

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3739399号
(P3739399)

(45) 発行日 平成18年1月25日(2006. 1. 25)

(24) 登録日 平成17年11月11日(2005. 11. 11)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543	5 9 7
BO 1 J 20/281 (2006. 01)	GO 1 N 30/48	R
GO 1 N 30/88 (2006. 01)	GO 1 N 30/64	C
GO 1 N 30/64 (2006. 01)	GO 1 N 30/70	
GO 1 N 30/70 (2006. 01)	GO 1 N 30/74	E
請求項の数 11 (全 9 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平8-531644	(73) 特許権者	キアディス ベー. ファウ.
(86) (22) 出願日	平成8年4月19日(1996. 4. 19)		オランダ国 ライデン 2 3 3 3 ツェー
(65) 公表番号	特表平11-509922		アー ニエルズ ボールウェーク 1 1 -
(43) 公表日	平成11年8月31日(1999. 8. 31)		1 3
(86) 国際出願番号	PCT/NL1996/000173	(74) 代理人	弁理士 武 顕次郎
(87) 国際公開番号	W01996/033409		
(87) 国際公開日	平成8年10月24日(1996. 10. 24)	(72) 発明者	ファン デア グレーフ, ヤン
審査請求日	平成15年4月2日(2003. 4. 2)		オランダ国 ライデン 2 3 1 2 アーフ
(31) 優先権主張番号	95201029. 6		ァウ スタシオンズウェーク 4 6 ツェ
(32) 優先日	平成7年4月21日(1995. 4. 21)		ー/オー リヨクスユニヴェルジテート
(33) 優先権主張国	オランダ(NL)		テ ライデン
(31) 優先権主張番号	95202987. 4		
(32) 優先日	平成7年11月3日(1995. 11. 3)		
(33) 優先権主張国	オランダ(NL)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 連続フロー分離技術への生化学的検出のオンライン結合

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分画工程と生化学的検出技術とをオンライン結合することから成るオンライン検出法であって、所定量の標識抗体以外の親和性分子を分画工程の流出液に加えて該親和性分子を前記流出液中の検体と結合させることと、該親和性分子と結合可能な所定量の検出可能なリガンドを続いて加え、該親和性分子を検体とリガンドに対して競合反応させ、中空繊維膜装置を用いて遊離リガンドと結合リガンドとを互いに分離し、次いで、該親和性分子と該検出可能なリガンドとの複合体を検出して、検出された複合体の量が減少している場合は検体の存在を示すことから成ることを特徴とするオンライン検出法。

【請求項 2】

既知の標識抗体以外の親和性分子への結合能力に基づいて化合物を選別するためのオンライン方法であって、所定量の該親和性分子を分画工程の流出液に加えて流出液中の化合物と反応させたり流出液中の化合物同士を反応させるのに十分な接触時間を与え、該親和性分子と結合可能な所定量の検出可能なリガンドを続いて加え、該親和性分子を検体とリガンドに対して競合反応させ、中空繊維膜装置を用いて遊離リガンドと結合リガンドとを互いに分離し、次いで該親和性分子と該検出可能なリガンドとの複合体を検出して、検出された複合体の量が減少している場合は親和性分子結合化合物の存在を示すこととなる方法。

【請求項 3】

該分画工程は液体クロマトグラフィ分離または毛管電気泳動工程である請求項 1 または

2 記載の方法。

【請求項 4】

該液体クロマトグラフィ分離工程は、HPLCまたは逆相HPLC工程である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

該検出は蛍光、時間遅延蛍光もしくは化学発光分光分析によって、または電気化学的検出もしくは放射測定検出に基づく方法によって成される請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

該親和性分子は核または細胞内受容体、可溶化膜結合受容体、抗体、酵素、アビジン、ポリヌクレオチドまたは多糖類である請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 7】

該検出可能なリガンドは標識リガンドまたは蛍光もしくは電気化学活性のような検出可能な天然の特性を有するリガンドである請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

該親和性分子はエストロゲン受容体またはその一部である請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

該親和性分子はエストロゲン受容体またはそのステロイド結合領域であり、該検出可能なリガンドはクメストロールまたは他の天然蛍光エストロゲン様リガンドである請求項 8 に記載の方法。 20

【請求項 10】

該方法は組み合わせ化学装置の下流において実施され、それによって該組み合わせ化学装置が流出液を供給する分画工程を実施する請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

該親和性分子はオーファン受容体である請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、連続フロー分離技術への生化学的検出のオンライン結合に関する。別の実施例では、このオンライン検出法は選別法として使用される。 30

イムノアッセイ（免疫測定法）が生的特有反応の選択力とレポーター分子として使われるラベル（標識）の敏感な検出とを併用した非常に敏感な検出技術であることは当業者によく知られている。

そのような技術の例が、W0 91/13354に記載されている。この文書には、或ターゲット（目標物）に特有な抗体を支持体上で動けなくするフロー免疫センサーが記載されている。抗体の結合部位は、標識された形のターゲットで飽和する。分析すべき液体がその抗体の前を通過して流され、その液体中に存在するターゲットが標識抗原に取って代わることを許される。最終的には、取って代わられた標識抗原が検出される。

しかしながら、複数の抗体が一個以上の数の検体と反応するという意味である交差反応性の問題にイムノアッセイが苦しめられることも同様に知られている。これは誤った結果を導く。この理由で、イムノアッセイは、しばしば、分画工程、例えばHPLCを使用する分離工程や他の型の液体クロマトグラフィと併用される。 40

本発明が関与する分野では、分画工程とイムノアッセイ検出システムとのオンライン結合が要求されている。連続フロー・イムノアッセイを実施するいくつかのアプローチが提案され記載されている。これらのイムノアッセイの大部分は、逐次追加型イムノアッセイに基づくポストカラム反応検出システムの形である。

Cassidy他 Anal. Chem. 64 (1992), 1973-1977は、1分未満でアルブミンとトランスフェリンのためのイムノアッセイを実施する、プロテインAカラム上の抗体、サンプル、標識の逐次追加に基づく動力学的に制御されたイムノアッセイを開示している。 50

Nilson他 J. Chromatography 597 (1992) 383-389は、酵素標識抗体を必要とする連続フロー競合イムノアッセイを記載する。記載されたシステムは寸法除外カラムと結合されて、活性の監視を認める。

逐次的性質のものであるこれら従来技術は、分画流出液の連続監視を認めないので、液体クロマトグラフや他の分画システムへのオンライン結合には適さない。

Journal of Chromatography 633 (1993) 65-72中のIrth他の論文中、Anal. Chem. 66 (1994) 4295-4301中やJournal of Chromatography 653 (1994) 55-61中のOosterkamp他の論文には、ジゴキシシンとその代謝物のオンライン検出法が記載されている。そのオンライン検出法は、ジゴキシシンとその代謝物を含むサンプルの直接注入と、液体クロマトグラフ (LC) 分画分離工程と、LCカラムの流出液とジゴキシゲニンに対するフルオレセイン標識抗体との混合と、抗原結合支持体で満たされた小カラムを通じて混合物からの遊離標識抗体の除去と、強い蛍光の免疫錯体の検出とから成る。

記載されたジゴキシゲニン・システムは、分析カラムから溶出する抗体と抗原との会合反応に基づく。フルオレセイン標識抗体の利用によって、ナノモル範囲内の検出限界が得られる。

この従来技術アッセイは、不均質検出システムである。遊離標識と結合標識との間に分離工程が必要である。遊離／結合標識分離技術のための例は、限定アクセス相や中空繊維モジュールである。

前述の従来技術アッセイにおける免疫試薬は、免疫精製された商業的入手容易なアンチジゴキシゲニン抗体のフルオレセイン標識碎片から成る。しかしながら、精製され標識された抗体が商業的入手容易なのは例外的である。ほとんど全ての場合、抗体は粗精製された抗血清中で非標識状態としてのみ入手可能である。抗体（または他の親和プロテイン）の標識・精製の仕組みが当業者には知られているけれど、商業的に入手容易な抗血清を前処置しないで利用するのが好ましい。

さらにその上、検体と反応しつつある抗体標本中のそれら抗体のみを選択的に標識するのは困難である。一般的に、標識する技術は抗体の第一級アミン基を利用しており、標本中に存在する全ての他のプロテインを共に標識することとなる。これは、背景信号の激増に、ひいては、検出限界の増大に導く。

本発明の目的は、フルオレセイン標識抗体を利用するこの既知技術に替わるものを提供することである。本発明の実施例は、抗体を標識することに関連するその欠点を持たない。より詳しくは、本発明のもとになる問題は、標識抗体を使用する必要のないオンライン検出技術を提供することである。

分画工程と生化学的検出技術とをオンライン結合することから成るオンライン検出法であって、親和プロテインや受容体のような制御量の親和分子を親和分子が分画工程の流出液中の検体と結合する分画工程の流出液に加えることと、標識配位子のような親和分子に結合できる制御量の検出可能配位子を続いて加えることと、該親和分子／検出可能配位子錯体を検出することとから成るオンライン検出法を提供することによって、この問題に打ち勝つ。

検出された親和分子／検出可能配位子錯体の量の減少は、流出液中に親和分子結合化合物が存在していることを示す。

特に第一工程では、検出されるべき検体のための適当な親和分子—その親和分子は例えば抗体やアビジンのような親和プロテインであるかもしれない—が液体クロマトグラフィまたは毛管電気泳動カラムの流出液に加えられ、カラムから流出する配位子または検体と反応する。非結合親和分子は、第二工程で、過剰分の検出可能配位子と反応する。その検出可能配位子は、残りの遊離結合部位を滴定するフルオレセイン標識検体のような、標識された形で検出される検体であるかもしれない。あるいは、代わりに、競合反応が親和分子、流出液中の検体、検出可能配位子間で起こる。普通は、標識配位子／親和分子錯体は、好ましくは分子量の相違に基づいて、遊離標識配位子と結合標識配位子の分離後に検出される。最終的には、標識配位子／親和分子錯体が検出される。

本発明による分画工程と生化学的検出工程との組み合わせは、両技術の性能を大いに高め

10

20

30

40

50

る。この組み合わせ技術は、高選択性と高感受性とに特徴を有する分析法を提供する。さらに、本発明の方法を使用すると、交差反応性に関連する問題はもはや起きない。

本発明の方法は、抗体、受容体等の生物学的親和分子を利用して該親和分子の配位子結合部位に対する高親和性を示す化合物を検出する。検出されるべき化合物は生化学化合物であって良いが、それに限定されるわけではない。

本発明の方法は、異なる化合物からなる混合物を或親和分子への結合能力上で、例えばその親和分子に対する阻害因子を見付けるため、選別することを可能にする。それゆえ、本発明は、さらに、既知の親和分子への結合能力に対して化合物を選別するための速いオンライン方法であって、流出液を提供する分画工程と、制御量の該親和分子を分画工程の流出液に加えて流出液中の化合物と反応したり流出液中の化合物同士が反応するのを許すに十分な接触時間をもたらす工程と、該親和分子と結合することができる制御量の検出可能配位子を続いて加える工程と、親和分子／検出可能配位子錯体を検出する工程とからなる方法に関する。検出された親和分子／検出可能配位子錯体の量の減少は、流出液中の親和分子結合化合物の存在を示す。

検体を注入するときに得られた検出信号と、制御量の親和分子と検出可能配位子のみを連続フローシステムに導入するときに得られた信号とを比較すれば、分画工程の流出液中に存在する検体によって占められた結合部位の百分率に関する情報が提供される。当業者は、この検出法によって得られたデータを処理して評価する知識を有する。流出液中に存在する検体によって占められた結合部位の百分率は、既知の親和分子との反応を示す新規の化合物を見付けるのに利用できる。この情報は、本発明のオンライン分離／親和分子検出法を、例えば、薬剤発見の道具とする可能性を提供する。

薬剤発見に利用される高スループットな選別システムは、例えば、次の工程からなりうる。例えば、上流組合せ化学システムによって生成された錯体サンプルは、例えば、固相抽出技術または電気泳動的サンプル取り扱い原理を利用して、同極性の化合物を含む分画に前分別される。各分画は、例えば分析分離カラムと予備的規模の液体クロマトグラフ・カラムとのいずれかを利用して、さらに分離して良い。該LCカラムから流出する化合物は、適当な親和分子検出技術を利用してオンラインで検出される。予備的規模の分離カラムが適用される場所では、ポストカラム・フロー分割がなされる。二つのフローストリームのうちの一方を親和分子検出技術を利用して検出し、他方を分画収集器に向ける。親和分子検出器から得られた信号しだいで、負の応答を引き起こす分画を捨てつつ正の応答を引き起こす化合物を含む分画を集める。この完全な選別方法は既知の値切り替え方法を利用して自動化できる。

本発明の方法に使用される適当な分画法は、液体クロマトグラフィ分離または毛細管電気泳動工程から成る。しかしながら、当業者に知られており、かつ、比較的連続な出力ストリームを許す他の分離または分画技術も同様に利用できる。

好ましい実施例では、その液体クロマトグラフィ分離工程は逆相HPLC工程である。

非常に有利な実施例では、遊離、結合標識の分離は選択性膜モジュールを利用して分子量に基づきなされる。好ましくは中空繊維膜モジュールが使用される。遊離、結合標識を含む反応混合物は、選択性膜に沿って通過、または、中空繊維膜の内部毛細管を介して汲み上げられる。限外濾過のようなよく知られた膜分離技術を利用して、液体は膜に押し入れられて受容器または浸透側で集められる。集められた液体は、続いて、適当な標識検出器システム、例えば蛍光検出器に向けられる。膜の分子量遮断は遊離標識のような比較的低分子量の化合物のみが受容器側に到達できることを許すように選択できる。高分子量の化合物は母体反応混合物中に残る。選択性膜分離技術を利用することによって、第一に、全ての膜または細胞膜碎片を含めて全種類の親和プロテインを使用できる。親和プロテインが完全に可溶または可溶化されているということは必要ない。細胞懸濁液は選択性膜モジュール、特に中空繊維モジュールによって扱われる。

本発明の方法の必須部分を構成する検出法は、適当な検出可能配位子に依存して選択できる。適当な検出法の例としては、蛍光、時間遅延蛍光、化学発光分光分析法のような全ての型の発光検出原理に基づく方法、電気化学的検出や放射分析検出に基づく方法がある。

10

20

30

40

50

本発明の方法では、他の分子と反応または結合可能な全ての分子を親和分子として使用できる。好ましい実施例では、親和分子は、エストロゲン、糖質コルチコイド受容器のような細胞質ゾル受容器； β 受容器のような可溶化膜結合受容器；抗体、酵素、アビジンのような親和プロテイン；ポリヌクレオチドや多糖類の群から選択される。

更にその上、親和分子は「オーファン」受容器であっても良い。そのような分子は、構造的には特性決定受容器に関連しているので該受容器であると考えられるが、それら受容器に対して選別されている配位子はない。オーファン受容器に対する配位子の決定は比較的ゆっくりである。本発明の方法を用いることによって、この決定を加速できる。

本発明と請求項で用いる用語「検出可能配位子」は、上述の親和分子と影響しあう、または、反応可能な、かつ、生化学的検出法で検出可能な配位子をいう。検出可能配位子の例としては、標識検体がある。

10

上記従来技術で使用された標識抗体の代わりに標識抗原を用いると、二つの大きな利点を得られる。第一には、低分子量の標識抗原を調製、特に精製するのがより容易である。第二には、標識抗原の調整工程で発生する背景ノイズ信号問題が、標識抗原を免疫検出に用いるときには、起こらない。

上述の選択性膜分離実施例では、適当な標識に関する次の二つの利点を挙げるができる。この分離技術は標識の物理化学的性質、特にその極性には依存しない。限定アクセス固体支持体分離システムとは違って、高い有極性の標識を利用できる。適切な膜遮断を選択することによって、酵素を標識として同様に利用できる。これは、例えばELISAシステムのために元来調整される酵素標識を利用する可能性を提供する。当業者は、この可能性が応用範囲を広げると認識するだろう。

20

本発明の方法に使用されるオンライン結合は、カラム外帯域への広がりを最小にするために速い反応時間を必要とする。これは、数時間よりもむしろ数分の程度の反応時間をもつ親和分子-配位子反応を考慮すべきであるということの意味する。

本発明の方法の一実施例では、ビオチン化DNA碎片がアビジンをHPLCカラムの流出液へ連続して加えることによって決定される。アビジンはいわゆる反応コイル中でビオチン化DNA碎片と反応することを許される。続いて、フルオレセイン標識ビオチンから成る溶液の連続フローが反応コイルを離れたフロー中に加えられる。連続フロー法の次の工程では、遊離、アビジン結合フルオレセイン標識ビオチンを、例えば、C18-シリカ制限アクセス支持体で満たされたカラムを通すような遊離、結合ビオチン間の分子量の相違を利用する分離手順を使って分離する。その高分子量標識配位子/プロテイン錯体は、保持されないC18-カラムを通り、続いて蛍光検出によって検出される。ビオチン-アビジンシステムについては100-500fmolの程度の検出限界がビオチンに対して得られた。

30

本発明の方法は、同様にDNAまたはRNAプローブをDNAおよび/またはRNA誘導検体のための受容器として用いるシステムに適用される。この場合検出可能配位子は、例えば放射性同位元素で標識されうる相補鎖（の一部）であって良い。

本発明の範囲内の非常に有利な実施例では、遊離、結合標識間の分離工程は必要ない。分離工程が省かれる技術は、均質技術と呼ばれる。そのような技術を、遊離、受容器結合標識が検出信号において、例えば蛍光強度、励起または発光波長、酵素活性等で大いに異なる全ての場合に本発明の方法により利用できる。

40

そのような均質な実施例の例としては、使用する親和分子がエストロゲン受容器であり、検出可能配位子がクメストロールまたは他の天然蛍光エストロゲン様配位子である実施例がある。この実施例では、例えば完全なエストロゲン受容器に換えて遺伝子技術によって調整されたヒト・エストロゲン受容器のステロイド結合領域をまた利用できる。この実施例では、結合、遊離クメストロールを分離する分離工程を必要としない。クメストロールは、エストロゲン受容器と結合すると強い蛍光信号を出し、かつ、遊離状態では弱い蛍光信号を出す化合物である。クメストロールとエストロゲン受容器とを本発明の連続フローシステムに制御された量で導入するので、得られる蛍光信号を比較すればクメストロールがどれ程多くのエストロゲン受容器の結合部位を占めているかや競合検体がどれ程多くの結合部位を占めているかに関する情報が得られる。エストロゲン受容器（のステロイド結

50

合領域)とクメストロールまたは他の天然蛍光エストロゲン様配位子を用いるこの実施例では結合と遊離クメストロールを分離する分離工程は必要ないけれど、そういう分離工程が実行されるなら蛍光データはより詳しい定性的、定量的情報を提供するだろう。

本発明を以下の例を参照しつつ更に詳しく説明する。

例 1

ビオチンを液体クロマトグラフィ (LC) カラムに適用した。その移動相がKratos-ABI (Ramsey, 米国) スペクトロフロー 400 ポンプによって投入される移動相としてメタノール/水溶性酢酸トリエチルアンモニウム (10mmol/l; pH 7.0) 10:90 (v/v) を使用してヌクレオシルC18 (5 μ m粒子、Macherey-Nagel、デュレン、ドイツ) を充填した100x3.0mm内径のステンレススチールカラム上にてLC分離を実行した。LC分離工程の流出液中、アビジンをその濃度34nmol/lでPharmacia (アップサラ、スウェーデン) P3500ポンプ (流量0.4ml/min) によって0.5mol/l塩化ナトリウム (分析等級; メルク、ダルムスタット、ドイツ) を含む燐酸ナトリウム (10mmol/l; pH 8.0; メルク、ダルムスタット、ドイツ) から成る結合緩衝液に投入した。組み合わされたアビジン-ビオチンフローを800 μ lの容量をもつ0.5mm内径の編ポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイルに導入した。続いて、フルオレセイン標識ビオチン (シグマ、セントルイス、米国) をKratos-ABIスペクトロフロー 400 ポンプを使用して0.8ml/minの流量で移動相に投入した。得られたフローを400 μ lの容量をもつ0.5mm内径の編ポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイルに導入した。反応は20°Cで実行された。

遊離とアビジン結合フルオレセイン-ビオチンの分離を (DE-A-41 30 475に記載された) C18アルカンエジオール・シリカで充填された10x4.0mm内径カラムを使って行った。このカラム後、フローを蛍光検出器 (メルク1080蛍光検出器; 励起波長486nm; 蛍光波長520nm) に導入した。

ビオチンについて得られた絶対検出限界は160fmolであった。検出システムは8から200nmol/lまで (20 μ l注入) の範囲の線形信号を提供した。

例 2

ビオチン化DNA-断片を代表するT6-ビオチン (0.5 μ M) とT3-ビオチン-T3 (0.5 μ M) とから成る混合物をLCカラム上に注入した。その移動相がKratos-ABI (Ramsey, 米国) スペクトロフロー400ポンプによって投入される移動相としてアセトニトリル/水溶性酢酸トリエチルアンモニウム (10mM; pH 7.0) 7:93 (v/v) を使用してヌクレオシルC8 (5 μ m粒子、Macherey-Nagel, デュレン、ドイツ) を充填した100x3.0mm内径のステンレススチールカラム上にてLC分離を実行した。LC分離工程の流出液中アビジンをその濃度34nmol/lでPharmacia (アップサラ、スウェーデン) P3500ポンプ (流量0.4ml/min) によって0.5mol/l塩化ナトリウム (分析等級; メルク、ダルムスタット、ドイツ) を含む燐酸ナトリウム (10mmol/l; pH 8.0; メルク、ダルムスタット、ドイツ) から成る結合緩衝液に投入した。組み合わされたアビジン-ビオチン化合物フローを800 μ lの容量をもつ0.5mm内径の編ポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイルに導入した。続いて、フルオレセイン標識ビオチン (シグマ、セントルイス、米国) をKratos-ABIスペクトロフロー400ポンプを使用して0.8ml/minの流量で移動相に投入した。得られたフローを400 μ lの容量をもつ0.5mm内径の編ポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイルに導入した。反応は20°Cで実行された。

遊離とアビジン結合フルオレセイン-ビオチンの分離を (DE-A-41 30 475に記載された) C18アルカンエジオール・シリカで充填された10x4.0mm内径カラムを使って行った。このカラム通過後、フローを蛍光検出器 (メルク1080蛍光検出器; 励起波長486nm; 発光波長520nm) に導入した。

T3-ビオチン-T3とT6-ビオチンの保持時間は、それぞれ6.2と6.6分であると解った。

例 3

ステロイド受容器に結合する化合物、17 β -エストラジオール、エストリオール、ジエチルスチルベストロール、ゼラノール、エストロン、プロゲステロン、テストステロン、およびデキサメサゾン (濃度: 100nmol/l; 注入20 μ l) の混合物をLCカラムに適用した

。その移動相がKratos-ABI (Ramsey, 米国) スペクトロフロー400ポンプによって0.5ml/minの流量で投入される移動相としてアセトニトリル：メタノール：燐酸カリウム緩衝液 (10mM; pH 7.4) 20:20:60 (v/v) を使用してヌクレオシルC2 (5 μ m粒子、Macherey-Nagel, デューレン、ドイツ) を充填したステンレススチールカラム上にてLC分離を実行した。LC分離工程の流出液中、エストロゲン受容器 (ヒト、エストロゲン受容器ステロイド結合領域; カローバイオ、ヒューディング、スウェーデン) をエストロゲン受容器濃度5nmol/lでPharmacia (アップサラ、スウェーデン) P3500ポンプ (流量0.5ml/min) によって燐酸カリウム緩衝液 (200mmol/l; pH 7.4; メルク、ダルムシュタット、ドイツ) に投入した。組み合わせられたエストロゲン検体フローを900 μ lの内容量をもつ0.5mm内径の編ポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイルに導入した。続いて、燐酸カリウム緩衝液中11

1nmol/lの濃度のクメストロール (イーストマン・コダック、ロチェスター、ニューヨーク、米国) をKratos-ABIスペクトロフロー400ポンプを使用して0.5ml/minの流量で移動相に投入した。得られたフローを570 μ lの内容量をもつ0.5mm内径の編ポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイルに導入した。反応は20°Cで実行された。

続いて、フローを蛍光検出器 (メルク1080蛍光検出器; 励起波長340nm; 発光波長410nm) に導入した。17 β -エストラジオール、エストリオール、ジエチルスチルベストロール、ゼラノール、およびエストロンは50nmol/lの濃度で検出することができるのに対してプロゲステロン、テストステロン、およびデキサメサゾン100nmol/lの濃度では何の応答もないと判った。

例 4

この例では、三つのHPLCポンプ、即ち、一つのジャスコ88PUと、二つのスペクトロフロー400-ABI分析クラトス分割ポンプと、20 μ lの注入量をもつ6ポート注入弁 (レオジン、パークレー、米国) と、メルクー日立F-1080蛍光検出器 (時定数8秒; 励起波長486nm; 発光波長516nm) と、キップ&ゾーネンBD 40記録器とからなるフロー注入 (FI) システムを使用した。0.5重量%のツイーン20を含む燐酸緩衝食塩水 (PBS; pH 8.0) を担体溶液として使った。流量は0.2ml/minであった。6.67nMの溶液; 免疫純粋のヤギのアンチービオチン (ピラス、31852X; 13.33nM結合部位) と13.33nMのフルオレセインービオチン (5ービオチンアミドカプロイルアミド) ペンチルチオウレイジル フルオレセイン、シグマ、B8889、ロット8H0077) とを0.5重量%ツイーン20からなるPBS中に調整した。これらの溶液を、xタイプとyタイプの混合ユニオンを経由して0.2ml/minの流量でD (+) ビオチン (メルク、ドイツ) を含むFI担体に加えた。抗体溶液を加えた後、フローを142 μ lの内容量をもつ0.5mm内径の編PTFE反応コイルに通した。標識抗体溶液を加えた後、フローを167 μ lの内容量をもつ0.5mm内径の編PTFE反応コイルに通した。システムを室温で運用した。遊離と抗体結合抗原からなる得られた反応混合物フローは、12cm長、1.5mm内径、分子量遮断100kK (X-Flow B. V., アルメロ、オランダ) の一つの毛細管交差流動膜タイプUFM, M5から成る中空繊維モジュールに向けられる。モジュールは、3.0mm内径の円形溝をもつプレキシグラスと、両端および両端の側部の螺子入り口とから製造される。そのPTFE管材料を中空繊維中に挿入して、中空繊維とその管材料との両方の周りに2mmのシリコン管材料を置き、O-リングと平坦な端をもつ指締めとをその管材料の上に置き、プレキシグラス中へとネジ締めした。シリコン管材料ははめ輪として働き、中空繊維とPTFE管材料の両方を締め付ける。O-リングは中空繊維を締め付ける際の摩擦力を防ぐ。モジュールの入口での側面接続は節のあるシリコン管で閉じられ、出口は膜を介して全ての流動体を出口での側面接続へと強制するギルソン制限器に接続され、その出口は蛍光検出器へと導く。

濃度依存信号が得られる。毛細管交差流動膜によって遊離フルオレセインービオチンを抗体結合標識抗原から分離した。異なるビオチン濃度を利用して1 μ g/lから10mg/l (4nM-40 μ M) までの範囲で応答が得られた。

例 5

PBS (0.5重量%ツイーン20) 中7.4nMの濃度のセイヨウワサビのペルオキシダーゼ (HRP) 標識ビオチン (シグマ) と、83.3 μ Mの3-p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸 (HPPA) と2

10

20

30

40

50

0mMの H_2O_2 の基質溶液とを蛍光標識抗原に換えて使った以外は例4を繰り返した。その基質溶液をギルソン・モデル302 HPLCポンプを使って中空繊維モジュールの入口側に加えた。900と570 μ lの反応コイルをそれぞれ使って、ビオチンは最初抗体と反応することが許されその後HRP標識抗原と反応することが許された。

遊離と抗体結合標識抗原の分離が生じた： ± 45 kDのHRP-ビオチンは自由に膜を通過できるが、一方 ± 195 kDの抗体結合分画は保持される。その基質溶液を蛍光信号を発生する受容器フローに加えた。フルオレセイン-ビオチンを使う免疫化学的検出システムとの比較においては、この組立は少なくとも類似の応答へと導く。

これら検出の組立のための時間枠は約7分であり、それは3分の反応時間と3.5分の終了させるピークのための時間とから成る。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 30/74 (2006.01)		G 0 1 N 30/74	F
G 0 1 N 30/84 (2006.01)		G 0 1 N 30/84	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 33/558 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	A
		G 0 1 N 33/558	

- (72)発明者 イルタ, フベルトゥス
オランダ国 ライデン 2 3 1 2 アーファウ スタシオンズウェーク 4 6 ツェー/オー リ
ヨクズウニヴェルジテート テ ライデン
- (72)発明者 オーステルカンフ, アイケ ヨハネス
オランダ国 ライデン 2 3 1 2 アーファウ スタシオンズウェーク 4 6 ツェー/オー リ
ヨクズウニヴェルジテート テ ライデン
- (72)発明者 ルッツ, エーファ サスキア マライケ
オランダ国 ライデン 2 3 2 4 エルイクス クリクスパーンウェーク 4 2

審査官 宮澤 浩

- (56)参考文献 特開平04-203967 (JP, A)
特開昭60-024450 (JP, A)
特開昭63-021559 (JP, A)
特表平8-500611 (JP, A)
特表平11-502608 (JP, A)
Jorunal of Chromatgraphy, 1993年, vol.633, p.65-72

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/543 597
G01N 30/48
G01N 30/64
G01N 30/70
G01N 30/74
G01N 30/84
G01N 30/88
G01N 33/53
G01N 33/558