

(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2004-3976

(P2004-3976A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/543

GO 1 N 37/00

F I

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 37/00 1 0 1

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2003-47982 (P2003-47982)  
 (22) 出願日 平成15年2月25日 (2003.2.25)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-103998 (P2002-103998)  
 (32) 優先日 平成14年4月5日 (2002.4.5)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000005821  
 松下電器産業株式会社  
 大阪府門真市大字門真1006番地  
 (74) 代理人 100072431  
 弁理士 石井 和郎  
 (74) 代理人 100117972  
 弁理士 河崎 眞一  
 (72) 発明者 河村 達朗  
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下  
 電器産業株式会社内

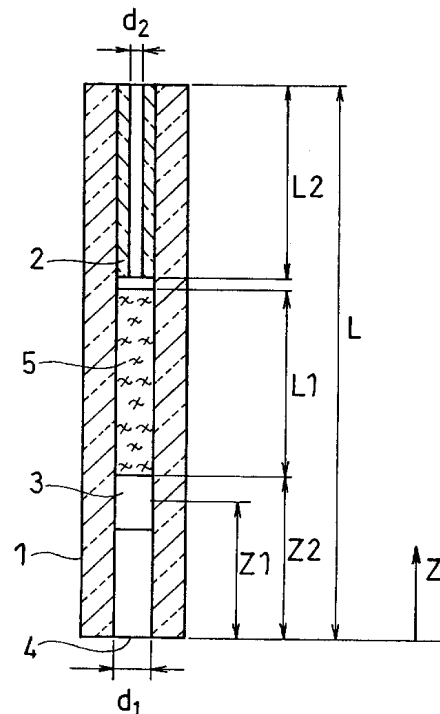
(54) 【発明の名称】 特異結合分析方法およびこれに用いるデバイス

## (57) 【要約】

【課題】 分析における感度や濃度範囲を自由に設定できる特異結合分析方法およびこれに用いるデバイスを提供する。

【解決手段】 試料が検出部を通過する速度を制御すること、および検出部に不要成分を残留させないことが可能な特異結合分析デバイスを用い、目的とする分析を最適化する。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

分析対象物を含んだ液状の試料を点着する試料点着部と、前記試料点着部と連結された毛細管現象を呈する空間形成部と、前記空間形成部内において特異結合反応に由来して得られた信号を検出し得る検出部とを具備し、前記点着された前記試料が、毛細管現象により前記空間形成部内の前記検出部に移動して特異結合反応が発生し、当該特異結合反応に由来した信号を検出することで前記分析対象物を定性または定量する特異結合分析デバイスを用い、

前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において、前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送力を大きくすることを特徴とする特異結合分析方法。

10

## 【請求項 2】

前記試料が前記検出部を通過する速度を制御することにより、前記特異結合反応が発生している時間を制御することを特徴とする請求項 1 記載の特異結合分析方法。

## 【請求項 3】

前記空間形成部の外部雰囲気に通じる部分の断面積および距離を制御することにより、前記試料が前記検出部を通過する速度を制御し、前記特異結合反応が発生している時間を制御することを特徴とする請求項 2 記載の特異結合分析方法。

## 【請求項 4】

前記空間形成部の外部雰囲気に通じる部分に第 1 の通気性部材を配置することにより、前記試料が前記検出部を通過する速度を制御し、前記特異結合反応が発生している時間を制御することを特徴とする請求項 2 記載の特異結合分析方法。

20

## 【請求項 5】

毛細管現象により発現する吸水特性を有する第 2 の通気性部材を、前記検出部よりも前記試料の移動方向の下流側に配置することにより、毛細管現象による液体輸送力を大きくすることを特徴とする請求項 4 記載の特異結合分析方法。

## 【請求項 6】

前記分析対象物と特異的に結合しかつ検出可能な標識材により標識された第 1 の特異結合物質と、前記分析対象物を結合させる工程 A、前記分析対象物と特異的に結合しかつ前記検出部に実質的に固定化された第 2 の特異結合物質と、前記分析対象物を結合させる工程 B、前記検出部で発生し前記標識材に由来して得られた信号の強度を計測する工程 C、および前記工程 C において計測された信号の強度に基づいて、前記試料中の分析対象物を定性または定量する工程 D を有することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の特異結合分析方法。

30

## 【請求項 7】

前記試料点着部に所定容量の前記試料を点着した後、前記工程 B において前記第 2 の特異結合物質と結合しなかった成分を、毛細管現象によって前記空間形成部内の前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側に移動させることを特徴とする請求項 6 記載の特異結合分析方法。

## 【請求項 8】

前記工程 C において、前記第 1 の特異結合物質と前記第 2 の特異結合物質とを前記分析対象物を介して結合させることを特徴とする請求項 6 または 7 記載の特異結合分析方法。

40

## 【請求項 9】

前記第 1 の特異結合物質を、前記試料点着部と前記検出部との間における前記空間形成部の前記試料との接触面上に保持し、前記試料が点着され湿潤状態になることによって、前記第 1 の特異結合物質を前記接触面で可動化させて前記検出部へ移動させることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の特異結合分析方法。

## 【請求項 10】

前記信号が呈色、蛍光または発光であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の特異結合分析方法。

## 【請求項 11】

50

第 1 の特異結合物質および第 2 の特異結合物質の少なくとも一方が抗体であることを特徴とする請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の特異結合分析方法。

【請求項 12】

前記標識材が金属ゾル、染料ゾル、蛍光物質を含んだ粒子または着色ラテックス粒子であることを特徴とする請求項 6 ～ 11 のいずれかに記載の特異結合分析方法。

【請求項 13】

分析対象物を含んだ液状の試料を点着する試料点着部と、前記試料点着部と連結された毛細管現象を呈する空間形成部と、前記空間形成部内において特異結合反応に由来して得られた信号を検出し得る検出部とを具備し、前記点着された前記試料が、毛細管現象により前記空間形成部内の前記検出部に移動して特異結合反応が発生し、当該特異結合反応に由来した信号を検出することで前記分析対象物を定性または定量する特異結合分析デバイスであって、

10

さらに前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送力を、前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において大きくする手段を具備することを特徴とする特異結合分析デバイス。

【請求項 14】

前記空間形成部の外部雰囲気に通じる部分に配置された第 1 の通気性部材を具備することを特徴とする請求項 13 記載の特異結合分析デバイス。

【請求項 15】

前記手段が、毛細管現象により発現する吸水特性を有し、かつ前記検出部よりも前記試料の移動方向の下流側に配置された第 2 の通気性部材であることを特徴とする請求項 13 または 14 記載の特異結合分析デバイス。

20

【請求項 16】

前記第 1 の特異結合物質を、前記試料点着部と前記検出部との間における前記空間形成部の前記試料との接触面上に保持し、前記試料が点着され湿潤状態になることによって、前記第 1 の特異結合物質を前記接触面で可動化させて前記検出部へ移動させることを特徴とする請求項 13 ～ 15 のいずれかに記載の特異結合分析デバイス。

【請求項 17】

前記空間形成部が二枚の平板と前記平板の間隔を規定するスペーサとで構成され、前記検出部が前記平板上に設けられ、前記特異結合反応に由来した信号を前記平板を介して検出することを特徴とする請求項 13 ～ 16 のいずれかに記載の特異結合分析デバイス。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の分析対象物の定性または定量分析を行う特異結合分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、家庭内および地域医療の充実や、緊急性の高い臨床検査等の増加に伴い、臨床検査の専門家でなくとも、迅速、簡便かつ正確に計測が実施できる特異結合分析方法の開発がとみに望まれるようになってきた。

40

特異結合分析方法としては、抗原抗体反応を応用したイムノアッセイ、受容体を用いたレセプターアッセイ、相補的核酸配列のハイブリダイゼーションを用いた核酸プローブアッセイなど多くの方法が知られている、これらの特異結合分析方法は、その特異性の高さから、臨床検査をはじめとする広い分野で繁用されている。

【0003】

さらに具体的には、イムノアッセイの 1 種であるクロマトグラフ分析法が挙げられる。このクロマトグラフ分析法においては、例えば、特異結合物質が不溶化された多孔性担体または微粒子充填型単体からなるマトリクスに液状試料を接触させ、液状試料がマトリクスに沿って毛細管現象による浸透力によって流出することを利用し、試料中の分析対象物の存否を分析する（日本国特許第 2504923 号および特許第 2667793 号各明細書

50

、ならびに特公平 7 - 7 8 5 0 3 号、特開平 1 0 - 7 3 5 9 2 号および特開平 8 - 2 4 0 5 9 1 号各公報)。

【0004】

具体的には、裸眼または光学的方法などにより任意に検知できる標識材によって標識された特異結合物質と分析対象物とを特異結合反応させる。そして、分析対象物と特異結合反応した特異結合物質をマトリクス上に固定化された結合材に結合させ、マトリクス上に固定された標識量に応じて、最終的に試料中の分析対象物の存否を分析するのである。

このクロマトグラフ分析法は、マトリクスにおける担体の表面積が大きいため、多量の特異結合物質を不溶化することができ、特異結合反応を引き起こしうる反応分子間の衝突頻度が液相中における反応の場合に比して大きいため、計測感度および計測時間の面から有利である。

10

【0005】

上記の従来のクロマトグラフ分析法では、マトリクスとして、毛細管現象により液体試料を展開輸送可能な吸水性材料を用いることが必要である。この吸水性材料としては、例えばガラス繊維ろ紙、セルロース膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜などが挙げられる。これらは、多孔性で 1 ~ 5 0  $\mu$ m 程度の孔径を有する孔を持つものが用いられる。

特に、ニトロセルロースは、あらかじめ増感しなくても多量の抗体のような蛋白質と結合する能力を有するため優れている。さらに、種々の孔径を有するニトロセルロースを入手することができるため、これを用いれば試料の流速を選択することも可能である。

【0006】

20

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記のようなマトリクス材料は繊維状材料からなるが、孔径および表面の親水性を再現性良く制御して生産することが難しい。この孔径の平均値および分布状況、ならびに繊維状表面の親水性は、試料の展開輸送速度、すなわち流速に大きく影響する。特異結合反応が発生している時間はこの流速に大きく依存するため、計測値も流速変化により変動する。すなわち、計測値が、マトリクス材料の特性に非常に敏感に反応するため、計測精度はマトリクス材料の製造精度に依存する。

そして、このマトリクス材料の製造精度を、定量計測の十分な精度を確保するまで向上させることは難しい。したがって、マトリクス材料の選別工程が必要になり、コストがかかるという問題があった。また、孔径の範囲やその製造精度に制限があるため、試料流速の選択幅も限られている。

30

【0007】

また、上記に対応して、広い範囲において流速を容易に制御することができ、流速の製造再現性が高い特異結合分析方法およびこれに用いる特異結合分析デバイスが、特願 2 0 0 1 - 3 2 2 4 4 7 号明細書に記載されている。しかし、特願 2 0 0 1 - 3 2 2 4 4 7 号明細書に開示されている内容では、第 2 の特異結合物質と結合しなかった成分が検出部に残留することがあり、この残留成分には、標識材が含まれていることがある。したがって、検出部におけるこの残留標識材が、検出信号に重畳されることがあった。すなわち、残留標識材に起因して、検出信号のバックグラウンドが上昇し、この結果、計測の S / N が低下することがあった。

40

【0008】

そこで、本発明は、流速の制御範囲が広くかつ流速の製造再現性が高く、さらに、検出信号のバックグラウンドの上昇を回避できる特異結合分析方法、およびこれに用いる特異結合分析デバイスを提供することを目的とする。本発明により、試料流速の選択幅を拡大することができ、また製造レベルにおいても流速を高精度に再現できる。さらに、本発明によれば、検出信号のバックグラウンドの上昇を回避できるため、高精度な特異結合分析デバイスを低コストで実現することができる。

【0009】

【課題を解決するための手段】

上記問題を解決するために、本発明は、分析対象物を含んだ液状の試料を点着する試料点

50

着部と、前記試料点着部と連結された毛細管現象を呈する空間形成部と、前記空間形成部内において特異結合反応に由来して得られた信号を検出し得る検出部とを具備し、前記点着された前記試料が、毛細管現象により前記空間形成部内の前記検出部に移動して特異結合反応が発生し、当該特異結合反応に由来した信号を検出することで前記分析対象物を定性または定量する特異結合分析デバイスを用い、前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において、前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送力を大きくすることを特徴とする特異結合分析方法を提供する。

#### 【0010】

前記特異結合分析方法においては、前記試料が前記検出部を通過する速度を制御することにより、前記特異結合反応が発生している時間を制御するのが好ましい。

10

また、前記空間形成部の外部雰囲気に通じる部分の断面積および距離を制御することにより、前記試料が前記検出部を通過する速度を制御し、前記特異結合反応が発生している時間を制御するのが好ましい。

また、前記空間形成部の外部雰囲気に通じる部分に第1の通気性部材を配置することにより、前記試料が前記検出部を通過する速度を制御し、前記特異結合反応が発生している時間を制御するのが好ましい。

なお、「空間形成部の外部雰囲気に通じる部分」とは、空間形成部において、試料点着部以外の部分であって、かつ試料が毛細管現象で輸送されるときに押し出される空気が通過できるような位置に相当する部分をいう。

#### 【0011】

20

また、毛細管現象により発現する吸水特性を有する第2の通気性部材を、前記検出部よりも前記試料の移動方向の下流側に配置することにより、毛細管現象による液体輸送力を大きくするのが好ましい。

さらに、前記特異結合分析方法は、前記分析対象物と特異的に結合しかつ検出可能な標識材により標識された第1の特異結合物質と、前記分析対象物を結合させる工程A、前記分析対象物と特異的に結合しかつ前記検出部に実質的に固定化された第2の特異結合物質と、前記分析対象物を結合させる工程B、前記検出部で発生し前記標識材に由来して得られた信号の強度を計測する工程C、および前記工程Cにおいて計測された信号の強度に基づいて、前記試料中の分析対象物を定性または定量する工程Dを有するのが好ましい。

#### 【0012】

30

また、前記試料点着部に所定容量の前記試料を点着した後、前記工程Bにおいて前記第2の特異結合物質と結合しなかった成分を、毛細管現象によって前記空間形成部内の前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側に移動させるのが好ましい。

また、前記工程Cにおいて、前記第1の特異結合物質と前記第2の特異結合物質とを前記分析対象物を介して結合させるのが好ましい。

#### 【0013】

前記第1の特異結合物質を、前記試料点着部と前記検出部との間における前記空間形成部の前記試料との接触面上に保持し、前記試料が点着され湿潤状態になることによって、前記第1の特異結合物質を前記接触面で可動化させて前記検出部へ移動させるのが好ましい。

40

前記信号は呈色、蛍光または発光であるのが好ましく、前記第1の特異結合物質および第2の特異結合物質の少なくとも一方が抗体であるのが好ましい。また、前記標識材が金属ゾル、染料ゾル、蛍光物質を含んだ粒子または着色ラテックス粒子であるのが好ましい。

#### 【0014】

さらに、本発明は、分析対象物を含んだ液状の試料を点着する試料点着部と、前記試料点着部と連結された毛細管現象を呈する空間形成部と、前記空間形成部内において特異結合反応に由来して得られた信号を検出し得る検出部とを具備し、前記点着された前記試料が、毛細管現象により前記空間形成部内の前記検出部に移動して特異結合反応が発生し、当該特異結合反応に由来した信号を検出することで前記分析対象物を定性または定量する特異結合分析デバイスであって、さらに前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送

50

力を、前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において大きくする手段を具備することを特徴とする特異結合分析デバイスに関する。

【0015】

前記特異結合分析デバイスは、前記空間形成部の外部雰囲気に通じる部分に配置された第1の通気性部材を具備するのが好ましい。

また、前記手段は、毛細管現象により発現する吸水特性を有し、かつ前記検出部よりも前記試料の移動方向の下流側において配置された第2の通気性部材であるのが好ましい。

【0016】

また、前記特異結合分析デバイスにおいては、前記第1の特異結合物質を、前記試料点着部と前記検出部との間における前記空間形成部の前記試料との接触面上に保持し、前記試料が点着され湿潤状態になることによって、前記第1の特異結合物質を前記接触面で可動化させて前記検出部へ移動させることが有効である。

10

【0017】

また、前記空間形成部が二枚の平板と前記平板の間隔を規定するスペーサとで構成され、前記検出部が前記平板上に設けられ、前記特異結合反応に由来した信号を前記平板を介して検出することが有効である。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明は、分析対象物を含んだ液状の試料を点着する試料点着部と、前記試料点着部と連結された毛細管現象を呈する空間形成部と、前記空間形成部内において特異結合反応に由来して得られた信号を検出し得る検出部とを具備し、前記点着された前記試料が、毛細管現象により前記空間形成部内の前記検出部に移動して特異結合反応が発生し、当該特異結合反応に由来した信号を検出することで前記分析対象物を定性または定量する特異結合分析デバイスを、

20

前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において、前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送力を大きくすることを特徴とする特異結合分析方法に関する。

【0019】

ここで、液体輸送力とは、毛細管現象により液体を輸送する能力を意味する。液体輸送力が高いということは、空間形成部の液体と接触する面の親水性が高くかつ液体の保持量が高いということである。したがって、前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において、前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送力を大きくすると、前記検出部に液体が到達すると、全液体が下流側に輸送される。ただし、点着された前記試料の量が、下流側液体の保持量以下であることが必要である。

30

【0020】

さらに、本発明は、かかる特異結合分析方法に用いる特異結合分析デバイスにも関する。この特異結合分析デバイスは、分析対象物を含んだ液状の試料を点着する試料点着部と、前記試料点着部と連結された毛細管現象を呈する空間形成部と、前記空間形成部内において特異結合反応に由来して得られた信号を検出し得る検出部とを具備し、前記点着された前記試料が、毛細管現象により前記空間形成部内の前記検出部に移動して特異結合反応が発生し、当該特異結合反応に由来した信号を検出することで前記分析対象物を定性または定量する特異結合分析デバイスであって、さらに前記空間形成部で呈する毛細管現象による液体輸送力を、前記検出部よりも前記試料の移動方向における下流側において大きくする手段を具備することを特徴とする。

40

【0021】

以下、本発明の実施の形態について、図面を参照しながら詳細に説明する。

図1は、本発明の一実施の形態に係る特異結合分析デバイスの構成を示す概略断面図である。また、図2は、図1に示すZ方向から見た前記特異結合分析デバイスの概略図である。

このデバイスは、例えば内径(d1)が5mm、長さ(L)が30mmの空間形成部を構成するガラス製の第1の毛細管1、および内径(d2)が0.5mm、長さ(L2)が3

50

mm、外径が約5mmの通気抵抗制御手段としての役割を果たすガラス製の第2の毛細管2で構成されている。

【0022】

図1に示すように、第2の毛細管2は第1の毛細管1の管内に挿入されている。ここで、第2の毛細管2の外側面と第1の毛細管1の内側面は密着しており、実質的に空気はこの間を透過できない。第2の毛細管2と第1の毛細管1とは、例えば接着剤で密着して接合されている。

第1の毛細管1の内部には検出部3が設けられており、この検出部3は、結合材として第2の特異結合物質が第1の毛細管1の内壁に固定化されて形成されている。また、この検出部3は、第1の毛細管1の開口部4（第2の毛細管2が挿入されていない側）からの距離（Z1）約2mmの部分に位置しており、Z方向における検出部3の長さは約1mmである。なお、Z1は、開口部4の端部から検出部3の中心までの距離を示している。

10

【0023】

また、第1の毛細管1の内部には、ガラス繊維濾紙GA200（東洋株式会社製）を直径5mm、長さ（L2）20mmの寸法に加工して得た通気性部材である吸水性部材5が挿入されている。吸水性部材5の一端は、第1の毛細管1内の開口部4より距離（Z2）約3mmの部分に位置しており、検出部3に接している。本実施の形態においては、開口部4が試料点着部としての役割を果たす。

【0024】

図1に示す特異結合分析デバイスを、開口部4を下に向け、かつ前記デバイスの長さ方向が水平方向に対して実質的に垂直になるように配置し、開口部4を試料の表面に接触させる。そうすると、試料の液面が毛細管現象によりZ方向へ移動する。すなわち、試料の液面が上昇する。このとき、試料の表面張力の鉛直方向成分と、上昇した試料の柱に働く重力とが釣り合うまで、試料の液面が移動（上昇）する。

20

【0025】

図1に示す特異結合分析デバイスから第2の毛細管2および吸水性部材5を取り除き、通常の大気圧および室温の雰囲気中で、試料として尿などの水溶液を用いた場合、試料の液面の移動（上昇）距離Zは約6mmであった。このとき、液面は約2～3秒間で6mm移動して静止した。

しかし、図1に示すデバイスから吸水性部材5のみを除き、通常の大気圧および室温の雰囲気中で、試料として尿などの水溶液を用いた場合、移動（上昇）距離Zは約6mmであった。このとき、液面は、約30秒間で6mm移動して静止した。これは、以下の理由からである。

30

【0026】

毛細管現象により試料が上に移動するのに伴って、空気は試料に押されるため空気も移動する。ここで、第1の毛細管1の開口部4の反対側が完全に封止されていれば、空気が圧縮されるため圧力が上昇する。そして、この圧縮された空気の圧力と大気圧との差、すなわち上昇した圧力分がさらに重力に加わるため、試料は6mmも上昇せずに静止する。ところが、第1の毛細管1の開口部4の反対側が完全には封止されていなければ、試料の移動により圧縮された空気は徐々に抜けるため、最終的には大気圧と平衡状態になり、試料は6mm上昇して静止する。

40

【0027】

ただし、静止するまでの時間は、第1の毛細管1の開口部4の反対側が完全に開放されている場合（第2の毛細管2が無い状態）に比べると増加する。換言すると、試料の移動速度は低下する。この移動速度の低下度合いは、第1の毛細管1の開口部4の反対側の通気抵抗に依存する。この通気抵抗は第2の毛細管2の有無で変化するため、移動速度も第2の毛細管2の有無で変化する。具体的には、第2の毛細管2が無い場合は、ある場合に比べると通気抵抗が低下し、移動速度が増加する。

【0028】

これらのことから、第1の毛細管1の開口部4の反対側の通気抵抗を制御することで、試

50

料の移動速度を制御できることがわかる。ここで、第2の毛細管2の内径( $d_2$ )が小さいほど、換言すると内部空間(空間形成部)の断面積が小さいほど通気抵抗が大きくなり、第2の毛細管2の長さが長いほど通気抵抗が大きくなる。例えば、第2の毛細管2の内径( $d_2$ )が1.0 mm、長さ( $L$ )が3 mmの場合は、7~10秒間で6 mm上昇して静止した。また、第2の毛細管2の内径( $d_2$ )が0.5 mm、長さ( $L$ )が2 mmの場合は、20~25秒間で6 mm上昇して静止した。

#### 【0029】

上述した移動速度は、吸水性部材5が無い場合の移動速度である。吸水性部材5を挿入すると当然通気抵抗が大きくなるため、第2の毛細管2の有無、第2の毛細管2の内径および長さが上記と同一条件であっても、移動速度は上記よりも小さくなる。ただし、図1に示すような配置を採用した場合は、吸水性部材5の一端が、第1の毛細管1内の開口部4より距離( $Z_2$ )約3 mmの部分に位置しているため、試料の液面は、6 mm上昇する前に、吸水性部材5の一端に到達する。そして、試料は吸水性部材5に吸収される。

10

#### 【0030】

つぎに、試料点着部に点着される試料の容量について述べる。試料の容量が、液面が6 mm上昇するのに必要な容量以上である場合は、液面が吸水性部材5の一端に到達するので、これに吸収される。ここで、検出部3上にある第2の特異結合物質に結合しなかった成分すべてを吸水性部材5に吸収させ、検出部3に残留させないようにする必要がある。したがって、試料点着部に点着される試料の容量は、吸水性部材5に吸水され得る試料の最大容量以下である必要がある。

20

#### 【0031】

具体的には、上記構造の吸水性部材5が吸水し得る試料の最大容量は約0.2 ml以上であった。また、試料の液面を6 mm上昇させるのに必要な前記試料の容量は約0.12 mlであった。したがって、試料の容量が0.12~0.2 mlの範囲であれば、検出部3上にある第2の特異結合物質に結合しなかった試料中の成分すべてを、吸水性部材5に吸収させて、検出部3に残留させないことができた。一般的に述べると、毛細管現象により移動する試料の液面が到達しうる位置に吸水性部材5の一端(下端)を配置し、同時に点着する試料の容量が、吸水性部材5の下端に到達し得る容量以上で、かつ吸水性部材5が吸水し得る最大容量以下であてばよい。

#### 【0032】

以上のように、第1の毛細管1の開口部4の反対側の通気抵抗を制御することで、試料が検出部3を通過する速度を制御し、特異結合反応が発生している時間を制御することができる。したがって、特異結合反応の反応を反映する信号強度も制御することができ、分析における感度や濃度範囲を自由に設定することができる。さらに、第1の毛細管1内で呈する毛細管現象による液体輸送力を、検出部よりも試料の移動方向における下流側で、吸水性部材5の存在により大きくすることができる。そのため、第2の特異結合物質と結合しなかった成分が検出部に残留することがなく、検出信号のバックグラウンドが上昇することを回避することができ、信号のS/Nの低下を防止することができる。なお、上記した数値は、開口部4を下に向け、かつ前記デバイスの長さ方向が水平方向に対して実質的に垂直になるように配置した場合に得られる。これ以外の配置の場合は、上記の数値は異なるが、当業者であれば実験的に適宜選択し得る。

30

40

#### 【0033】

また、開口部4の反対側の通気抵抗を、吸水性部材5自身の通気抵抗によって制御することで、移動速度を制御することもできる。ここでは、必要な吸水能力を確保した上で、ガラス繊維濾紙GA200の密度および長さなどを制御することで、通気抵抗を制御することができる。すなわち、吸水性部材5に吸水効果と通気抵抗制御効果を発揮させることで、実現することができる。

以下に、実施例を用いて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

#### 【0034】

50



**【実施例】****《実施例 1 および比較例 1》**

本実施例では、上述した図 1 に示す本発明に係る特異結合分析デバイスを用い、分析対象物として尿中のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を分析した。第 1 の特異結合物質および第 2 の特異結合物質としては、hCG とのサンドイッチ反応に参加し得る抗 hCG モノクローナル抗体を用い、標識材としては金コロイドを用いた。ここで、金コロイドのような着色粒子を用いる場合、着色粒子が微細なため、標識を小さな区域または容積の中に集中させることが可能であり、検出部 3 において第 1 の特異結合物質の標識材である金コロイドが寄与する反応に由来する信号を用いて hCG の定性または定量を正確に行うことができた。また、第 1 の毛細管 1 にスキムミルクの分散水溶液を通すことによってその内壁をブロッキングした。

10

**【0035】**

まず、尿と金コロイドで標識された抗 hCG モノクローナル抗体との混合溶液を調製し、この混合溶液を試料とした。この状態の試料中では、分析対象物である hCG とが金コロイドで標識された抗 hCG モノクローナル抗体と結合していた。この試料を試料点着部である開口部 4 に約 0.15 ml 点着したところ、試料は毛細管現象により上昇し検出部 3 を通過した。そして、約 1 分経過後には、見かけ上、液体成分すべて吸水性部材 5 に吸収され検出部 3 上には液体成分は残留しなかった。

**【0036】**

このとき、点着された試料中の分析対象物は、第 2 の特異結合物質と特異結合した。これにより、分析対象物は、第 2 の特異結合物質を介して検出部 3 に固定された。すなわち、金コロイドで標識された第 1 の特異結合物質である抗 hCG モノクローナル抗体は、分析対象物 hCG を介して検出部 3 に固定化された第 2 の特異結合物質である抗 hCG モノクローナル抗体と結合した。これにより検出部 3 において、分析対象物 hCG の濃度に応じて発色した。ここで、検出部 3 上には、第 2 の特異結合物質と特異結合しなかった金コロイド成分が残留しなかったため、吸水性部材 5 が存在しない場合に比べて、コントラストは遥かに大きかった。

20

**【0037】**

hCG 濃度が実質的にゼロである精度管理用のコントロール尿に、hCG を添加して種々の濃度の試料を調製した。これらの各試料を用い、上述のような原理に基づいて検出部 3 における金コロイドによる発色度合いを確認した。各試料の hCG 濃度は、それぞれ 0 (IU/L)、3 (IU/L)、10 (IU/L)、30 (IU/L)、100 (IU/L)、300 (IU/L)、1000 (IU/L)、3000 (IU/L) および 10000 (IU/L) であった。その結果、10 (IU/L) 以上の hCG 濃度を有する試料を用いると発色を確認することができた。

30

**【0038】**

つぎに、吸水性部材 5 を省略した場合についても、同様に実験を行った。この場合は、試料が毛細管現象によって上昇し、試料の上面が約 30 ~ 35 秒間で約 5 mm 移動して静止した。そして、300 (IU/L) 以上の hCG 濃度を有する試料を用いると発色を確認することができた。

40

さらに、吸水性部材 5 および第 2 の毛細管 2 を省略した場合についても、同様に実験を行った。この場合は、試料が毛細管現象によって上昇し、試料の上面が約 2 ~ 3 秒間で約 5 mm 移動して静止した。そして、10000 (IU/L) の hCG の濃度を有する試料を用いた場合のみ発色を確認できた。

**【0039】**

以上、説明したように、本発明に係る特異結合分析デバイスによると、第 1 の毛細管 1 の開口部 4 の反対側の通気抵抗を制御することで、試料が検出部 3 を通過する速度を制御することができた。さらに、第 1 の毛細管 1 内で呈する毛細管現象による液体輸送力を、検出部よりも試料の移動方向における下流側で、吸水性部材 5 の存在により大きくすることができた。そのため、第 2 の特異結合物質と結合しなかった成分が検出部に残留せず、検出

50

信号のバックグラウンドが上昇することを回避でき、信号の S / N の低下を防止することができた。これらにより信号強度の制御と、信号の S / N の向上による最小検出濃度を向上させることができた。

#### 【0040】

なお、本実施例では、点着前に金コロイドで標識された第1の特異結合物質と尿とを混合したが、当該第1の特異結合物質を、試料点着部である開口部4と検出部3との間に乾燥状態で保持させてもよい。これにより、尿をそのまま開口部4に点着して分析することができる。この場合、液体試料である尿により、乾燥状態で保持された第1の特異結合物質が湿潤状態になって自由に移動することができ、分析対象物と第1の特異結合物質とが結合した状態で、検出部3に移動し、同様に濃度に応じた発色をさせることができる。

10

#### 【0041】

##### 《実施例2》

つぎに、図3に示す本発明に係る特異結合分析デバイスを用い、分析対象物として尿中のヒト絨毛性性線刺激ホルモン(hCG)を分析した。図3に、本発明の別の実施の形態に係る特異結合分析デバイスの構成を示す概略断面図を示した。また、図4に、図3に示すZ方向から見た前記特異結合分析デバイスの概略図を示した。

図3において、第1の毛細管1、検出部3および試料点着部である開口部4は、図1のものと同一とした。ただし、第2の毛細管2は存在せず、吸水性部材5の長さL1を変化させ、通気抵抗を制御した。言い換えると、吸水性部材に通気性部材としての機能も発揮させた。

20

#### 【0042】

本実施例においては、実施例1と同様にガラス繊維濾紙GA200(東洋株式会社製)を直径5mm、長さ(L2)20mmの寸法に加工して得た吸水性部材5と、直径5mm、長さ25mmの寸法に加工し得た吸水性部材5'を用いた。これ以外は実施例1で用いた特異結合分析デバイスと同じ構成を採用した。吸水性部材5'は吸水性部材5よりも体積が大きいため、その吸水能力および通気抵抗も吸水性部材5よりも大きかった。

#### 【0043】

まず、吸水性部材5を用いた図3および4に示すデバイスで、本実施例においても、実施例1と同様に尿と金コロイドで標識された抗hCGモノクローナル抗体との混合溶液を調製し、この混合溶液を試料として開口部4に点着した。この試料を試料点着部である開口部4に約0.15ml点着したところ、試料は毛細管現象により上昇し検出部3を通過した。そして、約30~40秒経過後には、見かけ上、液体成分すべて吸水性部材5に吸収され検出部3上には液体成分は残留しなかった。

30

#### 【0044】

また、実施例1と同様にして、hCG濃度が実質的にゼロである精度管理用のコントロール尿にhCGを添加して種々の濃度の試料を調製し、検出部3における金コロイドによる発色度合いを確認した。各試料のhCG濃度は、それぞれ0(IU/L)、3(IU/L)、10(IU/L)、30(IU/L)、100(IU/L)、300(IU/L)、1000(IU/L)、3000(IU/L)および10000(IU/L)とした。その結果、30(IU/L)以上のhCG濃度を有する試料を用いた場合は発色を確認することができた。

40

#### 【0045】

つぎに、長さを変化させた吸水性部材5'を用いた図3および4に示すデバイスで、上記と同様に試料を試料点着部である開口部4に約0.15ml点着した。試料は毛細管現象により上昇し検出部3を通過した。そして、約50~60秒経過後には、見かけ上、液体成分すべて吸水性部材5に吸収され検出部3上には液体成分は残留しなかった。さらに、上記と同様にして、hCG濃度が実質的にゼロである精度管理用のコントロール尿にhCGを添加して種々の濃度の試料を調製し、検出部3における金コロイドによる発色度合いを確認した。

#### 【0046】

50

各試料のhCG濃度は、それぞれ0(IU/L)、3(IU/L)、10(IU/L)、30(IU/L)、100(IU/L)、300(IU/L)、1000(IU/L)、3000(IU/L)および10000(IU/L)とした。その結果、10(IU/L)以上のhCG濃度を有する試料を用いた場合は発色を確認することができた。

以上のように、吸水性部材5の長さを変化させることにより、通気抵抗を変化させ、移動速度を制御することができ、各濃度に対する発色度合いを調整することができた。

#### 【0047】

以上、説明したように、本実施例に係る特異結合分析デバイスによれば、ガラス製の第1の毛細管1の開口部4の反対側の通気抵抗を吸水性部材で制御することで、信号強度も制御することができた。ここでは、必要な吸水能力を確保した上で、ガラス繊維濾紙GA200の密度、長さ等を制御することで、通気抵抗を制御することができる。即ち、吸水性部材5に吸水効果と通気抵抗制御効果を発揮させることで、実現することができた。

10

#### 【0048】

##### 《実施例3》

本実施例においては、図5および6に示す特異結合分析デバイスを用いた。図5に、本発明に係る別の特異結合分析デバイスの分解斜視図を示した。図5に示すように、本特異結合分析デバイスは、ガラスまたは樹脂で構成された基板6、ガラスまたは樹脂または金属などで構成されたスペーサー7および8(x方向の厚みは50μm程度)、ガラス繊維濾紙GA200(東洋株式会社製)で構成された吸水性部材9(x方向の厚みは50μm程度)、ならびにガラスまたは樹脂からなる透明基板10を用いて作製した。また、基板6上には、第2の特異結合物質であるhCGとのサンドイッチ反応に参加し得る抗hCGモノクローナル抗体を固定化して検出部11を形成した。

20

#### 【0049】

図6に、図5に示す特異結合分析デバイスの合体斜視図を示した。図6に示すように、透明基板10を、スペーサー7および8を介して基板6と重ねた。これによって、基板6、スペーサー7および8ならびに透明基板10で、内部に空間形成部を構成した。そして、同時にこの空間形成部へ試料を導入することができる試料点着部12を構成できた。なお、本デバイスでは、通気抵抗は、スペーサー7および8の厚さ(x方向)、吸水性部材9を構成するガラス繊維濾紙の密度、吸水性部材9とスペーサー7および8との隙間(y方向)、または前記隙間の長さ(z方向)を調整することによって制御することができた。

30

#### 【0050】

本実施例では、図5および6に示す本発明に係る特異結合分析デバイスを用い、分析対象物として尿中のヒト絨毛性性線刺激ホルモン(hCG)を分析した。第1の特異結合物質および第2の特異結合物質としては、hCGとのサンドイッチ反応に参加し得る抗hCGモノクローナル抗体を用い、標識材としては蛍光ラテックスを用いた。本実施例では、反射吸光分光計を用い、検出部の第2の特異結合物質と特異結合した蛍光ラテックスによる蛍光強度を計測し、hCGの定量を正確に行うことができた。具体的には、検出部11に、本蛍光ラテックスの励起波長に相当する光を照射し、検出部11で発生した蛍光波長に相当する光のみを分光して計測した。

また、検出部11を作成した後、基板6および透明基板10で構成された空間形成部の内壁にスキムミルクの分散水溶液を塗布し、乾燥することによって前記内壁をブロッキングした。

40

#### 【0051】

まず、尿と金コロイドで標識された抗hCGモノクローナル抗体との混合溶液を調製し、この混合溶液を試料とした。この状態の試料中では、分析対象物であるhCGとが金コロイドで標識された抗hCGモノクローナル抗体と結合していた。この試料を試料点着部である開口部4に所定容量点着した。この所定容量とは、毛細管現象で吸水性部材9の一端に到達し得る容量以上の容量であり、吸水性部材9が吸水し得る最大容量以下とした。ただし、定量性を確保するためには、毎回同一容量を点着する必要がある。点着後、試料は毛細管現象により上昇し検出部11を通過した。そして、約5分経過後には、見かけ上

50

、液体成分すべて吸水性部材 9 に吸収され検出部 1 1 上には液体成分は残留しなかった。

【0052】

このとき、点着された試料中の分析対象物は、第 2 の特異結合物質と特異結合した。これにより、分析対象物は、第 2 の特異結合物質を介して検出部 3 に固定された。すなわち、蛍光ラッセクスで標識された第 1 の特異結合物質である抗 h C G モノクローナル抗体は、分析対象物 h C G を介して検出部 3 に固定化された第 2 の特異結合物質である抗 h C G モノクローナル抗体と結合した。これにより検出部 3 において、分析対象物 h C G の濃度に応じた蛍光を発した。ここで、検出部 1 1 上には、第 2 の特異結合物質と特異結合しなかった蛍光ラッセクスが残留しなかったため、吸水性部材 9 が存在しない場合に比べて、バックグラウンドは、大幅に低下した。

10

【0053】

h C G 濃度が実質的にゼロである精度管理用のコントロール尿に、h C G を添加して種々の濃度の試料を調製し、上述のような原理に基づいて検出部 1 1 における蛍光ラッセクスによる蛍光強度を計測した。各試料の h C G 濃度は、それぞれ 0 ( I U / L )、3 ( I U / L )、10 ( I U / L )、30 ( I U / L )、100 ( I U / L )、300 ( I U / L )、1000 ( I U / L )、3000 ( I U / L ) および 10000 ( I U / L ) であった。その結果、10 ( I U / L ) 以上の h C G 濃度を有する試料で蛍光を確認でき、かつこの蛍光強度の直線性は 1000 ( I U / L ) まで確認できた。すなわち、10 ( I U / L ) から 1000 ( I U / L ) までの定量性を確認できた。

この定量特性は、通気抵抗を調整することで、制御することができた。すなわち、最低検出濃度や、直線性を示す最高濃度を制御することができた。

20

【0054】

以上、説明したように、本実施の形態による特異結合分析デバイスによると、試料点着部 1 2 の反対側の通気抵抗を制御することで、試料が検出部 1 1 を通過する速度を制御することができた。さらに、空間形成部内で呈する毛細管現象による液体輸送力を、検出部 1 1 よりも試料の移動方向側で、吸水性部材 9 の存在により大きくする吸水性部材 9 の効果で、第 2 の特異結合物質と結合しなかった成分が検出部に残留することがないため、検出信号のバックグラウンド低減でき、信号の S / N が向上した。これらにより定量性の制御と、信号の S / N の向上による最小検出濃度を向上させることができた。

【0055】

なお、本実施例では、点着前に標識された第 1 の特異結合物質と尿とを混合していたが、当該第 1 の特異結合物質を、試料点着部 1 2 と検出部 1 1 との間に乾燥状態で保持させてもよい。これにより、尿をそのまま試料点着部 1 2 に点着して分析することができる。この場合、液体試料である尿により、乾燥状態で保持された第 1 の特異結合物質が湿潤状態になって自由に移動することができ、分析対象物と第 1 の特異結合物質とが結合した状態で、検出部 1 1 に移動し、同様に濃度に応じた蛍光を発生させることができる。

以上、説明したように、本実施例に係る特異結合分析デバイスによると、分析における感度や濃度範囲を自由に設定することができた。

30

【0056】

【発明の効果】

以上のように、本発明の特異結合分析方法およびこれに用いるデバイスによれば、試料が検出部を通過する速度を制御することができ、さらに、検出部に第 2 の特異結合物質により固定化されなかった成分が残留しにくいため感度や濃度範囲を自由に設定することができ、感度も向上した。これらにより、本発明は実用上極めて有効である。

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施の形態に係る特異結合分析デバイスの構成を示す概略断面図である。

【図 2】図 1 に示す Z 方向から見た前記特異結合分析デバイスの概略図である。

【図 3】本発明の別の実施の形態に係る特異結合分析デバイスの構成を示す概略断面図である。

50

【図 4】図 3 に示す Z 方向から見た前記特異結合分析デバイスの概略図である。

【図 5】本発明のさらに別の実施の形態に係る特異結合分析デバイスの分解斜視図である

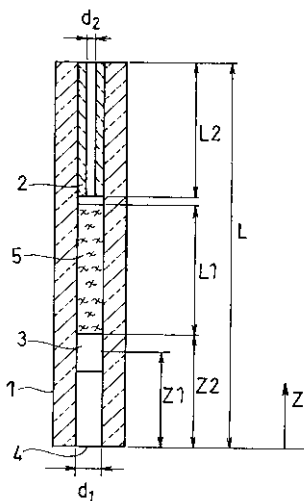
【図 6】図 5 に示す特異結合分析デバイスの合体斜視図である。

【符号の説明】

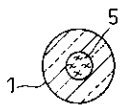
- |   |          |
|---|----------|
| 1 | 第 1 の毛細管 |
| 2 | 第 2 の毛細管 |
| 3 | 検出部      |
| 4 | 開口部      |
| 5 | 吸水性部材    |

10

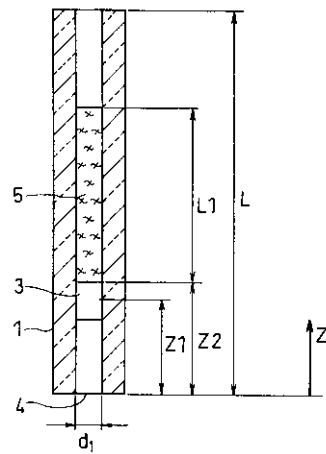
【 図 1 】



【 図 2 】



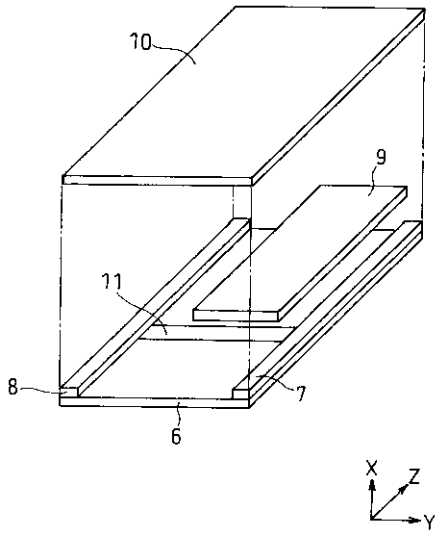
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

