

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4768202号  
(P4768202)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

|                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| (51) Int.Cl.            | F I                  |
| GO 1 N 27/48 (2006.01)  | GO 1 N 27/48 3 O 1   |
| GO 1 N 27/327 (2006.01) | GO 1 N 27/30 3 5 7   |
| GO 1 N 27/416 (2006.01) | GO 1 N 27/46 3 3 6 B |
| GO 1 N 33/483 (2006.01) | GO 1 N 27/46 3 3 6 G |
| GO 1 N 33/53 (2006.01)  | GO 1 N 27/46 S       |

請求項の数 14 (全 13 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                       |
|---------------|-------------------------------|-----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2002-506064 (P2002-506064)  | (73) 特許権者 | 309007575             |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年6月25日 (2001.6.25)        |           | サントル・ナシオナル・ドウ・ラ・ルシエ   |
| (65) 公表番号     | 特表2004-512496 (P2004-512496A) |           | ルシユ・シアンティファイク (セー・エヌ・ |
| (43) 公表日      | 平成16年4月22日 (2004.4.22)        |           | エール・エス)               |
| (86) 国際出願番号   | PCT/FR2001/002000             |           | フランス国、エフー75794・パリ・セ   |
| (87) 国際公開番号   | W02002/001178                 |           | デクス・16、リュ・ミシエランジュ、3   |
| (87) 国際公開日    | 平成14年1月3日 (2002.1.3)          | (74) 代理人  | 100080791             |
| 審査請求日         | 平成20年3月19日 (2008.3.19)        |           | 弁理士 高島 一              |
| (31) 優先権主張番号  | 00/08145                      | (72) 発明者  | リモージュ、ブノワ             |
| (32) 優先日      | 平成12年6月26日 (2000.6.26)        |           | フランス国、エフー63360 ジェルザ   |
| (33) 優先権主張国   | フランス (FR)                     |           | 、リュ ジャン グルニエール 5      |
|               |                               | (72) 発明者  | オティエール、ロラン            |
|               |                               |           | フランス国、エフー63170 オビエー   |
|               |                               |           | ル、リュ デ フォワッス 44       |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コロイド金属マーカ―を使用する電気化学的イムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コロイド金属粒子に結合した生物学的物質を電気化学的検出によって検出または定量する方法であって、

該コロイド金属粒子を化学的処理によって酸化剤を含有する酸性媒体中に溶解する工程

；

電極表面で金属を還元および／または堆積させる工程；

該電極の表面に堆積する金属の量を、該電極の電位の変化、ならびに該金属の再酸化およびその再溶解後に現れるボルタンメトリーピークの解析によって測定する工程；および

最初に該コロイド金属粒子に結合した生物学的物質を、該電極表面に電着された金属の存在および／または量の関数として、検出および／または定量する工程

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

コロイド金属粒子を溶解する工程の後に、該溶解を誘導する生成物の除去を目的とするさらなる処理を行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記金属のイオンを錯形成しうる試薬を溶液中に添加することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記電極上の金属の還元および／または堆積を適切な負電位を用いて行うことを特徴と

する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記コロイド粒子が、金属または金属化合物からなる粒子から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 の 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記コロイド粒子が金からなることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記コロイド粒子が  $1\text{ nm}$  と  $200\text{ nm}$  との間のサイズであることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 の 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

酸化剤を含有する前記酸性媒体が、臭素、次亜臭素酸、またはこれら 2 つの化合物の混合物を含む臭化水素酸の溶液であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 の 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

使用される電極が、スクリーンプリント電極であることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 の 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

使用される電極が、ストリップマイクロ電極であることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

溶解した金属の検出感度を改善するために、電極表面を電気化学的または化学的に処理することを特徴とする、請求項 1 ~ 10 の 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記コロイド金属粒子に結合した生物学的物質を、溶解前に濃縮することを特徴とする、請求項 1 ~ 11 の 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記コロイド粒子に結合した生物学的物質が、抗体、タンパク質レセプター、抗原、ハプテン、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチドおよび核酸フラグメントからなる群に含まれる、請求項 1 ~ 12 の 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

コロイド金属粒子で標識した少なくとも 1 つの試薬と少なくとも 1 つの電極、そしてまた、該コロイド金属粒子を化学的に溶解するための試薬を含むことを特徴とする、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

イムノアッセイ法、または核酸ハイブリダイゼーションによって DNA フラグメントをアッセイする方法を用いる生物学的物質の検出および定量は、臨床生物学の多くの分野（医学的および生物学的研究、診断、遺伝学、微量の違法物質のスクリーニングなど）において、また環境分野（農薬または細菌等の汚染物質の検出）においてさえ、極めて重要である。これらの方法は、選択性と感度という二重の基準を満足することを可能とする。これらの方法のうち、抗原 / 抗体アフィニティーの識別に基づくマーカーを用いた免疫分析が、特に効果的であり、酵素的、蛍光または化学発光マーカー（一般的に分光学的検出と結び付けられる）等広範囲の非放射性マーカーの開発に起因して広まってきている。しかし、各マーカーにはそれぞれ特有の利点および不都合がある。具体的には、理想的なマーカーは様々な要求を満たすべきであり、それは、

- 1) 安価で操作が簡単な分析機器を用いる高感度な様式で検出可能であるべきである、
- 2) 標識された分子（トレーサー）がアッセイ媒体中で可溶性かつ安定なままであることを可能とすべきである、
- 3) 手頃な費用で簡単かつ効果的な標識を可能とすべきである、
- 4) 長寿命を有すべきである、

- 5) それを扱う個人に全く危険がないものであるべきである、
- 6) 未標識分子に近い反応性を有するトレーサーを生ずるべきである、
- 7) 最小限のバックグラウンドノイズを生ずるべきである。

#### 【0002】

市販されているマーカーのうちで、1970年代初頭に開発された蛍光および発光マーカーが多くの特長を有する。これらは概して非毒性かつ安定であり、これらの検出は非常に感度がよい。しかし、これらは比較的複雑で高価な装置を必要とし、その測定はしばしば、サンプルのマトリックス効果に付随する内因性の蛍光により影響を受ける。

#### 【0003】

蛍光マーカーと同時に出現した酵素的マーカーは、今日おそらく、その特筆すべき触媒特性に起因して、また、とても単純な検出器（例えば、比色計）または操作者の目さえの使用を可能とする呈色反応を特定の基質に対して引き起こすその能力により、最も普及している。酵素的マーカーは、ELISA（酵素免疫測定法）と呼ばれる方法の基礎となっている。しかしこれらもまた、それら特有の不都合がある。サンプル中に存在する特定の物質が酵素を阻害する。さらに、それらは比較的壊れやすく、寿命が限られている。さらに、バックグラウンドノイズが無視できないほどでありうる。

#### 【0004】

金属ベースのマーカーは、上記の不都合のいくらかを改善することを一部目的として、1970年代の終わりに向かって導入された。金属ベースのマーカーは、その化学的性質、つまり、コロイド金属粒子、金属イオン、配位錯体、有機金属、または金属タンパク質、にしたがって区別される。その性質に依存して、様々な分析技術がそれと関連付けられうる（例えば、時間分解蛍光、原子吸光分析、またはフーリエ変換赤外、あるいはポーラログラフィーまたはボルタンメトリー等の電気化学的技術）。

#### 【0005】

分光光学的方法と比較して、電気化学的技術には、多くの利点がある。その測定は、非常に少量の液体（マイクロリットル未満）で、ことによると濁っている媒体（血清の場合）中で行うことができ、安価で、おそらく移動可能な（サイズが小さい）装置に良好な感度を与える可能性がある。電気化学的技術は、有機金属マーカーまたはイオン性金属を、ナノモル（ $10^{-9}$  M）濃度まで検出することを可能にするが、これは、ピコモル（ $10^{-12}$  M）限界まで検出可能な蛍光マーカーに比べて不十分なままだである場合が多い。本発明で開発した電気化学的検出戦略は、 $10^{-12}$  Mオーダーの金属性マーカー濃度を達成することが可能であることを示している。

#### 【0006】

本発明は、より詳細には、イムノアッセイにおけるマーカーとして使用されるコロイド金属粒子の電気化学的検出法に関する。本発明はまた、ハプテン、抗原または抗体でありうる化合物、また、DNAまたはRNAフラグメント等の化合物の定量的または定性的測定に関する。概して、本発明は、リガンドとホスト分子との間の特異的なアフィニティー相互作用を含みかつ当該相互作用を実質的に定量するためのマーカーを加える必要がある、全ての分析方法にまで拡大されうる。さらに、好ましくは不均質相の、イムノアッセイ（競合的であろうと非競合的であろうと）のまたは核酸ハイブリダイゼーションの方法の多くのフォーマットを適用できる。

#### 【0007】

マーカーとしてコロイド金属粒子を使用することは新規ではない。具体的には、これらは、電子顕微鏡技術における造影剤として、特に、例えば細胞表面の抗原分布を測定するために、抗体に結合された金コロイドの形で、非常に一般的に使用される（Beesley, Proceedings RMS, 1985, 20, 187-196）。一方、アフィニティーアッセイでのマーカーとしてコロイド金属粒子を使用することは、比較的まれである。この点で、原子吸光または比色分析による検出を伴うイムノアッセイにおけるコロイド金またはコロイド銀に基づくマーカーとしての使用に関する、特許（US4313734）および刊行物（Leuveringら, J. Immunoassay, 1980, 1, 71-91）の存在が注目されうる。他の非常に類似の特許もまた、比色検出

10

20

30

40

50

を伴うイムノアッセイにおけるマーカーとしての金コロイドの使用に関する (US4853335、EP0310872、EP0258963)。検出 (比色も) は最近、コロイド金マーカーを介した、ハイブリダイゼーションによる DNA フラグメントの分析に関して記載されている (Storhoff ら, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 1959-1964)。

#### 【0008】

電気化学的検出に関しては、コロイド金属マーカーの電気化学的検出または定量を含む、ハイブリダイゼーションにより DNA を免疫学的解析またはアッセイする方法は、現在のところ、記載されていないようである。しかしながら、抗体で被覆しカーボンペースト電極の表面に吸着させた金コロイドの直接検出に関する論文の存在を報告することができる (Gonzalez-Garcia および Costa-Garcia, Bioelectrochem. Bioenerg. 1995, 38, 389-395)。

10

#### 【0009】

この仮説を試験するために、本発明者らは、筆者らによって示唆されたようなイムノアッセイ、すなわち、電極のまさに表面で行われるイムノアッセイを実行することが可能か否かを検証しようとし、そしてそのために、免疫反応後、電極表面の近傍で反応したコロイド金マーカーを直接検出する。この実験の結果により、この方法では金コロイドを検出することが不可能であり、これはおそらく後者が電極表面ともはや直接接触していないからだろうと結論付けることが可能となった。本発明は、コロイド金属マーカーの間接検出 (これは、同じ証拠によって、電極表面とは異なりうる固相の使用を可能とする) によって、この問題から解放されることを可能にした。

20

#### 【0010】

したがって、本発明は、電気化学的検出によるコロイド金属粒子に結合した生物学的物質の検出または定量を可能とする。当該コロイド金属粒子は溶解され、電極表面で再堆積された後、電気化学によって検出される。これにより、局所濃度および感度限界の増大が可能となる。したがって、本発明の目的は、コロイド金属粒子を溶解する工程を含むことを特徴とする、電気化学的検出によるコロイド金属粒子に結合した生物学的物質の検出または定量の方法である。

#### 【0011】

本発明で開発した電気化学的イムノアッセイ法は、現在の酵素的イムノアッセイ技術よりも感度が良好でありうるだけでなく、性質が異なるいくつかのコロイド金属マーカーを使用した場合、数個の化合物を同時に測定および / または定量する可能性も提供する。具体的には、電気化学的方法は、同一の測定のうちに、いくつかの金属を同時に検出することを可能とする。さらに、コロイド金属マーカーは、放射性または酵素的なマーカーよりもずっと安定であるという利点を提供し、それらは、多くの物質を、低コストで、それらの物質の活性を全く失うことなく、簡単に標識することを可能とする。

30

#### 【0012】

コロイド金属粒子を溶解するための化学的処理は、酸化剤を含む酸性媒体中で行われる。酸化剤の濃度は、最も高濃度のコロイド金属マーカーを溶解するのに十分過多であるように選択される。臭素 ( $\text{Br}_2$ ) もしくは次亜臭素酸 ( $\text{HBrO}$ ) またはこれら 2 つの混合物を酸化剤として含む臭化水素酸の溶液が好ましく (例えば、0.1 または 1 M の  $\text{HBr}$  中  $\text{Br}_2$   $10^{-4}$  M)、特に、金コロイドの溶解が望まれる場合好ましい。臭化物塩 (濃度 0.1 M) と臭素とを含む塩酸溶液 (例えば、0.1 M) もまた適当でありうる。溶解すべき金属コロイドの性質に依存して、他の溶解用酸性媒体 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{HClO}_4$ 、 $\text{HF}$  など) および酸化剤 ( $\text{I}_2$ 、 $\text{Cl}_2$ 、 $\text{HClO}$ 、 $\text{HIO}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{HNO}_3$ 、 $\text{CN}^-$ 、 $\text{Cr}_2\text{O}_4^-$ 、 $\text{MnO}_4^-$ 、...) が想定されうる。

40

#### 【0013】

溶解後、臭素等の過剰の酸化剤を除去するために、さらなる処理が必要でありうる。これを行うために、過剰のフェノール、アニリン、ヒドラジン、オキシソ、またはそれらの誘導体のうちのひとつ、あるいは好ましくは、過剰の 3 - フェノキシ酢酸が、媒体に添加されうる。毒性がより少ないことから後者が好ましい。  $5 \times 10^{-4}$  M の濃度で一般的に十分

50

である。臭素はまた脱気によっても除去されうる。

【0014】

金属イオンと錯形成しうる試薬をその検出を促進するために溶液に加えることが有利でありうる。実際、錯形成は、電氣的に活性でない金属イオンを検出可能な電氣的に活性化化合物に変えることができる。さらに、錯形成した金属イオンは、より顕著な疎水特性を有するので電極に吸着することができ、したがって、吸着カソードィックストリッピングボルタンメトリー(adsorptive cathodic stripping voltammetry) (van den Berg, Anal. Chim. Acta, 1991, 250, 265-276) によってより高い感度でさらに検出することが可能である。

【0015】

金属が溶解した後、それは電極表面で還元される(好ましくは非常に負の電位を加えることによって)。次いで、金属を再酸化するためにその電位を変化させ、金属は次いで溶液に溶け出す。ボルタンメトリーピーク(表面)強度は電極上に沈着した金属量を反映し、したがって、コロイド粒子量は、最初、溶液中に存在する。それゆえ、これにより、アッセイを行うことが可能となる。異なる金属からなる粒子を使用した場合、様々な金属の区別可能な再酸化電位により、同時検出が可能となる。

【0016】

したがって、最初にコロイド粒子に結合した生物学的物質の存在および/または量を、電極表面に電着された金属の存在および/または量の関数として、推定することが可能である。

【0017】

コロイド金属粒子は、金、銀、銅、白金、ロジウム、パラジウム、イリジウム、ニッケル、または鉄コロイド等の金属、あるいは、例えば、 $Ag_2O$ 、 $AgI$ 、 $Bi_2O_5$ 、 $Cd_3P_2$ 、 $CdS$ 、 $CdSe$ 、 $CdTc$ 、 $Co_2O_3$ 、 $CrO_3$ 、 $Cu_2S$ 、 $HgI_2$ 、 $MnO_2$ 、 $PbS$ 、 $PbO_2$ 、 $SnO_2$ 、 $TiO_2$ 、 $RuO_2$ 、 $ZnO$ 、 $ZnS$ もしくは $ZnO_2$ 等の金属の酸化物もしくはハロゲン化物またはカルコゲニド、あるいは金属の水酸化物などの金属化合物からなりうる。一般に、電気化学的に検出可能な任意の金属または金属化合物が想定されうる(好ましくは、遷移金属)(van den Berg, Anal. Chim. Acta, 1991, 250, 265-276)。実際の要件は、アッセイ媒体にほとんど存在しないか全く存在しない金属または金属化合物、さらに具体的には、使用する電気化学的技術に関して最も良好な検出限界を与えるものを使用することが好ましいことを意味している。本発明は、特に金コロイドの場合について説明している。

【0018】

金属ベースのコロイド粒子は、科学文献に記載されている多くの方法のうちの1つを用いることによって得ることができる(Hayat編, Colloidal gold: principles, methods, and applications; Academic Press: San Diego, CA, 1991、MackayおよびTexter編, Electrochemistry in colloids and dispersions, VCH Publishers: New York, 1992、Murrayら, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 8706-8715、Frens, Nat. Phys. Sci. 1973, 241, 20-22、US5637508、Weller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1993, 32, 41-43、WangおよびHerron, J. Phys. Chem. 1991, 95, 525-532)。製造法に依存して、この粒子は、非常に低分散で、1 nmと200 nmとの間のサイズでありうる。本発明においては、5 nmと100 nmとの間の金属コロイドが好ましい。相当のサイズを有する粒子の使用が、アッセイの感度を向上させやすい。

【0019】

アッセイのフォーマットおよびタイプに依存して、コロイド金属粒子は、抗体、タンパク質レセプター、抗原、ハプテン、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチドまたは核酸フラグメント(特に、DNAもしくはRNA)に結合されうる。「結合」との語は、粒子表面に対する直接または間接の化学的または物理的付着の任意の方法、例えば、共有結合、または静電的相互作用を介した吸着、水素結合などを意味することを意図する。多くの結合プロトコールが記載されている(Beesley, Proceedings RMS, 1985, 20, 187-196、O

10

20

30

40

50

liver, Methods in molecular biology, 1999, 115, 331-334)。金属粒子でその後標識された種は、次いで、抗体、タンパク質レセプター、ハプテン、抗原、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチドまたはDNAもしくはRNAフラグメントに基づく免疫化学的試薬、緩衝液、他の化学試薬、および電極ベースの電気化学的検出システムと組み合わせて所定の物質をアッセイすることを可能とするであろう試薬として使用される。

#### 【0020】

本発明の原理を、一例として、サンドウィッチ型非競合的イムノアッセイの場合（図1A）および競合的イムノアッセイについて（図1B）、図1に示す。

#### 【0021】

第1のアプローチ（図1A）の場合、測定すべき化合物（分析物）は固相上に固定された第1のリガンド（この場合抗体；ハイブリダイゼーションアッセイの場合にはこれはオリゴヌクレオチドだろう）に最初に捕捉される。リガンドを固定するための固相は、例えば、マイクロキュベットの底（図1の場合）、マイクロビーズの表面（状況に応じて、磁性）、メンブランの表面、または電極の表面でありうる。所定のインキュベーション期間の後、状況に応じて洗浄工程が続き、金属コロイドで標識された第2のリガンド（ここでは抗体）が、それが固相上であらかじめ抽出しておいた分析物と反応するようにして添加される。このようにして構築した固相を次いで洗浄し、固相と反応したコロイド金属マーカを溶解することが可能な適量の試薬溶液で次いで処理する。その後、そのようにしてイオン状態で可溶化された金属は、溶液中（インサイチュ法 - 図1A）または溶液を移した後（エキソサイチュ法）のいずれかで浸漬された電極を使用して、検出および定量される。次いで、電気化学的応答が、アッセイすべき物質に定性的または定量的に関連付けられうる。

#### 【0022】

第2のアプローチ（図1B）の場合、この方法は、アッセイすべき物質を含むサンプルを金属コロイドで標識された既知量の当該物質、および固相上に固定されこの物質に向いているある量のリガンド（抗体）と接触させることにある。所定の反応時間の後、結合した画分に存在する金属コロイドの性質および量を、次いで、任意の洗浄工程後、溶解次に電気化学的検出の後、上述したように測定する。

#### 【0023】

（例えば、ラテックスまたは強磁性酸化物製の）マイクロビーズからなる固相を使用することは、感度を改善し、検出限界を低くするのに特に有利でありうる。具体的には、マイクロビーズは、免疫反応工程後、小さな表面、例えば、フィルタリングメンブランの表面（US4853335、Tuら、Anal. Chem. 1993, 65, 3631-3665）などまたは円錐管の底に濃縮されえ、そのようにして、免疫反応が生じたところよりも少量の液体に金属コロイドを溶解する可能性を提供する。

#### 【0024】

免疫反応またはオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションの過程のコロイド金属マーカの均質相における凝集および/または堆積に基づく方法もまた想定できる（US5851777）。この場合、形成された凝集体を単離し、次いで先のように溶解および検出する。

#### 【0025】

電極の性質に関して、炭素ベースの電極、より詳細には、炭素ベースのインクを用いたスクリーンプリントによって得られるディスク電極（図2A）およびストリップマイクロ電極（図2B）、が好ましい。これらの電極は、実際、低コストで大規模生産可能であり、それゆえ、状況に応じて単一用途用でありうるので、特に良好に適する。さらに、その幾何形状またそのサイズも容易に変更できる。しかし、他のタイプの電極を使用してもよい（例えば、ガラスカーボン、グラファイト、炭素を含む複合材料、炭素繊維、および/またはカーボンペースト製の電極）。さらに、溶解した金属の検出感度を向上させるために、電極表面を電気化学的または化学的に処理することもできる（Kalcher, Electroanalysis, 1990, 2, 419-433、Kalcherら、Electroanalysis, 1995, 7, 5-22、UgoおよびMoretto, Electroanalysis, 1995, 7, 1105-1113）。これは、一例として、静電的相互作用または

錯形成を介して金属イオンを引き付けうるポリマーでの電極表面またはインク組成物の修飾、あるいは、電極表面の電気化学的前処理でありうる。水銀フィルムの沈着も、炭素電極で検出することが困難な特定の金属イオンに有利であることが証明されうる。電極を製造する方法に関して、スクリーンプリント技術が好ましいが、他の工業的製造方法（例えば、輪転グラビア、インクジェットプリント、または状況に応じてフォトリソグラフィ）が適合されうる。

#### 【0026】

本発明の特徴により、スクリーンプリントにより得られるマイクロ電極（好ましくは、ストリップマイクロ電極）の使用が、金属イオン検出の感度および限界の点に関して概して改善される分析性能のためにこれらは（数マイクロリットルのオーダーの）非常に少量で測定を行う可能性を提供するので、特に有利である（WongおよびEwing, Anal. Chem. 1990, 62, 2697-2702、Wangら, J. Electroanal. Chem., 1993, 361, 77-83、WangおよびArmalis, Electroanalysis, 1995, 7, 958-961、Alames-VarelaおよびCosta-Garcia, Electroanalysis, 1997, 9, 1262-1266）。

#### 【0027】

スクリーンプリントしたストリップマイクロ電極（表面積  $S = 1.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ ）（曲線 1）およびスクリーンプリントしたディスクマイクロ電極（表面積  $S = 0.0962 \text{ cm}^2$ ）（曲線 2）で得られた、 $0.1 \text{ M HBr}$  中の  $\text{AuBr}_4^-$  の較正曲線（電流密度）を比較する図 3 は、ストリップマイクロ電極の場合のより良好な感度を立証する。これらの曲線は、以下のようなリニアアノードックストリップングボルタンメトリーにより得られた：（I）300 秒間  $E = -0.3 \text{ V}$  の定電位での金の電着、（ii）次いで、 $50 \text{ mV s}^{-1}$  の速度での  $0.2 \text{ V}$  から  $1.1 \text{ V}$  までの直線的電位走査。ピーク電流（ $i_p$ ）は、 $1.0 \text{ V}$  付近に現れ（金の酸化と関連付けられる）、分析的応答と考えられる。

#### 【0028】

実際には、マイクロ電極の使用により、マクロ電極を用いるよりも効果的な金属の沈着を得ることが可能となるようである。具体的には、マクロ電極の使用は、電極表面での十分量の金属沈着を確実にするために、溶液を攪拌することを必要とする。驚くべきことに、本発明者らは、マイクロ電極の使用により、この攪拌工程なしに行うことができるようになることに気づいた。これは、観察される感度の増大を説明しうるが、（とても小さなサイズの）マイクロ電極のまさにその性質によって、他の仮説も想定されうる。

#### 【0029】

電気化学的分析の様々な技術を、溶解した金属イオンをアッセイするために使用しうる。これらは、優先的には、リニア、サイクリック、方形波、ノーマルパルスもしくはディファレンシャルパルスでありうる電位走査を用いるかまたはスーパーインポーズ正弦電圧 (superimposed sinusoidal voltage) を用いるアノードックストリップングボルタンメトリー（またはポーラログラフィー）、あるいは、アノードックストリップングクロノポテンシオメトリーである。しかし、他の技術を使用してもよい（例えば、イオン交換ボルタンメトリー、リニア、サイクリック、方形波、ノーマルパルスもしくはディファレンシャルパルスでありうる走査を用いるかまたはスーパーインポーズ正弦電圧を用いる吸着カソードックストリップングボルタンメトリー（またはポーラログラフィー）、あるいはクロノアンペロメトリー、クロノクーロメトリー、あるいは、リニア、サイクリック、方形波、ノーマルパルスまたはディファレンシャルパルスのボルタンメトリー（またはポーラログラフィー）、あるいはスーパーインポーズ正弦電圧を用いるボルタンメトリー（またはポーラログラフィー））。これらの技術は、おそらく二電極または三電極のアセンブリ（すなわち、上記測定電極、参照電極、および状況に応じて補助電極を含むアセンブリ）を必要とする。アッセイ媒体が金属または参照電極の電解質で汚染されることを避けるために、この電極を、その末端が多孔質の材料からなりかつ電解質で満たされた伸長部と隔離することが有利である。銀および塩化銀に基づくインクを用いてスクリーンプリントされた参照電極もまた想定されうる。ここで再び、測定の間の銀イオンからの干渉を避けるために、例えばイオン伝導性ゲルまたはイオン伝導性ポリマー等の電解質架橋を介して

10

20

30

40

50

、この電極を隔離することが有用でありうる。

#### 【0030】

本発明はまた、少なくとも1つの生物学的化合物をアッセイするためのキットに関する。本発明の特徴により、このキットは、コロイド金属粒子で標識した少なくとも1つの試薬と、少なくとも1つの電極とを含む。本発明のキットはまた、コロイド金属粒子を溶解するための少なくとも1つの試薬と、状況に応じて、過剰の酸化剤を除去するための試薬とを含みうる。このキットはまた、検出を促進するために、金属イオンを錯形成しうる試薬を含みうる。最後に、このキットはまた、本発明の方法を実施可能とするための取扱説明書を含みうる。

#### 【0031】

以下の実施例は本発明の特徴を例示するものであるが、本発明を制限すると考えられるべきものではない。

#### 【0032】

(実施例)

実施例1：マイクロウェルの底への特異的付着後の金コロイドで標識したストレプトアビジンの検出

実験は周囲温度で行う。

#### 【0033】

ウシ血清アルブミン(BSA、画分V)、BSAに結合したビオチンアミドカプロイル(B-BSA、ビオチン含有量：8~12mol/BSAのmol)、直径20nmのコロイド金で標識したストレプトアビジン(S-Au)、また10nmのコロイド金粒子を吸着させたアルブミンに結合したストレプトアビジン(SA-Au)は、Sigma Chemical Co.製である。

#### 【0034】

炭酸水素緩衝液(15mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; pH9.6)中10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のB-BSAを100 $\mu\text{l}$ 、ポリスチレンマイクロウェル(Nunc)の底にピベッティングし、2時間インキュベートする。マイクロウェルを空にし、それをリン酸緩衝液(PBS: 4.3mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、15.1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ および50mM  $\text{NaCl}$ ; pH7.4)110 $\mu\text{l}$ でリンスした後、0.1%のBSAを含むPBS(PBS-BSA)100 $\mu\text{l}$ を加え、2時間インキュベートする。次いで、マイクロウェルを空にし、純水110 $\mu\text{l}$ で3回リンスする。次に、0.05%のTween 20を含むPBS-BSA緩衝液(PBS-BSA-T)中x  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (0.003 < x < 3)のS-AuまたはSA-Au溶液35 $\mu\text{l}$ をマイクロウェルに入れ、3時間反応させる。空にしたらずぐ、マイクロウェルを、PBS-BSA-T 3 $\times$ 110 $\mu\text{l}$ 、次いで、PBS 2 $\times$ 110 $\mu\text{l}$ で十分に洗浄する。次いで、マイクロウェルの壁面に付着した金コロイドを、1M HBr中10 $^{-4}$ M濃度の $\text{Br}_2$ 溶液40 $\mu\text{l}$ を入れて溶解する。5分後、容積35 $\mu\text{l}$ をマイクロウェルから取り出し、スクリーンプリントしたカーボンディスク電極( $S = 0.0962\text{ cm}^2$ 、参考文献: Bagelら, Anal. Chem. 1997, 69, 4688-4694に記載の方法に従って作製した電極)の表面に移し、これに、1M HBr中4 $\times$ 10 $^{-3}$ Mの3-フェノキシプロピオン酸の新鮮溶液5 $\mu\text{l}$ を加える。次いで、NaBrの飽和溶液を含む伸長部を介して伸長した参照電極(Ag/AgBr、 $\text{NaBr}_{\text{sat}}$ )および補助電極を図4の線図に示すようなスクリーンプリントした炭素電極の表面にあらかじめ沈着した溶液40 $\mu\text{l}$ に浸漬する。次いで、以下のようにしてリニアアノードックストリッピングボルタメトリー測定を行う：

- 1) 300秒間  $E = -0.3\text{ V}$  の定電位での金の電着、
- 2) 次いで、50  $\text{mV s}^{-1}$  の速度での0.2Vから1.1Vまでの直線的電位走査。

#### 【0035】

1.0V付近に現れるピーク電流( $i_p$ ) (金の酸化に関連付けられる)は、分析的応答と考えられる。測定はまた、ピークの積分でありえ、これは次いで、クーロン量( $Q_p$ )に対応する。金で標識したストレプトアビジンのそれぞれについての較正曲線を対数スケ

10

20

30

40

50

ールで図5に示す。S - Auの場合（曲線2）よりもSA - Au（曲線1）の場合の良好な感度が注目される。

【0036】

**実施例2：免疫グロブリンの「サンドイッチ」イムノアッセイ**

オボアルブミン（OA、グレードIII）およびヤギ免疫グロブリンG（IgG）はSigma Chemical Co.により市販されている。18nmの金コロイドで標識した抗ヤギIgG、および未標識の抗ヤギIgGは、Jackson ImmunoResearch Laboratoriesからのポリクローナル抗体である。

【0037】

PBS緩衝液中 $24\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ の抗IgG溶液 $60\mu\text{l}$ をマイクロウェル中にピペティングし、1時間インキュベートした。マイクロウェルを空にし、それを0.5%のオボアルブミンおよび0.1%のTween20（PBS-OA-T）を含むPBS緩衝液 $2\times 100\mu\text{l}$ でリンスした後、次いでこの同じ緩衝液 $100\mu\text{l}$ を加え、1時間インキュベートする。次いで、この溶液を抜き取り、0.1%のTween20を含むPBS緩衝液に希釈した $x\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ （ $0.5 < x < 1000$ ）のヤギIgG溶液 $35\mu\text{l}$ を入れ、40分間インキュベートする。マイクロウェルを空にし、PBS-OA-T  $2\times 100\mu\text{l}$ でリンスしたらすぐ、PBS-OA-T  $100\mu\text{l}$ を入れる。30分後、液体を、コロイド金で標識した抗IgGの希釈溶液（市販されている溶液の45倍希釈、PBS-OA-T中） $35\mu\text{l}$ と交換し、次いで、3時間インキュベートする。最終リンスサイクルを行う（マイクロウェルを、PBS-OA-T  $200\mu\text{l}$ 、続いてPBS  $2\times 100\mu\text{l}$ を用いて、3回洗浄する）。次いで、液体を慎重に抜き取り、次に、マイクロウェルの壁面に付着した金コロイドを、実施例1に示されるように溶解し検出する。

【0038】

リニアアノーディックストリッピングボルタンメトリーにより得られる測定の一つの例を図6Aに示し、対応するヤギIgG校正曲線を図6Bに示す。各点は2回測定の平均を示し、各測定は異なる電極（使い捨て電極）を用いて得た。およそ $3\times 10^{-12}\text{M}$ 濃度のIgGを測定できた。

【0039】

**実施例3：ヒト $\alpha$ -フェトタンパク質の非競合的イムノアッセイ**

炭酸緩衝液（15mM、pH9.6）中 $24\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ のモノクローナル抗 $\alpha$ -フェトタンパク質（マウス抗体）溶液 $80\mu\text{l}$ をマイクロウェル中にピペティングし、4で一晩インキュベートする。マイクロウェルを空にし、それをPBS-OA-T緩衝液 $2\times 250\mu\text{l}$ でリンスした後、この同じ緩衝液 $250\mu\text{l}$ を次いで加え、40分間インキュベートする。次いで、この溶液を抜き取り、0.1%のTween20を含むPBS緩衝液に希釈した $x\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ （ $0.05 < x < 20$ ）の $\alpha$ -フェトタンパク質溶液 $80\mu\text{l}$ を次に入れ、2時間インキュベートする。マイクロウェルを空にし、PBS-OA-T  $2\times 250\mu\text{l}$ でリンスしたらすぐ、PBS-OA-T  $250\mu\text{l}$ を入れる。30分後、この液体を、PBS-OA-T中 $5\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ に希釈したポリクローナル抗 $\alpha$ -フェトタンパク質（ヤギ抗体）の希釈溶液 $80\mu\text{l}$ と入れ替え、1時間インキュベートする。次いで、PBS-OA-T緩衝液 $2\times 250\mu\text{l}$ でリンスした後、コロイド金で標識した抗ヤギIgG溶液（市販溶液の45倍希釈、PBS-OA-T中） $50\mu\text{l}$ 、次いで、1時間30分インキュベートする。最終リンスサイクルを行う（マイクロウェルをPBS-OA-T  $250\mu\text{l}$ 、続いてPBS-T  $2\times 250\mu\text{l}$ 、次にPBS  $2\times 250\mu\text{l}$ を用いて、3回洗浄する）。次いで、この液体を慎重に抜き取り、次に、マイクロウェルの壁面に付着した金コロイドを溶解し、以下のようにしてストリップマイクロ電極で検出する： $0.1\text{M}$  HBr中 $0.1\text{mM}$   $\text{Br}_2$ 溶液 $50\mu\text{l}$ を30分間マイクロウェルに加え、次いで、 $40\mu\text{l}$ を、 $0.1\text{N}$  HBr中 $2\times 10^{-3}\text{M}$ の3-フェノキシプロピオン酸溶液 $10\mu\text{l}$ を含む新たなマイクロウェルに移す。次いで、溶解した金の検出を、実施例1に示すようにして行う。

【0040】

10

20

30

40

50

スクリーンプリントしたストリップマイクロ電極の作製：

ストリップマイクロ電極を作製するのに使用した炭素ベースのインクは、Acheson Colloidにより製造される市販インクである（M3000-1RSシリーズのMinico（登録商標）インクまたは423 SSもしくはPF 407A等のElectrodag（登録商標）インク）。このインクを、硬質または半硬質の担体（好ましくは、半結晶性ポリスチレンまたは耐衝撃性ポリスチレン製）（おそらく0.1mmと2mmとの間の厚みのプレート）上にスクリーンプリントする。フレーム上にマウントしたピンと張ったスクリーン上に得られるスクリーンプリントマスクの織度（fineness）、ならびに、該スクリーンの性質およびメッシュサイズが、大部分、インク沈着およびその厚みの品質を決定する。本発明において、5μmと50μmとの間のインク厚が、77または120スレッド/cmを含むスクリーンプリントフレームを用いて得ることができた。

10

**【0041】**

インクをスクリーンプリントしたらすぐ、60と100との間のオープンで乾燥する。次に、ポリスチレンベースの隔離層を、先にスクリーンプリントした炭素インク部分を再び被覆するようにして沈着またはスクリーンプリントする（図2）。乾燥後、このようにして構築した電極をその厚みに沿って、その部分に、マイクロメートル厚（最初にスクリーンプリントした炭素インクの厚みに依存する）およびミリメートル長（最初に選択した電極のモチーフ長に依存する）の炭素ストリップが現れるよう、横方向にカットする（図2B）。

20

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】**（A）非競合的イムノアッセイおよび（B）競合的イムノアッセイの場合において示される本発明の原理の概略図。

**【図2】** スクリーンプリントしたディスク電極（A）およびマイクロストリップ電極（B）の概略図。

**【図3】**（1）ストリップマイクロ電極および（2）ディスク電極を用いて得られるイオン性の金の較正曲線。

**【図4】** 少量の溶液ドロップに溶解した金を検出するために使用した測定装置の概略図。

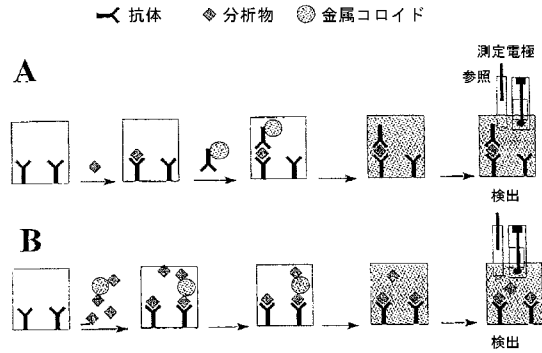
**【図5】** ストレプトアビジンで被覆した金の2つのコロイドの較正曲線。

30

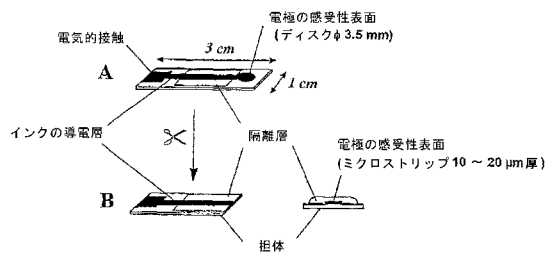
**【図6】**（A）IgG非競合的イムノアッセイのlog-log較正曲線。（B）様々な濃度のIgGについて得られたアノーディックストリップングボルタンメトリー曲線。曲線は、それらをIgG較正曲線上に同じ文字で示した濃度に対応させるよう、文字によって識別する。

**【図7】** α-フェタンパク質非競合的イムノアッセイのlog-log較正曲線。

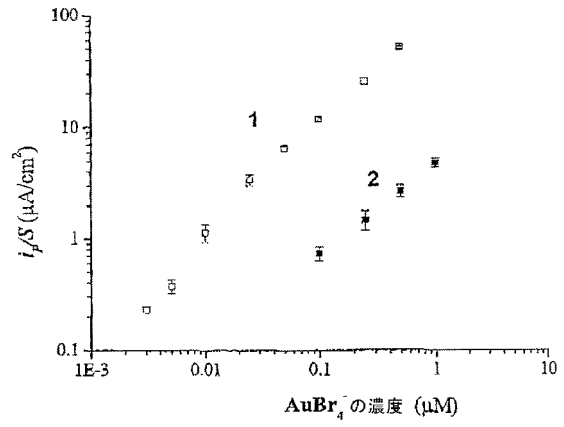
【図 1】



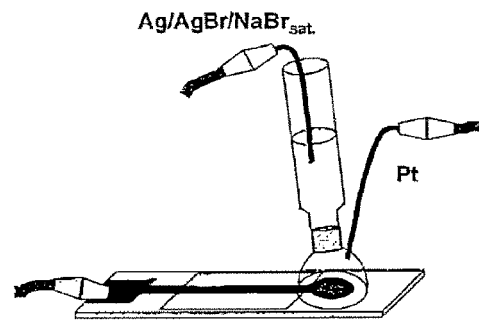
【図 2】



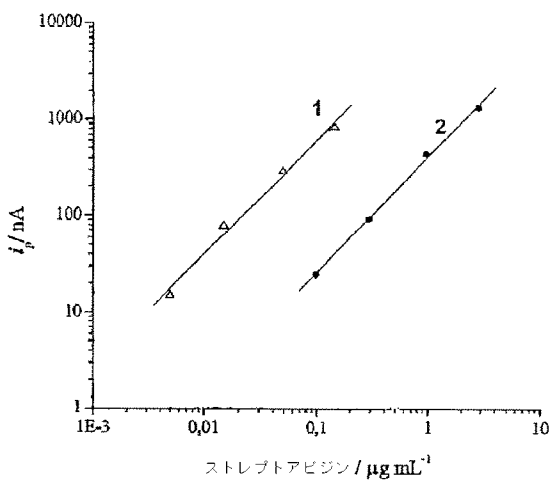
【図 3】



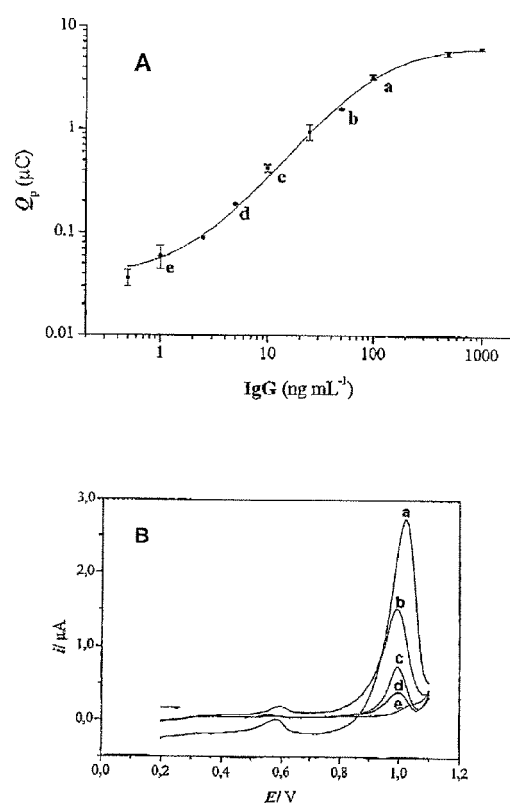
【図 4】



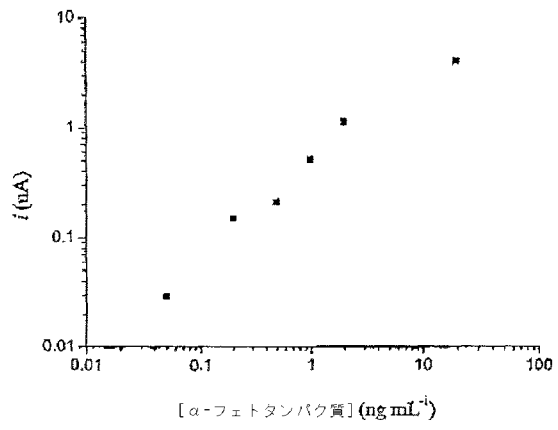
【図 5】



【図 6】



【図 7】



---

 フロントページの続き

|                                 |                  |
|---------------------------------|------------------|
| (51)Int.Cl.                     | F I              |
| <b>G 0 1 N 33/553 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/483 F |
|                                 | G 0 1 N 33/53 D  |
|                                 | G 0 1 N 33/53 J  |
|                                 | G 0 1 N 33/53 M  |
|                                 | G 0 1 N 33/53 N  |
|                                 | G 0 1 N 33/553   |

(72)発明者 ドゥケール、ミュリエール  
 フランス国、エフ - 6 3 0 0 0 クレルモン - フェラン、リュ ネラボン 1 7 ビス

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 0 6 5 8 3 5 ( J P , A )  
 国際公開第 0 0 / 0 7 0 3 2 7 ( W O , A 1 )  
 M.B. Gonzalez et al. , Adsorptive stripping voltanmmetric behaviour of colloidal gold a  
 nd immunogold on carbon paste electrode , Bioelectrochemistry and Bioenergestics , 1 9  
 9 5 年 , Vo.38 , p.389-395

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 G01N 27/26-27/49  
 G01N 33/48-33/98  
 JSTPlus(JDreamII)