

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4212189号
(P4212189)

(45) 発行日 平成21年1月21日(2009.1.21)

(24) 登録日 平成20年11月7日(2008.11.7)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 8 5

GO 1 N 33/543 5 8 1 C

GO 1 N 33/543 5 9 1

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平11-197419
 (22) 出願日 平成11年7月12日(1999.7.12)
 (65) 公開番号 特開2001-21564(P2001-21564A)
 (43) 公開日 平成13年1月26日(2001.1.26)
 審査請求日 平成18年6月6日(2006.6.6)

(73) 特許権者 306037311
 富士フイルム株式会社
 東京都港区西麻布2丁目2番30号
 (73) 特許権者 303036670
 合同酒精株式会社
 東京都中央区銀座6丁目2番10号
 (73) 特許権者 000252300
 和光純薬工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
 (74) 代理人 100082223
 弁理士 山田 文雄
 (74) 代理人 100094282
 弁理士 山田 洋資

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乾式分析方法及び乾式分析要素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、前記被検物質の量を分析する乾式分析方法において、

前記被検物質を前記標識特異結合物質と共に、光透過性支持体上に積層された多孔性層に供給し、

この多孔性層内で、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集反応を行わせ、生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定することを特徴とする乾式分析方法。

【請求項2】

被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、前記被検物質の量を分析する乾式分析方法において、

前記被検物質を、光透過性支持体上に積層された多孔性層であって前記標識特異結合物質を含有する多孔性層に供給し、

この多孔性層内で、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集反応を行わせ、生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定することを特徴とする乾式分析方法。

【請求項3】

前記標識担体が金属コロイドであり、凝集反応による金属コロイドの色調の変化によって凝集反応の程度を検出することを特徴とする請求項1又は2の乾式分析方法。

10

20

【請求項 4】

被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、水性検体中の被検物質を分析する乾式分析要素において、

光透過性支持体と；

前記支持体上に積層された多孔性層であって、前記標識特異結合物質を含有する多孔性層を備え、

多孔性層内で生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定可能としたことを特徴とする乾式分析要素。

【請求項 5】

前記展開層が、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集による色調変化を観察可能とする光学的性能を有することを特徴とする請求項 4 の乾式分析要素。

【請求項 6】

前記多孔性層が繊維質材料からなる層であることを特徴とする請求項 4 又は 5 の乾式分析要素。

【請求項 7】

前記多孔性層が非繊維質材料からなる層であることを特徴とする請求項 4 又は 5 の乾式分析要素。

【請求項 8】

前記標識担体が金属コロイドであり、凝集反応による金属コロイドの色調の変化によって凝集反応の程度を検出することができることを特徴とする請求項 4 ~ 7 のいずれかの乾式分析要素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、被検物質（例えば抗原）に対する特異結合物質（例えば抗体）を標識担体に結合した標識特異結合物質と、被検物質との凝集反応により、微量物質の検出、分析を行う分析方法に関するものである。詳しくは、乾式分析要素の層構成の中で凝集反応を行わせる被検物質の乾式分析方法に関するものである。またこの分析方法を可能にする乾式分析要素に関する。

【0002】

【発明の背景】

近年、医療分野において、病態の診断や治療効果の判定などのために、検体中の微量物質、特に抗体又は抗原を迅速、簡便にしかも精度よく定量することが非常に重要となっている。このため抗体又は抗原などを不溶性担体粒子に固定化し、これと抗原又は抗体を反応させて体液成分中の抗原又は抗体の存在を検査する免疫血清学的検査が広く利用されている。

【0003】

広く行われているラテックス粒子イムノアッセイは、抗体を吸着させたラテックス粒子（感作ラテックス）と検体とをガラス板上で混合し、検体中の抗原との反応によりラテックス粒子の凝集を起こさせ、この凝集状態を肉眼で観察する。他の定性的検出法と同様、検体を様々に希釈してアッセイを行うことにより、検体中の抗原を半定量的に測定することができる。

【0004】

また、抗体を結合したラテックス粒子を使用し、検体中の抗原と反応したラテックス粒子の凝集物の量を比濁法により光学的に測定する方法も提案されている（特公昭58-11575号公報、特公昭62-43138号公報、特公昭62-55103号公報等）。この方法により、最近では、自動分析装置を用いて抗原又は抗体を定量的に測定することも行われるようになってきている。

【0005】

10

20

30

40

50

また、金コロイド凝集法を利用して、抗原物質の検出を吸光度の変化に基づき行う方法が提案されている（特開平2-141665、特開平6-94719、特開平6-213891）。

【0006】

これらの免疫分析方法はB/F分離を必要としない点で有用な方法であるが、ラテックス試薬の場合、液状試薬である為に保存安定性が悪い。また金コロイド凝集法においては、金コロイド溶液が試薬としての保存安定性に劣る。このため、凍結乾燥品の金コロイド試薬を、測定時に専用の溶解液と混合する必要があり、操作が煩雑であった。また、少量検体の測定には向いていないなどの欠点があった。

【0007】

このような保存安定性や、操作の簡便性などの点で優れる分析方法として、いわゆる乾式分析方法がある。いわゆる湿式法（又は溶液法）とは、使用する試薬をまず水性溶媒に溶解して試薬溶液を作り、この試薬溶液を分析試料に加えて生じた呈色反応生成物を比色計で測定するものである。これに対して乾式法は、試薬組成物を乾燥状態で含有させた試験片、分析スライド、分析テープなどの乾式分析要素に、水性試料を直接点着して、要素内で生じた呈色又は変色をそのまま比色測定するものであり、試薬溶液を用いる湿式法に比べ、操作の簡便性、分析の迅速性に優れている。

【0008】

しかしながら、乾式分析要素の層構成の中で凝集反応を行わせ、その凝集物の存在自体を直接検出するものは未だ提案されていない。

【0009】

いわゆる固相イムノクロマト法と呼ばれる乾式分析方法も提案されている（例えば、特開平9-5326）。この方法では、濾紙などの毛細管作用を有する反応液透過性媒体シートの一端に金コロイド標識抗体を保持させる一方、他端には第2抗体を捕捉用抗体として固定化しておく。抗原を含有する検体試料を金コロイド標識抗体含有部位に供給すると、被検抗原と金コロイド標識抗体は毛細管作用により、固定化抗体のある帯域まで拡散、移動し、この固定化抗体により抗原と金コロイド標識抗体とが捕捉される。捕捉用第2抗体の帯域に現れる金コロイドの色調を検出することにより被検抗原の存在を確認するものである。この方法は、試薬が乾式化されているので、その保存安定性には優れている。しかし、定量性に欠けるという問題があった。また、原理上、被検抗原を介して第2抗体で金コロイド標識抗体を捕捉するというサンドイッチ法であるので、過剰の金コロイド標識抗体を取り除くためには、透過性媒体シートを十分大きくして、過剰の金コロイド標識抗体が捕捉用抗体固定化部位から拡散除去されるようにする必要がある（これが、イムノクロマト法と言われる所以である）。このため、シートへ供給する液量も多くなり、必然的にシート形状が大きくなるという問題もあった。また、過剰の金コロイド標識抗体が毛細管作用により十分に拡散除去されるまでの時間も必要となり、アッセイ時間が長いという問題もあった。

【0010】

このような状況下にあって、本発明者は、乾式分析要素の層媒体中で凝集反応を起こさせることができる材料の探索を試みた。その結果、分析要素の展開層として用いられる多孔性媒体層の中でも凝集反応を生起させることができ、またこれを感度良く定量性を持って測定できることを見出した。そしてこの多孔性媒体層の中に標識抗体などを含有させることにより、乾式分析要素の特性である試薬の保存安定性を確保することに成功したものである。

【0011】

【発明の目的】

すなわち、本発明は、被検物質に対する特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質と、被検物質との凝集反応を乾式分析法により行い、試薬の保存安定性に優れ、簡便に高感度の検出・分析ができる被検物質の乾式分析方法を提供することを第1の目的とする。

また、本発明は、被検物質との反応による標識特異結合物質の凝集を検出して、被検物質

10

20

30

40

50

を簡便かつ高感度に分析することができる乾式分析要素を提供することを第2の目的とする。

【0012】

【発明の構成】

このような本発明の第1の目的は、被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、前記被検物質の量を分析する乾式分析方法において、

前記被検物質を前記標識特異結合物質と共に、光透過性支持体上に積層された多孔性層に供給し、

この多孔性層内で、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集反応を行わせ、生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定することを特徴とする乾式分析方法、により達成される。

10

【0013】

すなわち、本発明は、被検物質（例えば抗原）と標識特異結合物質（例えば金属コロイド標識抗体）との凝集反応を、多孔性媒体層の空隙中で行わせるものである。多孔性層の空隙の中に液体試料を保持することができるので、単位面積当たり大量の液体試料が存在する中で凝集反応を起こすことができ、より高感度な凝集反応の検出が期待できる。また、この多孔性媒体層に標識特異結合物質を予め含有させることにより、保存時には、その安定性を損なわない程度の乾燥状態とすることができ、分析時には被検抗原として供給される水性検体の存在により、標識特異結合物質の凝集反応を十分生起できる程度の反応の場

20

【0014】

標識特異結合物質は、アッセイ時に被検物質と共に多孔性層に供給してもよい。あるいは、多孔性層に予め標識特異結合物質を含有させておき、アッセイ時に供給される被検物質と標識特異結合物質とを凝集反応させてもよい。

【0015】

多孔性層中で生じた凝集は、透過光又は反射光の光学的変化として検出する。凝集物の有無、その量は、多孔性層媒体中の濁度変化として検出してもよく、また凝集による標識担体の色調変化で検出してもよい。このとき多孔性層は、凝集による濁度変化、呈色、色調変化など層の外側から検出可能とする光学的性能を有することが好ましい。

30

【0016】

また本発明の第2の目的は、被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、水性検体中の被検物質を分析する乾式分析要素において、

光透過性支持体と；

前記支持体上に積層された多孔性層であって、前記標識特異結合物質を含有する多孔性層を備え、

多孔性層内で生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定可能としたことを特徴とする乾式分析要素、により達成される。

40

【0017】

多孔性層には、標識特異結合物質を含有させておくのが好ましい態様である。また多孔性層はいわゆる展開層として機能させてもよく、展開層の層材料として用いられる繊維質材料や非繊維質材料で形成することができる。

【0018】

【発明の構成の詳細な説明】

被検物質と特異結合物質

本発明で分析できる被検物質は、これに特異的に結合する特異結合物質が自然界に存在するもの、あるいは化学的手段によりこれを用意できるものであればよい。特異結合物質は、被検物質に対し特異的に結合することが可能であり、かつ標識担体に結合させることのできる物質である。

50

【 0 0 1 9 】

被検物質と特異結合物質との組み合わせは、例えば、抗原と抗体、ある種の糖類とレクチン、ビオチンとアビジン、プロテイン A と IgG、ホルモンとそのレセプター、酵素と基質、核酸と相補的な核酸、などが例として挙げられる。この組合せは、逆でもよい。

【 0 0 2 0 】

最も一般的な例は、抗原を被検物質とし、抗体を特異結合物質とするものである。特異結合物質としての抗体は、ポリクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体であってもよい。また、複数の種類の抗体を使用してもよい。また、抗体のクラスは特に限定されず、IgGであってもIgMであっても使用可能であるし、また例えばFabやFab'やF(ab')₂等の抗体のフラグメントであってもよい。なお、モノクローナル抗体を特異結合物質として使用する場合には、抗体を固定化した標識担体の凝集を生じさせるためには、被検物である抗原が2以上のエピトープを有するか、2種類以上のモノクローナル抗体が必要となる。ただし、被検物がヘモグロビンのようにサブユニットの多量体である場合には、1種類のモノクローナル抗体を固定化した標識担体の凝集を生じさせることができる。標識担体には2以上の抗体分子が結合していることが、凝集反応を生じさせるのに好ましい。

【 0 0 2 1 】

標識担体

特異結合物質を結合して標識する標識用担体は、特異結合物質を結合した固定化標識担体が被検物との反応により凝集し、その凝集の程度が検出可能なものであればよい。免疫凝集反応に用いられている担体を使用することができる。例えば、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体のような有機高分子のラテックス粒子、金属コロイドのような金属等を用いることができる。担体粒子（又はコロイド）の平均粒径は、0.02～10μmの範囲が好ましい。担体の粒径が大きすぎると免疫学的反応前の担体自体による光学的反射又は散乱による光学的強度が高すぎて測定が困難となりやすい。また粒径が小さすぎると担体凝集物の検出感度が低くなる傾向にある。

【 0 0 2 2 】

従来公知の金属コロイドはいずれも標識担体として使用することができる。例えば、金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、鉄コロイド、水酸化アルミニウムコロイド、などが挙げられる。特に、金コロイドと銀コロイドが適当な粒径において、金コロイドは赤色、銀コロイドは黄色を示す点で好ましい。金属コロイドの粒径としては、約1～500nmが好ましく、特に強い色調が得られる5～100nmがさらに好ましい。

【 0 0 2 3 】

金属コロイドと特異結合物質との結合は、従来公知の方法（例えばThe Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol.30, No.7, pp691-696, (1982)）に従い、行うことができる。すなわち、金属コロイドと特異結合物質（例えば抗体）を適当な緩衝液中で室温下5分以上混合する。反応後、遠心分離により得た沈殿を、ポリエチレングリコール等の分散剤を含む溶液中に分散させることにより、目的の金属コロイド標識特異結合物質を得ることができる。

【 0 0 2 4 】

金属コロイドとして金コロイド粒子を用いる場合には、市販のものを用いてもよい。あるいは、常法、例えば塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法（Nature Phys. Sci., vol.241, 20, (1973)等）により金コロイド粒子を調製することができる。

【 0 0 2 5 】

分析要素の層構成

図1は、本発明の乾式分析要素の一実施態様を示す。図1において、符号10は支持体であり、その上には多孔性層12が積層されている。

【 0 0 2 6 】

支持体10としては光不透過性（不透明）、光半透過性（半透明）、光透過性（透明）のいずれのものも用いることができるが、一般的には光透過性で水不透過性の支持体が好ましい。光透過性水不透過性支持体の材料として好ましいのものはポリエチレンテレフタレ

10

20

30

40

50

ート、ポリスチレンである。この上に積層される多孔性層 1 2 を強固に接着するため、通常下塗り層を設けるか親水化処理を施す。

【 0 0 2 7 】

多孔性層 1 2 は、繊維質であってもよいし、非繊維質であってもよい。繊維質材料としては、例えば濾紙、不織布、織物布地（例えばブロードやポプリンなどの平織布地）、編物布地（例えばトリコット、ダブルトリコット、ミラニーズ等の編物布地）、ガラス繊維濾紙等を用いることができる。非繊維質材料としては、特開昭49-53888等に記載の酢酸セルロース等からなるメンブランフィルター；特開昭49-53888、特開昭55-90859（対応米国特許 4,258,001）、特開昭58-70163（対応米国特許 4,486,537）等に記載の無機物又は有機物微粒子からなる連続空隙含有粒状構造物層；等のいずれでもよい。特開昭61-4959（対応欧州公開 EP 0166365A）、特開昭62-116258、特開昭62-138756（対応欧州公開 EP 0226465A）、特開昭62-138757（対応欧州公開 EP 0226465A）、特開昭62-138758（対応欧州公開 EP 0226465A）等に記載の部分接着された複数の多孔性層の積層物でもよい。

10

【 0 0 2 8 】

多孔性層 1 2 は、供給される液体の量にほぼ比例した面積に液体を層内に展開する、いわゆる計量作用を有する展開層であってもよい。多孔性層に展開層としての機能を持たせることにより、多孔性層に供給される液体の展開が面積当たり均一になり、層内の凝集反応による被検物質の定量的分析の精度が向上する。

【 0 0 2 9 】

展開層としては、これらのうち織物布地、編物布地などが好ましい。織物布地などは特開昭57-66359号に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため、特開昭60-222770（対応：EP 0162301A）、特開昭63-219397（対応ドイツ特許公開 DE 37 17 913A）、特開昭63-112999（対応：DE 37 17 913A）、特開昭62-182652（対応：DE 37 17 913A）に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有させてもよい。

20

【 0 0 3 0 】

この多孔性層 1 2 には、担体標識特異結合物質と被検物質との特異的結合反応の際に至適な pH を与えるため、緩衝剤を含有させてもよい。例えば結合反応が抗原抗体反応であれば、通常の抗原抗体反応に使用できる pH 緩衝剤、例えばトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）を含む緩衝剤；燐酸塩を含む緩衝剤；硼酸塩を含む緩衝剤；クエン酸又はクエン酸塩を含む緩衝剤；グリシンを含む緩衝剤；ピシン（Bicine）を含む緩衝剤；HEPESを含む緩衝剤；MES（2-モルホリノエタンスルホン酸）を含む緩衝剤などのグッド緩衝剤などを用いることができる。pH は通常の抗原抗体反応が行われる pH の範囲内であれば問題ない。

30

【 0 0 3 1 】

また多孔性層 1 2 中には、凝集反応を促進させる為にポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、PEG（ポリエチレングリコール）等の高分子ポリマーを含有させてもよい。

【 0 0 3 2 】

多孔性層 1 2 には、予め標識特異結合物質を含有させてもよい。この場合には、多孔性層 1 2 に被検物質を供給するだけで、この多孔性層 1 2 内で凝集反応を生じさせることができる。

40

【 0 0 3 3 】

また多孔性層 1 2 に二酸化チタンや硫酸バリウムなどの光反射性微粒子を含有させて、光反射層として機能させてもよい。このように光を遮蔽する層とすることにより、多孔性層 1 2 内での凝集反応により生じる呈色、色調の変化を透明支持体 1 0 側から反射測光する場合の白色背景とすることができる。但し、多孔性層 1 2 自体が色調変化の白色背景となる光学的性能を有するものである場合には、光反射性微粒子を含有させなくてもよい。

【 0 0 3 4 】

支持体 1 0 と多孔性層 1 2 との積層は、支持体 1 0 に施された下塗り層（ゼラチンなど）

50

を介して接着することができる。このとき、部分接着を行ってもよい。部分接着とは、特開昭61-4959(EP 0133365A)、特開昭62-138756(EP 0226465A)等に記載の2つの隣接する多孔性層同士又は隣接する多孔性層と非多孔性層との接着の態様であって、「隣接する2層の界面の間に部分的(又は断続的)に配置された接着剤により実質的に密着され一体化されており、隣接する2面及びその間において液体の一樣通過が実質的に妨げられないように構成されている接着」である。

【0035】

一般的には、支持体に接着剤を部分的に配置し、その上に多孔性層を一樣に軽く圧力を加えながら貼りあわせる。接着剤を支持体に部分的に配置する方法は、特開昭61-4959(EP 0166365A)、特開昭62-138756(EP 0226465A)、特開昭64-23160(DE 3721236A)等に記載の方法によることができる。それらの方法の内では、印刷法による方法が望ましい(例えば、日本印刷学会編「印刷工学便覧」(技報堂出版(株)、1983年)838-858頁に記載の方法)。後述の実施例のようにシルクスクリンを用いてもよい。

10

【0036】

接着剤としては、特開昭62-138756(EP 0226465A)に記載の諸種の接着剤、その他前記の「印刷工学便覧」839-853頁に記載の公知の接着剤を用いることができる。接着剤としては水溶媒型の接着剤、有機溶剤型の接着剤、熱接着性(ホットメルト又は感熱性)接着剤を用いることができる。水溶媒型の接着剤の例として、デンプン糊などの水性の糊、デキストリン、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコールなどの水溶液; 酢酸ビニル-ブチルアクリレート共重合体エマルジョンがある。

20

【0037】

本発明の分析要素では、多孔性層12から支持体10の間を部分接着を行っても、両層の間で液体が一樣に通過するわけではない。しかし、支持体と多孔性層との間には、接着剤で充填されていない連続微小空間が生じることになる。このような空間が一種の弱い吸水作用を発揮するものと思われる。水性検体が多孔性層に点着されると、多孔性に浸透拡散する液体が支持体と多孔性層の界面にまでに十分に達することができる。多孔性層内で生じる標識担体の凝集物は、液体の拡散・浸透に伴い、この界面に効率よく移動することができる。従って、支持体と多孔性層との界面を測定対象とすることにより、凝集反応による光学的変化をを感度良く測定することが可能となる。

【0038】

乾式分析要素の製造方法

本発明の乾式分析要素は諸特許明細書に記載の公知の方法により調製することができる。本発明の分析要素は一辺約15mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-28331(対応米国特許4,169,751)、実開昭56-142454(対応米国特許4,387,990)、特開昭57-63452、実開昭58-32350、特表昭58-501144(対応国際公開:WO 83/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることが、製造, 包装, 輸送, 保存, 測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、または小片を開口のあるカードに貼付または収めて用いることなどもできる。

30

【0039】

乾式分析要素による分析方法

本発明の分析要素は前述の諸特許明細書等に記載の操作と同様の操作により液体試料中の被検物質の定量分析ができる。被検物質が抗原又は抗体である場合は、例えば約5 μ L~約30 μ L、好ましくは8~15 μ Lの範囲の血漿、血清、尿などの水性液体試料液を、多孔性層12に点着する。点着した分析要素を約20~約45の範囲の一定温度で、好ましくは約30~約40の範囲内の一定温度で1~10分間インキュベーションする。要素内の発色又は変色を光透過性支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の被検物質の量を求めることができる。点着する液体試料の量、インキュベーション時間及び温度を一定にすることにより定量分析を高精度に実施できる。

40

【0040】

50

測定操作は特開昭60-125543、同60-220862、同61-294367、同58-161867(対応米国特許 4, 424, 191)などに記載の化学分析装置により極めて容易な操作で高精度の定量分析を実施できる。なお、目的や必要精度によっては、目視により発色や色調変化の度合いを判定して、半定量的な測定を行なってもよい。

【0041】

分析要素内に標識特異結合物質を含有させていない場合には、分析要素外の適当な反応溶液中で被検物質と標識特異結合物質とを混合してから、分析要素に点着すれば被検物を分析することができる。例えば、抗原を分析する場合には、要素に点着する前に、水性試料液を標識抗体を含む溶液と混和してから、分析要素に点着すればよい。

【0042】

例えば、被検物質が抗原、特異結合物質が抗体、標識担体が金属コロイドの場合は、以下のように乾式分析要素を作製し、分析を行うことができる。

【0043】

金属コロイドで標識した抗体を適当な分散剤、安定化剤を含有する緩衝液中に分散し、この分散物を展開層媒体である多孔性層に塗布し乾燥する。この多孔性層を透光性支持体10上に積層して、凝集反应用乾式分析要素を作製する。或いは、透光性支持体上に多孔性展開層を積層した後に、この展開層に金属コロイド標識抗体含有溶液を塗布し乾燥して乾式分析要素を作製してもよい。

【0044】

この分析要素に被検物質(抗原)を含む水性検体を点着する。被検物質は多孔性層12内の金属コロイド標識抗体と抗原抗体反応を起こしその結果金属コロイドが凝集する。

【0045】

金属コロイドは凝集により色調が変化することから、多孔性層12内の色調変化を測定することにより被検物質の検出、定量が可能となる。例えば金コロイドの場合は、凝集前には540nm付近を主吸収波長とする赤紫色を呈する。凝集によりコロイド粒子のサイズが大きくなると吸収は長波長側にシフトして、薄い赤紫色又は灰色を呈する。従って、540nmにおける反射光学濃度の減少、凝集により出現する約650nmにおける反射光学濃度の増加、あるいは540nmと630nmの2波長で反射光学濃度を測定し、その差から被検物質(抗原)の量を定量することができる。

【0046】

【実施例1】

乾式分析要素の作製と評価

ゼラチン下塗りされている180 μ mのポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルム(支持体)に、孔径200 μ m、その中心間隔が700 μ mのシルクスクリーンを当てその上に、事務用接着剤(澱粉糊)をスクイズ法によって塗った後、スクリーンをはがして接着剤の網点を支持体上に形成した。この支持体に、予め1.0%牛血清アルブミン添加10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に室温で24時間浸漬し、乾燥させたポリエステル製の白色ブロード織物布地を載せ、軽く圧力をかけて接着し、展開層とした。

【0047】

この展開層に、下記被覆量となるように下記組成の水溶液を塗布し乾燥して、試薬層を設けた。

50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)	242.3 g/m ²
金コロイド標識抗ヒトヘモグロビン抗体	200 mg/m ²

(なお金コロイド標識抗ヒトヘモグロビン抗体は、免疫学的便中ヘモグロビン検出キット「イムノゴールドHem」(合同酒精(株)製造、和光純薬工業(株)販売)の金コロイド抗体試薬(マウスモノクローナル抗ヒトヘモグロビン抗体結合金コロイド)を使用した。)

【0048】

次いで、この分析要素を12 \times 13mmのチップに裁断し、特開昭57-63452に記載のスライドの枠に収めて、本実施例のヘモグロビン分析用多層乾式スライド1とした。

【0049】

10

20

30

40

50

この乾式スライド1に、Exocell . INC製 ヒトヘモグロビン A₀ (Hb) を6% ポリエチレングリコール6000を含む0.2M塩化アンモニウム (pH6.8) 水溶液にて希釈して作製した希釈溶液系 (0, 100, 250, 500, 1000ng/mL) を、それぞれ20 μ L点着した。各スライドを37にて5分間インキュベーション後、中心波長540nmにてPET支持体側から反射光学濃度を測定した。得られた検量線を図2に示す。

【0050】

図2から明らかなように、本実施例のスライド1において、ヘモグロビンの定量が精度よく行えることが判明した。特にHb低濃度領域におけるOD₅₄₀の減少が急激である。このことは、本実施例のスライド1では、より低濃度の被検物質の定量に適し、高感度な分析が可能であることを示している。また、本実施例のスライド1では、液体試料を点着したときに、展開層 (多孔性層) による液体試料の保持が可能となり、取り扱い時や、測定機器への搬送時、あるいは測定機器内でスライド搬送に際する、液の乱れ等が無く、作業性に優れていることが確認できた。

10

【0051】

【実施例2】

乾式分析要素の保存安定性

実施例1の乾式分析要素 (スライド1) の保存安定性を検討した。乾式分析要素は、通常4 保存で1年程度安定であるが、ここでは加速試験として、35 に設定した恒温槽にスライド作成後0, 1, 4, 7日間保存した。

【0052】

比較例として、250 μ g/mLの金コロイド標識抗ヒトヘモグロビン抗体溶液 (50mMリン酸ナトリウム (pH7.0)) を調製し、比較例の溶液系凝集反応試薬とした。この比較例溶液試薬をスライド1と同様調製後、35 の恒温槽に0, 1, 4, 7日間保存した。

20

【0053】

100ng/mL及び500ng/mLのヒトヘモグロビン溶液 (Exocell . INC製 Human Hemoglobin A₀ (Hb))、6% ポリエチレングリコール6000、0.2M塩化アンモニウム (pH6.8) を、各日保存後のスライド1にそれぞれ20 μ L点着し、37にて5分間インキュベーション後、540nmにて支持体側から反射光学濃度を測定した。得られた反射光学濃度から、実施例1にて作成された検量線 (スライド1作製当日に作成) を用いてヘモグロビン濃度を算出した。

【0054】

比較例については、その溶液試薬100 μ Lと100ng/mL及び500ng/mLのヒトヘモグロビン溶液50 μ Lを混合後、10分後540nmにて透過光学濃度を測定し、あらかじめ標準液にて作成された検量線によりヘモグロビン濃度を算出した。

30

【0055】

表1に示すように、従来の溶液系金コロイド凝集に使用する溶液試薬 (比較例) では、35 保存により日が経つにつれて算出Hb濃度の誤差が大きくなり、保存4日目には約20%、保存7日目には約40%ないし70%の誤差を生じるようになっていた。これに対し、スライド1では、保存4日目で約5~10%、保存7日目でも5~16%の誤差にとどまった。このように本発明による乾式分析要素は保存安定性に優れていることが示された。

【0056】

【表1】

40

保存安定性の比較

Hb濃度 (ng/mL)	保存期間 (日)	見かけのHb濃度 (ng/mL)		
		スライド1	比較例	
100	0	100	100	10
	1	95	105	
	4	105	120	
	7	105	140	
500	0	500	500	20
	1	480	550	
	4	550	600	
	7	580	850	

【0057】

【発明の効果】

以上のように本発明の分析方法は、乾式分析要素の多孔性層内で被検物質（例えば抗原）と標識特異結合物質（例えば金属コロイド標識抗体）との凝集反応を可能としたものである。単位面積当たり大量の液体試料を保持することができる多孔性媒体層中で凝集反応を行うので、標識特異結合物質の凝集反応による被検物質の定量分析を高感度に行うことができる。また迅速、簡便な分析が可能となる。

【0058】

また本発明の乾式分析要素は、保存時には使用する試薬組成物の安定性を損なわない程度の乾燥状態の媒体とすることができ、分析時には被検物質として供給される水性検体の存在により、標識特異結合物質の凝集反応を十分生起できる程度の反応の場を確保できる。

【0059】

また、多孔性層に予め標識特異結合物質を含有させておけば、被検物質を含有する液体試料を点着・供給するだけで、高感度な被検物質の乾式分析を行うことができる。従来の試薬溶液を用いる湿式法の凝集反応に比べ、試薬の用時調製や混合作業などの必要がないので、極めて、迅速かつ簡便に分析を行うことができる。また液体試料を多孔性層により保持するので、分析作業の際の搬送時に、液の乱れ等が無く、作業性に優れている。

【0060】

【好ましい実施態様】

最後に本発明の好ましい態様をまとめると以下の通りである。

(1) 被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、前記被検物質の量を分析する乾式分析方法において、

前記被検物質を前記標識特異結合物質と共に、光透過性支持体上に積層された多孔性層に供給し、

この多孔性層内で、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集反応を行わせ、生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定することを特徴とする乾式分析方法。

(2) 被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合し

10

20

30

40

50

た標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、前記被検物質の量を分析する乾式分析方法において、

前記被検物質を、光透過性支持体上に積層された多孔性層であって前記標識特異結合物質を含有する多孔性層に供給し、

この多孔性層内で、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集反応を行わせ、生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定することを特徴とする乾式分析方法。

- (3) 前記標識担体が金属コロイドであり、凝集反応による金属コロイドの色調の変化によって凝集反応の程度を検出することを特徴とする(1)又は(2)の分析方法。
- (4) 前記金属コロイドが金コロイド又は銀コロイドである(3)の分析方法。
- (5) 前記被検物質が抗原であり、前記特異結合物質が抗体である(1)～(4)の分析方法。
- (6) 被検物質と、この被検物質に特異的に結合可能な特異結合物質を標識担体に結合した標識特異結合物質との凝集反応の程度を測定することにより、水性検体中の被検物質量を分析する乾式分析要素において、

光透過性支持体と；

前記支持体上に積層された多孔性層であって、前記標識特異結合物質を含有する多孔性層を備え、

多孔性層内で生じた凝集反応の程度を前記支持体側から測定可能としたことを特徴とする乾式分析要素。

- (7) 前記多孔性層が、前記被検物質と前記標識特異結合物質との凝集による色調変化を観察可能とする光学的性能を有することを特徴とする(6)の分析要素。
- (8) 前記多孔性層が繊維質材料からなる層である(6)又は(7)の分析要素。
- (9) 前記多孔性層が編物布地又は織物布地からなる層である(8)の分析要素。
- (10) 前記多孔性層が非繊維質材料からなる層である(6)又は(7)の分析要素。
- (11) 前記多孔性層が展開層としても機能する層である(6)～(10)の分析要素。
- (12) 前記支持体と前記多孔性層とが部分接着されている(6)～(11)の分析要素。
- (13) 前記標識担体が金属コロイドであり、凝集反応による金属コロイドの色調の変化によって凝集反応の程度を検出することができることを特徴とする(6)～(12)の分析要素。
- (14) 前記金属コロイドが金コロイド又は銀コロイドである(13)の分析要素。
- (15) 前記被検物質が抗原であり、前記特異結合物質が抗体である(6)～(13)の分析要素。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の乾式分析要素の一実施態様例の構成図である。

【図2】実施例1の結果を示す図であり、実施例スライド1の乾式分析要素の検量線を示す図である。

【符号の説明】

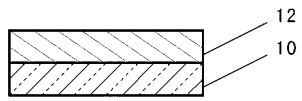
- 10 透光性支持体
- 12 多孔性層(展開層)

10

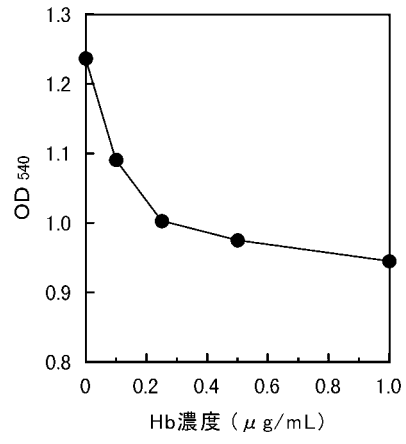
20

30

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 中村 健太郎
埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内
- (72)発明者 川崎 和也
埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内
- (72)発明者 瀬志本 修
埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内
- (72)発明者 永田 正人
東京都中央区銀座6丁目2番10号 合同酒精株式会社内
- (72)発明者 田中 徹
東京都中央区銀座6丁目2番10号 合同酒精株式会社内

審査官 竹中 靖典

- (56)参考文献 特開平01-214760(JP,A)
特開平07-151754(JP,A)
特開平09-005327(JP,A)
特開昭64-032169(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/543