を結合させるための最適な手法を選択すればよい。

【 0 0 8 0 】

(リガンドの導入)

リガンド結合官能基とリガンドとを化学結合する化学反応は、本発明の目的を達成可能な範囲において、従来公知の方法を適用することができる。また、リガンドをアミド結合させる場合は、1 - [3 - (ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド] 等の触媒を適宜用いることができる。

【 0 0 8 1 】

本実施形態に用いられる発光試薬は、臨床検査、生化学研究等の領域において広く活用されている免疫ラテックス凝集測定法に好ましく適用できる。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

(検査試薬)

本発明はさらなる実施形態として、

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値 (R) を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査試薬であって、

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

を含む発光試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤、

を含む検査試薬を提供する。

10

本実施形態の検査試薬において、好ましくは、親水性ポリマーは、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも1つであり、また、分子量が200,000以上、2,000,000以下である。好ましくは、発光分子がユウロピウム錯体である。好ましくは発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有する。また、好ましくは、標的物質と反応していない発光試薬について測定される前記RをR0としたとき、R0 = 0.001である。

本実施形態における検査試薬は、体外診断における試料中の標的物質の解析に用いられる。

【0083】

20

検査試薬は、発光試薬と、増感剤と、さらに分散媒とを有することができる。検査試薬中に含有される本実施形態に係る発光試薬の量は、0.000001質量%以上20質量%以下が好ましく、0.0001質量%以上1質量%以下がより好ましい。本実施形態における検査試薬中に含有される本実施形態に係る親水性ポリマー増感剤の量は0.01w/v%以上2.0w/v%以下であることが好ましい。本実施形態に係る検査試薬は、本発明の目的を達成可能な範囲において、本実施形態に係る発光試薬の他に、添加剤やブロッキング剤等の第三物質を含んでも良い。添加剤やブロッキング剤等の第三物質は2種類以上を組み合わせ含んでも良い。本実施形態において用いる分散媒の例としては、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液、アンモニア緩衝液等の各種緩衝液が例示されるが、本実施形態における検査試薬に含まれる分散媒はこれらに限定されない。本実施形態における検査試薬は、各成分が独立して存在する検査試薬を保存しておいても構わない。各成分が独立して存在する検査試薬を、測定時に混合することで、検体検査に必要な成分が含まれた検査試薬を調製することができる。

30

【0084】

本実施形態における検査試薬を、検体中の抗原または抗体の検出に用いる場合は、リガンドは、抗体または抗原を用いることができる。

【0085】

(検査キット)

本発明はさらなる実施形態として、

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値 (R) を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査キットであって、

40

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

を含む発光試薬を含む第1の試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤を含む第2の試薬、

を含む検査キットを提供する。

【0086】

本実施形態の検査試薬において、好ましくは、親水性ポリマーは、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸

50

リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも1つであり、また、分子量が200,000以上、2,000,000以下である。好ましくは、発光分子がユウロピウム錯体である。好ましくは発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有する。また、好ましくは、標的物質と反応していない発光試薬について測定される前記RをR0としたとき、R0 = 0.001である。

本実施形態における検査キットは、体外診断における試料中の標的物質の解析に用いられる。

【0087】

第1の試薬、および第2の試薬は、それぞれ、分散媒を有することができる。本実施形態に係る検査試薬は、本発明の目的を達成可能な範囲において、本実施形態に係る発光試薬の他に、添加剤やブロッキング剤等の第三物質を含んでも良い。添加剤やブロッキング剤等の第三物質は2種類以上を組み合わせ含んでも良い。本実施形態において用いる分散媒の例としては、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液、アンモニア緩衝液等の各種緩衝液が例示されるが、本実施形態における検査試薬に含まれる分散媒はこれらに限定されない。

10

【0088】

第1の試薬、第2の試薬は、標的物質を含む試料と混合して、偏光異方に関する値(R)を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる。混合の順番は問わず、本キットの第2の試薬は、第1の試薬に混合して用いてもよいし、標的物質を含む試料に混合して用いてもよいし、あるいは、標的物質を含む試料と、第1の試薬を混合してから、第2の試薬を混合して用いてもよい。

20

【0089】

混合された液において、発光試薬の量が、0.000001質量%以上20質量%以下が好ましく、0.0001質量%以上1質量%以下となるように、第1の試薬の濃度は調整されていることが好ましい。また、混合された液において、増感剤の量は0.01w/v%以上2.0w/v%以下となるように、第2の試薬の濃度は調整されていることが好ましい。

【0090】

検査キットは、さらに、第1の試薬または第2の試薬を含む容器、およびこれらを内包する筐体を有することができる。第1の試薬、第2の試薬は、それぞれ、適宜希釈されてよく、また、検査キットは、さらに、陽性コントロール、陰性コントロール、希釈液等を備えても良い。陽性コントロール、陰性コントロールの媒体として、測定しうる標的物質が含まれていない血清、生理食塩水その他、溶剤を用いても良い。

30

【実施例】

【0091】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

【0092】

(1) 発光粒子の作製

pH7のMES(2-モルホリノエタンスルホン酸)緩衝液(キシダ化学社製)にポリビニルピロリドン(PVP-K30:東京化成工業社製)を溶解して溶媒Aを調製した。ユウロピウム錯体である[トリス(2-テノイルトリフルオロアセトン)ビス(トリフェニルホスフィンオキシド)ユウロピウム(III)]([Tris(2-thenoyltrifluoroacetone)(Bis(triphenylphosphine oxide))europium(III)]) (セントラルテクノ株式会社製、以下「Eu(TTA)₃(TPPO)₂」と略)、スチレンモノマー(キシダ化学社製)、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン(東京化成工業社製、以下「MPS」と略す。)を混合して反応液Bを調製した。溶媒Aを含む4つ口フラスコ中に、反応液Bを添加してメカニカルスターラーを300rpmに設定して攪拌を行った。窒素フロー条件下

40

50

で15分攪拌後、用意していた油浴の温度を70 に設定してさらに15分窒素フローを行った。混合液を加熱攪拌後、過硫酸カリウム（以下、「KPS」と略す。）（アルドリッチ社製）を溶解した水溶液を反応溶液内に加えて20時間乳化重合を行った。重合反応後、得られた懸濁液を分画分子量100Kの限外ろ過膜を用いて約4Lのイオン交換水で限外ろ過を行い生成物の洗浄を行い発光粒子の分散液を得た。

【0093】

乳化重合により得られた発光粒子の分散液を分取してTween20（キシダ化学社製）が1質量%溶解している水溶液に添加した。10分間攪拌後、シランカップリング剤、X12-1135（信越化学工業社製）を添加して一晩攪拌した。攪拌後、分散液を遠心分離し、上清を除去して沈殿物を純水で再分散した。遠心分離と再分散の作業を3回以上 10
 行い、生成物を洗浄した。洗浄後の沈殿物を純水に再分散させた。以上により粒子1~8にはリガンド結合官能基が導入された。仕込んだ粒子、純水、X12-1135の質量比は、1:300:2とした。

【0094】

（抗CRP抗体を有する発光試薬の作製）

合成した発光粒子に相当する1.2wt%の粒子分散液を0.25mL分取し、1.6mLのpH6.0のMES緩衝液で溶媒を置換した。粒子MES緩衝液に、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスルホスクシンイミドナトリウムを0.5wt%添加し、25℃で1時間反応させた。反応後、分散液をpH5.0のMES緩衝液で洗浄し、抗CRP抗体を100μg/mL添加し、 20
 25℃で2時間抗CRP抗体を粒子に結合させた。結合後、粒子をpH8のTris緩衝液で洗浄した。反応後、粒子をリン酸緩衝液で洗浄し、0.3wt%濃度の抗CRP抗体修飾発光試薬（アフィニティー粒子ともいう）を得た。

【0095】

（抗TSH抗体を有する発光試薬の作製）

合成した発光粒子に相当する1.2wt%の粒子分散液を0.25mL分取し、1.6mLのpH6.0のMES緩衝液で溶媒を置換した。粒子MES緩衝液に、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスルホスクシンイミドナトリウムを0.5wt%添加し、25℃で1時間反応させた。反応後、分散液をpH5.0のMES緩衝液で洗浄し、抗TSH抗体を100μg/mL添加し、 30
 25℃で2時間抗TSH抗体を粒子に結合させた。結合後、粒子をpH8のTris緩衝液で洗浄した。反応後、粒子をリン酸緩衝液で洗浄し、1.0wt%濃度の抗TSH抗体修飾発光試薬（アフィニティー粒子ともいう）を得た。使用した抗TSH抗体はモノクロナール抗体であり、測定物であるTSH抗原に少なくとも2個以上粒子を反応させるため、2種類の抗TSH抗体を発光粒子に修飾した。

【0096】

粒子に抗体が結合していることは、抗体を加えた緩衝液中の抗体濃度の減少量をBCAアッセイで測定することで確認した。

【0097】

（発光試薬液の調製）

得られた発光試薬を、0.1mg/mLの濃度になる様にpH7.4のリン酸（PBS）緩衝液で希釈して発光試薬液を調製した。 40

【0098】

（希釈液の調製）

4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）緩衝液とPBS緩衝液を体積比で1:1の割合で混合し、適宜、増感剤を添加して、希釈液とした。添加した増感剤の種類と量は後述の実施例で示す。

【0099】

標的物質とリガンドの反応（抗原抗体反応）

HEPES緩衝液にCRP抗原を混合した液を調製し、37℃の温度に加温した。調製 50

励起光 340 nm の LED 光源を用意し、偏光フィルタ（シグマ光機社製、NSPFU - 30C）およびショートパスフィルタ（エドモント・オプティクス社製、84 - 706）を光路に差し込み、1 cm の石英角セルに照射できる光学系をセットした。入射光と 90° の方向に偏光フィルタ（ソーラボ社製、PIVISC050）およびバンドパスフィルタ（ソーラボ社製、FB610 - 10）をセットした。発光は I_{VV} と I_{VH} の 2 方向を同時に測定する為、入射光と 90° 方向で偏光子の組み方を変えた 2 つのセットを用意した。偏光の検出には、オーシャンオプティクス社製の QEP *r* を用いて分光測定を行った。サンプルホルダーには温調をセットして 37 °C で計測できるようにした。偏光異方性 *r* の測定は、LED 光源を 12 mW の出力に固定し、積算時間を 3 秒として行った。測定間隔は 15 秒とした。得た偏光発光の発光スペクトルより、波長 600 nm から 630 nm の範囲における発光強度を式 (1) に当てはめて *R* とした。*R* は 2400 秒間計測し、時間と *R* の数値をプロットした。

実施例および比較例における *R* の比較は反応直後、即ち発光試薬と CRP 抗原を混合した直後の *R* (R_0) を、反応から 300 秒後の *R* (R_{300}) から差し引く $R_{300} - R_0$ を求め比較した。或いは、反応から 900 秒後の *R* (R_{900}) から、CRP 抗原を混合した直後の *R* (R_0) を差し引く $R_{900} - R_0$ を求めた。

【0111】

生成物の非特異凝集抑制評価は以下の通りに行った。

発光試薬分散液 (3 mg/mL) に、緩衝液で 15 倍に希釈したヒト血清溶液 60 μ l を添加し、37 °C で 5 分保温した。保温の前後で 527 nm の吸光度を測定し、保温前後での吸光度の変化量を 3 回測定した。表 2 に 3 回の平均値を示す。吸光度 $\times 10000$ の値の変化量が 1000 未満を非特異凝集が抑制されているとし、1000 以上を非特異凝集が起こっていると評価した。

【0112】

(性能評価)

合成した発光試薬の粒径は約 100 nm であり、340 nm の励起光で強い赤色の発光を示した。

非特異凝集抑制評価の結果、吸光度の変化が規定の数値以下であり (吸光度 $\times 10000$ の値の変化量が 1000 以下)、非特異吸着を抑制することができる粒子であることを確認した。

実施例 1 および比較例 1 の結果を図 2 に示す。

【0113】

図 2 は、横軸に反応時間、縦軸に *R* (偏光異方性 *r*) をプロットした図である。図 2 中の丸でプロットした実施例 1 は反応直後の *R* が 0.065 であり、1000 秒経過すると 0.1 まで急上昇していることがわかる。一方、図 2 中のバツ印でプロットした比較例 1 は反応直後の *R* が 0.056 であるが、1000 秒後の *R* は 0.064 程度であり、*R* は反応時間と共に上昇するがその差分は小さい。また、実施例 1 の試料を一晩放置した後に再測定すると *R* は、0.015 程度であった。この数値は、ゲル中での発光試薬の *R* と同じであり、偏光異方性が飽和していることを示す。図 2 からわかるように、実施例 1 の *R* は 2400 秒後に 0.113 まで上昇していて、約 40 分の反応で *R* が十分に飽和するまで反応が促進していることが判明した。

【0114】

実施例 1 ~ 6 および比較例 1 の結果を表 1 に示す。

全ての実施例および比較例において発光試薬の表面には親水性ポリマーとして PVP - K30 が存在する。すべての実施例と比較例 1 の偏光異方性の初期値、 R_0 を比較すると、比較例 1 の 0.05676 より実施例の方が高くなっている。これは、増感剤を添加したことによる液粘性の増加を反映している。しかしながら、実施例における R_0 の上昇は *R* の飽和値 (約 0.150) と比較して小さいので、十分に評価できる範囲に納まっている。また、実施例 1 の液の粘性を測定したところ 2.3 mPa \cdot s であった。表 1 より、300 秒後の偏光異方性の値 R_{300} から R_0 を差し引いた $R_{300} - R_0$ を比較する

と実施例 1, 2, 3 および比較例 1 の順に 0.0143、0.0087、0.0073、0.007 および 0.00138 となり、実施例における増感剤の効果を確認することができた。更に、表 1 より、900 秒後の偏光異方性の値 R900 から R0 を差し引いた R900 - R0 を比較すると実施例 1, 2, 3 および比較例 1 の順に 0.0377、0.0225、0.00136、0.0198 および 0.00594 となり、実施例と比較例の差が更に開いていることが確認できた。特に実施例 1 におけるアルギン酸ナトリウムを増感剤に用いた場合においては、R300 - R0 の数値が比較例の R900 - R0 よりも 2 倍以上高く、増感剤によって測定中の反応時間を三分の一以下にすることが可能であることを示している。

実施例 5 では、複数の親水性ポリマーを増感剤として用いることで、わずか 1 pM の濃度の CRP 抗原を 300 秒以内で十分に検出可能であることを示している (R300 - R0 = 0.00601)。実施例 6 では、CRP とは別の TSH 抗原抗体反応でも増感剤の効果があることを示している。また、親水性ポリマーとして、ポリオキサゾリンを用いても効果があることを示している (R300 - R0 = 0.0046)。また、実施例 6 の検討からポリオキサゾリンを差し引いて検討を行うと、偏光異方性の変化はほとんど観察することはできなかった。

【0115】

【表 1】

表1

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	比較例1
発光粒子表面に存在するポリマー	PVP-K30	PVP-K30	PVP-K30	PVP-K30	PVP-K30	PVP-K30	PVP-K30
添加した親水性ポリマー増感剤	アルギン酸ナトリウム	PVP-K90	PVP-K90	PVP1300K	アルギン酸ナトリウムおよびPEG	ポリオキサゾリン	-
添加した親水性ポリマー増感剤の量	0.1w/v%	0.2w/v%	0.4w/v%	0.1w/v%	各0.2w/v%	2.0w/v%	-
偏光異方性初期値 (R0)	0.0649	0.0620	0.0627	0.0644	0.0789	0.0803	0.05676
300秒後の偏光異方性 (R300)	0.0792	0.0707	0.0700	0.0714	0.0859	0.0849	0.05814
900秒後の偏光異方性 (R900)	0.1026	0.0845	0.0763	0.0842	-	-	0.0627
ΔR300- R0	0.0143	0.0087	0.0073	0.007	0.007	0.0046	0.00138
ΔR900- R0	0.0377	0.0225	0.0136	0.0198	-	-	0.00594

【0116】

以上より、本実施形態に係る解析方法によって、標的物質である CRP 抗原を、高感度かつ短時間で測定できたことが示された。

【0117】

本実施形態に係る解析方法を用いると、標的物質を短時間かつ高感度で計測することが可能となる。本実施形態に係る解析方法を用いると、短時間で大量に検査を行う検体検査のような応用に対して、高感度で計測をおこなう装置を実現することが可能であると考えられる。

【0118】

本実施形態の開示は以下の方法および構成を含む。

(方法 1)

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値 (R) を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析方法であって、

前記標的物質を含む試料、前記発光試薬、および増感剤を混合して反応させ、反応液を

得る反応工程、および

前記反応液の前記 R を測定する測定工程、

を有し、さらに、

前記発光試薬は発光粒子基質、および該発光粒子基質の外側の親水層、を含み、

前記増感剤は親水性ポリマーを含む、

ことを特徴とする解析方法。

(方法 2)

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも 1 つであることを特徴とする方法 1 に記載の解析方法

10

(方法 3)

前記親水性ポリマーは分子量が 200,000 以上、2,000,000 以下であることを特徴とする方法 1 または方法 2 に記載の解析方法。

(方法 4)

前記発光粒子基質がユウロピウム錯体を含むことを特徴とする方法 1 から方法 3 のいずれかに記載の解析方法。

(方法 5)

前記発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有することを特徴とする方法 1 から方法 4 に記載の解析方法。

20

(方法 6)

前記標的物質と反応していない前記発光試薬について測定される前記 R を R0 としたとき、R0 = 0.001 であることを特徴とする方法 1 から方法 5 のいずれかに記載の解析方法。

(方法 7)

前記 R が下記式 (1) の r で定められることを特徴とする方法 1 から方法 6 のいずれかに記載の解析方法。

【数 3】

$$r = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2 * G * I_{VH}} \quad (1)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

30

(式 (1) 中、

I_{VV} ・・・第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度

I_{VH} ・・・第一の偏光で励起したときの、第一の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度

I_{HV} ・・・第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が直交する発光成分の発光強度

40

I_{HH} ・・・第一の偏光と振動方向が直交する第二の偏光で励起したときの、第二の偏光と振動方向が平行な発光成分の発光強度

G・・・補正值

である。)

(構成 1)

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値 (R) を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査キットであって、

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層

50

を含む発光試薬を含む第 1 の試薬、および
親水性ポリマーを有する増感剤を含む第 2 の試薬、
を含む検査キット。

(構成 2)

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも 1 つであることを特徴とする構成 1 に記載の検査キット。

(構成 3)

前記発光粒子基質がユウロピウム錯体を含むことを特徴とする構成 1 または構成 2 に記載の検査キット。 10

(構成 4)

前記発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有することを特徴とする構成 1 から構成 3 のいずれかに記載の検査キット。

(構成 5)

標的物質と結合する発光試薬を用いて、偏光異方に関する値 (R) を測定することで、前記標的物質の有無及び前記標的物質の濃度の少なくともいずれか一方を決定する解析に用いられる検査試薬であって、

発光粒子基質、および

該発光粒子基質の外側の親水層 20

を含む発光試薬、および

親水性ポリマーを有する増感剤、

を含む検査試薬。

(構成 6)

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸、ポリオキサゾリンからなる群より選ばれる少なくとも 1 つであることを特徴とする構成 5 に記載の検査試薬。

(構成 7)

前記発光粒子基質がユウロピウム錯体を含むことを特徴とする構成 5 または構成 6 に記載の検査試薬。 30

(構成 8)

前記発光試薬が前記標的物質と結合するリガンドを有することを特徴とする構成 5 から構成 7 のいずれかに記載の検査試薬。

【0119】

1 粒子基質

2 親水層

3 ユウロピウム錯体

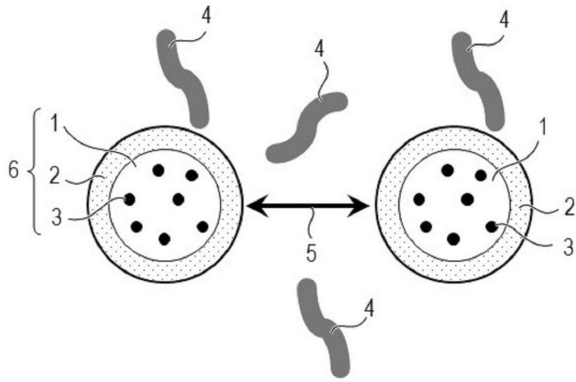
4 親水性ポリマー

5 発光試薬間の距離 40

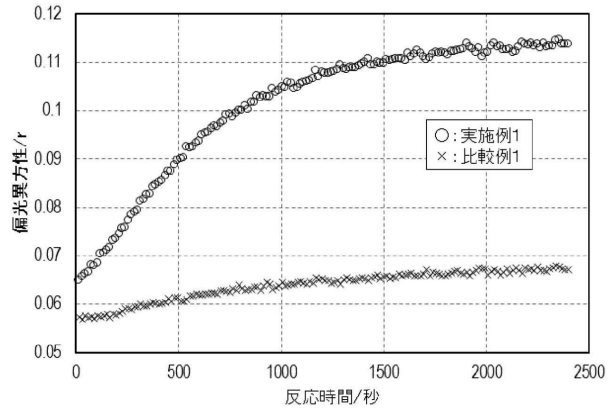
6 発光試薬

【 図面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
増村 考洋
- (72)発明者 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
山内 文生
- (72)発明者 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
金崎 健吾
- (72)発明者 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
中村 智広
- (72)発明者 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
中嶋 生朗
- (72)発明者 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
榊原 悌互
- 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内