

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4573486号
(P4573486)

(45) 発行日 平成22年11月4日(2010.11.4)

(24) 登録日 平成22年8月27日(2010.8.27)

(51) Int.Cl.

G01N 21/76 (2006.01)
G01N 27/416 (2006.01)

F 1

G01N 21/76
G01N 27/46

U

請求項の数 24 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2001-517146 (P2001-517146)
 (86) (22) 出願日 平成12年8月16日 (2000.8.16)
 (65) 公表番号 特表2003-507704 (P2003-507704A)
 (43) 公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)
 (86) 國際出願番号 PCT/FI2000/000693
 (87) 國際公開番号 WO2001/013095
 (87) 國際公開日 平成13年2月22日 (2001.2.22)
 審査請求日 平成19年6月8日 (2007.6.8)
 (31) 優先権主張番号 09/376,139
 (32) 優先日 平成11年8月17日 (1999.8.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504383807
 オリオン・ディアグノスティカ・オサケユ
 キテュア
 Orion Diagnostics O
 y
 フィンランド、エフィーエン-02200
 エスパー、コイヴーマンカーン・ティエ6
 ベー番
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 葵
 (74) 代理人 100091465
 弁理士 石井 久夫
 (72) 発明者 ティモ・アラ-クレメ
 フィンランド、エフィーエン-32300
 メッリレ、パッピステンティエ428番
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ルミネセンス測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発光化合物を定量するための発光化合物のルミネセンスの発生方法であって、
 (i) 一対の供電用電極と、(ii) 前記電極の間に、前記電極と電気的に接触せずに配置されている導電物質と、(iii) 前記導電物質と電気的に接触している前記発光化合物と、を内部に有している電解液を設け、

前記電極間に電流を流し、それによって前記導電物質と電気的に接触している前記発光化合物からルミネセンスを誘起させるルミネセンス発生方法。

【請求項 2】

前記発光化合物の濃度を定量するために、さらに前記ルミネセンスの測定を含む請求項 1 に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項 3】

前記導電物質が、電気化学的不活性物質である請求項 1 記載のルミネセンス発生方法。

【請求項 4】

前記電気化学的不活性物質が、ガラス状炭素、金、白金、又はそれらの混合物である請求項 3 に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項 5】

前記導電物質が、絶縁された金属又は半金属である請求項 1 に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項 6】

10

20

前記絶縁された金属又は半金属が、酸化物被覆又はポリマー被覆により絶縁されている請求項5に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項7】

前記金属又は半金属が、アルミニウム、ハフニウム、マグネシウム、ケイ素、タンタル、チタン、ジルコニウム、又はそれらの混合物である請求項5に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項8】

前記導電物質が、電気化学的不活性物質の薄膜、又は絶縁された金属若しくは半金属の薄層によって被覆された多孔膜である請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項9】

前記導電物質が、電気化学的不活性物質と、絶縁された金属又は半金属との結合体である請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項10】

前記導電物質が、さらに磁性材料を含む請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項11】

前記電解液が、少なくとも2つの導電物質を含有している請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項12】

前記電解液が、少なくとも2つの異なるタイプの導電物質を含有している請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項13】

前記電解液が水系電解液である請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項14】

前記電解液が非水系電解液である請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項15】

前記発光化合物が、前記導電物質の表面に付着している請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項16】

前記発光化合物が、分析対象物と結合している請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項17】

前記ルミネセンスが、前記供電用電極間に流される前記電流の終点よりも遅れて測定される請求項1に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項18】

前記ルミネセンスが、少なくとも2つの異なる発光化合物に起因する請求項16に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項19】

前記ルミネセンスが、少なくとも2つの異なるタイプの導電物質の表面で形成される請求項16に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項20】

前記異なる導電物質の表面上での前記ルミネセンスが、供電用電極を介して通電される種々の電流値により発光して測定される請求項19に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項21】

異なる導電体上の2以上の化学発光化合物の測定値が、内部の基準化に用いられる請求項18に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項22】

異なる導電体上の2以上の発光化合物の測定値が、2以上の分析物の濃度決定に用いられる請求項19に記載のルミネセンス発生方法。

【請求項23】

前記分析対象物が核酸配列である請求項16に記載のルミネセンス発生方法。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

前記分析対象物がアミノ酸配列である請求項 16 に記載のルミネセンス発生方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ルミネセンスによる発光化合物の濃度分析法に関し、さらに詳しくは、電気発生の化学ルミネセンスによる発光化合物の濃度分析法に関する。

【0002】

【従来の技術】

化学、生物学、および生化学上の物質、例えば、抗体、ホルモン、ウィルス、酵素、代謝物、麻酔薬、毒物、薬品、微生物、核酸などの物質を検出し定量するための、正確で感度がよく、迅速かつ費用効果のある方法への必要性が高まっている。必要な感度と精度は、抗原 - 抗体反応などの結合反応を用いて、診断評価用の錯体 (complex) すなわち分析物の存在が、1 以上の錯体物質 (complexing material) に付着した検出可能な標識によつて指示されることにより得られる。商業的な標識化合物の一例には、光化学的、化学的、電気化学的な励起方法に基づいて、ルミネセンスを発生させることができる化合物がある。

【0003】

種々に改良されたルミネセンスに基づく分析方法は、その感度について広く知られているが、発光種が非常に低濃度である場合には、各方法に特有の短所を有する。蛍光の感度は、蛍光不純物と同様にレイリー散乱およびラマン散乱現象によっても制限され、これらは非特異性バックグラウンド発光を増加させる。燐光は主として固体に限定され、溶液中で常温で燐光を発するそれらごく少数の化合物からの発光は、たいてい酸素に非常に敏感であり、これが実用化を阻害している。従来の蛍光や燐光に基づく方法は、光励起を用いるので、適切な光源や光学系を必要とする。化学ルミネセンスに基づいた方法は、励起用光学系を必要としないので、一般的に装置が非常に単純である。しかし、化学ルミネセンス法には、多くの場合、深刻な化学的妨害を受ける。装置的に単純な電気化学的励起に基づく方法（電気発生化学ルミネセンス、すなわち ECL）は、電極に印加された電気パルスを励起に利用しており、低い検出限界を提供する。

【0004】

電解液中の無機化合物および有機化合物の ECL は、この分野ではよく知られている。例えば水系電解液中における白金電極でのルミノールのアノード ECL は、1929 年以来研究されている（例えば、N. Harvey の J. Phys. Chem. 33(1929)1456 や、K. Haapakka と J. Kankare の Anal. Chem. Acta 138(1982)263）。水系電解液中におけるシュウ酸塩の存在下での $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ のアノード ECL、およびアセトニトリル / 水の混合液中においてペルオキシ二硫酸塩の存在下での $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ のカソード ECL が、Bard によって報告されている（D. Ege, W. Becker と A. Bard, Anal. Chem. 56(1984)2413）。適した酸化剤を含んでいる水系電解液中において、酸化物被覆アルミニウム電極での多数の無機イオンのカソード ECL（K. Haapakka, J. Kankare と S. Kulmala Anal. Chem. Acta 171(1985)259）、および多数の有機イオンのカソード ECL（K. Haapakka, J. Kankare と O. Puhakka の Anal. Chem. Acta 207(1988)195）が報告されており、短寿命 ECL は、電極に電気パルスを印加している間に測定される。種々のテルビウム (III) 錯体は、ペルオキシ二硫酸塩を含む電解水溶液中において、酸化物被膜アルミニウム電極で、長寿命なテルビウム (III) 特有のカソード ECL を発させることが可能である。このカソード ECL は、時分割 ECL 検出を用いることにより、短寿命のバックグラウンド ECL を除去することが可能であり、極微量分析のための基礎を成している（J. Kankare, K. Fallden, S. Kulmala と K. Haapakka の Anal. Chem. Acta 256(1992)17、および J. Kankare, A. Karppi と H. Takalo の Anal. Chem. Acta 295(1994)27）。電極表面での ECL 測定に基づく、分析対象物の結合分析 (binding assay) が提案された。例えば、A. Bard によって（D. Ege, W. Becker と A. Bard, Anal. Chem. 56(1984)2413、および国

10

20

30

40

50

際公開WO 86/02734は、ルテニウム(III)、およびオスミウム(III)を含有するECL標識を提案している。J. KankareとK. Haapakka(英国特許GB 2217007B、米国特許US 5308754、J. Kankare, K. Haapakka, S. Kulmala, V. Nanto, J. EskolaとH. Takalo Anal. Chem. Acta 266(1992)205)、さらにM. Billadeauら(国際公開WO 96/41177)は、時分割ECLに基づく結合分析におけるLn(III)含有ECL標識(Ln(III)=Dy(III)、Eu(III)、Sm(III)、Tb(III))の使用を提案している。ECLを検出するための数多くの試料セル構成と測定方法が提案された。ECLは、電極表面(例えば、ヨーロッパ特許EP 658760 A1および国際公開WO 96/28538)か、又は電極表面上に集められた磁性ビーズ表面(例えば、国際公開WO 92/14139、WO 92/14138、日本特許公開8-190801 A2および国際公開WO 96/15440)のいずれかで発生している。ECL検出器は、高圧液体クロマトグラフィ(例えば、D. Skotty, W. LeeとT. NiemanのAnal. Chem. 68(1996)1530)や、キャピラリー電気泳動(G. Forber, T. NiemanとJ. SweedlerのAnal. Chem. 347(1997)289)に適用されている。

【0005】

Jones(ヨーロッパ特許EP 962773)は、双極電極上での公知のECL反応を研究した。その公報では、非常に小さい導電性炭素粒子上で電気化学反応が起こっており、導電性炭素粒子に亘って十分な電圧降下を得るには、大きい電圧勾配が、それは実際問題としては非現実的であるが、要求される。Jonesは、電気化学的不活性物質と、絶縁した金属、半金属、又はその混合物とが結合した導電体については開示しておらず、そのような導電体が本発明の特徴的な形態の1つを提供し、以下に記載するように、多重成分分析および内部基準を可能にするのに寄与している。多重成分分析においては、本発明の好ましい実施形態であるが、以下に記載するように、各標識ごとに、また各導電体ごとに特定の緩衝剤も必要である。

【0006】

発明が解決しようとする課題

通常は、ECLでは、ルミネセンス化合物は電極表面のごく近傍に位置しなければならない。特に、ECLイムノアッセイ(immunoassay)に関しては、ECL標識は、抗体又は抗原と結合している発光化合物を含んでいるが、この標識が電極表面に結合される。この結合は、たとえば、電極表面で免疫試薬の1つが固定される場合には直接免疫反応によって(J. Kankare and K. Haapakkaの英国特許GB 2217007、米国特許US 5308754)、あるいは免疫試薬で被覆した非導電性磁性ビーズを用い、免疫反応が起こされた後に、磁性ビーズを磁場によって電極表面上に集めて間接的になされる。磁性ビーズを使う利点は、例えば、抗体被覆した平面電極表面に起こる結合反応と比べて、かなり効率的な結合反応にある。しかしながら、ECLアッセイ(ECL assay)で磁性ビーズを用いることは、以下の不利益がないわけではない。即ち、(i)電極表面からおよそ25以下の励起距離が要求されるので、励起効率がたいてい低く(国際公開WO 92/14139を参照)、(ii)電極表面近傍からの発光の検出効率が、光を遮断するビーズ層によって妨げられ、(iii)短い励起パルスの間に磁性ビーズが電極表面から離れるので励起効率が抑制される。

【0007】

磁性ビーズは従来のECL法の改良を提供するが、ECLアッセイの当業者の間では、さらに高い感度を示し、多重成分分析および/又は内部基準を可能にする、という要望が未だにある。よって、本発明は、高感度を有し、そして多重分析対象物の濃度分析能という利点を有するECL法を提供することを目的とする。

【0008】

発明の概要

本発明は、発光化合物の濃度を高感度で測定する方法を提供するものである。その方法は、電極と電気的接触をせずに電極間に配置された導電物質を備えた1対の電流供給用の電極と、発光化合物とを、電解液に浸漬して備えることを含む。そして、電流を電極に印加

10

20

30

40

50

して、導電物質と電気的接觸している発光化合物を発光させる。発光を測定して、発光化合物の濃度を確立する。

【0009】

導電物質の例には、電気化学的不活性物質、絶縁した金属、合金、および半金属、及びそれらの複合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。代表的な電気化学的不活性物質には、不定形炭素、金、白金、及びそれらの混合物がある。絶縁する金属又は半金属の代表的なものは、アルミニウム、ハフニウム、マグネシウム、ケイ素、タンタル、チタン、ジルコニウム、およびそれらの混合物である。好ましくは、絶縁用材料は、酸化物膜又はポリマー膜がよい。ある実施形態では、導電物質は、電気化学的不活性物質、絶縁した金属又は半金属からなる薄膜で被覆された多孔質膜である。

10

【0010】

電解液は、非水系又は水系の電解液である。発光化合物は、導電物質の表面に付着されているか、又は分析対象物（例えば、核酸又はアミノ酸配列など）と結合されている。ある実施形態では、ルミネセンスは、供電用電極に印加される電気パルスの終点から遅延して測定される。他の実施形態では、ルミネセンスは、少なくとも2つの異なった電気化学発光化合物、少なくとも2つの異なるタイプの導電物質、又は少なくとも2つの異なった分析対象物を用いて発光される。

【0011】

本発明の方法の利点は、感度のよいECLアッセイを提供できることである。他の利点は、多重分析対象物の濃度の分析能、および内部基準能を含むことである。これらの利点、及び他の利点は、以下に記載した説明により明らかになるであろう。

20

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、発光化合物の濃度を感度よく測定する独特な方法を提供する。以下に説明する測定方法は、これからは非接觸型電気発生ルミネセンス法、即ちCOELと称することにする。

【0013】

本発明では、発光化合物を含む電解液に一組の供電用電極が浸漬される。導電物質は、供電用電極と電気的接觸をせずに電極の間に配置される。ここでいう電気的接觸とは、物理的に接觸していること、及び発光化合物のルミネセンスを発光するのに要求される励起距離、好ましくは25以下での距離以内に存在していること、の両方を意味する。電流は、導電物質と電気的接觸してルミネセンスを発する発光化合物を含んでいる電極間で発生する。したがって、従来のECL法と比べると、発光化合物が通電用電極に電気的接觸する範囲内に存在しなくても、発光することができる。ルミネセンス（発光）は、発光化合物の濃度を突きとめるための以下の従来技術で測定される。

30

【0014】

導電物質（以後は「導電体」と称する）は、電解液と有害な反応をしなければ、どのような導電物質であってもよい。導電体は、電解液と等しい電導度、好ましくは電解液より大きい電気伝導度を有している。理論にたよるべきではないが、電流供給用電極間に電流が発生するとき、電解液内に電圧降下を与えることによって、導電体を通してファラデー電流が発生していると考えられている。ファラデー電流を発生させるこの方法は、双極電解（bipolar electrolysis）としても知られており、Eardley, D. Handley と S. Andrew の *Eletrochim. Acta* 18(1973)839、F. Goodridge, C. King と A. Wright の *Eletrochim. Acta* 22(1977)347、M. Fleischmann, J. Ghoroghchian と S. Pons の *J. Phys. Chem.* 89(1985)5530 に述べられている。

40

【0015】

導電体は、ECLアッセイの電極に用いられる電気伝導性材料からなると好ましい。例えば、導電体は、不定形炭素、金、白金、ステンレス鋼、又はそれらの組合せなどの電気化学的に不活性な物質で形成することができる。導電体はまた、絶縁した金属、合金、半金属、およびそれらの組合せであってもよい。金属及び半金属の特別な例には、アルミ

50

ニウム、ハフニウム、マグネシウム、シリコン、タンタル、チタン、ジルコニウム、又はそれらの組合せなどが含まれているが、これらに限定されるものではない。ここで、絶縁した (insulated) というのは、金属、合金、又は半金属が、酸化物膜又はポリマー膜のような保護膜によって絶縁されている（即ち被覆されている）ことを意味する。保護膜は、1 ~ 1 0 0 nm の範囲でできること、これは公知の E C L アッセイに用いられる酸化物被膜電極と同様である。

【 0 0 1 6 】

当業者にとっては自明なことであるが、導電体用の材料の選択は、ルミネセンスの発光に利用される E C L 反応のタイプに依存する。例えば、もしアノード E C L 反応がルミネセンスを発するのに用いられるなら、電気化学的不活性物質が選択される。他方、カソード E C L 反応がルミネセンスを発するのに用いられるなら、絶縁した金属、合金、半金属が選択される。

10

【 0 0 1 7 】

本発明の導電体は、導電体の物理的性質を修正するために、余分の非導電性部分を含んでもよい。例えば、導電体の密度を小さくして電解液中に浮かせることができるように、導電体がポリマーの芯 (core) を有してもよい。さらに、導電体の収集を助けるために、導電体が磁性金属又は磁性合金から成る芯を有してもよい。the Handbook of Chemistry and Physics 第 70 版 CRC プレスに列挙されている磁性金属又は磁性合金などの、公知の磁性金属又は磁性合金が利用可能である。これは引用して組み込む。

【 0 0 1 8 】

20

本発明においては、導電体は、どのような形状・寸法であってもよい。たとえば、導電体は球形や楕円形でもよい。球状の導電物質は、たとえば米国コネチカットにある Abbott Ball 社などの商業的な供給会社から容易に入手可能である。球状導電体はサイズが 10 μm から 10 mm の範囲にあることができる。さらに、導電体は、表面に電気化学的不活性物質、絶縁した金属又は半金属を備えた多孔性マトリクスであってもよい。

【 0 0 1 9 】

任意であるが、電解液は、形状、サイズ、電気伝導性材料の異なる導電体を含むことで、交互に切り替わる (alternating) ルミネセンス発生の閾値電位を提供することもできる。例えば、本発明の教示するところに従えば、当業者には明らかになるであろうが、金とアルミニウムのように異なる材料で形成された導電体は、導電体と電気的接触している発光化合物（即ち E C L モイエティ (moiety)）からルミネセンスを開始するための異なる閾値電位を有するであろう。さらに、異なるサイズの導電体も、E C L モイエティでルミネセンスを発するための異なる閾値電圧を示すであろう。本発明におけるこの独特な形態は、同じ電解液内で接触されることによる多重 E C L 反応を可能とし、これは、内部基準および多重分析対象物の分析を促進する。

30

【 0 0 2 0 】

電解液は、E C L 反応に用いられるどんな電解液でもよい。本発明においては、電解液には、水系電解液又は非水系電解液を用いることができる。電解液の選択は、検出されるべき分析物と用いられるべき E L C モイエティなどの要素によって、部分的に決定される。例えば、もし生体分子（核酸やタンパク質）の濃度を確立するには、緩衝剤で処理された水系電解液が選択できる。そのような要因は、当業者には容易に決定できるであろう。

40

【 0 0 2 1 】

本発明においては、E C L C モイエティは、E C L アッセイに用いられるどんな発光モイエティでもよい。従って、E C L モイエティは、好ましくは金属キレートである。利用できる金属キレートの例には、ルテニウム、テルビウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、インジウム、パラジウム、モリブデン、テクネチウム、銅、クロム、タンゲステン、又はそれらの組合せなどの遷移金属又は希土類金属のキレートが含まれるが、これに限定されるものではない。特に好ましい 2 つは、ルテニウムの、およびテルビウムのキレートである。

【 0 0 2 2 】

50

供電用電極は、ECL反応の電極に用いられるどんな電気伝導性材料で形成されていてもよい。従って、電極は、上記の導電体を形成するのに用いたのと同じ電気伝導性材料で形成することができる。本発明のある実施形態では、電極と導電体とは同じ材料で形成される。別の実施形態では、供電用電極は、バックグラウンド発光を最小にするために、表面でのECL無発光が可能な電気伝導性材料で形成される。電極は、末端で互いに間隔をあけて配置されていると好ましい。

【0023】

電流は、適切な電圧を供電用電極に所定の時間枠に印加して発生させ、その結果、電導体を通る部分電流が、導電体と電気的接触しているECLモイエティを発光させる。ルミネセンスを発生させるために必要な電圧（すなわち、閾値電位）は、導電体-電解液界面の界面ポテンシャルと、界面を通じて流れるファラデー電流の一部分とに依存する。双極電解の分野の当業者にとって自明になるであろうが、導電体を通じて流れる電流は、以下の要因に依存する。即ち（1）電解液の電導度、（2）導電体に用いられる電気伝導性材料、（3）電流線に配向した導電体の最長寸法、（4）導電体周囲の電解液中における電流経路の自由空間、（5）境界で起きている電極プロセスの特徴、および（6）導電体と電解液の間の境界抵抗である。従って、導電体の寸法、形状、方向、位置、または材料などの要因の変更は、ルミネセンスを誘起するために供電用電極に印加されるべき必要電圧に影響するであろう。これらの要因は、以下の本発明の教示に従えば、当業者によって容易に明確にことができるであろう。

【0024】

得られた光の強度が、要求される信号対雑音比を得るために必要な時間についての波長及び/又は時間分割ベースで測定され、そして発光化合物の定量のために用いられる。光検出器は、たとえば光学フィルタ又はモノクロメータと組合わせた光電子倍増管又はフォトダイオードなど、どのような光検出装置でもよい。任意に、光検出装置には、光検出器からの電気信号を増幅する増幅器と接続されてもよい。ECLモイエティの濃度は、その分野で知られている標準的な分析技術により決定される。

【0025】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、対象分析物の測定に用いられる。他の公知のECLアッセイでは、ECLモイエティは、対象分析物の濃度定量のための標識剤として用いられる。ECLモイエティは、標識剤として、分析対象物と、又は分析物の存在を突きとめるために用いる試薬（例えば、イムノアッセイでの抗原又は抗体）と、結合される。それゆえ、本発明の方法は、特に低い検出限界の要求のある分析法に用いるのに適している。そのような分析法の例には、イムノアッセイのような結合アッセイ、核酸交雑（hybridization）アッセイ、解離アッセイ、逆滴定アッセイ、およびクロマトグラフィ、キャピラリ電気泳動およびフローインジェクション分析で用いられる検出システムを含むが、これに限定されるものではない。

【0026】

例えば、本発明の方法は、1以上の抗原の濃度を決定するためのイムノアッセイとして用いられる。抗原は、その表面に一次抗体を固定されている導電体又は多導電体を、まず抗原含有試料と、次いでECLモイエティが結合されている二次抗体とインキュベートすることにより、定量化される。十分に時間をかけてインキュベーションした後、その導電体又は多導電体導電体は洗浄され、結合していない標識抗体は洗い流される。続いて、その導電体又は多導電体導電体は、セル内の供電用電極間に配置され、それによってルミネセンスは、本発明に従って発光され、測定される。

【0027】

上記のイムノアッセイの様々な変形が用いられる。例えば、時分割又はスペクトル識別を用いて、2以上の標識化合物は同時検出が可能である。上記の2重標識は、非競合アッセイに拡張され、第2の抗体は、アッセイの内部基準をなしつけるために、異なるECLモイエティで標識される。2以上の異なる標識化合物を代わりに用いることができるが、ルミネセンスを発するために異なる電解液が要求される。電解液を変えることにより、同じ

10

20

30

40

50

又は異なる導電体の上の異なる標識化合物および分析物とが、順次定量化される。

【0028】

さらに、導電体の寸法又は材質を変えると、異なる発光化合物の同時測定および試料中の異なる分析物の濃度検出が可能になる。例えば、寸法の異なる2つの導電体を異なる第一抗体で被覆してもよい。そこでは、導電体は、定量されるべき2つの異なる抗原と、同じECLモイエティで標識された2つの第二抗体とを含む混合物でインキュベートされる。十分な時間経過の後、導電体は、未結合の第二抗体を除去するために洗浄される。その後、導電体はセル内に配置され、供電用電極に印加される電圧を徐々に増加させることによって、ルミネセンスが発せられる。大きい方の導電体は、小さい方に比べて低い閾値電位を有するので、電圧が徐々に増加すると、光は、はじめに大きい方の導電体で発光する。電解液中の電圧降下が十分に高くなれば、小さい方の導電体で発光しはじめる。本発明の他の変形は、当業者には容易に明らかになるであろう。

【0029】

実施例

以下の非限定的な例では、非接触型電気発生ルミネセンス(COEL)の利用を説明している。図1は、本発明に従った使用をするための装置の概略図である。図1には、電解液(14)を収容するセル壁(12)を有する、セル(10)が備えられている。電解液(14)は、一対の供電用電極(16, 18)と導電体(20)とを浸してあり、導電体(20)は、電極と電気的接觸せずに、電極間に配置されている。電流源(22)は、電極(16, 18)と接続され、記録装置(24)とも接続されている。記録装置(24)の次には、導電体で発光された光(h)を検出するために、光検出器(26)が接続されている。

【0030】

以下の実施例に用いたセルは、寸法が長さ16mm、幅7mm、深さ9mmのポリテトラフルオロエチレンのセルであった。供電用電極は、直径2mmのステンレス鋼線であった。2本の電極は、11mmの間隔をあけて設けた。電源は自作の静電型(coulostatic)パルス発生器で、60ボルト(V)、0.4ミリ秒(ms)の矩形パルスが発生可能であった。光検出器は、浜松ホトニクス社製の光電子倍増管R3550型であった。検出信号は、スタンフォード・リサーチ社製のプリアンプSR455型で増幅した。増幅された信号は、スタンフォード・リサーチ社製のフォトンカウンタSR400型で計測した。光子計数器は、測定システムを制御しデータを蓄積するために、PCコンピュータに接続した。

【0031】

電流は、導電体の電圧降下と、ルミネセンス発生の主要な要素であるが、装置的な理由により、実施例1ないし6では供電用電極に印加された電圧だけを述べている。

【0032】

実施例1

ルミノールの非接触型電気発生ルミネセンス

試料溶液は、次の成分、pH7.8に調整された 5.0×10^{-2} Mのホウ酸塩緩衝液、 7.1×10^{-2} Mのアジ化ナトリウム、及びさまざまな量のルミノール(5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン)で調製した。非接触型電気発生ルミネセンス(COEL)は、直径6.3mmの球状アルミニウム導電体(A1導電体)(AbbotBall社製)の表面で、次のように発光した。振幅60V、継続時間0.4msと、その間に0レベル、10msとがある励起パルスを供電用電極に印加し、その結果、試料溶液中に約50mAのピーク電流を生じた。得られたA1導電体からの発光(COEL応答)は、光電子倍増管で検出した。500回の励起パルスからの総COEL応答を、試料溶液中のルミノール濃度の関数として、表1および図2に示した。バックグラウンドCOEL応答(サンプルセル内でA1導電体のないCOEL応答)は、表1の類似バックグラウンドCOEL応答の約50倍ほど低かった。

【0033】

10

20

30

40

50

【表1】

ルミノール濃度の関数とした COEL 応答	
[ルミノール]/mol l ⁻¹	COEL/au
0	7563
1.0 × 10 ⁻¹¹	7490
1.0 × 10 ⁻¹⁰	15839
1.0 × 10 ⁻⁹	58352
1.0 × 10 ⁻⁸	363900
1.0 × 10 ⁻⁷	2381000

10

20

【0034】

実施例2

Ru(bpy)₃²⁺ の非接触型電気発生ルミネセンス

試料溶液は、次の成分、pH 7.2 に調整した、1.12 × 10⁻¹ M のリン酸二水素カリウムと 8.80 × 10⁻² M のリン酸水素二カリウムとからなる緩衝液、1.0 × 10⁻¹ M のトリプロピルアミン、7.1 × 10⁻² M のアジ化ナトリウム、及びさまざまな量のトリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)(Ru(bpy)₃²⁺)で調製した。非接触型電気発生ルミネセンス(COEL)は、直径 5.0 mm の球状の金導電体(Au導電体)(金の真空蒸着薄膜で被覆したガラス球)の表面で、次のように生じた。振幅 60 V、継続時間 0.4 ms と、その間に 0 レベル、10 ms とがある励起パルスを供電用電極に印加し、その結果、試料溶液中に約 50 mA のピーク電流を生じた。Au導電体から得られる発光(COEL 応答)は、光電子倍増管で検出した。500 回の励起パルスからの総 COEL 応答を、試料溶液中の Ru(bpy)₃²⁺ 濃度の関数として、表2および図3に示した。バックグラウンド COEL 応答(サンプルセル内の Au導電体なしでの COEL 応答)は、表2の類似バックグラウンド COEL 応答の約 50 倍ほど低かった。

30

【0035】

【表2】

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の濃度の関数とした COEL 応答

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] / \text{mol l}^{-1}$	COEL/au
0	853
1.0×10^{-8}	11025
1.0×10^{-7}	131540
1.0×10^{-6}	942059
1.0×10^{-5}	6715220

10

【0036】

実施例3

テルビウム(III)-1の非接触型電気発生ルミネンス

試料溶液は、次の成分、pH 7.8 に調整された 5.0×10^{-1} M のホウ酸塩緩衝液、 7.1×10^{-2} M のアジ化ナトリウム、及びさまざまな量のテルビウム(III)-1キレートで調製された。ここで1とは、2,6-ビス[N,N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]-4-ベンゾイルフェノールのことである。COELは、直径 6.3 mm の球状アルミニウム導電体 (A1導電体) (AbbotBall社製) の表面で、次のように発光した。振幅 60 V、継続時間 0.4 ms と、その間に 0 レベル、100 ms とがある励起パルスが、供電用電極に印加され、その結果、試料溶液中に約 50 mA のピーク電流を生じた。A1導電体から得られる発光 (COEL応答) は、0.4 ms 励起パルスの終わりから 0.08 ~ 8.0 ms の間に光電子倍増管で検出した (遅延 COEL 応答、略して DCOEL 応答)。500 回の励起パルスからの総 DCOEL 応答を、試料溶液中のテルビウム(III) 濃度の関数として、表3および図4に示した。バックグラウンド DCOEL 応答 (サンプルセル内の A1導電体なしでの DCOEL 応答) は、表3に示した類似バックグラウンド COEL 応答の約 500 倍ほど低かった。

20

【0037】

【表3】

テルビウム(III)-1濃度の関数とした DCOEL 応答

$[\text{Tb(III)-1}] / \text{mol l}^{-1}$	DCOEL/au
0	10054
1.0×10^{-9}	46499
1.0×10^{-8}	337576
1.0×10^{-7}	4001260

30

【0038】

実施例4

非接触型電気発生ルミネンスによる、ヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)のイムノアッセイ

A. 標識化合物の調製

4-(3-イソチオシアナトベンゾイル)-2,6-ビス[N,N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]フェノールが配位しているテルビウム(III)錯体を標識化合物として用いた。この化合物は、J. Kankareらの、Anal. Chem. Acta, 266, 205(1992)に公開

40

50

されているように合成した。この論文は、参照してここに組み込まれる。

【0039】

B. 抗hTSHのIgGへの標識

60倍過剰の4-(3-イソチオシアナトベンゾイル)-2,6-ビス[N,N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]フェノールテルビウム(III)錯体は、pH9.5で、抗hTSH IgG(フィンランド KauniainenのOy Medix Biochemica Ab社製)と一晩反応させた。標識抗体は、セファデックスG-50(1.0×5.5cm)、セファロース6B(1.0×5.2cm)を充填したカラムで、過剰な遊離したテルビウム(III)錯体と分離した。そのとき、pH9.3の1.0×10⁻¹M炭酸ナトリウム緩衝液に、抽出剤として塩化ナトリウム9g l⁻¹と0.05%のアゾ化ナトリウムを含有するものを用いて分離された。 10

【0040】

C. アルミニウム導電体の被覆

直径6.3mmのA1導電体(AbbotBall社製)は、塩化ナトリウム9g l⁻¹と0.05%のアゾ化ナトリウムを含んでいるpH7.5に調整した5.0×10⁻²Mのトリス塩酸緩衝液を用いて、物理吸着により抗hTSHのIgGで被覆した。反応混合物は、常温で一晩放置する。被覆後、A1導電体は塩化ナトリウム9g l⁻¹、0.01%のアゾ化ナトリウム、0.2g l⁻¹のツイン(Tween)を含む溶液で洗浄し、0.1%のBSA(ウシの血清アルブミン)で一晩浸し、4、液中で保存した。 20

【0041】

D. hTSHのイムノアッセイ

hTSHの適当な標準含有量が0, 1, 10, 100, 1000 μU ml⁻¹である100 μlのアリコート(aliquot)(フィンランド、EspooのOrion Diagnostica社製)を、300ml試験管に加え、その後テルビウム(III)で標識された抗hTSH溶液14.5mlを加えた。ここでは、そのテルビウム(III)で標識された抗hTSHの23.4ml⁻¹が、pH7.8に調整された5.0×10⁻²Mのトリス硫酸緩衝液5.064mlへ、さらに塩化ナトリウム9g l⁻¹、BSA5g l⁻¹、アゾ化ナトリウム0.5g l⁻¹、ウシ-グロブリン0.5g l⁻¹、ツイン20(Tween 20)0.1g l⁻¹、DTPA(ジエチレントリアミンペンタ酢酸)7.9mg l⁻¹を含ませている液に溶解されていた。被膜され、洗浄されたA1導電体は前述の試験管内に入れられた。連続攪拌しながら1時間インキュベーションした後、A1導電体は、pH7.4に調整された5.0×10⁻²Mのトリス塩酸緩衝液400mlへ、さらにアゾ化ナトリウム0.05%、BSA0.2%、ツイン(Tween)0.1%を含ませている液で、2分間2回洗浄した。A1導電体は、pH7.8に調整した5.0×10⁻²Mのホウ酸-硫酸緩衝液と、5.0×10⁻²Mのアゾ化ナトリウムとを含んでいるCOELセルに移した。 30 DCOEL応答は、実施例3の手順に従って測定され、その結果を表4および図5に示す。

【0042】

【表4】

非接触型電気発生ルミネセンスによる <i>hTSH</i> のイムノアッセイ	
<i>hTSH</i> /μU ml ⁻¹	DCOEL/au
0	471
1	650
10	1070
100	4380
1000	13620

【0043】

実施例5非接触型電気発生ルミネセンスによる多重成分分析

試料溶液は、次の成分、pH 7.8に調整された 5.0×10^{-1} Mのホウ酸塩緩衝液、 3.0×10^{-3} Mのペルオキシ二硫酸、 1.0×10^{-3} Mのツイン(Tween) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタン-ラウリン酸塩)、及びさまざまな量の Ru(bpy)₃²⁺ および Tb(III)-1 キレートで調製した。COELは、直径6.3mmの球状アルミニウム導電体 (A1導電体) (AbbotBall社製) の表面で、次のように発光させた。

継続時間0.4msで電圧60Vと、その間に0レベル、100msとがある励起パルスを、供電用電極に印加し、その結果、試料溶液中に約50mAの電流を生じた。A1導電体から得られる発光は、励起パルスの間(すなわちCOEL応答)と、励起パルスの終わりから0.08~8.0msの間(すなわち遅延COEL応答、即ちDCOEL応答)とで光電子倍増管で検出した。500回の励起パルスからの総COEL応答および総DCOEL応答を表5および図6に示した。DCOEL応答は、試料中のTb(III)-1の定量に用いることができる。それは、Ru(bpy)₃²⁺のCOELは、あまりに短寿命なので、0.08~8.0msの検出窓に到達しないからである。表に記載したCOEL応答(観測されたCOEL応答からDCOEL応答より見積もられたTb(III)-1のCOEL応答を減じたもの)はRu(bpy)₃²⁺を定量するのに用いることができる。

【0044】

【表5】

Tb(III)-1及びRu(bpy) ₃ ²⁺ の濃度の 関数とした COEL および DCOEL 応答		
[Tb(III)-1 + [Ru(bpy) ₃ ²⁺]/mol ⁻¹]	Ru(bpy) ₃ ²⁺ のCOEL/au	Tb(III)-1のDCOEL/au
$1.0 \times 10^{-8} + 1.0 \times 10^{-6}$	335772	36377
$1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-6}$	382782	317303
$1.0 \times 10^{-6} + 1.0 \times 10^{-6}$	1383670	2933600
$1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7}$	34376	377757
$1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-6}$	382782	317303
$1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-5}$	1697352	395255

【0045】

実施例6

10

20

30

40

50

寸法選択性の非接触型電気発生ルミネセンス

試料溶液は、次の成分、pH 7.2に調整された、 1.12×10^{-1} Mのリン酸二水素カリウムと 8.80×10^{-2} Mのリン酸水素二カリウムとからなる緩衝液、 1.0×10^{-1} Mのトリプロピルアミン、 7.1×10^{-2} Mのアジ化ナトリウム、および 1.0×10^{-8} Mのトリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)で調製した。試料溶液中で0Vから20Vまでの直流励起電圧を、掃引速度 0.25 V s^{-1} で供電用電極に印加すると、COELは、表6に記載されている直径の球状の金導電体(Au導電体)(すなわち金の真空蒸着薄膜で被覆したガラス球)の表面で別々に発光した。異なるAu導電体からの $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ のCOEL応答の結果は、光電子倍増管によって検出され、その結果を図7に図示する(2mm(---)、2.5mm(....)、3.5mm(- - -)、6.0mm(----)である)。異なるAu導電体を用いた場合の、ピーク電圧と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ のCOEL強度とを表6に示す。

【0046】

【表6】

異なるAu導電体を用いて確認された電気ルミノグラムにおける $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ COELのピーク電圧およびピーク強度		
Au導電体の直径 / mm	ピーク電圧 / V	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の COEL / au
2.0	14.0	4600
2.5	10.5	10600
3.5	8.9	46300
6.0	5.7	157000

【図面の簡単な説明】

【図1】 1つの導電物質を備えた、非接触型電気発生ルミネセンス測定装置のプロック図である。

【図2】 非接触型電気発生ルミネセンス法で測定して、ルミノール濃度の関数としてルミネセンスをプロットしたグラフである。

【図3】 非接触型電気発生ルミネセンス法で測定して、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度の関数としてルミネセンスをプロットしたグラフである。

【図4】 遅延非接触型電気発生ルミネセンス法で測定して、テルビウム(III)濃度の関数としてルミネセンスをプロットしたグラフである。

【図5】 遅延非接触型電気発生ルミネセンス法で測定して、ヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)濃度の関数としてルミネセンスをプロットしたグラフである。

【図6】 サンプル混合物中のテルビウム(III)(---)、及び $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (-)の濃度を、おのおの非接触型、および遅延非接触型電気発生ルミネセンス法で測定してプロットしたグラフである。

【図7】 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の複数の電気ルミノグラムであり、金の球状導電体の直径を変えることによりルミネセンスに与える影響を示している。直径は、2mm(---)、2.5mm(....)、3.5mm(- - -)、6.0mm(----)である。

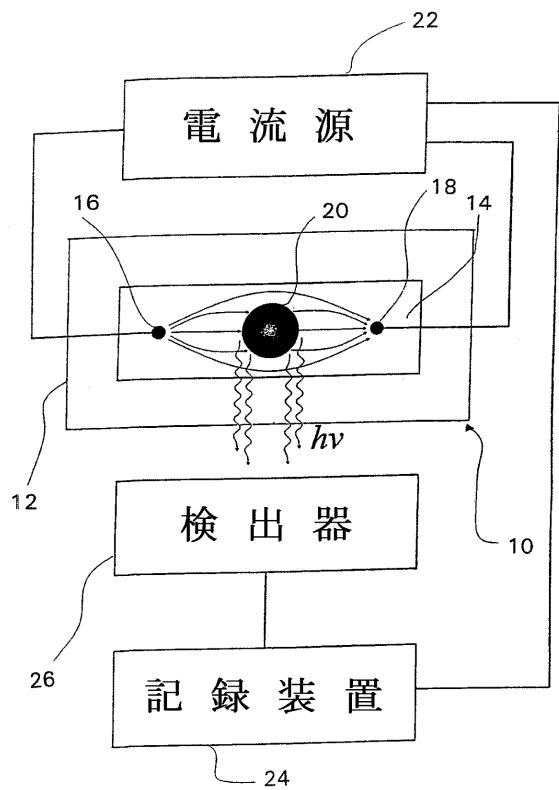
10

20

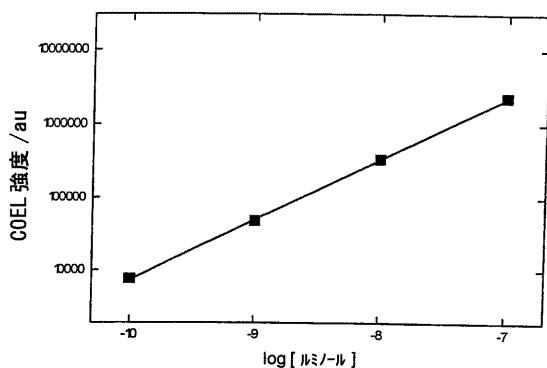
30

40

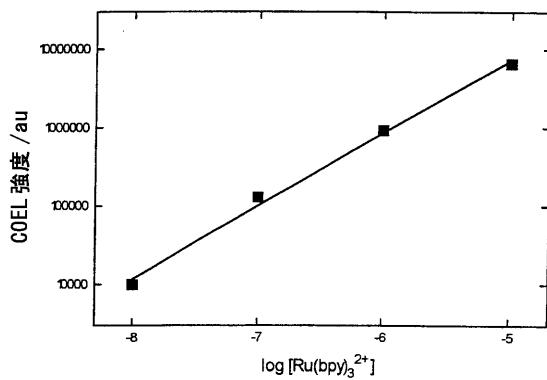
【図1】



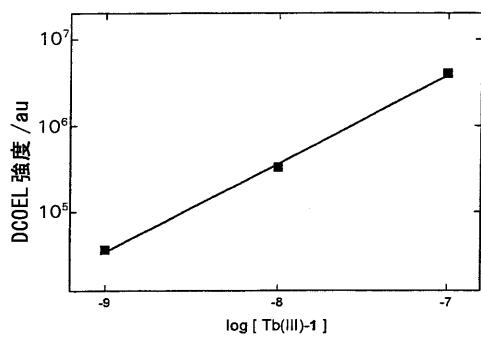
【図2】



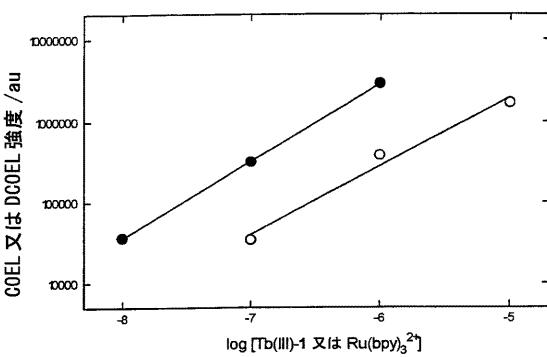
【図3】



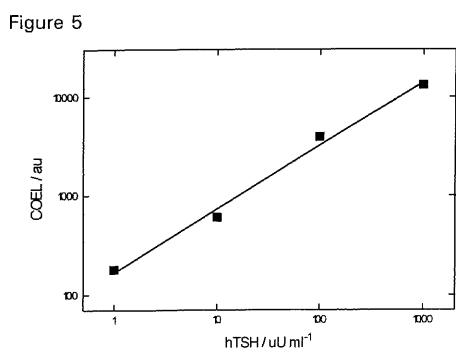
【図4】



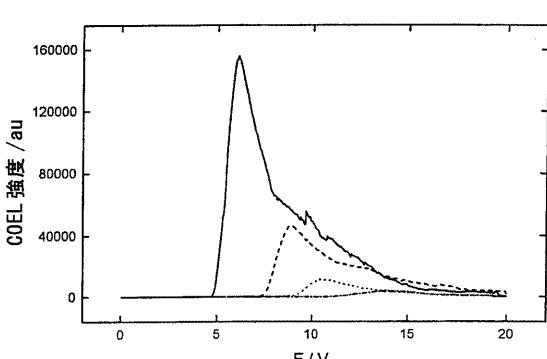
【図6】



【図5】



【図7】



フロントページの続き

- (72)発明者 ケイヨ・ハーパッカ
　　フィンランド、エフィーエン - 21290ルスコ、ハラッカハーンティエ17番
- (72)発明者 ペンッティ・ユハラ
　　フィンランド、エフィーエン - 21620クーシスト、ヴオラハティ
- (72)発明者 ヨウコ・カンカレ
　　フィンランド、エフィーエン - 20610トゥルク、バルヤスペー8エー番
- (72)発明者 サカリ・クルマラ
　　フィンランド、エフィーエン - 02400キルッコヌンミ、アームルスコンクヤ11番
- (72)発明者 ライネル・ケッピ
　　フィンランド、エフィーエン - 20750トゥルク、ラーティミエヘンポルク12アー番
- (72)発明者 カリ・ロイカス
　　フィンランド、エフィーエン - 21260ライシオ、ボルスメエンティエ31番
- (72)発明者 マウリ・ナウマ
　　フィンランド、エフィーエン - 21200ライシオ、ハカペッロンカトウ1番、ア-6
- (72)発明者 ユルキ・ピヒラヤ
　　フィンランド、エフィーエン - 21530パイミオ、ユントランティエ341番
- (72)発明者 ティモ・ステラ
　　フィンランド、エフィーエン - 20300トゥルク、ポホヨランカトウ2デー番
- (72)発明者 ライリ・ヴァツリ
　　フィンランド、エフィーエン - 20900トゥルク、ヘッピレンティエ98番

審査官 廣田 健介

- (56)参考文献 特開平05-079989(JP, A)
　　特表平04-502964(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/75-21/83
G01N 27/416
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)