(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3580821号
(P3580821)
(45)発行日　平成16年10月27日(2004.10.27)　(24)登録日　平成16年7月30日(2004.7.30)

(51)Int.Cl.[7]　F I
G01N 21/75　G01N 21/75　Z
G01N 33/58　G01N 33/58

請求項の数 14　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平7-521284
(86)(22)出願日　平成7年2月6日(1995.2.6)
(65)公表番号　特表平9-509253
(43)公表日　平成9年9月16日(1997.9.16)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/001527
(87)国際公開番号　WO1995/022059
(87)国際公開日　平成7年8月17日(1995.8.17)
審査請求日　平成14年1月16日(2002.1.16)
(31)優先権主張番号　08/196,536
(32)優先日　平成6年2月15日(1994.2.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
アボツト・ラボラトリーズ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４－３５００、アボツト・パーク、アボツト・パーク・ロード・１００、チヤド・０３７７／エイ・ピー・６・デイ－２
(74)代理人
弁理士　川口　義雄
(74)代理人
弁理士　中村　至
(74)代理人
弁理士　船山　武
(74)代理人
弁理士　伏見　直哉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アクリジニウムの微粒子への標識方法および計器における用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）微粒子をタンパク質化合物で被覆し；および
（ｂ）該タンパク質化合物に10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミドトリフルオロメタンスルホン酸塩を結合する
工程を含む、活性化アクリジニウム微粒子の製造法。
【請求項２】
タンパク質化合物が牛血清アルブミンであることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
さらに、
（ｃ）該10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を活性化する工程を含むことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
活性化工程（ｃ）が
（ｉ）該10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩にＮ－ヒドロキシスクシンイミド溶液を添加し；および
（ii）該10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミドトリフルオロメタンスルホン酸塩に１－エチル－３－カルボジイミド溶液

を添加する
工程を含むことを特徴とする請求項３に記載の方法。
【請求項５】
結合工程（ｂ）が
（ｉ）該被覆微粒子を接合体緩衝液に添加し；および
（ii）該10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を該接合体緩衝液および該被覆微粒子に添加する
工程を含むことを特徴とする請求項３に記載の方法。
【請求項６】
結合工程（ｂ）が
（ｉ）該被覆微粒子を接合体緩衝液に添加し；および
（ii）該10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を該接合体緩衝液および該被覆微粒子に添加する
工程を含むことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項７】
（ａ）微粒子をビオチニル化タンパク質化合物で被覆し；および
（ｂ）該微粒子を抗－ビオチンで標識した10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩と反応させる工程を含む、活性化アクリジニウム微粒子の製造法。
【請求項８】
反応工程（ｂ）が
（ｉ）該ビオチニル化タンパク質化合物で被覆した該微粒子を10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗－ビオチンに懸濁する
工程を含むことを特徴とする請求項７に記載の方法。
【請求項９】
反応工程が
（ｉ）　該ビオチニル化タンパク質化合物で被覆した該微粒子を10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗－ビオチンに懸濁する
工程を含むことを特徴とする請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
請求項１の方法による活性化アクリジニウム微粒子物質。
【請求項１１】
（ａ）微粒子をタンパク質化合物で被覆し；
（ｂ）該タンパク質化合物に10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を結合し；
（ｃ）該10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を活性化して活性化アクリジニウム微粒子を得；および
（ｄ）該活性化アクリジニウム微粒子をテストで使用する
工程を含む、分析計器上でテストを行なう方法。
【請求項１２】
（ａ）微粒子をビオチニル化タンパク質化合物で被覆し；
（ｂ）該微粒子を10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗－ビオチンと反応させ；および
（ｃ）該微粒子をテストで使用する

工程を含む、化学発光に基づく分析計器上でテストを行なう方法。
【請求項１３】
（ａ）タンパク質化合物で被覆した微粒子；および
（ｂ）微粒子上のタンパク質化合物に結合した10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩
を含む、分析計器で使用するためのテスト要素。
【請求項１４】
（ａ）ビオチニル化タンパク質化合物で被覆した微粒子；および
（ｂ）微粒子と反応させた10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗－ビオチン
を含む、分析計器で使用するためのテスト要素。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
本発明は、化学アッセイおよび測定を行なうための装置に使用する方法ならびに化合物に関し、特に、化学および生化学溶液に関する定量および定性テストを行なう計器などの化学アッセイを行なう際に使用する計器での、化学発光に基づくテストのための方法および化合物に関する。
種々のアッセイ方法および化合物が化学および生化学混合物の定量および定性分析に使用されている。いくつかの場合、それらの定量および定性分析は計器によって行なわれる。分析に使用されるある種の方法および化合物は、それらの分析に使用する計器のテストに有用である。そのようなテストは、例えば、変換効率、計器の検定、膜穴の大きさの測定などに関する。計器に関するこれらのテストに使用される多くの方法および化合物が知られている。しかし、新規方法および化合物ならびに既存の方法および化合物の改良が開発されつつある。
計器に関するテストなどのある種の分析用途に使用される一つの化学的性質は、「化学発光」と呼ばれる。化学発光は化学反応の結果としての光の放出である。化学発光は、化学反応物質が励起され、光を放出すると生じる。
化学発光を生じる典型的な化学反応において、その反応工程は、化学エネルギーが電子励起エネルギーに変換する化学励起工程（単分子でも二分子でもよい）である。その反応では、生成物分子が化学エネルギーを受け取り、それを励起した電子状態に変える。この電子的に励起した生成物分子は、次いで、反応条件下で光を生じ、すなわち発光する。
化学発光の測定を自動化する試みが成されている。そのうちのいくつかは、種々の計器、例えば、透明な微量滴定プレートでの反応から生じる化学発光シグナルを記録するための写真フィルムおよび濃度計の使用などを伴っている。
正確で望ましい結果を得るために、その系に関する測定および他の分析を周期的に行なってもよい。これらの分析は、関与する系の状態を示すと考えられる。
例えば、化学発光は、化学発光特性によって測定または観察されるアッセイを行なうために使用される計器の変換効率および／または他の面の測定に有用である。これらに関する低い許容度に適合できる計器は、比較的高い変換効率を有するものである。変換に対する正確な成分測定値を与えない計器は、比較的低い変換効率を有する。いくつかの分析計器では、正確なテストを行なうために、変換効率（すなわち、計器の固有の正確さおよび不正確さ）を知ることが望ましい。
アッセイおよび他のテストを行って計器の正確さなどを測定するために使用する計器に関し、ある種のテストを行なうことが知られている。そのようなテストを行なうための公知方法は、既知組成物および特性の標準的サンプルに対して特定のアッセイを行なう。標準的サンプルの組成物および特性は知られているので、そのサンプルに関して行なわれるアッセイおよびテストの結果は、計器が正確に働くならば、予想される結果を生じるはずである。もし、予想される結果が得られないならば、使用している計器の不正確さが示されると考えられる。

使用する計器に関して特定のテストを行なうことは知られている。計器のそのようなテストでは、アクリジニウム活性化粒子を標準サンプルとして使用することができる。アクリジニウムは、アルカリ性過酸化物と反応すると、光発生反応を生じる。化学発光に基づく計器のテストに使用される、現在利用されているアクリジニウム活性化粒子には、いくつかの欠点がある。そのような欠点の一つは、これらの粒子の製造法に関与する。この従来の方法では、ラテックス粒子を、受動吸着を使用して抗－HBsAg標識したアクリジニウムで被覆する。次いで、活性化アクリジニウムが粒子表面に受動的に吸着される。

公知方法によって得られる活性化アクリジニウム微粒子物質は、化学発光に基づく計器のテストでの使用には不利であると考えられる。粒子の光放出プロフィールは、化学発光に基づくイムノアッセイの実際の光放出プロフィールと十分一致する、あるいは密接に似ているとは言えない。テスト用標準サンプルが、未知サンプルをテストしたときの未知サンプルと実質的に同様に作用するのが望ましい。しかし、これは、いつも当てはまるとは限らない。現在利用されている活性化アクリジニウム微粒子物質の光放出における相違の考えられる理由としては、アクリジニウムを存在させることにより引き起こされる立体障害の影響が挙げられる。

発明の要旨

本発明の態様では、活性化アクリジニウム微粒子の多数の製造法および該微粒子を計器で使用する方法を提供する。一つの態様によれば、活性化アクリジニウム微粒子の製造法が、微粒子をタンパク質化合物で被覆し、そのタンパク質化合物に10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を結合することを含む。

本発明の別の態様によれば、活性化アクリジニウム微粒子の別の製造法は、微粒子をビオチニル化タンパク質化合物で被覆することを含む。次いで、この微粒子を10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシイミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗ビオチンと反応させる。

本発明のさらに別の態様によれば、分析計器のテスト法が提供される。微粒子をタンパク質化合物で被覆する。そのタンパク質化合物に10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を結合させる。10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を活性化して、活性化アクリジニウム微粒子を得る。あるいは、微粒子にビオチニル化タンパク質化合物を被覆することにより、微粒子を作る。その微粒子を、10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシイミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗ビオチンと反応させる。こうして得られた微粒子は、計器のテストに使用することができる。テストでは、変換効率を測定または推定したり、計器の光学系を検定したり、膜穴の大きさを測定したりすることができる。計器は、化学発光に基づく装置であってもよい。

本発明のさらに別の態様では、分析計器で使用するためのテスト要素を提供する。該テスト要素は、タンパク質化合物で被覆した微粒子を含む。次いで、10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩を微粒子上のタンパク質化合物に結合させる。あるいは、微粒子をビオチニル化タンパク質化合物で被覆する。次いで、10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシイミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩で標識した抗ビオチンをその微粒子と反応させる。

【図面の簡単な説明】

図１は、直接共有結合による活性化アクリジニウム微粒子の製造法の流れ図である。

図２は、親和性様式による活性化アクリジニウム微粒子の製造法の流れ図である。

図3A～Ｃは、各々、2.3μｍおよび4.0μｍの親和性様式により標識した活性化アクリジニウム微粒子の走査電子顕微鏡写真を描写した図である。

図4A～Ｃは、各々、3.5μｍおよび6.0μｍの親和性様式により標識した活性化アクリジニ

ウム微粒子の走査電子顕微鏡写真を描写した図である。
図５は、光子カウント情報を検出するための、マイクロコンピューターに基づく自動データ収集システムを含む、ミリ秒読システムの簡単なブロック図である。
図６は、共有的に結合した（約0.002%）2.5μmのビオチニル化ラテックス粒子上の抗－ビオチンアクリジニウム接合体の濃度を変えたときの減衰率を示す化学発光による光放出プロフィールである。
図7Aは、HBsAgアッセイに対する光放出プロフィールである。
図7Bは、2.5μm親和性様式により標識した活性化アクリジニウム微粒子の光放出プロフィールである。
図7Cは、親和性様式により標識した活性化アクリジニウム微粒子の光放出プロフィールと抗－HBsAgで標識した微粒子の光放出プロフィールとの比較を示す図である。
図８は、（約0.001%）2.5μmの親和性様式により標識した微粒子上のアクリジニウムの濃度を変えることの影響を示す化学発光による光放出プロフィールである。
図９は、（約0.002%）2.5μm、3.6μm、4.5μmおよび6.0μmの親和性様式により標識した微粒子の化学発光による光放出プロフィールである。
図10は、計器の光学系の検定における、種々の希釈度の4.5μmの活性化アクリジニウム微粒子の使用を示す。
図11は、（約0.1%）4.5μmの親和性様式により活性化したアクリジニウム微粒子の約２～８℃での安定性を示す。
図12は、５μmの親和性様式により活性化したアクリジニウム微粒子の約45℃での安定性を、抗－HBsAgで被覆した活性アクリジニウム微粒子の安定性と比較して示す。
図13は、分析計器上で孔の大きさを測定する際の種々の活性化アクリジニウム微粒子の使用を示す。
図14は、親和性様式により標識した微粒子と抗－HBsAgで標識した微粒子との間の推定変換効率を比較する表である。

好ましい態様の詳細な説明

以下に、イムノアッセイを行なう際に使用する自動計測運転および装置に関し、化学発光に基づく測定用の化合物の製造法ならびに化合物について記載する。これらの方法に従って作られる微粒子は、所望のテストを行なうのに適した種々の計器で使用することができる。
本発明の態様を表す活性化アクリジニウム微粒子の二つの製造法を開示する。一方を、本明細書では「直接共有結合」と言う。直接共有結合では、活性化メチルアクリジニウムを共有結合によって牛血清アルブミン（BSA）を被覆した微粒子に直接結合する。第二の方法は、本明細書では「親和性様式」と言う。親和性様式では、メチルアクリジニウム標識抗ビオチンを反応させて、ビオチニル化BSA被覆微粒子との接合体を得る。これらの二つの方法に対する特定の方法を以下に述べる。典型的な態様では、微粒子が、ラテックス、ポリスチレンなどの適切なポリマーから成る。なお、これらの方法の変形も可能である。ここに記載する工程は、適切な順序で行なうことができ、一つの方法の工程を別の方法の工程と組み合わせてもよい。
ここで図１を参照して、活性化アクリジニウム微粒子を製造するための直接共有結合法の流れ図を説明する。一般に、この態様における直接共有結合法は３工程を含む。第一工程（詳細には示していない）は活性化工程であり、10－メチル－Ｎ－トシル－Ｎ－（２－カルボキシエチル）－９－アクリジニウムカルボキシミド　トリフルオロメタンスルホン酸塩（ここでは「メチルアクリジニウム」と略称する）を活性化する。第二工程の被覆工程22では、微粒子２をBSA4で被覆する。最後に、第三工程の結合工程23では、微粒子６の表面上に被覆したBSAのアミノ基を、活性化メチルアクリジニウム８に共有的に結合させる。
第一の（すなわち活性化の）工程は、約510μｌのＮ－ヒドロキシスクシンイミド溶液（約10mg/1.74mlジメチルホルムアミド）および約510μｌの１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDAC）（約10mg/1.31mlジメチルホルムアミド）を、約1

.04mlのジメチルホルムアミド（DMF）中に約10mgのメチルアクリジニウムを含む溶液に添加することにより開始する。この混合物を、光のない状態で約12～約16時間、室温で攪拌する。活性化は、薄層クロマトグラフィーを使用してモニターする。活性化物質６が得られたら、その物質を精製することなく使用してタンパク質に結合させる。

図１への参照を続けると、被覆工程22は、ポリスチレン粒子（例えば、2.5μm、Spherotech、1ml、５％w/v）などの粒子２の遠心分離によって開始する。粒子２を約11,000×ｇで約５分間遠心分離し、上清を捨てる。遠心分離後、充填した粒子２を、約0.01Mのリン酸ナトリウム、約0.15Mの塩化ナトリウム（pH約7.2）である約1mlのリン酸塩緩衝生理的食塩水（PBS）に再懸濁し、遠心分離工程を繰り返す。他の緩衝液を使用することもできる。この２回目の遠心分離工程で得た充填粒子２を次いで、約1mlのBSA溶液４（PBSに約2mg/ml）に再懸濁し、混合物を室温で約16時間、攪拌する。攪拌して得られた懸濁物を次いで、約11,000×ｇで約５分間、遠心分離し、上清を捨てる。この攪拌により得られた粒子を次いで洗浄（好ましくは３回）する。各洗浄は、遠心分離および再懸濁により、約1mlのPBSを使用して行なう。得られたBSA被覆粒子６を次いで約5mlのPBSに再懸濁すると、約１％w/vの懸濁物が得られる。

さらに図１を参照すると、結合工程23では、被覆工程22から得られたBSA被覆粒子６（例えば、典型的態様では、0.5ml、１％w/v）を、約72μｌの接合緩衝液（約0.1％CHAPSを有する、pHが約6.3の約0.1M　PBS）および活性化工程で得た約15μｌの活性化メチルアクリジニウム８（約5mg/mlDMF）に添加する。次いで、混合物を室温で約30分間、静かに攪拌する。得られた粒子10を次いで、約11,000×ｇで約５分間、遠心分離し、遠心分離により好ましくは３回洗浄した後、第二（即ち被覆）工程と同様に再懸濁する。粒子を約1mlのPBSに再懸濁すると約0.5％w/vの粒子10が得られる。

次に図２を参照して、活性化アクリジニウム微粒子を製造するための、親和性様式法の流れ図を示す。一般に、親和性様式法は２つの工程を含む。第一の工程である被覆工程41は、ビオチニル化BSA12の微粒子２への被覆に関与する。第二の工程である親和性反応工程42は、メチルアクリジニウム標識抗ビオチン16をビオチニル化BSA被覆微粒子14に対してコンジュゲートする、親和性反応を含む。

図２への参照を続け、親和性様式法の二つの工程の各々の詳細を詳しく記載する。第一の被覆工程41において、微粒子２、好ましくはポリスチレン粒子（例えば、約2.5μm、Spherotech、約1mlの５％w/v）を約11,000×ｇで約５分間、遠心分離し、上清を捨てる。その遠心分離により得られた充填粒子２を次いで、約1.5mlのビオチニル化BSA溶液12（例えば、Sigma製、PBS中に約1mg/ml、pHは約7.2）に再懸濁し、その混合物を室温で約20時間攪拌する。攪拌によって得られた懸濁物は次いで、約11,000×ｇで約５分間、遠心分離し、上清を捨てる。この攪拌により得られた粒子は次いで洗浄する（好ましくは３回）。各洗浄は、遠心分離および再懸濁により、約1mlのPBSを使用して行なう。得られたBSA被覆粒子14を次いで、約5mlのPBSに再懸濁すると、約１％w/vの懸濁物が得られる。

さらに図２を参照すると、親和性反応法の親和性反応工程42では、親和性反応法の被覆工程41のビオチニル化BSA被覆粒子14（約1mlの約１％w/v）を、約11,000×ｇで約５分間、遠心分離し、上清を捨てる。遠心分離により得られた充填粒子14は次いで、メチルアクリジニウム16で標識した約1mlの抗－ビオチンに再懸濁する。メチルアクリジニウム16で標識したこの量の抗－ビオチンは、約9.960mlの接合体希釈物に添加した約40μｌの抗－ビオチンアクリジニウム（約250μg/ml、タンパク質濃度、アクリジニウム/IgGは約1.8である）の溶液から得られる。該接合体希釈物は、典型的な態様では、約40％の牛血清、約10％の正常なヒト血漿、約100mMのリン酸塩緩衝液（pH約6.3）および約0.15MのNaClを含む。次いで、メチルアクリジニウム16で標識した抗－ビオチンに再懸濁した充填粒子の混合物を、光のない状態で約16時間、室温で攪拌する。攪拌によって得られた粒子18を約11,000×ｇで約５分間、遠心分離し、遠心分離により好ましくは３回洗浄した後、この親和性反応工程と同様に再懸濁する。活性化アクリジニウム微粒子18を約10mlのPBSに再懸濁すると、約0.1％w/vの粒子が得られる。

次に、図１および２を共に参照すると、直接共有結合法および親和性様式法に従って活性

化アクリジニウム微粒子を製造するための上記で詳述した方法と同様の方法を使用して、種々の大きさ、例えば、約3.5μｍ、4.5μｍ、５μｍ、および６μｍなどの活性化微粒子を製造することができる。さらに、本明細書では、直接共有結合法および親和性様式法の各々に関して特定の方法を記載したけれども、それらの方法は、ただ明確に理解するためのものである。典型的な態様について詳細に記載しているが、特定の方法を本明細書に記載した態様によって保護する際に、種々の変更、追加、改良および代替法が可能であることは、当業者であれば理解される旨を意図するものである。

次に、図3A～Ｃおよび4A～Ｃを参照して、2.3μｍ、4.0μｍ、3.5μｍおよび6.0μｍの活性化アクリジニウム微粒子の走査電子顕微鏡写真、ならびに4.0μｍおよび3.5μｍの粒度分布を追跡するグラフを示す。顕微鏡写真に示される活性化アクリジニウム微粒子は、親和性様式法に従って製造した。図3A～Ｂおよび4A～Ｂに示す顕微鏡写真は、特に、親和性様式法から得られた、各々、2.3μｍ、4.0μｍ、3.5μｍおよび6.0μｍの微粒子18のモノ粒子への高い分散性および一様な大きさを示すために提供する。図3Cおよび4Cは、特に、各々、4.0μｍおよび3.5μｍの活性化アクリジニウム微粒子18の粒度分布を示す。

ここで図５を参照して、親和性様式法に従って作った活性化アクリジニウム微粒子18の性能を測定するための読取システム30を示す。読取システム30は、ミリ秒読取法を使用する。読取システム30は、マイクロコンピューター32に基づく自動データ収集システムを含む。そのシステムには、読取機34などの、光学系によって発生する光子カウント情報を収集することができる電子インターフェースボード40が備えてある。また、インターフェース36は、データ収集サイクルの開始を例えば読取部38での活性剤溶液の分配と同調させるために使用することができる。読取システム30は、約２秒の読取サイクル中に収集される光子カウントの実行和を、約10ミリ秒間隔で行なって記録される一時的収集とともに蓄積する。蓄積されたデータを使用すると、例えば、読取間隔ごとのカウント増分を得ることができ、従って、光放出のプロフィールを例えばオフラインコンピューター端末42で描くことができる。これは、化学発光反応で得られるものと実質的に同じである。図６、7A、7B、８および９は、例えば、約10ミリ秒間隔ごとの事象の数を得るために、約10ミリ秒後の数を削除することにより得ることができる。約10ミリ秒の事象を時間に対してプロットして、速度反応プロフィールを作る。

さらに図５を参照すると、例えば親和性様式法に従って作った活性化アクリジニウム微粒子10、18の性能を評価する方法を理解することができる。この方法は、分析計器上で行なうことができる方法と実質的に同様である。その方法は、一つ以上の反応容器における反応マトリックス上で直接、約50μｌの活性化アクリジニウム微粒子をピペットにより移すことにより開始できる。粒子は次いで、約100μｌの洗浄溶液をマトリックス上で直接ピペットにより移すことにより洗浄することができる。反応容器は次いで、読取部に移すことができる。次いで、読取システム30を使用すると、化学発光による光子のカウントを得ることができる。約85μｌの活性剤溶液を反応トレイマトリックスに分配して化学発光反応を誘発する。次いで、読取システム30から、正味の光子カウントおよび増加した光子カウントを各々得る。正味の光子カウントは、全活性カウントと、例えば約２秒の読取時間にわたって得られたあらかじめ記録したダークカウントとの差である。正味の光子カウントおよび増加した光子カウントは、活性化アクリジニウム微粒子18の性能を評価するための、読取システム30によって確認される化学発光反応との比較に役立つ。

次に、図６を参照して、化学発光による光放出プロフィールを示す。これらの光放出プロフィールは、直接共有結合法に従って作った活性化アクリジニウム微粒子に対して測定した。図６のプロフィールは、共有的に結合した（約0.002％）2.5μｍのビオチニル化微粒子上の抗－ビオチンアクリジニウム接合体の濃度を変えて示す。なお、そのプロフィールは、特に、化学発光による光放出プロフィールの減衰率に関して、濃度に応じて変化する。アクリジニウムの存在によって引き起こされる立体障害の影響は、化学発光反応のプロフィールとは異なる活性化アクリジニウム微粒子の光放出プロフィールを引き起こすと考えられる。

図7Aを参照して、抗－HBsAgアッセイ陽性サンプルに対する化学発光による光放出プロフ

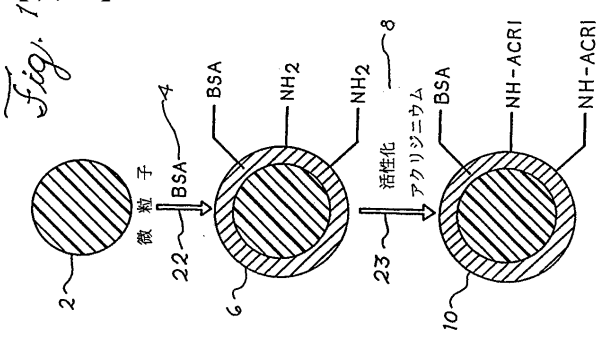
ィールを示す。続いて図7Aおよび7Bを参照すると、化学発光に基づく抗－HBsAgアッセイおよび2.5μｍの親和性様式により標識した活性化アクリジニウム微粒子に対する光放出プロフィールを比較することができる。なお、二つのプロフィールは類似している。
図7Cに注目すると、親和性様式により標識したアクリジニウム微粒子に対する化学発光プロフィールが約1.52秒の減衰時間を有することが分かる。化学発光プロフィールの尾部は指数的減衰に似ているので、約1.52秒の減衰時間の最後の約20～30ミリ秒に含まれるカウントは、化学発光のカウント総数の約0.02％未満である。これに対し、抗－HBsAg被覆微粒子に対する同様のプロフィールは、約２秒を大きく超える減衰時間を有する。同じく約1.52秒の減衰時間の最後の約20～30ミリ秒に含まれるカウントは、化学発光のカウント総数の約１％と多く、すなわち、そのプロフィールは、完全には減衰しなかった。光学検定に対しては、例えば、アクリジニウム活性化微粒子の量を増加させる数（例えば４）を使用することができ、傾斜は、化学発光カウントを使用して、各読取機に対して得ることができる。実際の化学発光プロフィールの時間測定における誤差が約１％であると仮定すると、特定の読取機の傾斜推定における誤差は、抗－HBsAg被覆微粒子に対しては1.2％と大きいと考えられる。同様の条件下において、親和性様式により標識した微粒子に対する読取機の傾斜推定における誤差はほんの約0.023％であることは注目に値する。
次に図８を参照して、別の化学発光による光放出を示す。これらのプロフィールは、活性化アクリジニウム微粒子を親和性様式法に従って作るとき、アクリジニウムの濃度を変えることによる影響を示す。これらの特定のプロフィールは、（約0.001％）2.5μｍの親和性様式により標識した粒子に対するものである。アクリジニウムの存在は、活性化アクリジニウム微粒子の化学発光による光放出プロフィールにあまり影響を及ぼさないことに注目したい。各存在量（すなわち、高、中、低、非常に低い）での光放出プロフィールはほぼ同じである。この理由により、ここに詳細に記載した方法の態様に従って作った粒子により、改善された結果および重要な利点が得られる。
図９を参照して、さらに別の化学発光による光放出プロフィールを示す。これらのプロフィールの各々は、親和性様式法に従って作った活性化アクリジニウム微粒子に対するものである。それらのプロフィールは、ただ種々の大きさの微粒子を化学発光による光放出の測定で使用した点でのみ、異なる。たとえ微粒子の大きさが変わっても、（約0.002％）2.5μｍ、3.6μｍ、4.5μｍおよび6.0μｍ親和性様式活性化アクリジニウム微粒子の各々に対する化学発光プロフィールの類似性に注目したい。活性化アクリジニウム微粒子のこれらの特定の特性は、技術においてかなりの有利性をもたらす。
図10を参照すると、前述したように、本発明の態様は、化学発光に基づく分析計器などの計器の検定に特に有効である。図10において、棒グラフは、4.5μｍの活性化アクリジニウム微粒子の種々の希釈度を使用して、読取システム30の光学検定をなす可能性を示す。
図11および12を参照すると、本発明の態様は、活性化アクリジニウム微粒子の環境的および経時的安定性の利点を提供する。図11は、（約0.1％）4.5μｍの親和性様式活性化アクリジニウム微粒子の約２～８℃での経時的安定性を示す。図12も、活性化アクリジニウム微粒子の環境的および経時的安定性を示す。図12に示すように、４μｍ新和性様式活性化アクリジニウム微粒子の約45℃での経時的安定性を、公知の抗－HBsAg被覆活性化アクリジニウム微粒子と比較する。すでに明らかなように、本発明の態様は、活性化アクリジニウム微粒子の安定性の故に、従来の技術よりもかなり有利であることを示す。
図13に注目すると、上記態様に従って構成した微粒子の利用による分析計器の孔の大きさの測定を調べている。典型的態様において、測定される孔の大きさは、ガラス繊維マトリックスなどの捕獲要素を有するマトリックスセルまたは他の読取容器上に物理的に存在すると考えられる。孔のサイジングに対して2.5μｍおよび3.5μｍの新和性様式により標識したアクリジニウム活性化微粒子の化学発光を使用することの可能性を示す。孔の平均の大きさの増大とともに、化学発光カウントは減少する傾向にあることが認められる。
図14では、新和性様式微粒子および抗－HBsAg微粒子を使用して得られる変換効率の値または推定値が実質的に等価であることを示す。変換効率は、ガラス繊維マトリックスなどの微粒子捕獲要素上で直接分配される約100μｌの約0.0033％活性化微粒子を誘発するこ

とにより得られる化学発光カウントと、反応トレイ上のインキュベーションウェルなどの別個の領域で同量の微粒子を分配することにより得られる化学発光カウントとの比である。典型的態様では、微粒子を、約600μｌの変換溶液を使用して反応ウェルに移し、約85μｌの活性剤溶液で微粒子を誘発させる。

先の記載および説明から明らかなように、本発明の態様は、従来技術における重要な改良である。それらの態様は、ここに記載したように行い、使用すると特に有効であると考えられるが、当業者であれば、記載した態様ならびにそれらの使用および実施において、多数の変更および置き換えを行なうことができることは容易に理解される。それらの変更の各々は、本明細書の記載に含まれるものである。例えば、特定の溶液および化学組成物を開示しているが、他の均等の溶液および組成物も可能である。先の詳細な記載は、従って、明らかに、説明および実施例としてのみ与えられるものであると理解すべきであり、本発明の精神および範囲は、添付する請求の範囲によってのみ限定される。

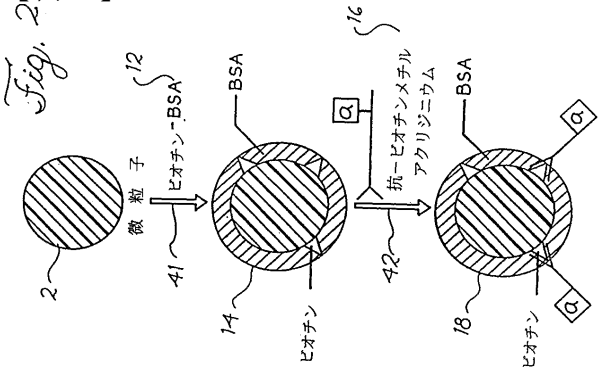
【図１】

Fig. 1



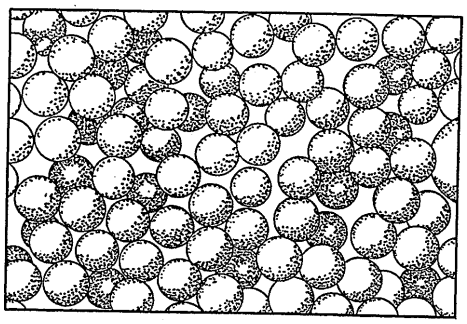
【図２】

Fig. 2



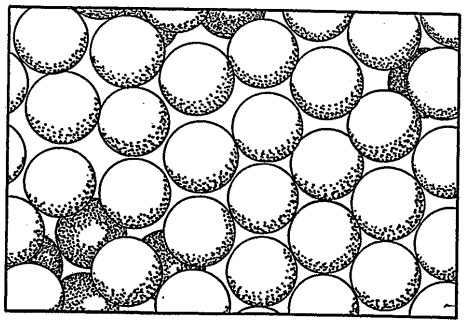
【図３Ａ】

Fig. 3A



【図３Ｂ】

Fig. 3B



【図３Ｃ】

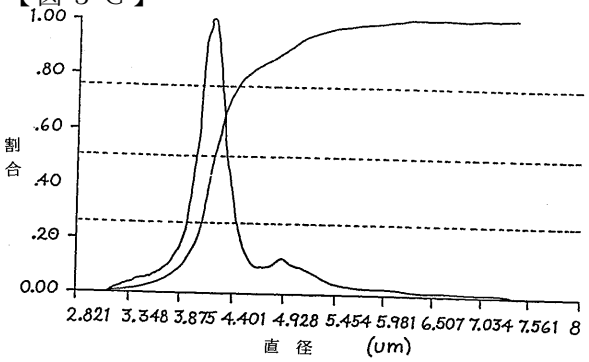


Fig. 3c

【図４Ｃ】

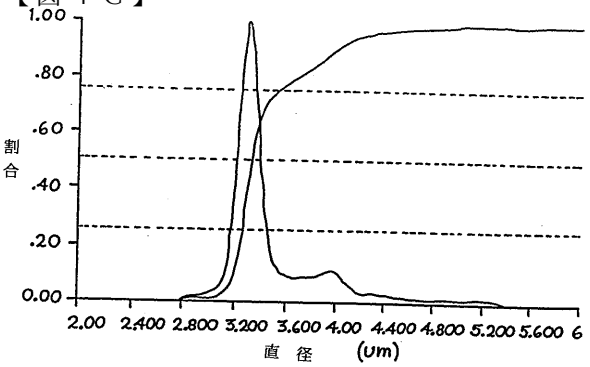


Fig. 4c

【図１１】

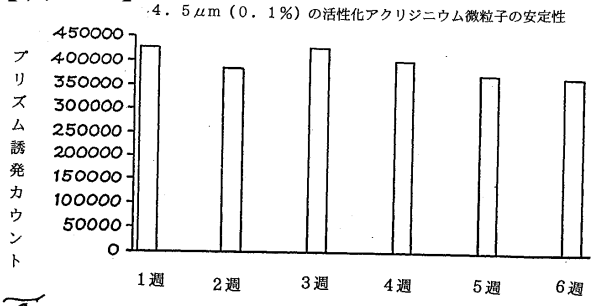
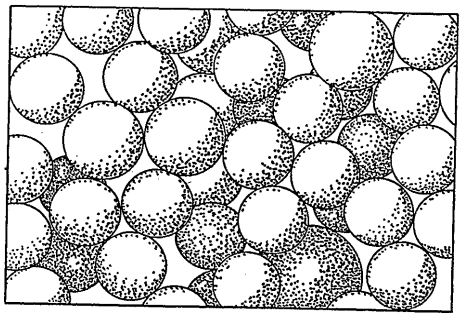


Fig. 11

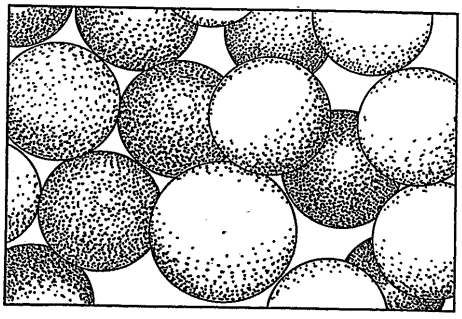
【図４Ａ】

Fig. 4A



【図４Ｂ】

Fig. 4B



【図１０】

4．5μmのアクリジニウム活性化微粒子を使用した光学検定

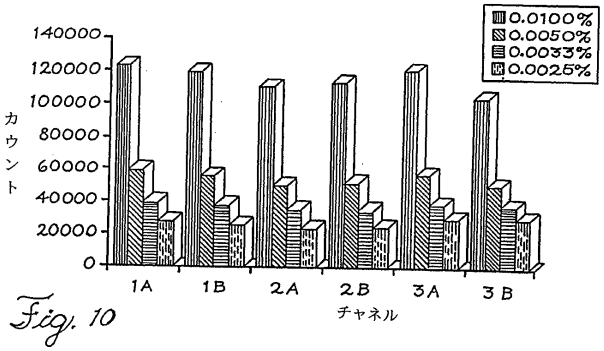


Fig. 10

【図１４】

Fig. 14

親和性様式及び抗－ＨＢｓＡｇにより標識した活性化微粒子の変換効率の比較

	変換交換率_A	変換交換率 _B
親和性様式微粒子	101.50%	102.50%
抗－HBsAg 微粒子	101.00%	102.30%

【図５】

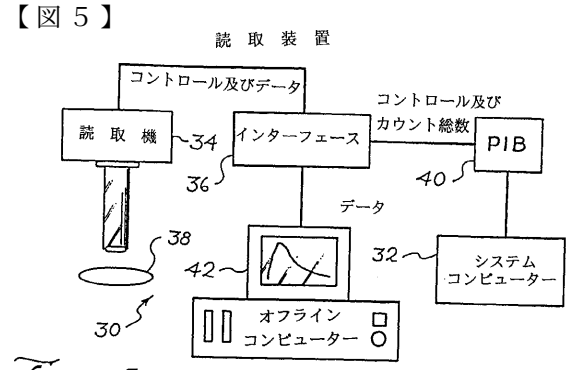
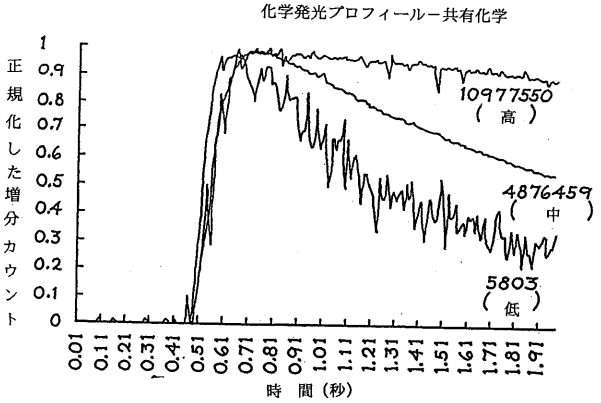


Fig. 5

【図６】

Fig. 6



【図１２】

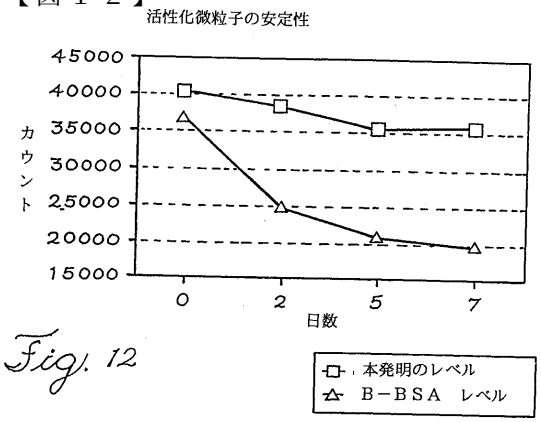


Fig. 12

【図７Ａ】

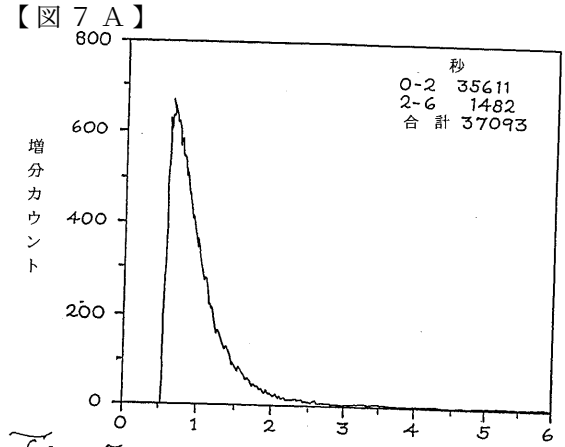
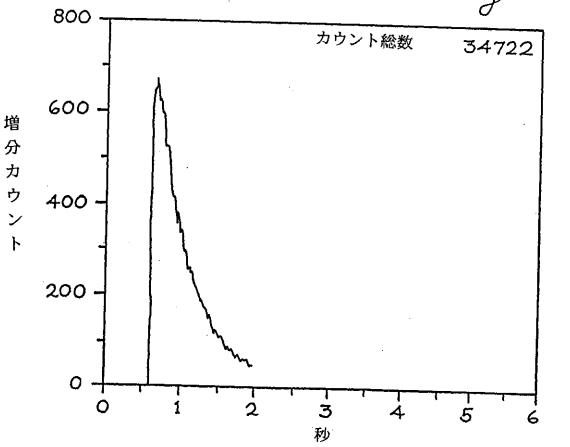


Fig. 7A

【図７Ｂ】

Fig. 7B



【図７Ｃ】

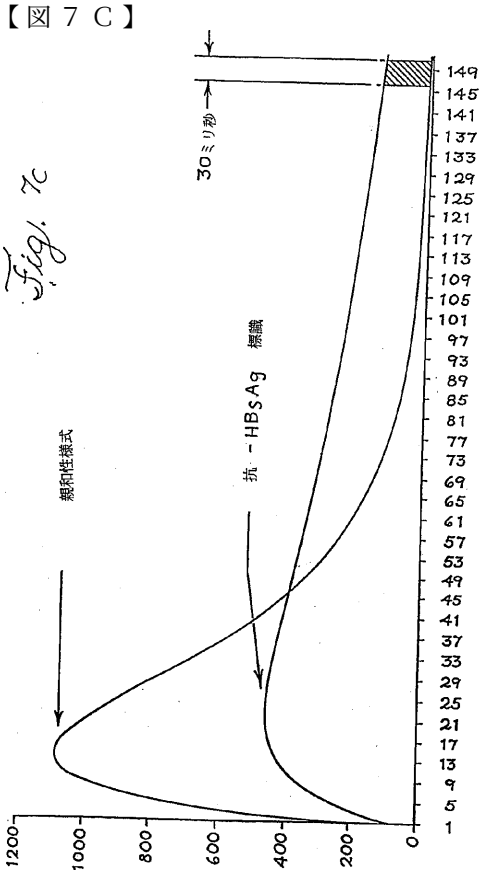


Fig. 7c
30ミリ秒
抗－HBsAg 標識
親和性様式
149
145
141
137
133
129
125
121
117
113
109
105
101
97
93
89
85
81
77
73
69
65
61
57
53
49
45
41
37
33
29
25
21
17
13
9
5
1
1200
1000
800
600
400
200
0

【図８】

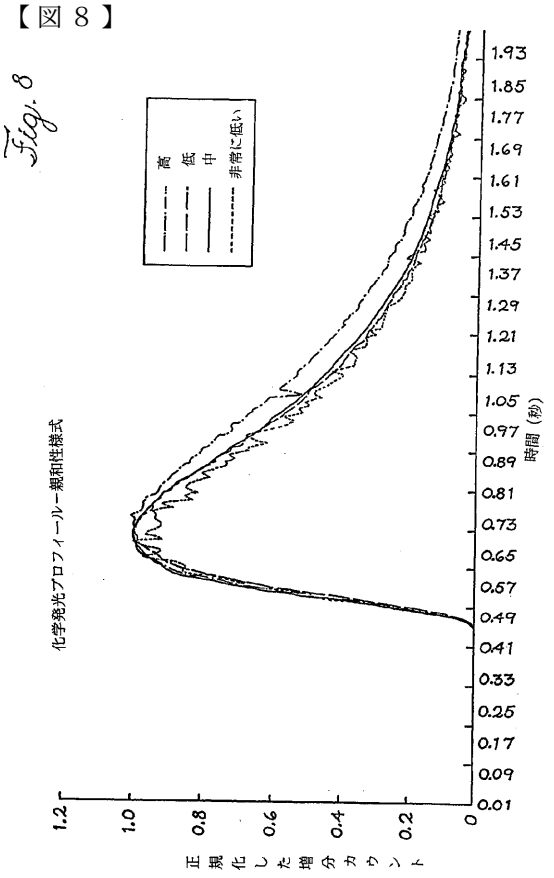


Fig. 8
高
低
中
非常に低い
化学発光プロフィール－親和性様式
時間（秒）
1.93
1.85
1.77
1.69
1.61
1.53
1.45
1.37
1.29
1.21
1.13
1.05
0.97
0.89
0.81
0.73
0.65
0.57
0.49
0.41
0.33
0.25
0.17
0.09
0.01
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
正規化した増分カウント

【図９】

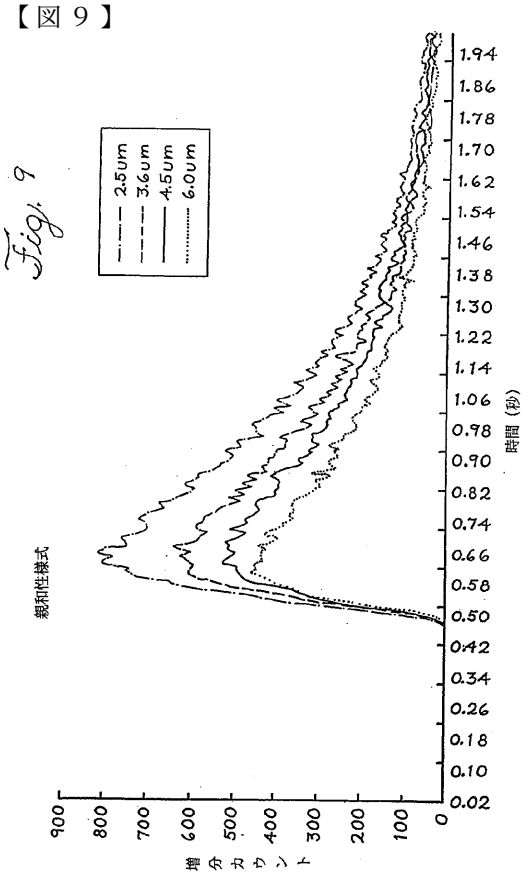
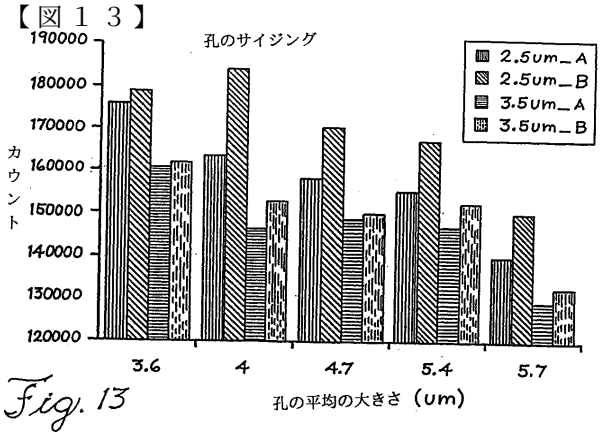


Fig. 9
2.5um
3.6um
4.5um
6.0um
親和性様式
時間（秒）
1.94
1.86
1.78
1.70
1.62
1.54
1.46
1.38
1.30
1.22
1.14
1.06
0.98
0.90
0.82
0.74
0.66
0.58
0.50
0.42
0.34
0.26
0.18
0.10
0.02
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
増分カウント

【図１３】


孔のサイジング
2.5um_A
2.5um_B
3.5um_A
3.5um_B
190000
180000
170000
160000
150000
140000
130000
120000
カウント
3.6
4
4.7
5.4
5.7
孔の平均の大きさ（um）
Fig. 13

フロントページの続き

(72)発明者　シヤー，デイネツシユ・オー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６１、バーノン・ヒルズ、アレクサンドリア・ドライブ・２５５
(72)発明者　チヤンドラ，タラン
アメリカ合衆国、イリノイ・６０００８、ローリング・メドウズ、アーバー・ドライブ・４７２２、ウツドフイールド・ガーデンズ・アパートメント・３１５
(72)発明者　クロスターマン，クルト
アメリカ合衆国、イリノイ・６００３１、ガニー、ベニントン・ドライブ・６９８０

審査官　宮澤　浩

(56)参考文献　特開昭６３－１１２５６４（ＪＰ，Ａ）
米国特許第５１３２２４２（ＵＳ，Ａ）
特開平２－９６５６７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－５７５７２（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－２２８３４９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第８２／２７７３（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G01N 21/75
G01N 33/58