

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年5月9日(09.05.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/088142 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/553 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01) *G01N 37/00* (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/040435

(22) 国際出願日: 2018年10月31日(31.10.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2017-210952 2017年10月31日(31.10.2017) JP

(71) 出願人: 田中貴金属工業株式会社
(**TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.**) [JP/JP];
〒1006422 東京都千代田区丸の内二丁目7番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 加藤 伸一(**KATO, Shinichi**); 〒2540076
神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社 平塚テクニカルセンター内 Kanagawa (JP). 伊藤 大輔(**ITO, Daisuke**);
〒2540076 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社 平塚テクニカルセンター内 Kanagawa (JP). 関根 宗一郎(**SEKINE, Soichiro**); 〒2540076 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社 平塚テクニカルセンター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 佐伯 拓郎, 外(**SAEKI, Takuro et al.**);
〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目15番8号 アミノ酸会館ビル4階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) **Title:** DETECTION AGENT FOR BIOASSAY AND SIGNAL AMPLIFICATION METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: バイオアッセイのための検出剤及びそれを用いたシグナルの増幅方法

(57) **Abstract:** The present invention provides, in a method for measuring a subject substance by using a bonding partner that specifically recognizes the substance to be measured, a detection agent for amplifying a signal from a reporter substance which is indirectly coupled with the substance to be measured via the bonding partner, and a signal amplification method using the detection agent. The present invention pertains to the detection agent in which the bonding partner which specifically recognizes the substance to be measured is fixed on gold nanoparticles together with a plurality of the reporter substances.

(57) 要約: 本発明は、測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを利用した対象物質の測定方法において、結合パートナーを介して測定対象物質に間接的に結合するレポーター物質からのシグナルを増幅するため検出剤、及びそれを用いたシグナルの増幅方法を提供する。本発明は、測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを、複数のレポーター物質とともに金ナノ粒子上に固定化した検出剤に関する。

WO 2019/088142 A1

明 細 書

発明の名称：

バイオアッセイのための検出剤及びそれを用いたシグナルの増幅方法

技術分野

[0001] 本発明は、生物学的に特異的な結合パートナーによる結合を利用した対象物質の測定方法においてシグナルを増幅するための検出剤及びそれを用いた測定方法に関する。

背景技術

[0002] 抗原抗体反応に代表される生物学的に特異的な結合パートナーによる結合を利用した対象物質の測定方法は、結合パートナーの測定対象物質への特異性が高く結合の親和性も大きいので、ごく微量の測定対象物質であっても極めて特異的にかつ高い感度で、しかも迅速かつ簡便に測定することが可能である。そのため、生物学的に特異的な結合パートナーを用いた測定法の1つである免疫測定法は、臨床化学検査の分野でホルモン、腫瘍マーカー、ウイルス・細菌、自己抗体、血液凝固線溶系などの測定項目の検査に利用されるのみならず、現在では食品に含まれる有害物質の検出、土壌や河川に含まれる環境ホルモン（外因性内分泌攪乱物質）の調査、乱用薬物のスクリーニングなどの幅広い分野での検査に応用されている。

[0003] 免疫測定法の反応形式には、いくつかのバリエーションが存在する。それらは測定原理の観点、すなわち、（１）測定対象物質と抗原又は抗体との反応が競合的か非競合的か、（２）B／F（B o u n d ／ F r e e）分離が必要か否か、（３）レポーター物質による標識が必要か否か、といった観点から分類することができる。免疫測定法のなかでも、抗原又は抗体を何らかのレポーター物質で標識しB／F分離を必要とする、非均一系標識免疫測定法は汎用性の高い重要な測定方法である。この方法は、さらに競合法と非競合法に分類される。競合法では、例えば測定対象物質が抗原の場合、一定量の抗原を固相に固定化し、これに特異的な抗体をレポーター物質により標識す

る。固定化抗原に対して、測定対象の抗原と限られた量の標識抗体を添加すると、固定化抗原と遊離の抗原が競合的に抗体と反応し、遊離抗原の量が多くなるほど固相に吸着される標識抗体の量が減少する。遊離の抗原の量を変化させ、固相上に残る標識抗体からのシグナル強度を測定することにより、標準曲線（用量作用曲線）を作成できる。濃度不明の測定対象抗原について固定化抗原と競合反応を行い標準曲線に挿入することで、測定対象抗原の量を決定することができる。一方、非競合法では、測定対象物質が抗原の場合、これを過剰量の標識抗体と反応させて、定量的に生成する免疫複合体の量を標識抗体からのシグナル強度により決定する。

非競合法では、過剰の抗体を用いることにより、反応が迅速に平衡に達し、微量の抗原を効率よくシグナル強度に変換することができる。そのため、非競合法を採用すると、分析時間の短縮が容易で、測定の精度を上げることができ、さらに高い感度を得ることができる。特に、一定過剰量の抗体を固定化した固相を用い、測定対象の抗原を固相に捕捉し、さらに抗原分子上の異なる抗原決定基を認識する標識抗体を過剰に加えて反応させる測定法は、抗原が2種類の抗体にサンドイッチされた複合体を形成することから、サンドイッチアッセイと呼ばれている。サンドイッチアッセイは一般に高感度で、特にタンパク質抗原の高感度分析法として現在最もよく利用されている。

[0004] 非均一系標識免疫測定法、なかでもサンドイッチアッセイでは、分析時間のさらなる短縮化のために、また、新たな測定項目の開発のために、より一層の感度の向上が求められている。標識免疫測定法では、測定対象の抗原の量はこれに結合する標識抗体からのシグナル強度に相関するので、アッセイの感度を向上させるためには、標識抗体からのシグナルを増強する必要がある。そのため、抗体を標識するレポーター物質に関して、レポーター物質の種類、及び最終的に発生するシグナルの検出方法が現在までに種々検討されてきている。現在最もよく用いられるレポーター物質は酵素であり、その代表的なものとしては西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -GAL）、アルカリホスファターゼ（ALP）などがある。

これらの酵素に、適切な基質を反応させることにより、最終的に色素、蛍光物質又は発光物質などを生成させ、生成物による吸光度の変化、又は蛍光強度若しくは発光強度をシグナルとして測定する。酵素を用いることの利点は、色素、蛍光物質又は発光物質それ自体をレポーター物質として用いた場合と比較して、酵素活性により色素、蛍光物質又は発光物質の量を増大させることができるので、最終的に発生するシグナルを増幅することが可能な点にある。特に、レポーター物質としてHRP、 β -GAL、ALP又はルシフェラーゼなどの酵素を用い、基質としてルミノール、アダマンチルジオキセタン誘導体又はルシフェリンなどを加え、反応生成物が放出する光を検出する方法（化学発光酵素イムノアッセイ）では、レポーター物質としてラジオアイソトープを用いた場合を超える、高い感度を得ることが可能となっている。

[0005] しかし、前記のような、レポーター物質及びその検出方法の検討にもかかわらず、現在の標識免疫測定法の検出感度は満足できるものではなく、標識抗体からのシグナルを増幅する方法には未だ改善の余地がある。標識免疫測定法の測定対象となる物質には、ホルモン、腫瘍マーカーなどの低分子やペプチドが多く含まれており、これらの小分子に結合できる標識抗体の数には限りがある。特に、サンドイッチアッセイでは、これらの物質を固相に固定化した抗体で捕捉するため、一般に標識抗体は測定対象物質に1つしか結合できない。また、標識抗体に結合させることのできるレポーター物質の数は1から数個程度が限界である。測定対象物質の量はこれに結合する標識抗体からのシグナル強度に相関するものの、測定対象物質に抗体を介して間接的に結合することのできるレポーター物質の数には制限があり、このことが標識免疫測定法における感度の向上を妨げる一因となっていた。

[0006] 測定対象物質に間接的に結合するレポーター物質の数を増加させて、測定対象物質の量に相関するシグナル強度を増幅させるために、測定対象物質を特異的に認識する抗体を検出可能な部分とともにビーズなどの検出支持体に固定化したものを使用することが提案されている（特許文献1）。そこでは

、検出支持体に固定化された複数の抗体のうちの何れか1つが、捕捉支持体に固定化された抗体で捕捉された測定対象物質に結合してサンドイッチ型の免疫複合体を形成する。測定対象物質との結合に関与していない検出支持体上の抗体に、さらにシグナルを発生する検出可能な部分を有する結合剤を反応させることで、最終的に1つの測定対象物質に対して間接的に数多くの検出可能な部分を結合させることができ、シグナル強度を増幅することが可能となる。検出可能な部分は、前記のように結合剤を介して検出支持体に結合させることもできるが、複数の抗体とともに検出支持体に直接に固定化することもでき、或いは、予め検出可能な部分を複数の抗体に結合させ、それを検出支持体に固定化することもできる。検出支持体としては、ポリスチレンビーズが開示されており、その大きさとしては直径が約0.1～50 μm 、特に約1～3 μm のものが記載されている。そして、シグナルを増幅させるための鍵となる重要な要素は、抗体が結合し得る検出支持体の表面積の大きさにあり、検出支持体の表面積が大きいほどシグナルの増幅率が高いことも開示されている。しかし、検出支持体として、直径が数nmから数十nm程度のナノ粒子を使用し得ることは記載されておらず、特に金ナノ粒子などの金属ナノ粒子を検出支持体に用いることの開示はない。

[0007] 一方、特許文献2には、抗体及び酵素をその表面に固定化した金ナノ粒子が開示されている。そこでは、抗体を金ナノ粒子に物理的に吸着させることにより、抗体が変性して失活したりランダムな配向により抗原結合部位が露出せず抗体の機能が低下したりすることを避けるために、抗体結合タンパク質—金結合ペプチドを介して、抗体を金ナノ粒子に固定化することが提案されている。しかし、抗体結合タンパク質及び金結合ペプチドの利用によって、抗体を適切な配向性をもって金ナノ粒子の表面に固定化したにもかかわらず、酵素標識抗体を固定化した金ナノ粒子を用いて免疫測定法のシグナルを増幅することは困難であった。特許文献2には、1mg/ml濃度の抗原溶液を用いて抗原をプレートに吸着させ、これを抗体及び標識抗体を固定化した金ナノ粒子で検出したことが記載されているが、金ナノ粒子を介して抗原

に結合し免疫複合体を形成することができた標識酵素の量は決して十分なものではなく、標識酵素からのシグナルを検出するために標準的な基質と比色法を用いても90分もの時間を要したことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2015-508180号公報

特許文献2：特開2013-151454号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを利用した対象物質の測定方法において、結合パートナーを介して測定対象物質に間接的に結合するレポーター物質からのシグナルを増幅するための方法を提供する。また、本発明は、測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを利用した対象物質の測定方法で用いられる、結合パートナーを介して測定対象物質に結合できレポーター物質からのシグナルを増幅することができる検出剤を提供する。さらに、本発明は、レポーター物質で標識された生物学的に特異的な結合パートナーを利用した対象物質の測定方法において、測定の感度を向上させる方法及びそれに用いられる検出剤を提供する。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、レポーター物質で標識された生物学的に特異的な結合パートナーを利用した対象物質の測定方法において、より一層の測定感度の向上を実現させるために、レポーター物質からのシグナルを増幅するための方法を検討してきた。そして、本発明者らが鋭意検討を行った結果、測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを、複数のレポーター物質とともに金ナノ粒子上に直接に固定化し、これに対象物質と反応させることにより、測定対象物質に間接的に結合するレポーター物質の数を著しく増加させることができ、測定対象物質の量に相関するレポーター物質からのシグナルを顕著

に増幅できることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は、以下の（１）～（３６）に関する。

（１）対象物質を測定するための方法であって、

（ｉ）測定対象物質、並びに測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤を含有する複合体を形成させること、及び

（ｉｉ）複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定すること、を含有してなり、

第一の結合パートナーは、検出剤中で金ナノ粒子に直接に固定化されたものである、方法。

（２）複合体が、さらに、固体支持体に固定化された、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナーを含有する、前記（１）に記載の方法。

（３）複合体が、固体支持体に固定化された測定対象物質を含有する、前記（１）に記載の方法。

（４）前記（ｉ）は、測定対象物質を含む液体試料と、測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤とを接触させ、測定対象物質と検出剤とを含有する複合体を形成させる工程である、

前記（１）に記載の方法。

（５）前記工程（ｉ）は、前記接触と同時又は接触後に、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナーが予め固定化された固体支持体と接触させる工程をさらに含有するものであり、

前記（ｉｉ）は、固体支持体上に形成された複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定する工程である、

前記（４）に記載の方法。

（６）前記工程（ｉ）は、測定対象物質が予め固定化された固体支持体を含有する反応系内で実施される工程であり、

前記（ｉｉ）は、固体支持体上に形成された複合体に含まれるレポーター

物質からのシグナルを測定する工程である、

前記（４）に記載の方法。

（７）前記（ｉ）は、測定対象物質を含む液体試料と、測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤と、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナーが予め固定化された固体支持体とを少なくとも使用する工程であって、

第二の結合パートナーが予め固定化された固体支持体と、測定対象物質を含む液体試料とを接触させ、次いで測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤を接触させることにより測定対象物質と検出剤とを含有する複合体を形成させる工程であり、

前記（ｉｉ）は、固体支持体上に形成された複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定する工程である、

前記（１）に記載の方法。

（８）固体支持体が、マイクロプレート、磁性粒子、多孔性膜及びマイクロ流体チップからなる群より選ばれる、前記（２）、（３）、及び（５）～（７）の何れかに記載の方法。

（９）固体支持体が、磁性粒子である、前記（８）に記載の方法。

（１０）磁性粒子の平均粒子径が、 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ である、前記（９）に記載の方法。

（１１）金ナノ粒子の平均粒子径が、 $20 \sim 150 \text{ nm}$ である、前記（１）～（１０）の何れかに記載の方法。

（１２）結合パートナーが、抗原又は抗体若しくはその抗原結合性断片である、前記（１）～（１１）の何れかに記載の方法。

（１３）結合パートナーが、抗体又はその抗原結合性断片である、前記（１２）に記載の方法。

（１４）レポーター物質が、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質及び発光物質からなる群より選ばれる、前記（１）～（１３）の何れかに記載の方法

。

(15) レポーター物質が、電気化学的に活性な発光物質、又は電気化学活性物質を反応生成物として生じる酵素である、前記(1)～(13)の何れかに記載の方法。

(16) 液体試料が生体液である、前記(4)～(15)の何れかに記載の方法。

(17) 測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤であって、

第一の結合パートナーは、金ナノ粒子に直接に固定化されたものであり、
レポーター物質は、第一の結合パートナー又は金ナノ粒子に直接に固定化されたものであり、

レポーター物質は、第一の結合パートナーに結合した測定対象物質の量に
相関した強度のシグナルを発生できるものである、

対象物質を測定するための検出剤。

(18) 金ナノ粒子の平均粒子径が、20～150nmである、前記(17)に記載の検出剤。

(19) 結合パートナーが、抗原又は抗体若しくはその抗原結合性断片である、前記(17)又は(18)に記載の検出剤。

(20) 結合パートナーが、抗体又はその抗原結合性断片である、前記(19)に記載の検出剤。

(21) レポーター物質が、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質及び発光物質からなる群より選ばれる、前記(17)～(20)の何れかに記載の検出剤。

(22) レポーター物質が、電気化学的に活性な発光物質、又は電気化学活性物質を反応生成物として生じる酵素である、前記(17)～(20)の何れかに記載の検出剤。

(23) レポーター物質は、第一の結合パートナーに直接に固定化されたものである、前記(17)～(22)の何れかに記載の検出剤。

(24) 対象物質を測定するためのキットであって、

前記(17)～(23)の何れかに記載の検出剤、及び複合体形成部を備えた固体支持体からなるデバイスを含み、

デバイスの複合体形成部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化されたものである、キット。

(25) 対象物質を測定するためのキットであって、

前記(17)～(23)の何れかに記載の検出剤と、複合体形成剤保持部及び複合体捕捉部を備えた固体支持体からなるデバイスとを含み、

デバイスの複合体形成剤保持部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなる複合体形成剤を含み、

デバイスの複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより複合体形成剤を捕捉する機構を備えたものである、キット。

(26) 対象物質を測定するためのキットであって、

前記(17)～(23)の何れかに記載の検出剤、複合体形成剤、及び複合体捕捉部を備えた固相支持体からなるデバイスを含み、

複合体形成剤は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなるものであり、

デバイスの複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより複合体形成剤を捕捉する機構を備えたものである、キット。

(27) 固体支持体が、マイクロプレート、磁性粒子、多孔性膜及びマイクロ流体チップからなる群より選ばれる、前記(24)に記載のキット。

(28) 固体支持体が、マイクロ流体チップである、前記(25)又は(26)に記載のキット。

(29) 磁性粒子の平均粒子径が、 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ である、前記(25)～(28)の何れかに記載のキット。

(30) 前記(24)～(29)の何れかに記載のキット、及び前記キット

に含まれるデバイスを着脱可能なデバイス装着部と前記キットに含まれる検出剤のレポーター物質から発生したシグナルを測定することができるシグナル検出部とを備えた測定装置を含有してなる、免疫測定システム。

(31) 対象物質を測定するためのデバイスであって、

検出剤保持部、及び複合体形成部を備えた固体支持体からなり、

検出剤保持部は、前記(17)～(23)の何れかに記載の検出剤を含有し、

複合体形成部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化されたものである、デバイス。

(32) 対象物質を測定するためのデバイスであって、

検出剤保持部、複合体形成剤保持部、及び複合体捕捉部を備えた固体支持体からなり、 検出剤保持部は、前記(17)～(23)の何れかに記載の検出剤を含有し、

複合体形成剤保持部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなる複合体形成剤を含有し、

複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより複合体形成剤を捕捉する機構を備えたものである、デバイス。

(33) 固体支持体が、多孔性膜又はマイクロ流体チップである、前記(31)に記載のデバイス。

(34) 固体支持体が、マイクロ流体チップである、前記(32)に記載のデバイス。

(35) 磁性粒子の平均粒子径が、 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ である、前記(32)又は(34)に記載のデバイス。

(36) 前記(31)～(35)の何れかに記載のデバイス、及び前記デバイスを着脱可能なデバイス装着部と前記デバイスの検出剤保持部に含まれる検出剤のレポーター物質から発生したシグナルを検出することができるシグナル検出部を備えた測定装置を含有してなる、免疫測定システム。

発明の効果

[0012] 本発明は、レポーター物質で標識された生物学的に特異的な結合パートナーを利用した対象物質の測定方法において、測定の感度を向上させる方法及びそれに用いられる検出剤を提供するものである。

従来の標識免疫測定法では、例えば酵素標識抗体が抗原に結合することにより抗原に結合できる酵素の数は一般に１個程度に制限されており、抗原に結合した酵素からのシグナルを増幅し測定の感度を高めることには限界があった。しかし、本発明では、測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを、複数のレポーター物質とともに金ナノ粒子上に固定化した検出剤を提供することにより、測定対象物質に間接的に結合するレポーター物質の数を著しく増加させることができ、測定対象物質の量に相関するレポーター物質からのシグナル強度を顕著に増幅することが可能となる。

また、本発明の検出剤は、第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された固体支持体とともに用いることで、競合法又は非競合法のいずれの反応形式による測定方法でも高い感度を得ることができる。

さらに、本発明の検出剤は、免疫測定法で汎用される固体支持体のいずれと組み合わせても高い感度で対象物質を測定することができるが、特に磁性粒子等の粒子形状の固体支持体との組み合わせにおいて極めて高感度な測定を達成することができる。

発明を実施するための形態

[0013] 本明細書においては、別段の定義がない限り、本発明に関連して使用される科学用語及び専門用語は、当業者が一般に理解する意味を有する。さらに、状況に応じて定義することが要求されない限り、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含むことが意図されている。「又は」という用語は、代替物のみを言及することが明確に示されない限り又は代替物が相互排他的でない限り、「及び／又は」を意味するために使用されるが、本明細書では、代替物のみ及び「及び／又は」の両者を意味するものとして使用される。数値範囲としてA～Bのように数値Aと数値Bとを用いて表記される場合、

別段の定義がない限り、「A～B」は、A以上B以下の数値範囲を意味するものとして使用される。公知の方法及び技術は、他の例示がない限り、当技術分野で周知の通常の方法によって又は一般の参考文献において記載される方法によって実施される。

[0014] 本明細書における「測定」には、測定対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する一般的な意味の「測定」の他、測定対象物質の存在の有無を判定する「検出」の意味も含まれる。

[0015] 本発明における「結合パートナー」とは、測定対象物質を生物学的な特異性を利用して認識し結合でき、測定対象物質とともに複合体を形成することができる物質であれば、特に限定されるものではない。生物学的な特異性を利用した結合としては、例えば、抗原抗体反応、レセプターーリガンド反応、酵素－基質反応、タンパク質間相互作用（例えば、IgGとプロテインAとの反応）、タンパク質－低分子間相互作用（例えば、アビジンとビオチンとの反応）、タンパク質－糖鎖間相互作用（例えば、レクチンと糖鎖との反応）、タンパク質－核酸間相互作用、核酸間ハイブリダイゼーション反応などを利用した結合が挙げられる。例えば、生物学的に特異的な反応として抗原抗体反応を利用する場合には、測定対象物質と結合パートナーとの組合せは、抗原（測定対象物質）と抗体（結合パートナー）との組合せ、或いは、抗体（測定対象物質）と抗原（結合パートナー）との組合せとなる。生物学的に特異的な反応として酵素－基質反応を利用する場合には、測定対象物質と結合パートナーとの組合せは、酵素（測定対象物質）と基質（結合パートナー）との組合せ、或いは、基質（測定対象物質）と酵素（結合パートナー）との組合せとなる。

[0016] 本発明において「第一の結合パートナー」に加え「第二の結合パートナー」が用いられるとき、第二の結合パートナーは、測定対象物質を生物学的な特異性を利用して認識し結合でき、測定対象物質とともに複合体を形成することができる物質であって、第一の結合パートナーが結合する領域とは重複しない領域で測定対象物質に結合できる物質であれば特に限定されるもので

はない。「第一の結合パートナー」と「第二の結合パートナー」は、同じ物質であってもよく異なる物質であってもよい。通常、第二の結合パートナーが結合可能な測定対象物質の部分は第一の結合パートナーが結合可能な部分とは異なっており、第二の結合パートナーは少なくとも測定対象物質に結合する部分又は能力に関して第一の結合パートナーとは異なる物質である。しかし、測定対象物質が、第一の結合パートナーが結合可能な部分を複数有している場合には、第二の結合パートナーは第一の結合パートナーと同じ物質であってもよく、第二の結合パートナーは第一の結合パートナーが結合しない部分で測定対象物質に結合することができる。さらに、第二の結合パートナーと測定対象物質との結合は、第一の結合パートナーと測定対象物質との結合と同じ生物学的に特異的な反応を利用してもよく、異なる生物学的反応を利用してもよい。例えば、第一の結合パートナー－測定対象物質－第二の結合パートナーの組合せとして、抗原抗体反応のみを利用して、抗体（第一の結合パートナー）－抗原（測定対象物質）－抗体（第二の結合パートナー）又は抗原（第一の結合パートナー）－抗体（測定対象物質）－抗体（第二の結合パートナー）などの組合せとすることができる。或いは、抗原抗体反応と酵素－基質反応を利用して、抗体（第一の結合パートナー）－酵素（測定対象物質）－基質（第二の結合パートナー）又は酵素（第一の結合パートナー）－基質（測定対象物質）－抗体（第二の結合パートナー）などの組合せとすることもできる。

[0017] 本発明の結合パートナーとしては、生物学的に特異的な反応のなかでも特異性が極めて高く結合の親和性が大きい抗原抗体反応を利用して測定対象物質に結合することができる、抗体又は抗原が好ましい。さらには、天然には特異的な結合パートナーが存在しない測定対象物質に対して新たに結合パートナーを作製できる点で、抗体がより好ましい。

[0018] 本発明の結合パートナーとして用いられる「抗体」は、測定対象物質に対して十分な特異性と親和性を示すことができれば、必ずしも免疫グロブリン分子全体の構造が維持されていなくてもよく、抗体の抗原結合性断片であっ

てもよい。抗体の抗原結合能は、抗体の可変部に支配されており、抗体の定常部は必ずしも存在しなくてもよい。従って、本発明の「抗体」としては、5種類の免疫グロブリン分子（IgG、IgM、IgA、IgD、IgE）の他、これらの分子の可変部からなる断片である、Fab、Fab'、F(ab')₂、FabからV_Lを取り除いたFd、一本鎖Fvフラグメント（scFv）及びその二量体であるdibody、又はscFvからV_Lを取り除いた単ドメイン抗体（sdAb）などを用いることができるが、これらに限定されない。

[0019] 本発明の抗体は、商業的に入手することもできるし、公知の標準的な方法によって作製することもできる。測定対象物質に対する抗体を作製する場合には、測定対象物質でウサギ、マウス、ラット、モルモット、ロバ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどの実験動物を免疫し、測定対象物質に特異的に結合する抗体を動物体内で生成させ、抗体を含む抗血清又はポリクローナル抗体を調製するか、又は、抗体産生に関わる細胞をミエローマ細胞と融合させたのちクローン化してモノクローナル抗体を調製することができる。或いは、遺伝子工学的な手法により、化学的に合成した抗体遺伝子を大腸菌などに発現させて、動物体内では生成されない構造をもつ人工抗体をin vitroで作製することもできる。

本発明の抗体として抗原結合性断片を用いる場合には、公知の方法により、前記のように作製された抗体を酵素消化することにより得ることができる。パパインによる分解でFabが得られ、ペプシンによる処理でF(ab')₂が得られ、F(ab')₂を還元処理することによりFab'が得られる。或いは、遺伝子操作により、抗体の重鎖可変部（V_H）と軽鎖可変部（V_L）を可動性に富むリンカーペプチドで連結することによりscFvを作製することができる。

[0020] 本発明により測定することのできる「対象物質」としては、生物学的な特異性を利用してそれに結合できる結合パートナーが存在すれば如何なる物質であってもよく、例えば、タンパク質（抗原、抗体、レセプター、酵素、レ

クチン等)、ペプチド、糖鎖(単糖、オリゴ糖、多糖等の糖鎖)、脂質、核酸、低分子化合物、ホルモン(ステロイドホルモン、アミンホルモン、ペプチドホルモン等)、腫瘍マーカー、アレルギー物質、農薬、環境ホルモン、乱用薬物、ウイルス、又は細胞(細菌、血球等)等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0021] 前記の測定対象物質を含有し、本発明による測定に供される試料としては、血液(全血、血漿、血清)、リンパ液、唾液、尿、大便、汗、粘液、涙、随液、鼻汁、頸部又は膣の分泌液、精液、胸膜液、羊水、腹水、中耳液、関節液、胃吸引液、組織・細胞等の抽出液や破砕液等の生体液の他、食品、土壌、植物の抽出液や破砕液等の溶液や、河水、温泉水、飲料水、汚染水等を含む、ほとんど全ての液体試料が挙げられる。

[0022] 本発明の検出剤を用いて、競合法により対象物質を測定するときには、測定対象物質を予め固体支持体に固定化しておく必要がある。本発明の「測定対象物質が予め固定化された固体支持体」とは、液体試料中に遊離する測定対象物質と競合的に第一の結合パートナーと結合する測定対象物質が予め固定化された固体支持体をいう。この固体支持体に予め固定化された測定対象物質は、必ずしも液体試料中に存在する測定対象物質と全く同じ立体構造を保持していなくてもよい。固体支持体に固定化された測定対象物質は、第一の結合パートナーに生物学的な特異性を利用して結合できる構造を固体支持体に固定化された状態で保持している限り、液体試料中に遊離する測定対象物質と全く同じ物質であってもよいし、その断片であってもよく、さらにはキャリアとなる高分子化合物(例えば、タンパク質)に連結されたものであってもよい。

[0023] 本発明の「レポーター物質」としては、定量的に測定することができるシグナルを発生することができる物質であれば特に限定されず、如何なる物質も用いることができ、例えば、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。レポーター物質として、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質を用いた場合には、それらが発生する放射線、蛍光、発光を

シグナルとして定量的に測定することができる。レポーター物質が酵素の場合には、適切な基質を作用させ、最終的に生成した色素、蛍光物質、発光物質に由来する色、蛍光、発光をシグナルとして測定する。本発明のレポーター物質としては、前記のいずれの物質も用いることができるが、基質を過剰に加えることで反応生成物の量を増加させることができ、最終的なシグナルを増幅することが可能な酵素が好ましい。

[0024] 近年、レポーター物質からのシグナルを増幅する方法として、サイクリング法と呼ばれる方法が開発されている。この方法では、発光により構造が変化した発光物質或いは酵素反応による反応生成物を、酸化還元反応によって発光前の構造に又は酵素の基質の状態に変換することで、発光物質又は酵素反応生成物を繰り返し生成することができ、発光物質又は酵素反応生成物からのシグナルを増幅することが可能となる。酸化還元反応は、化学的に不活性な電極を用いて行うこともできるし、或いは酸化還元酵素によって促進することもできる。本発明のレポーター物質としては、サイクリング法と組み合わせることができる電気化学的に活性な発光物質又は電気化学活性物質を反応生成物として生じる酵素が好ましい。より好ましいレポーター物質は、前記のように過剰な基質の添加によるシグナル増幅とサイクリング法によるシグナル増幅とを組み合わせることでより一層の高感度化が図れる酵素であり、これを酵素反応生成物として電気化学活性物質を生じさせる適切な基質と共に用いることができる。

[0025] 本発明のレポーター物質として用いることができるラジオアイソトープとしては、 ^3H 、 ^{125}I などが挙げられる。蛍光物質としては、フルオレセイン及びその誘導体（例えば、F I T C）、テトラメチルローダミン（T A M R A）及びその誘導体（例えば、T R I T C）、C y 3、C y 5、T e x a s R e d、フィコエリスリン（P E）、量子ドット（Q u a n t u m d o t、商品名 Q d o t（登録商標））などが挙げられるが、これらに限定されない。発光物質としては、ルミノール誘導体（例えば、イソルミノール）、アクリジニウム誘導体（例えば、アクリジニウムエステル）、エクオリン、

ルテニウム錯体（例えば、2価のルテニウムピリジン錯体）等が挙げられるが、これらに限定されない。特に、2価のルテニウムピリジン錯体は、前記のサイクリング法により3価の錯体を経て発光前の構造に再変換することができシグナルの増幅が可能であることから、本発明のレポーター物質として好ましい発光物質である。

[0026] 本発明のレポーター物質として酵素を用いる場合には、適切な基質と組み合わせることにより、酵素活性を比色法、蛍光法、発光法などの方法で測定することができる。本発明の酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -GAL）、アルカリホスファターゼ（ALP）、グルコースオキシダーゼ（GOD）、ルシフェラーゼ、エクオリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、HRPは、1, 2-フェニレンジアミン又は3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を基質とすることで比色法により活性を検出することができ、4-ヒドロキシフェニル酢酸又は3-（4-ヒドロキシフェニル）プロピオン酸を基質として蛍光法、ルミノールを基質として発光法でその活性を検出することができる。 β -GALは、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド（ONPG）を基質として比色法、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド（MUG）を基質として蛍光法、アダマンチル1, 2-ジオキセタン誘導体であるAMP GDを基質として発光法で活性を検出できる。ALPは、4-ニトロフェニルホスフェートを基質として比色法、4-メチルウンベリフェリルホスフェートを基質として蛍光法、アダマンチル1, 2-ジオキセタン誘導体であるAMP PDを基質として発光法で活性を検出できる。また、酵素活性を発光法で検出する場合、酵素反応で生じた生成物からの発光を直接に検出するのみならず、酵素反応生成物によって発光物質を励起してその結果生じる発光を検出することもできる。例えば、ALPや β -GALに基質としてインドキシル誘導体を反応させ、生じた過酸化水素をイソルミノールと反応させることにより発生する発光を測定することもできる。

さらに、レポーター物質としての酵素は、前記のサイクリング法と組み合

わせることにより反応生成物を再利用することが可能となり、反応生成物からのシグナルをより一層増強することができる。例えば、酵素としてALPを用いこれに基質であるNADPを作用させ生じたNAD⁺を、サイクリング法によりNADHを経てNAD⁺に再変換させることができる。このサイクリング法による循環反応を、酸化還元反応によりフォルマザン色素を生成させる反応と組み合わせることで、フォルマザン色素の生成が増幅され、比色法ながらも非常に高い感度でALPの酵素活性を測定することができ、ごく微量の測定対象物質であってもその濃度を決定することが可能となる。

[0027] 本発明の「金ナノ粒子」とは、ナノサイズの金の微粒子をいい、その表面に第一の結合パートナー及び複数のレポーター物質を結合できる粒子をいう。本発明の金ナノ粒子は、第一の結合パートナー及び複数のレポーター物質とともに検出剤を形成する。検出剤に含まれる第一の結合パートナーのうちの1つが測定対象物質に結合すると、検出剤は複数のレポーター物質を含んでいるため、1つの測定対象物質に対して間接的に複数のレポーター物質が結合することとなる。一般的な標識免疫測定法では、1つの測定対象物質に対して1つのレポーター物質しか結合できないところ、本発明の検出剤によれば1つの測定対象物質に対して複数のレポーター物質を結合させることができるので、測定対象物質の量に相関するレポーター物質からのシグナルを著しく増幅することが可能となる。

[0028] 本発明の金ナノ粒子は、その平均粒子径が約1～400nm、好ましくは約10～200nm、より好ましくは約20～150nmの範囲である。平均粒子径が20nm～150nmの範囲では、測定時のシグナル／ノイズ比（S／N比）が高い極めて良好な結果が得られており（後記実施例参照）、同範囲においてはいずれの平均粒子径を有する金ナノ粒子も好ましく用いることができる。ここで、金ナノ粒子を含む金コロイド溶液の取扱容易性も考慮すると、平均粒子径20nm以上100nm未満の範囲、特に40nm以上80nm以下の金ナノ粒子がとりわけ好ましい態様として挙げられる。一方、平均粒子径が80nm以上150nm以下の範囲では、測定対象物の濃

度が低い場合であっても比較的強いシグナルが得られるので、測定対象によっては平均粒子径80nm以上150nm以下の範囲、特に100nm以上150nm以下の金ナノ粒子を別のとりわけ好ましい態様として挙げることができる。

本発明の方法において、特に高感度、高精度が求められる場合には、金コロイドの例で言えば、コロイドの粒子の形状を同じ形のもの、例えば真球状にしたものを多くするとか、コロイド粒子の粒径を均一にすること、例えば、40nm、80nm、または120nmというような、特定の粒径の一点に集中させるという、いわゆる粒度分布曲線を狭くした（粒度分布の幅が狭い）コロイドにするという工夫をすることも可能である。粒子径の分散の程度は、多分散指数（PDI）によって評価することができ、PDI値として0.1以下、より好ましくは0.07以下、さらに好ましくは0.05以下となることを指標として、粒度分布の幅が狭い粒子群を公知の手法によって調製することができる。

平均粒子径は、通常、動的光散乱法により測定することができる。例えば金ナノ粒子の場合、粒子が分散された金コロイド液の粒度分布を動的光散乱法粒度分布計で測定した後の平均粒径を求めることで測定できる。粒子の形状は特に限定されるものではなく、球、シェル、ロッド、ライス、ピラミッド、プリズム、スター、プレートなどの種々の形状であってもよいが、粒子の表面に立体障害なく測定対象物質と結合できるように数多くの第一の結合パートナーを固定化できる点で、特に球状の金ナノ粒子が好ましい。

[0029] 本発明の金ナノ粒子は、公知の方法で製造することができ、金ハロゲン化物の還元等による化学的な方法、或いは、レーザーアブレーション等の物理的な方法によって製造することができる。化学的な方法としては、例えば、テトラクロロ金（III）塩（ $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ ）溶液をクエン酸等の還元剤の存在下で還元し種となる粒子を生成した後、アスコルビン酸等の還元剤の存在下に酸性条件で緩やかに成長させる方法などが挙げられる。この方法によれば、約10～200nmの範囲内にある所望の平均粒子径でかつ球状の均

一な金ナノ粒子を含む金コロイド溶液を製造することができる。

[0030] 本発明における「第一の結合パートナーが金ナノ粒子に直接に固定化される」とは、第一の結合パートナーが、これに生物学的な特異性を利用して結合する物質を介することなく、金ナノ粒子にランダムな配向性で結合し固定化されることをいう。生物学的な特異性を利用した結合とは本明細書ですでに記載されたとおりの結合であり、例えば、抗原抗体反応、レセプターーリガンド反応、酵素ー基質反応、タンパク質間相互作用（例えば、IgGとプロテインAとの反応）、タンパク質ー低分子間相互作用（例えば、アビジンとビオチンとの反応）などがある。第一の結合パートナーに生物学的な特異性を利用して結合する物質としては、例えば第一の結合パートナーが抗体である場合には、抗原の他、抗体のFc部分に結合する抗体、細菌由来のタンパク質であるプロテインA、プロテインG及びプロテインLなどの抗体結合タンパク質が挙げられる。本発明においては、第一の結合パートナーは、前記のような物質を介することなく金ナノ粒子に固定化される。

[0031] 本発明の一態様では、第一の結合パートナーは、金ナノ粒子の表面との間に生じる静電相互作用及び／又は疎水性相互作用に基づいて受動的に吸着し固定化される。コロイド状金粒子は、約pH6～8の緩衝液中ではその表面が負に帯電しており、抗体などのタンパク質からなる第一の結合パートナーを容易に固定化することができる。別の態様では、金ナノ粒子の表面を、アミノ基、カルボキシル基、Nーヒドロキシスクシンイミド（NHS）基などの官能基で化学的に修飾し、第一の結合パートナーをこれらの官能基に共有結合することにより金ナノ粒子表面に固定化する。これらの官能基は、第一の結合パートナーの任意のカルボキシル基又はアミノ基と結合するため、第一の結合パートナーは金ナノ粒子の表面にランダムな配向性で固定化されることとなる。金ナノ粒子の表面を修飾する官能基は、ポリエチレングリコール（PEG）などの第一の結合パートナーとは生物学的に特異的な相互作用を示さないスペーサーを介して金ナノ粒子に結合していてもよい。スペーサーは数kDaの大きさ、例えば1～5kDaの大きさとすることができる。

[0032] 本発明のレポーター物質は、第一の結合パートナーと同様に、金ナノ粒子に直接に固定化することもできるし、第一の結合パートナーをレポーター物質によって標識し、標識された第一の結合パートナーを金ナノ粒子に直接に固定化することもできる。或いは、第一の結合パートナーを金ナノ粒子に直接に固定化した後、レポーター物質で第一の結合パートナーを標識することもできる。しかし、レポーター物質がタンパク質以外である場合には受動的な吸着による固定化が困難であること、金ナノ粒子表面に固定化された結合パートナーにレポーター物質を反応させることにより結合パートナーの測定対象物質との結合能が損なわれる恐れがあること、金ナノ粒子の表面に所定の数の結合パートナー及びレポーター物質を固定化し品質の安定した検出剤を供給する必要があること等の理由から、レポーター物質で予め結合パートナーを標識し、標識された結合パートナーを金ナノ粒子に直接に固定化することが好ましい。

[0033] 本発明のレポーター物質による第一の結合パートナーの標識は、酵素、蛍光物質又は発光物質などの種々のレポーター物質で、低分子抗原、高分子抗原又は抗体を標識するときに用いられる、公知の標準的な方法に準じて実施することができる。本発明のレポーター物質は、金ナノ粒子に少なくとも2分子、好ましくは5分子、10分子、100分子、より好ましくはそれ以上の多数の分子を結合させる。レポーター物質を直接に又は間接に金ナノ粒子に「複数」結合して結合剤を形成することにより、結合剤に含まれる第一の結合パートナーを介して測定対象物質に結合するレポーター物質の数を増大させることができ、測定対象物質の量に相関するシグナル強度を増幅することが初めて可能となる。本発明のレポーター物質を数多く金ナノ粒子に結合させることは、レポーター物質で標識した第一の結合パートナーを過剰に用いて金ナノ粒子に受動的に吸着させることにより、或いは、その表面が多数の官能基で化学修飾された金ナノ粒子を用いてレポーター物質で標識した第一の結合パートナーを共有結合させることにより、容易に達成することができる。

[0034] 本発明における「固体支持体」とは、第二の結合パートナー又は測定対象物質を固定化でき、固定化された第二の結合パートナー又は測定対象物質に結合しない遊離の測定対象物質又は結合剤を除去するためのB／F分離の操作に付すことができ、生物学的な特異性を利用した結合に影響を与えない不活性な材質からなるものであれば種々の形状のものを用いることができる。固体支持体の例として、ガラス製又はプラスチック製の小試験管又はマイクロプレート、プラスチックビーズ、磁性粒子、試料の水分によって毛細管現象が生じる多孔性膜、又は、ガラスやプラスチックの小片の中に微細な流路を設けたマイクロ流体チップ等が挙げられるがこれらに制限されず、一般に免疫測定法で用いられる公知の固体支持体であれば何れも本発明に用いることができる。これらの固体支持体への第二の結合パートナー又は測定対象物質の固定化は、免疫測定法で用いられる標準的な方法で実施することができ、例えば、固体支持体表面を官能基等で化学修飾することにより共有結合で固定化することもできるし、より一般的には第二の結合パートナー又は測定対象物質が固体支持体に吸着する性質を利用して受動的に固定化させることもできる。第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された固体支持体は、第二の結合パートナー又は測定対象物質に対する生物学的に特異的な結合以外の非特異的な結合が生じるのを抑制する目的で、ブロッキング処理が行われてもよい。ブロッキング処理では、公知のブロッキング剤（スキムミルク、カゼイン、ウシ血清アルブミン（BSA）、ゼラチン、正常血清等）を用いて、第二の結合パートナー又は測定対象物質が結合していない固体支持体表面を被覆する。

[0035] 本発明の固体支持体としては、そこに固定化された第二の結合パートナー又は測定対象物質が液相中で効率よく結合対を形成できること、磁石等により磁場を適用することにより液相中からの回収が可能でありB／F分離が容易に行えること等の理由から、磁性粒子が好ましい。さらに、化学的に不活性な電極を用いたサイクリング法によってシグナルの増幅を図る場合には、固体支持体として磁性粒子を用いることにより、電極の背面から磁場を適用

することにより電極表面に磁性粒子を集めることが容易となる。磁性粒子上に形成された測定対象物質及び検出剤からなる複合体が、レポーター物質として発光物質又は酵素を含む場合には、発光物質又は酵素反応生成物が電極表面で効率よく酸化又は還元されサイクリング反応が促進されるので、固体支持体として磁性粒子を用いることでシグナルの増幅がより一層加速するといった利点もある。

[0036] 本発明で用いられる磁性粒子とは、磁気を帯びた粒子のことをいい、液相中に分散又は懸濁することができ、分散液又は懸濁液から磁場の適用により分離することができる粒子であれば任意の粒子を使用することができる。その粒子の種類は特に限定されず、有機粒子若しくは無機粒子（金属粒子を含む）、又は有機と無機の組み合わせにより構成される粒子が含まれる。本発明における磁性粒子は、特に有機（ポリマー）粒子の内部に磁性体を含有する態様であるものが好ましく、さらには、この磁性体は粒子の内部のみに含有され、粒子表面に露出していないことがより好ましい。磁性体は、強磁性、常磁性、超常磁性のいずれであってもよいが、磁場による分離と磁場を取り除いた後の再分散が容易となることから、超常磁性であることが好ましい。本発明の磁性体としては、例えば、鉄、コバルト、マンガン、クロム若しくはニッケルのような金属、該金属の合金、又は該金属の塩、酸化物、ホウ化物若しくは硫化物、高い磁化率を有する稀土類元素（例えば、ヘマタイト又はフェライト）等が挙げられる。このうち、安全性の観点から酸化鉄、フェライトが好ましく、特に好ましくはマグネタイト（ Fe_3O_4 ）である。

[0037] 本発明における磁性粒子の大きさは、特に限定されず、ナノ粒子、マイクロ粒子、又はミリ粒子の何れでもよいが、好ましくはナノ粒子又はマイクロ粒子である。このうち本発明における磁性粒子は、好ましくは平均粒子径 $0.05\ \mu\text{m} \sim 20\ \mu\text{m}$ の粒子であり、より好ましくは平均粒子径 $0.1\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$ の粒子であり、さらに好ましくは平均粒子径 $0.3\ \mu\text{m} \sim 3\ \mu\text{m}$ の粒子であり、最も好ましくは平均粒子径 $1.5\ \mu\text{m} \sim 3\ \mu\text{m}$ の粒子である。また、本発明においては、良好な測定シグナルを得る上で、使用する金

ナノ粒子のサイズとの関係からも好ましい磁性粒子の大きさを規定することができる。平均粒子径の比較において、磁性粒子の大きさは金ナノ粒子の10倍～150倍の範囲が好ましく、15倍～75倍の範囲がより好ましく、15倍～50倍の範囲がさらに好ましい。磁性粒子と金ナノ粒子のサイズに関する具体的な組み合わせとして、平均粒子径1.5 μm の磁性粒子に対して、平均粒子径20 nm～150 nm、40 nm～150 nm、40 nm～100 nm未満、40 nm～80 nm、又は80 nm～100 nm未満の金ナノ粒子、好ましくは平均粒子径40 nm、60 nm又は80 nmの金ナノ粒子を組み合わせ使用すること、あるいは、平均粒子径3 μm の磁性粒子に対して、平均粒子径20 nm～150 nm、40 nm～150 nm、40 nm～100 nm未満、40 nm～80 nm、又は80 nm～100 nm未満の金ナノ粒子、好ましくは平均粒子径40 nm、60 nm又は80 nmの金ナノ粒子を組み合わせ使用することが例示できる。また、該磁性粒子に含まれる磁性体の平均粒子径は、好ましくは0.1～10 nmであり、より好ましくは0.5～5 nmであり、さらに好ましくは1～3 nmである。該磁性体の平均粒子径が10 nmを超えると、残留磁化の影響が現れ、磁場を取り除いた後でも、磁性粒子同士の相互結合が残り、粒子の再分散性に影響を与えるので好ましくない。なお、本発明における磁性粒子及びそれに含まれる磁性体の粒子形状は如何なる形状でもよく必ずしも完全な球状である必要はないが、磁性粒子の表面に立体障害によりその結合能を損なうことなく数多くの第二の結合パートナー又は測定対象物質を固定化できる点で、磁性粒子については球状が好ましい。

[0038] 本発明の磁性粒子に第二の結合パートナー又は測定対象物質を固定化する方法としては、第二の結合パートナー又は測定対象物質を過剰に用いて磁性粒子の表面に受動的に吸着させることが挙げられる。或いは、カルボキシル基又はトシル基などの官能基や抗体、プロテインA、アビジンなどの生物学的に特異的な結合対を形成できるタンパク質でその表面が修飾された磁性粒子も市販されており、これらの粒子を用いて第二の結合パートナー又は測定

対象物質を共有結合又は生物学的な相互作用により固定化することもできる。磁性粒子への固定化方法としては、受動的吸着に比べて結合の安定性が高いことから官能基やタンパク質を介した方法が好ましく、なかでもトシル基による固定化は、タンパク質を介する固定化に比べて立体障害が少なく、カルボキシル基等を介する結合のように縮合剤による処理を必要としないため、第二の結合パートナー又は測定対象物質の結合活性を損なう恐れが少なく、特に好ましい。

[0039] 本発明の固体支持体として磁性粒子を用いる場合、本発明の結合剤と磁性粒子に固定された第二の結合パートナー又は測定対象物質との反応は、試験管、マイクロプレート又はマイクロ流体デバイス等の免疫測定法で一般に用いられる容器内の液相中で行われる。そして、容器の外部から磁場を適用することにより磁性粒子が集められ、B/F分離のための洗浄操作に付されたり、所定の位置でレポーター物質から発生したシグナルの測定が行われたりする。本発明の固体支持体としてマイクロプレート、多孔性膜及びマイクロ流体チップを用いる場合には、これらの固体支持体に液体試料が直接に添加され、固体支持体上の所定の位置に固定化された第二の結合パートナー又は測定対象物質が検出剤とともに複合体を形成し、複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルの測定が行われる。

[0040] 本発明のある態様では、本発明の第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤は、第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された複合体形成部を備えた固体支持体からなるデバイスと組み合わされ、測定対象物質を測定するためのキットとして提供される。この態様では、検出剤は、測定対象物質を含む液体試料と同時に又は液体試料に続いてデバイスに添加され、デバイスの複合体形成部で第二の結合パートナー又は測定対象物質と複合体を形成する。このようなデバイスは、マイクロプレート、磁性粒子、多孔性膜又はマイクロ流体チップ等の固体支持体を用いて製造できる。複合体形成部は、任意の大きさ又は形で設計することができる。例えば、固体支持体がマイクロプレートの場合には各ウェルの底面

全体を、固体支持体が磁性粒子の場合には粒子の表面全体を複合体形成部とすることができる。

[0041] 本発明の別の態様では、本発明の検出剤は、複合体形成部を備えた固体支持体からなるデバイスに設けられた検出剤保持部に保持され、デバイスに内蔵された形態で提供される。検出剤保持部は、デバイス上の液体試料が添加される部位と複合体形成部の間に設置され、検出剤が検出剤保持部に乾燥保持される。デバイスに添加された測定対象物質を含む液体試料がデバイスの検出剤保持部を通過するときに検出剤が液体試料中に溶解して、検出剤が測定対象物質に結合できるようになる。このような検出剤保持部を設けることのできるデバイスは、多孔性膜又はマイクロ流体チップ等の固体支持体を用いて製造できる。

[0042] 本発明のさらに別の態様では、デバイスはマイクロ流体チップで形成され、マイクロ流体チップは複合体形成部を備える代わりに、複合体形成剤保持部と複合体捕捉部を有する。複合体捕捉部の上流に位置する複合体形成剤保持部には、複合体形成剤が乾燥保持されており、測定対象物質を含む液体試料がデバイスに添加され複合体形成剤保持部を通過するときに複合体形成剤が液体試料中に溶解する。複合体形成剤は、第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなり、液体試料中で本発明の検出剤と複合体を形成する。複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより、磁性粒子を含む複合体形成剤を捕捉する。磁場は、デバイスの複合体捕捉部に磁石を設ける、或いはデバイスの複合体捕捉部の外側に磁石を配置する等の手段により、デバイスの複合体捕捉部に適用することができる。ここで用いられる磁石は、永久磁石であっても電磁石であってもよい。複合体捕捉部に捕捉された検出剤に含まれるレポーター物質はそこでシグナルを発生させる。レポーター物質の量は測定対象物質の量に相関するので、レポーター物質からのシグナル強度を測定することにより測定対象物質の量を決定することができる。複合体捕捉部は、必要に応じてサイクリング反応のための電極を有していてもよい。この複合体形成剤保持部と複合体捕捉部を有するデバイスは

、本発明の検出剤とともにキットとして提供することもできるし、このデバイスにさらに検出剤保持部を形成してもよい。デバイスに複合体形成剤保持部に加えて検出剤保持部を形成するときには、これら2つの保持部を複合体捕捉部の上流の異なる位置に設けてもよいし同じ位置に設けてもよい。例えば、複合体形成剤と検出剤とを予め混合しておき乾燥保持させることで、複合体形成剤保持部と検出剤保持部とを同じ位置に設けることができる。

マイクロ流体チップで形成されたデバイスの更なる態様としては、複合体捕捉部のみを有するデバイスが挙げられ、このデバイスを複合体形成剤と組み合わせることでキットとして提供することができる。上記のように、本発明の検出剤は、更なる構成要素としてキットに含めることもできるし、デバイスに検出剤保持部を設けそこに保持させることもできる。

マイクロ流体チップは、当技術分野で公知の方法によって製造することができ、例えば、ガラスやプラスチックの小片に、混合部や反応部を有する流路、1又は複数のインレット、廃液貯蔵部を作製することで製造できる。インレットは測定対象物質を含む液体試料の注入に用いられるが、必要に応じて、洗浄液及び／又は酵素の基質溶液を流路に注入するためのインレットを別に設けてもよい。

[0043] 本発明はさらに、本発明の検出剤を含むキットと、検出剤のレポーター物質から発生したシグナルを測定することができる測定装置とを組み合わせた免疫測定システムを提供する。本発明はまた、本発明の検出剤を検出剤保持部に有するデバイスと、検出剤のレポーター物質から発生したシグナルを測定することができる測定装置とを組み合わせた免疫測定システムも提供する。前記測定装置は、少なくともデバイス装着部及びシグナル検出部を有する。デバイス装着部は、検出剤を含むキットのさらなる構成要素であるデバイス又は検出剤保持部を有するデバイスを着脱可能なように設計されている。これらのデバイスは、測定対象物質と検出剤からなる複合体を保持することのできる複合体形成部又は複合体捕捉部のいずれかを有しており、デバイスが測定装置のデバイス装着部に取り付けられると、複合体形成部又は複合体

捕捉部に保持された複合体に含まれるレポーター物質から発生したシグナルを測定装置のシグナル検出部によって測定することが可能となる。上記のとおり、レポーター物質の種類に応じて発生するシグナルは蛍光、発光、発色、放射線と異なるため、測定装置のシグナル検出部には発生するシグナルに応じた公知の検出器が設けられる。さらに、測定装置は、必要に応じて、測定対象物質を含む液体試料、洗浄液又は酵素の基質溶液がデバイス上を移動する速度を制御するために、送液ポンプを備えていてもよい。また、マイクロ流体チップからなるデバイスと組み合わせる場合には、測定装置は、複合体捕捉部に磁場を適用するための磁石、複合体捕捉部の電極に電圧を印加するための電源等を備えることもできる。

[0044] 本発明の検出剤を用いた競合法による対象物質の測定は、例えば以下のようにして実施することができる。測定対象物質が抗原であり第一の結合パートナーがそれに特異的な抗体である場合、先ずは固体支持体に一定量の抗原を抗体結合部位の立体構造が保持された状態で固定化する。この固定化された抗原に対して、液体試料中に遊離している抗原と同時に或いはその添加後に本発明の検出剤を加えて、検出剤に含まれる抗体を固定化抗原に反応させる。検出剤に含まれる抗体と固定化抗原との結合は遊離の抗原により競合的に阻害されるので、液体試料中の遊離の抗原の量に依存して固定化抗原と複合体を形成することのできる検出剤の量は低下し、検出剤に含まれるレポーター物質からのシグナルの量は低下する。抗原濃度が明らかな液体試料を用いて競合反応を行い、標準曲線（用量作用曲線）を作成しておき、未知の濃度の抗原を含む液体試料を添加したときに測定されるシグナル強度を標準曲線に挿入することにより、液体試料中の抗原の量を決定することができる。

[0045] 本発明の検出剤を用いてサンドイッチアッセイにより対象物質を測定する場合には、例えば以下のように実施できる。測定対象物質が抗原である場合には、第二の結合パートナーとしてこれに特異的な抗体を用いて一定過剰量の抗体を固体支持体に固定化させる。この固定化された抗体に液体試料中の遊離の抗原と本発明の検出剤を添加して、固定化抗体－抗原－検出剤からな

る複合体を形成させるが、抗原と検出剤を添加する順序は次の何れであってもよい。初めに抗原のみを添加して固定化抗体によって捕捉させ、その後に検出剤を加え捕捉された抗原に反応させてもよいし（forward assay）、抗原と検出剤を反応させて、予め抗原－検出剤複合体を形成しておいてから、これを添加して固相化抗体に捕捉させてもよく（reverse assay）、或いは、抗原と検出剤を同時に添加して、両者を同時に固定化抗体に反応させて固定化抗体－抗原－検出剤複合体を形成させてもよい（simultaneous assay）。洗浄操作により、固体支持体上に形成された固定化抗体－抗原－検出剤複合体を遊離の抗原及び／又は検出剤から分離して、複合体中の検出剤に含まれるレポーター物質からのシグナル強度を測定する。サンドイッチアッセイでは、液体試料に含まれる遊離の抗原の量に依存して固体支持体上にレポーター物質が捕捉されるので、レポーター物質からのシグナル強度を測定することにより液体試料中の抗原の量を決定することができる。

[0046] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0047] 実施例 1 酵素標識抗体が固定化された金ナノ粒子の製造

動的光散乱法によって測定した平均粒子径が20nm、40nm、60nm、80nm、100nm及び150nmのいずれかである金ナノ粒子を含む金コロイド溶液（金濃度（ICP）約65～68ppm、田中貴金属工業株式会社製）を材料として使用した。粒子径の分散の程度を示すPDI値は、金ナノ粒子の平均粒子径が20nm、40nm、60nm、80nm、100nm及び150nmのものについて、それぞれ0.080、0.056、0.061、0.034、0.022、0.020であった。それぞれの金コロイド溶液9mLに100mMトリス緩衝液（pH8.5）1mLを加えて混和した。さらに、溶媒としてリン緩衝液（pH7.0）を用いた1.0mg/mLのアルカリホスファターゼ（ALP）標識抗心筋トロポニンI抗体の溶液0.05mLを加え混和し、5℃で5分間反応させた。ここに10%牛血清アルブミン（BSA）を含有する蒸留水0.1mLを加えて混和し、5℃で5

分間反応させた。12,000gで5分間遠沈し、上清を取り除いて、1%BSAを含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を10mL加え、超音波洗浄器を用いて完全に分散させた。再び12,000gで5分間遠沈し、上清を取り除いて、1%BSAを含有するPBSを1mL加え、超音波洗浄器を用いて完全に分散させた。

[0048] 実施例2 マイクロプレートを用いた心筋トロポニンI（cTnI）の測定

（1）cTnIを固定化したマイクロプレートの作製

96ウェルマイクロプレート（Nunc社製）に、溶媒として炭酸緩衝液（pH9.5）を用いた0.01mg/mL濃度の抗cTnI抗体溶液を0.1mLずつ分注し、5℃で一夜静置した。溶液を吸引除去した後、PBSで3回洗浄した。1%BSAを含むPBSを各ウェルに300 μ L分注し、37℃で1時間静置した。溶液を吸引除去した後、0.05%（v/v）Tween20を含むPBS（PBS-T）で3回洗浄した。

[0049] （2）cTnIの測定

溶媒としてリン緩衝液（pH7.0）を用いて希釈した濃度0ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、又は100ng/mLのcTnI溶液、及び実施例1で作製した平均粒子径が80nmの金コロイド溶液をそれぞれ各ウェルに10 μ Lずつ分注し、室温で5分間反応させた。溶液を吸引除去した後、PBS-Tで3回洗浄した。ALPの基質溶液であるBluePhos（KPL社製）を各ウェルに100 μ Lずつ分注した。10分後に各ウェルの上清を市販のプレートリーダーで600nmでの吸光度について測定した。

結果を以下の表1及び2に示す。表1は、それぞれの抗原濃度に対応する600nmでの吸光度を表す。表2は、抗原濃度が0ng/mLのときの吸光度をノイズ（N）とし、抗原濃度が1ng/mL、10ng/mL、及び100ng/mLのときの吸光度をシグナル（S）とした場合の、S/N比を表す。

[0050] 実施例3 磁性粒子を用いた心筋トロポニンI（cTnI）の測定

（1）抗cTnI抗体を固定化した磁性粒子の作製

固形分濃度が10mg/mLである、平均粒子径が1.5 μ mで表面がトシル基で化学修飾された磁性粒子（商品名Magnosphere™ MS160/Tosyl、J S R株式会社製）の粒子分散液2mLをマイクロチューブに取り、磁石で粒子を集め、上清を取り除いた。100mMホウ酸緩衝液（pH9.5）2mLを加えて混和した。溶媒としてリ

ン緩衝液 (pH7.0) を用いて希釈した20 μ gの抗cTnI抗体を含む抗体溶液を加え混和し、さらに3M硫酸アンモニウムを含有する100mMホウ酸緩衝液 (pH9.5) 1mLを加えて混和した。ローテーターで穏やかに転倒混和しながら、室温で24時間反応させた。10%牛血清アルブミン (BSA) を含有する蒸留水0.02mLを加えて混和し、ローテーターで穏やかに転倒混和しながら、室温で6時間以上反応させた。磁石で粒子を集め、上清を取り除いた。そこにPBS-Tを5mL加えて混和し、磁石で粒子を集め、上清を取り除くといった洗浄操作を3回繰り返した。洗浄後の磁性粒子に1%BSAを含有するPBSを10mL加えて混和し、粒子を分散させた。

[0051] (2) cTnIの測定

96ウェルマイクロプレートに、濃度0ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mLのcTnI溶液、上記(1)で作製した磁性粒子分散液、及び実施例1で作製した平均粒子径が80nmの金コロイド溶液をそれぞれ各ウェルに10 μ Lずつ分注し、室温で5分間反応させた。96ウェルマイクロプレート用の磁石プレートで粒子を集め、上清を取り除いた後、PBS-Tで3回洗浄した。ALPの基質溶液であるBluePhos (KPL社製) を各ウェルに100 μ Lずつ分注した。10分後に各ウェルの上清を市販のプレートリーダーで600nmでの吸光度について測定した。

結果を以下の表1及び2に示す。

[0052] (比較例1)

実施例2のマイクロプレートを用いたcTnIの測定において、実施例1で作製したALP標識抗体が固定化された金コロイド溶液を用いる代わりに、金ナノ粒子に固定化されていないALP標識抗体を用いた。ALP標識抗体の濃度は、実施例2で用いられた金コロイド溶液 ($OD_{550}=6.0$) に含まれる金ナノ粒子に固定化されたALP標識抗体の濃度と同じになるように調製し、各ウェルに10 μ Lずつ分注し反応させた。

結果を以下の表1及び2に示す。

[0053] (比較例2)

実施例3の磁性粒子を用いたcTnIの測定において、実施例1で作製したALP

標識抗体が固定化された金コロイド溶液を用いる代わりに、金ナノ粒子に固定化されていないALP標識抗体を用いた。ALP標識抗体の濃度は、実施例3で用いられた金コロイド溶液 ($OD_{550}=6.0$) に含まれる金ナノ粒子に固定化されたALP標識抗体の濃度と同じになるように調製し、各ウェルに10 μ Lずつ分注して反応させた。

結果を以下の表1及び2に示す。

[0054] [表1]

抗原濃度 (ng/mL)	Abs.600			
	実施例2	実施例3-1	比較例1	比較例2
100	0.947	2.023	0.105	0.381
10	0.232	0.584	0.042	0.187
1	0.082	0.187	0.030	0.114
0	0.067	0.106	0.030	0.111

[0055] 表1に記載される実施例3-1の吸光度の数値は、実施例2及び比較例1、2と同日に行われた実験により得られたものである。

[0056] [表2]

抗原濃度 (ng/mL)	S/N			
	実施例2	実施例3-1	比較例1	比較例2
100	14.13	19.08	3.50	3.43
10	3.46	5.51	1.40	1.68
1	1.22	1.76	1.00	1.03
0	—	—	—	—

(なお、抗原濃度が0 (ng/mL)の場合はシグナルを含まないので、S/N比は表中に示していない。以下の表も同様である。)

[0057] 表1及び2に示される結果によると、酵素標識抗体のみ(比較例1又は2)を用いて濃度10ng/mL又は100ng/mLのcTnI抗原を測定したときに得られるS/N比とほぼ同じ値が、酵素標識抗体を金ナノ粒子に固定化した検出剤(実施例2又は3-1)を用いて濃度1ng/mL又は10ng/mLのcTnI抗原を測定したと

きに得られることが明らかとなった。酵素標識抗体を金ナノ粒子に固定化した検出剤を用いることにより、cTnI抗原に間接的に結合する標識酵素の数を増大させ、cTnI抗原に結合する標識酵素からのシグナルを増幅することができた。その結果、測定の感度を約10倍も増加させることが可能であった。酵素標識抗体を金ナノ粒子に固定化した検出剤によるシグナルの増幅効果は、抗原を捕捉する固体支持体の種類によらず発揮されたが、固体支持体がマイクロプレート（実施例2）よりも磁性粒子（実施例3-1）のときにより一層の高い感度を得ることができた。

[0058]（比較例3）

実施例3の磁性粒子を用いたcTnIの測定において、実施例1で作製したALP標識抗体が固定化された金コロイド溶液を用いる代わりに、ALP標識抗体が固定化されたラテックス粒子の懸濁液を用いた。ラテックス粒子には、平均粒子径が75nm（Merck社製）のものと1 μ m（Polysciences社製）のものを用いた。ラテックス粒子へのALP標識抗cTnI抗体の固定化は、実施例1に記載される金ナノ粒子への固定化方法に準じて、受動的な吸着により行った。ラテックス粒子の懸濁液の濃度は、ラテックス粒子に固定化されたALP標識抗体の濃度が実施例3で用いられた金コロイド溶液（OD₅₅₀=6.0）に含まれる金ナノ粒子に固定化されたALP標識抗体の濃度と同じになるように調製して、各ウェルに10 μ Lずつ分注して反応させた。

結果を以下の表3及び4に示す。表3は、それぞれの抗原濃度に対応する600nmでの吸光度を表す。表4は、抗原濃度が0ng/mLのときの吸光度をノイズ（N）とし、抗原濃度が1ng/mL、10ng/mL、及び100ng/mLのときの吸光度をシグナル（S）とした場合の、S/N比を表す。

[0059]

[表3]

	Abs.600		
抗原濃度 (ng/mL)	実施例3-2	比較例3	
	平均粒子径80nm	平均粒子径75nm	平均粒子径1 μ m
100	1.227	0.470	0.248
10	0.254	0.239	0.145
1	0.180	0.227	0.131
0	0.127	0.206	0.123

[0060] 表3に記載される実施例3-2の吸光度の数値は、比較例3と同日に行われた実験により得られたものである。

[0061] [表4]

	S/N		
抗原濃度 (ng/mL)	実施例3-2	比較例3	
	平均粒子径80nm	平均粒子径75nm	平均粒子径1 μ m
100	9.66	2.28	2.02
10	2.00	1.16	1.18
1	1.42	1.10	1.07
0	—	—	—

[0062] 表3及び4に示される結果によると、酵素標識抗体をラテックス粒子に固定化したものを用いて濃度10ng/mL又は100ng/mLのcTnI抗原を測定したときに得られるS/N比とほぼ同じ値が、酵素標識抗体を金ナノ粒子に固定化した検出剤を用いて濃度1ng/mL又は10ng/mLのcTnI抗原を測定したときに得られることが明らかとなった。酵素標識抗体を金ナノ粒子に固定化した検出剤は、酵素標識抗体をラテックス粒子に固定化したものと比較して、約10倍も標識酵素からのシグナルを増幅することが可能であり、対象物質の測定の感度を著しく増加させた。

[0063] 実施例4 金ナノ粒子の平均粒子径の検討

実施例1で作製した平均粒子径が20nm、40nm、60nm、80nm、100nm及び150n

mの金コロイド溶液を用いて、実施例3と同様に、磁性粒子を用いてcTnIの測定を行った。

結果を以下の表5及び6に示す。表5は、それぞれの抗原濃度に対応する600nmでの吸光度を表す。表6は、抗原濃度が0ng/mLのときの吸光度をノイズ（N）とし、抗原濃度が1ng/mL、10ng/mL、及び100ng/mLのときの吸光度をシグナル（S）とした場合の、S／N比を表す。

[0064] [表5]

	Abs.600					
抗原濃度 (ng/mL)	平均粒子径 20nm	平均粒子径 40nm	平均粒子径 60nm	平均粒子径 80nm	平均粒子径 100nm	平均粒子径 150nm
100	1.999	2.026	1.949	1.730	2.333	2.240
10	0.375	0.461	0.494	0.565	1.371	1.153
1	0.127	0.232	0.224	0.256	0.321	0.227
0	0.126	0.204	0.203	0.202	0.163	0.128

[0065] [表6]

	S/N					
抗原濃度 (ng/mL)	平均粒子径 20nm	平均粒子径 40nm	平均粒子径 60nm	平均粒子径 80nm	平均粒子径 100nm	平均粒子径 150nm
100	15.87	9.93	9.60	8.56	14.31	17.50
10	2.98	2.26	2.43	2.80	8.41	9.01
1	1.01	1.14	1.10	1.27	1.97	1.77
0	—	—	—	—	—	—

[0066] 表5及び6に示される結果によると、平均粒子径が20nmから150nmの範囲のいずれの金ナノ粒子を用いた測定系でも十分な強度のシグナルが得られることが明らかにされた。また、抗原濃度が10ng/mL以上の測定系では、いずれの場合もS／N比が2を大きく上回っているように、平均粒子径が20nmから150nmの範囲の金ナノ粒子を使用する測定系がS／N比が十分に高い測定系であることも明らかにされた。これらの結果から、平均粒子径が80nmの金ナノ粒子を用いる場合のみならず、平均粒子径が20nmから150nmの範囲のいずれの平均粒子径を有する金ナノ粒子を用いた場合であっても、金ナノ粒子を用いて標

識抗体を固定化し結合剤を形成することによって良好なシグナル増幅効果もたらされることが理解できる。

[0067] 実施例 5 磁性粒子の平均粒子径及び抗体の固定化方法の検討

実施例 3 (1) の抗cTnI抗体を固定化した磁性粒子の作製に記載される方法に準じて、平均粒子径が $3\mu\text{m}$ で表面がトシル基で化学修飾された磁性粒子（商品名Magnosphere™ MS300/Tosyl、J S R 株式会社製）の粒子分散液を用いて、表面に抗cTnI抗体が固定化された磁性粒子を作製した。さらに、平均粒子径が $0.3\mu\text{m}$ 又は $2.6\mu\text{m}$ であり、表面にストレプトアビジンが固定化され生物学的に修飾された磁性粒子（商品名Estapor、Merck社製）の粒子分散液とビオチン標識された抗cTnI抗体を用いて、表面に抗cTnI抗体が固定化された磁性粒子を作製した。

これらの磁性粒子を用いて、実施例 3 (2) のcTnIの測定に記載される方法に準じて、実施例 1 で作製した平均粒子径が 80nm の金コロイド溶液を用いてcTnIの測定を行った。

結果を以下の表 7 及び 8 に示す。表 7 は、それぞれの抗原濃度に対応する 600nm での吸光度を表す。表 8 は、抗原濃度が 0ng/mL のときの吸光度をノイズ（N）とし、抗原濃度が 1ng/mL 、 10ng/mL 、及び 100ng/mL のときの吸光度をシグナル（S）とした場合の、S/N比を表す。

[0068] [表7]

抗原濃度 (ng/mL)	Abs.600			
	化学修飾		生物学的修飾	
	平均粒子径 $1.5\mu\text{m}$	平均粒子径 $3\mu\text{m}$	平均粒子径 $0.3\mu\text{m}$	平均粒子径 $2.6\mu\text{m}$
100	1.730	1.015	0.237	0.662
10	0.565	0.301	0.129	0.187
1	0.256	0.139	0.139	0.157
0	0.202	0.130	0.111	0.117

[0069]

[表8]

抗原濃度 (ng/mL)	S/N			
	化学修飾		生物学的修飾	
	平均粒子径1.5 μ m	平均粒子径3 μ m	平均粒子径0.3 μ m	平均粒子径2.6 μ m
100	8.56	7.81	2.14	5.66
10	2.80	2.32	1.16	1.60
1	1.27	1.07	1.25	1.34
0	—	—	—	—

[0070] 上記の表1及び2の結果によると、本発明の検出剤と組合せて測定に用いる固体支持体としては、磁性粒子が適している。さらに、表7及び8に示される結果によると、磁性粒子への抗体の固定化方法としては、アビジン-ビオチンなどの生物学的な特異性を利用した結合よりも、トシル基などの官能基を用いて抗体を共有結合させる方法がより適していることが明らかとなった。さらに、磁性粒子の大きさとしては、金ナノ粒子の平均粒子径に対して15～50倍程度のものを用いた時に、特に優れたシグナル増幅効果が発揮され、最も高い測定感度を得ることが分かった。

産業上の利用可能性

[0071] 本発明は、金ナノ粒子の表面に測定対象物質を特異的に認識する結合パートナーを複数のレポーター物質とともに固定化することにより、測定対象物質に間接的に結合するレポーター物質の数を著しく増大し、測定対象物質の量に相関するシグナルを顕著に増幅することができる検出剤を提供するものである。本発明の検出剤によれば、対象物質をより高感度で測定することが可能となるので、本発明はごく微量の対象物質を特異的かつ高い感度でしかも迅速かつ簡便に測定する必要のある産業分野において特に有用であり、臨床化学検査の分野のみならず、食品検査や環境分析等の分野においても産業上の利用可能性を有している。

請求の範囲

- [請求項1] 対象物質を測定するための方法であって、
- (i) 測定対象物質、並びに測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤を含有する複合体を形成させること、及び
- (i i) 複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定すること、
- を含有してなり、
- 第一の結合パートナーは、検出剤中で金ナノ粒子に直接に固定化されたものである、方法。
- [請求項2] 複合体が、さらに、固体支持体に固定化された、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナーを含有する、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 複合体が、固体支持体に固定化された測定対象物質を含有する、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項4] 前記 (i) は、測定対象物質を含む液体試料と、測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤とを接触させ、測定対象物質と検出剤とを含有する複合体を形成させる工程である、
- 請求項 1 に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程 (i) は、前記接触と同時又は接触後に、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナーが予め固定化された固体支持体と接触させる工程をさらに含有するものであり、
- 前記 (i i) は、固体支持体上に形成された複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定する工程である、
- 請求項 4 に記載の方法。
- [請求項6] 前記工程 (i) は、測定対象物質が予め固定化された固体支持体を含有する反応系内で実施される工程であり、

前記 (i i) は、固体支持体上に形成された複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定する工程である、

請求項 4 に記載の方法。

[請求項 7]

前記 (i) は、測定対象物質を含む液体試料と、測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤と、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナーが予め固定化された固体支持体とを少なくとも使用する工程であって、

第二の結合パートナーが予め固定化された固体支持体と、測定対象物質を含む液体試料とを接触させ、次いで測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤を接触させることにより測定対象物質と検出剤とを含有する複合体を形成させる工程であり、

前記 (i i) は、固体支持体上に形成された複合体に含まれるレポーター物質からのシグナルを測定する工程である、

請求項 1 に記載の方法。

[請求項 8]

固体支持体が、マイクロプレート、磁性粒子、多孔性膜及びマイクロ流体チップからなる群より選ばれる、請求項 2、3 及び 5～7 の何れか一項に記載の方法。

[請求項 9]

固体支持体が、磁性粒子である、請求項 8 に記載の方法。

[請求項 10]

磁性粒子の平均粒子径が、 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ である、請求項 9 に記載の方法。

[請求項 11]

金ナノ粒子の平均粒子径が、 $20 \sim 150 \text{ nm}$ である、請求項 1～10 の何れか一項に記載の方法。

[請求項 12]

結合パートナーが、抗原又は抗体若しくはその抗原結合性断片である、請求項 1～11 の何れか一項に記載の方法。

[請求項 13]

結合パートナーが、抗体又はその抗原結合性断片である、請求項 12 に記載の方法。

- [請求項14] レポーター物質が、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質及び発光物質からなる群より選ばれる、請求項1～13の何れか一項に記載の方法。
- [請求項15] レポーター物質が、電気化学的に活性な発光物質、又は電気化学活性物質を反応生成物として生じる酵素である、請求項1～13の何れか一項に記載の方法。
- [請求項16] 液体試料が生体液である、請求項4～15の何れか一項に記載の方法。
- [請求項17] 測定対象物質を特異的に認識する第一の結合パートナー、複数のレポーター物質及び金ナノ粒子からなる検出剤であって、
第一の結合パートナーは、金ナノ粒子に直接に固定化されたものであり、
レポーター物質は、第一の結合パートナー又は金ナノ粒子に直接に固定化されたものであり、
レポーター物質は、第一の結合パートナーに結合した測定対象物質の量に相関した強度のシグナルを発生できるものである、
対象物質を測定するための検出剤。
- [請求項18] 金ナノ粒子の平均粒子径が、20～150nmである、請求項17に記載の検出剤。
- [請求項19] 結合パートナーが、抗原又は抗体若しくはその抗原結合性断片である、請求項17又は18に記載の検出剤。
- [請求項20] 結合パートナーが、抗体又はその抗原結合性断片である、請求項19に記載の検出剤。
- [請求項21] レポーター物質が、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質及び発光物質からなる群より選ばれる、請求項17～20の何れか一項に記載の検出剤。
- [請求項22] レポーター物質が、電気化学的に活性な発光物質、又は電気化学活性物質を反応生成物として生じる酵素である、請求項17～20の何

れか一項に記載の検出剤。

[請求項23] レポーター物質は、第一の結合パートナーに直接に固定化されたものである、請求項17～22の何れか一項に記載の検出剤。

[請求項24] 対象物質を測定するためのキットであって、
請求項17～23の何れか一項に記載の検出剤、及び複合体形成部を備えた固体支持体からなるデバイスを含育し、
デバイスの複合体形成部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化されたものである、キット。

[請求項25] 対象物質を測定するためのキットであって、
請求項17～23の何れか一項に記載の検出剤と、複合体形成剤保持部及び複合体捕捉部を備えた固体支持体からなるデバイスとを含育するものであり、
デバイスの複合体形成剤保持部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなる複合体形成剤を含育し、
デバイスの複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより複合体形成剤を捕捉する機構を備えたものである、キット。

[請求項26] 対象物質を測定するためのキットであって、
請求項17～23の何れか一項に記載の検出剤、複合体形成剤、及び複合体捕捉部を備えた固相支持体からなるデバイスを含育するものであり、
複合体形成剤は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなるものであり、
デバイスの複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより複合体形成剤を捕捉する機構を備えたものである、キット。

[請求項27] 固体支持体が、マイクロプレート、磁性粒子、多孔性膜及びマイク

口流体チップからなる群より選ばれる、請求項24に記載のキット。

[請求項28] 固体支持体が、マイクロ流体チップである、請求項25又は26に記載のキット。

[請求項29] 磁性粒子の平均粒子径が、 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ である、請求項25～28の何れか一項に記載のキット。

[請求項30] 請求項24～29の何れか一項に記載のキット、及び前記キットに含まれるデバイスを着脱可能なデバイス装着部と前記キットに含まれる検出剤のレポーター物質から発生したシグナルを測定することができるシグナル検出部とを備えた測定装置を含有してなる、免疫測定システム。

[請求項31] 対象物質を測定するためのデバイスであって、
検出剤保持部、及び複合体形成部を備えた固体支持体からなり、
検出剤保持部は、請求項17～23の何れか一項に記載の検出剤を含有し、
複合体形成部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化されたものである、デバイス。

[請求項32] 対象物質を測定するためのデバイスであって、
検出剤保持部、複合体形成剤保持部、及び複合体捕捉部を備えた固体支持体からなり、
検出剤保持部は、請求項17～23の何れか一項に記載の検出剤を含有し、
複合体形成剤保持部は、測定対象物質を特異的に認識する第二の結合パートナー又は測定対象物質が固定化された磁性粒子からなる複合体形成剤を含有し、

複合体捕捉部は、磁場が適用されることにより複合体形成剤を捕捉する機構を備えたものである、デバイス。

[請求項33] 固体支持体が、多孔性膜又はマイクロ流体チップである、請求項31に記載のデバイス。

[請求項34] 固体支持体が、マイクロ流体チップである、請求項32に記載のデ

バイス。

[請求項35] 磁性粒子の平均粒子径が、 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ である、請求項32又は34に記載のデバイス。

[請求項36] 請求項31～35の何れか一項に記載のデバイス、及び前記デバイスを着脱可能なデバイス装着部と前記デバイスの検出剤保持部に含まれる検出剤のレポーター物質から発生したシグナルを検出することができるシグナル検出部を備えた測定装置を含有してなる、免疫測定システム。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/040435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/553(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i,
G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N33/553, B82Y5/00, B82Y40/00, G01N33/543, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2016-011943 A (RICOH CO., LTD.) 21 January 2016, entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0036], [0039], [0050]-[0054], [0056], fig. 2A-3E, 4, 5, etc. & WO 2015/098784 A1	1-2, 4-5, 7-8, 11-14, 16-21, 24, 27-28, 30-31, 33-34, 36/3, 6, 9-10, 15, 22-23, 25-26, 29, 32, 35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 January 2019 (23.01.2019)

Date of mailing of the international search report
05 February 2019 (05.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/040435

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 07-072155 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORP.) 17 March 1995, entire text, in particular, see claims, paragraphs [0008], [0015]-[0017], etc. (Family: none)	1-5, 7-9, 12-14, 16-17, 19-21, 23-27/6, 10-11, 15, 18, 22, 28-36
X/A	WO 2012/168991 A1 (PANASONIC CORP.) 13 December 2012, entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0021]-[0033], [0047], fig. 1, 3, etc. & JP 5011458 B1 & US 2012/0309033 A1, entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0036]-[0053], [0071], fig. 1, 3, etc.	1, 4, 11-14, 16-21/2-3, 5-10, 15, 22-36
Y	JP 2017-505436 A (ABAXIS, INC.) 16 February 2017, entire text, all drawings, in particular, see paragraphs [0117]-[0136], etc. & US 2015/0204868 A1, entire text, all drawings, in particular, see paragraphs [0124]-[0143], etc. & US 2016/0109457 A1 & US 2017/0363639 A1 & WO 2015/112558 A2 & EP 3096784 A1	3, 6, 9-10, 15, 22-23, 25-26, 29, 32, 35
A	JP 2011-242387 A (OSAKA PREFECTURE UNIV) 01 December 2011, see entire text, all drawings (Family: none)	1-36
A	JP 2013-151454 A (JAPAN ATOMIC ENERGY AGENCY) 08 August 2013, see entire text, all drawings (Family: none)	1-36
A	WO 2011/096394 A1 (KONICA MINOLTA HOLDINGS, INC.) 11 August 2011, see entire text, all drawings & JP 2015-129773 A	1-36
A	JP 2014-527169 A (MOLECULAR VISION LIMITED) 09 October 2014, see entire text, all drawings & US 2014/0271368 A1 & WO 2013/024031 A1 & EP 2742353 A1	1-36

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/553(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/553, B82Y5/00, B82Y40/00, G01N33/543, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 2016-011943 A (株式会社リコー) 2016.01.21, 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]、段落[0036]、[0039]、[0050] - [0054]、[0056]、[図2A] - [図3E]、[図4]、[図5] 等参照 & WO 2015/098784 A1	1-2, 4-5, 7-8, 11-14, 16-21, 24, 27-28, 30-31, 33-34, 36/3, 6, 9-10, 15, 22-23, 25-26, 29, 32, 35

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.01.2019

国際調査報告の発送日

05.02.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

草川 貴史

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

4 0 7 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	JP 07-072155 A (三菱化学株式会社) 1995. 03. 17, 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0008]、[0015] - [0017] 等参照 (ファミリーなし)	1-5, 7-9, 12-14, 16-17, 19-21, 23-27/6, 10-11, 15, 18, 22, 28-36
X/A	WO 2012/168991 A1 (パナソニック株式会社) 2012. 12. 13, 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0021] - [0033]、[0047]、[図1]、[図3] 等参照 & JP 5011458 B1 & US 2012/0309033 A1, 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0036] - [0053]、[0071]、Fig. 1, Fig. 3 等参照	1, 4, 11-14, 16-21/2-3, 5-10, 15, 22-36
Y	JP 2017-505436 A (アバクシス, インコーポレイテッド) 2017. 02. 16, 全文・全図、特に、段落 [0117] - [0136] 等参照 & US 2015/0204868 A1, 全文・全図、特に、段落 [0124] - [0143] 等参照 & US 2016/0109457 A1 & US 2017/0363639 A1 & WO 2015/112558 A2 & EP 3096784 A1	3, 6, 9-10, 15, 22-23, 25-26, 29, 32, 35
A	JP 2011-242387 A (公立大学法人大阪府立大学) 2011. 12. 01, 全文・全図参照 (ファミリーなし)	1-36
A	JP 2013-151454 A (独立行政法人日本原子力研究開発機構) 2013. 08. 08, 全文・全図参照 (ファミリーなし)	1-36
A	WO 2011/096394 A1 (コニカミノルタホールディングス株式会社) 2011. 08. 11, 全文・全図参照 & JP 2015-129773 A	1-36
A	JP 2014-527169 A (モレキュラー・ビジョン・リミテッド) 2014. 10. 09, 全文・全図参照 & US 2014/0271368 A1 & WO 2013/024031 A1 & EP 2742353 A1	1-36