

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-192270

(P2009-192270A)

(43) 公開日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 E	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2008-31011 (P2008-31011)
 (22) 出願日 平成20年2月12日 (2008.2.12)

(71) 出願人 593025712
 株式会社ビーエル
 静岡県沼津市神田町6番26号
 (74) 代理人 100091502
 弁理士 井出 正威
 (74) 代理人 100125933
 弁理士 野上 晃
 (72) 発明者 蓮実 文彦
 静岡県三島市沢地30-3
 (72) 発明者 難波 靖治
 静岡県沼津市神田町6番26号 株式会社
 ビーエル内

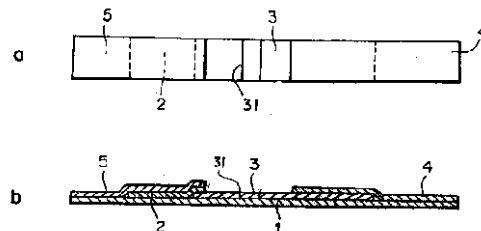
(54) 【発明の名称】 高感度免疫測定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】金属コロイドを呈色標識物質として用いた免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィー測定法において、安価に高感度の測定が行えるようにする。

【解決手段】分析対象物質と、該分析対象物質に対して免疫学的に反応する試薬とを反応させて両者の複合体を検出することからなる免疫測定法であって、前記分析対象物質または前記試薬の何れか一方を、パラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で標識しておき、前記複合体を、金属イオンを含有する増感剤溶液と接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とする免疫測定法が提供される。サンドイッチ法、特にイムノクロマトグラフィー測定法が好ましい。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析対象物質と、該分析対象物質に対して免疫学的に反応する試薬とを反応させて両者の複合体を検出することからなる免疫測定法であって、前記分析対象物質または前記試薬の何れか一方を、パラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で標識しておき、前記複合体を、金属イオンを含有する増感剤溶液と接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とする免疫測定法。

【請求項 2】

競合法又はサンドイッチ法である、請求項 1 に記載の免疫測定法。

10

【請求項 3】

前記分析対象物質に対して免疫学的に反応する第一及び第二の試薬を用意し、前記第一の試薬を担体に固定しておき、前記第二の試薬をパラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で標識しておき、前記分析対象物質を前記第一の試薬と第二の試薬との間にサンドイッチするサンドイッチ法により行われる、請求項 2 に記載の免疫測定法。

【請求項 4】

イムノクロマトグラフィー測定法である、請求項 2 または 3 に記載の免疫測定法。

【請求項 5】

前記金属コロイド粒子は、平均粒径30～90ナノメートルのパラジウムコロイド粒子の表面に白金コロイドを担持させてなる金属コロイド粒子である請求項 1 に記載の免疫測定法。

20

【請求項 6】

前記金属イオンは、ニッケル、コバルト及び銅からなる群より選ばれた少なくとも 1 種のイオンである請求項 1 に記載の免疫測定法。

【請求項 7】

前記増感剤溶液は、硫酸銅と還元剤とを含有する溶液である請求項 1 に記載の免疫測定法。

【請求項 8】

分析対象物質に対して免疫学的に反応する第一及び第二の試薬並びに膜担体を用意し、前記第一の試薬を予め前記膜担体の所定位置に固定せしめて捕捉部位を形成し、前記第二の試薬をパラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で予め標識しておき、該第二の試薬と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる分析対象物質と前記第二の試薬との複合体を前記捕捉部位に捕捉させた後、該捕捉部位を、金属イオンを含有する増感剤溶液と接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法。

30

【請求項 9】

前記金属コロイド粒子は、平均粒径30～90ナノメートルのパラジウムコロイド粒子の表面に白金コロイドを担持させてなる金属コロイド粒子である請求項 8 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

40

【請求項 10】

前記金属イオンは、ニッケル、コバルト及び銅からなる群より選ばれた少なくとも 1 種のイオンである請求項 8 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 11】

前記増感剤溶液は、硫酸銅と還元剤とを含有する溶液である請求項 8 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 12】

分析対象物質に対して免疫学的に反応する第一及び第二の試薬並びに膜担体を少なくとも備え、前記第一の試薬は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の試薬はパラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で予め標

50

識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように用意されてなるイムノクロマト法テストキットであって、さらに、金属イオンを含有する増感剤溶液を備え、前記クロマト展開後に該増感剤溶液を前記捕捉部位に接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とするイムノクロマト法テストキット。

【請求項 13】

前記金属コロイド粒子は、平均粒径30～90ナノメートルのパラジウムコロイド粒子の表面に白金コロイドを担持させてなる金属コロイド粒子である請求項 12 に記載のイムノクロマト法テストキット。

【請求項 14】

前記金属イオンは、ニッケル、コバルト及び銅からなる群より選ばれた少なくとも 1 種のイオンである請求項 12 に記載のイムノクロマト法テストキット。

【請求項 15】

前記増感剤溶液は、硫酸銅と還元剤とを含有する溶液である請求項 12 に記載のイムノクロマト法テストキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標識物質として金属コロイドを用いた免疫測定法であって、増感剤を用いることにより、従来と同等の感度を有し且つ安価に実施できる測定法に関する。

【背景技術】

【0002】

金コロイド粒子は、従来、免疫測定法における呈色標識物質として知られている。また、金コロイド粒子の表面上で銀イオンを還元させて銀を生成させ、高感度の呈色を生じさせる方法も知られている（特許文献 1～3 参照）。

【0003】

また、金コロイド粒子の表面に白金を担持させてなる複合金属コロイド粒子を免疫測定法における呈色標識物質として使用することも知られている。また、かかる複合金属コロイド粒子と硫酸銅や 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンチジン (TMBZ) などの発色剤を併用することにより、検出感度を向上することも知られている（特許第 3886000 号公報）。しかし、金コロイドは高価であり、測定に要するコストが高くなるため、安価に高感度の検出を行える測定法が求められている。

【0004】

【特許文献 1】特開昭 63 - 277971 号公報

【特許文献 2】特開平 4 - 220642 号公報

【特許文献 3】特開平 7 - 120470 号公報

【特許文献 4】特許第 3886000 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、金属コロイドを呈色標識物質として用いた免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィー測定法において、安価に高感度の測定が行えるようにすることにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、免疫測定法で呈色標識物質として用いられる金属コロイドとして金属イオンの還元を触媒する特定の金属コロイド粒子を使用し、抗体抗原反応終了後、該金属コロイド粒子に金属イオンを接触させて金属を析出させることにより、従来と同等の感度で安価に検出が行えることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

10

20

30

40

50

すなわち、本発明の一局面によれば、分析対象物質と、該分析対象物質に対して免疫学的に反応する試薬とを反応させて両者の複合体を検出することからなる免疫測定法であって、前記分析対象物質または前記試薬の何れか一方を、パラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で標識しておき、前記複合体を、金属イオンを含有する増感剤溶液と接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とする免疫測定法が提供される。

【0008】

この検出法における免疫測定法としては、特に限定されるものではなく、競合法でもサンドイッチ法でもよいが、サンドイッチ式法、とりわけELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法、イムノクロマトグラフィー測定法などが好ましい。

10

【0009】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明の免疫測定法は、前記分析対象物質に対して免疫学的に反応する第一及び第二の試薬を用意し、前記第一の試薬を担体に固定しておき、前記第二の試薬をパラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で標識しておき、前記分析対象物質を前記第一の試薬と第二の試薬との間にサンドイッチするサンドイッチ法に従って実施される。

【0010】

また、本発明の別の好ましい実施形態によれば、分析対象物質に対して免疫学的に反応する第一及び第二の試薬並びに膜担体を用意し、前記第一の試薬を予め前記膜担体の所定位置に固定せしめて捕捉部位を形成し、前記第二の試薬をパラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で予め標識しておき、該第二の試薬と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる分析対象物質と前記第二の試薬との複合体を前記捕捉部位に捕捉させた後、該捕捉部位を、金属イオンを含有する増感剤溶液と接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法が提供される。

20

【0011】

また、本発明の別の局面によれば、分析対象物質に対して免疫学的に反応する第一及び第二の試薬並びに膜担体を少なくとも備え、前記第一の試薬は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の試薬はパラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子で予め標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように用意されてなるイムノクロマト法テストキットであって、さらに、金属イオンを含有する増感剤溶液を備え、前記クロマト展開後に該増感剤溶液を前記捕捉部位に接触させることにより、前記金属コロイド粒子上で前記金属イオンを還元させて金属を析出させて検出するようにしたことを特徴とするイムノクロマト法テストキットが提供される。

30

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、免疫測定法において、呈色標識物質として金コロイド以外の特定の金属コロイド粒子を使用するとともに、該金属コロイド粒子の触媒作用を利用して増感剤の金属イオンを該金属コロイド粒子上に析出させることとしたので、従来と同等の感度で安価に測定を行うことができる。

40

また、本発明で使用する金属コロイド粒子は、従来使用されている金属コロイド粒子よりも、金属イオンの還元を触媒する能力に優れ、また、粒径のばらつきの少ない粒子を安定に且つ安価に製造できるという利点がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の分析対象物質は、免疫学的に検出できるものであれば特に限定されない。分析対象物質が抗原である場合は、上記試薬として、該分析対象物質に対して特異的に反応す

50

る抗体が使用され、分析対象物質が抗体である場合は、上記試薬として、該抗体が特異的に反応する抗原が使用される。上記試薬として用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、反応特異性の観点から、モノクローナル抗体とすることが好ましい。

【0014】

イムノクロマトグラフィ測定法などのサンドイッチ式免疫測定法の場合、そこで使用する第一の試薬及び第二の試薬としては、分析対象物質が抗原である場合は、抗体が使用される。この場合、第一の試薬及び第二の試薬は、それぞれ、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、反応特異性の観点から、一般に、少なくとも一方の抗体をモノクローナル抗体とすることが好ましく、両方の抗体をモノクローナル抗体とすることが特に好ましい。

10

【0015】

本発明において、分析対象物質及び上記試薬の何れか一方を金属コロイド粒子で標識すればよいが、上記のような第一の試薬及び第二の試薬を用いるイムノクロマトグラフィ測定法などのサンドイッチ式免疫測定法の場合、第一の試薬及び第二の試薬の何れか一方が金属コロイド粒子で標識される。

【0016】

本発明では、金属コロイド粒子としては、パラジウムコロイドに白金コロイドを担持させた金属コロイド粒子が用いられる。この複合金属コロイド粒子は、ニッケルイオン、コバルトイオン、銅イオン等の金属イオンの還元を触媒してそれぞれの金属を析出させる能力を有する。この複合金属コロイド粒子としては、パラジウムコロイド粒子の表面に白金コロイドを担持させてなるものが好ましく、平均粒径30~90ナノメートルのパラジウムコロイド粒子の表面に白金コロイドを担持させてなる複合金属コロイド粒子がより好ましく、平均粒径40~80ナノメートルのパラジウムコロイド粒子の表面に白金コロイドを担持させてなる複合金属コロイド粒子が更により好ましい。該複合金属コロイド粒子の平均粒径は、40~200ナノメートルであることが好まし。イムノクロマトグラフィ測定法の場合、該複合金属コロイド粒子の平均粒径は60~100ナノメートルであることが好ましく、該複合金属コロイド粒子として、平均粒径40~80ナノメートルのパラジウムコロイド粒子の表面に白金を担持させてなる60~100ナノメートルの複合金属コロイド粒子が特に好ましい。

20

30

【0017】

本発明で使用する増感剤溶液は、上記金属イオンの供給源となる各種金属塩を必須成分として含有し、必要に応じて、還元剤、錯化剤、pH調製剤、緩衝剤、安定剤などを更に含有することができる。このような増感剤溶液としては、従来公知の無電解めっき溶液を使用することもできる。

【0018】

上記金属イオンの供給源となる金属塩としては、周期律表第4、5、6周期に属する金属の塩が挙げられるが、析出速度などの観点からみて、ニッケル、コバルト、銅などの塩を使用することが好ましく、硫酸銅などの銅の塩を使用することがより好ましい。

【0019】

還元剤としては、次亜リン酸ナトリウム、抱水ヒドラジン、硫酸ヒドラジン、水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミンボラン、ホルムアルデヒド、ロッシェル塩、ブドウ糖が挙げられるが、次亜リン酸ナトリウム又はホルムアルデヒドが好ましく使用され、このうち、ホルムアルデヒドが最も好ましい。

40

【0020】

また、錯化剤としては、アンモニア、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩などが挙げられる。pH調製剤としては、酢酸塩、プロピオン酸塩、アンモニウム塩などが挙げられる。安定剤としては、各種の界面活性剤などが挙げられる。

【0021】

イムノクロマト法テストストリップの具体例としては、例えば、図1に示されるテスト

50

ストリップが挙げられる。図 1 において、数字 1 は粘着シート、2 は含浸部材、3 は膜担体、3 1 は捕捉部位、4 は吸収用部材、5 は試料添加用部材を示している。

【0022】

図示の例では、膜担体 3 は、幅 5 mm、長さ 36 mm の細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターで作成されている。

該膜担体 3 には、そのクロマト展開開始点側の末端から 7.5 mm の位置に、第一の試薬が固定され、検体の捕捉部位 3 1 が形成される。

図示の例では、膜担体 3 は、ニトロセルロース製メンブレンフィルターを用いているが、被験試料に含まれる分析対象物質をクロマト展開可能で、かつ、上記捕捉部位 3 1 を形成する抗体を固定可能なものであれば、いかなるものであってもよく、他のセルロース類膜、ナイロン膜、ガラス繊維膜なども使用できる。

10

【0023】

含浸部材 2 は、前記第二の試薬を含浸等の方法で配置せしめた部材からなる。当該第二の試薬は、上記金属コロイド粒子で予め標識される。

図示の例では、含浸部材 2 として、5 mm × 15 mm の帯状のガラス繊維不織布を用いているが、これに限定されるものではなく、例えば、セルロース類布（濾紙、ニトロセルロース膜等）、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類なども使用できる。

【0024】

第二の試薬の標識物質として使用される金属コロイド粒子は、捕捉部位 3 1 に集積することにより、肉眼で観察できる程度の色を呈し、さらに、増感剤溶液と接触することによって金属を析出させて呈色の度合いが向上するものであることが好ましい。

20

【0025】

当該含浸部材 2 は、標識された第二の試薬の懸濁液を前記ガラス繊維不織布等の部材に含浸せしめ、これを乾燥させることなどによって作製できる。

【0026】

図 1 に示されるように、膜担体 3 を粘着シート 1 の中程に貼着し、該膜担体 3 のクロマト展開の開始点側（すなわち図 1 の左側、以下「上流側」と記す、また、その逆の側、すなわち図 1 の右側を、以下「下流側」と記す）の末端の上に、含浸部材 2 の下流側末端を重ね合わせて接続するとともに、この含浸部材 2 の上流側部分を粘着シート 1 に貼着して本発明のイムノクロマト法テストストリップを作成できる。

30

【0027】

さらに、必要に応じて、含浸部材 2 の上面に試料添加用部材 5 の下流側部分を載置するとともに、該試料添加用部材 5 の上流側部分を粘着シート 1 に貼着してもよく、また、膜担体 3 の下流側部分の上面に吸収用部材 4 の上流側部分を載置するとともに、該吸収用部材 4 の下流側部分を粘着シート 1 に貼着せしめることもできる。

【0028】

試料添加用部材 5 としては、例えば、多孔質ポリエチレンおよび多孔質ポリプロピレンなどのような多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、ならびに、濾紙および綿布などのようなセルロース製の紙または織布もしくは不織布を用いることができる。

40

吸収用部材 4 は、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等を挙げることができるが、特に濾紙が最適である。

【0029】

さらに、市販品の場合、図 1 のイムノクロマト法テストストリップは、試料添加用部材 5 と捕捉部位 3 1 の上方にそれぞれ被験試料注入部と判定部が開口された適当なプラスチック製ケース内に収容されて提供してもよい。

【0030】

かくして、生体試料などを含む被験試料を必要に応じて適当な展開溶媒と混合してクロマト展開可能な混合液を得た後、当該混合液を図 1 に示されるイムノクロマト法テストス

50

トリップの試料添加用部材 5 上に注入すると、該混合液は、該試料添加用部材 5 を通過して含浸部材 2 において、標識された第二の試薬と混合する。

その際、該混合液中に分析対象物質が存在すれば、抗原抗体反応により分析対象物質と第二の試薬との複合体が形成される。

【0031】

この複合体は、膜担体 3 中をクロマト展開されて捕捉部位 3 1 に到達し、そこに固定された第一の試薬と抗原抗体反応して捕捉される。

このとき、標識物質である金属コロイド粒子の集積により捕捉部位 3 1 が発色する。そして、さらに、該捕捉部位 3 1 と増感剤溶液とを接触させることにより、増感剤溶液に含まれている金属イオンが金属コロイド粒子の触媒作用によって還元されて金属として析出するので、金属コロイド粒子による発色がさらに増強されて、高い感度で測定を行うことができる。捕捉部位 3 1 の発色を測定機器で読み取り、定量的に測定することもできる。

【0032】

なお、本発明では、第二の試薬又は第二の試薬を含有する前記含浸部材を膜担体上に配置せず、適当な容器に収納しておき、当該容器内で被験試料と第二の試薬を混合して膜担体に注入することにより、膜担体にてクロマト展開可能なように用意しておくこともできる。

【0033】

被験試料の調製に用いる生体試料としては、特に制限はなく、公知の免疫測定法で使用されている生体試料であれば何れも使用することができる。また、本発明の分析対象物質も生体試料由来のものに限られず、公知の免疫測定法で使用されているものであれば何れも使用できる。

【0034】

なお、全血を被験試料として用いる場合、前記試料添加用部材に血球捕捉膜部材を配置しておくことが好ましい。血球捕捉膜部材は、前記含浸部材と前記試料添加用部材との間に積層することが好ましい。これにより、赤血球が膜担体に展開されるのが阻止されるので、膜担体の捕捉部位における呈色標識の集積の確認が容易になる。血球捕捉膜部材としては、カルボキシメチルセルロース膜が用いられ、具体的には、アドバンテック東洋株式会社から販売されているイオン交換濾紙 CM (商品名) や、ワットマンジャパン株式会社から販売されているイオン交換セルロースペーパーなどを用いることができる。

【実施例】

【0035】

下記の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0036】

実施例 1 (白金微粒子被覆パラジウムコロイド粒子の調製)

(1) 使用するガラス器具の全てを王水で洗浄した。

(2) 390ml の超純水をフラスコに入れて沸騰させ、この沸騰水に塩化パラジウム水溶液 (水溶液 1L あたりパラジウムとして 1g) 30ml を加え、その後、1 重量% クエン酸ナトリウム水溶液 60ml を加え、20 時間還流しパラジウムコロイド懸濁液を得た。得られた懸濁液中のパラジウムコロイド粒子の平均粒径を動的光散乱式粒径分布測定装置 LB-500 (株) 堀場製作所製) によって測定したところ 60nm (標準偏差 2.4) であった。その後、上記懸濁液に塩化白金酸水溶液 (水溶液 1L あたり白金として 1g) 30ml を加えた。塩化白金酸水溶液添加から 5 分後に 1 重量% クエン酸ナトリウム水溶液 60ml を加え、4 時間還流を行い白金微粒子被覆パラジウムコロイド懸濁液を得た。

(3) 得られた白金微粒子被覆パラジウムコロイド懸濁液 1ml を 13800 × g で 25 分間遠心分離を行い、遠心分離後、上清を除き、残った沈殿に超純水を 0.5ml 加え、攪拌後、超音波で沈殿を再懸濁せしめ、この懸濁液を 200mM 炭酸カリウム水溶液で pH9.0 に調整し、これに超純水を加えて全量を 100ml として白金微粒子被覆パラジウムコロイド再懸濁液を得た。この再懸濁液中の白金微粒子被覆パラジウムコロイドの平均粒径を動的光散乱式粒径分布

10

20

30

40

50

測定装置LB-500（（株）堀場製作所製）によって測定したところ80nmであった。

【0037】

実施例2（白金 - パラジウムコロイド標識抗体の調製）

抗ヒトCRP（C反応性蛋白、C-reactive protein）マウスモノクローナル抗体の蛋白換算重量1 μ g（以下抗体の重量を示すとき、その蛋白換算重量を示す）と実施例1で得られた白金微粒子被覆パラジウムコロイド再懸濁液1mlとを混合し、室温で2分間静置して、この抗体の全量を該再懸濁液中の白金微粒子被覆パラジウムコロイド粒子（以下「白金 - パラジウムコロイド粒子」と記す）と結合させた。

これに最終濃度が0.2%となるように1%ウシ血清アルブミン（以下「BSA」と記す）水溶液を加えて、上記抗体に結合せしめられた白金 - パラジウムコロイド粒子の表面をブロックした。この懸濁液を4000 \times gで25分間遠心分離して、白金 - パラジウムコロイド粒子の表面がBSAでブロックされた白金 - パラジウムコロイド標識抗体を沈殿せしめて集めた。この白金 - パラジウムコロイド標識抗体を0.05%ツイーン（Tween）20および1%BSAを含有する50mMトリス塩酸塩緩衝液（pH7.4）に再懸濁して、精製白金 - パラジウムコロイド標識抗体懸濁液を得た。

【0038】

実施例3（イムノクロマト法テストストリップの作成）

図1に示されるイムノクロマト法テストストリップを下記の手順で作成した。

（1）抗CRP抗体と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位

幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース膜をクロマトグラフ媒体のクロマト展開用膜担体3として用意した。

抗ヒトCRPマウスモノクローナル抗体1.0mg/mlが含有されてなる溶液0.5 μ lを、このクロマト展開用膜担体3におけるクロマト展開開始点側の末端から7.5mmの位置にライン状に塗布して、これを室温で乾燥し、抗原であるヒトCRPと白金 - パラジウムコロイド標識抗体との複合体の捕捉部位3-1とした。

（2）白金 - パラジウムコロイド標識抗体含浸部材

5mm \times 15mmの帯状のガラス繊維不織布に、実施例2で得られた白金 - パラジウムコロイド標識抗体懸濁液37.5 μ lを含浸せしめ、これを室温で乾燥させて白金 - パラジウムコロイド標識抗体含浸部材2とした。

（3）イムノクロマト法テストストリップの作成

上記クロマト展開用膜担体3、上記標識抗体含浸部材2の他に、試料添加用部材5として綿布と、吸収用部材4として濾紙を用意した。そして、これらの部材を用いて、図1と同様のクロマト法テストストリップを作成した。

【0039】

比較例1（金コロイドの調製）

使用するガラス器具の全てを王水で洗浄するかまたはシリコンコーティングした。

99mlの超純水をフラスコにいれ沸騰させ、この沸騰水に塩化金酸（片山工業株式会社製）水溶液（水溶液1リットル当たり金として5.8g）1mlを加えさらにその1分後に、1重量%クエン酸ナトリウム水溶液1.5mlを加え、5分間還流を行い、その後、室温に放置して冷却し懸濁液を得た。次いでこの懸濁液を200mM炭酸カリウム水溶液でpH9.0に調整し、これに超純水を加えて全量を100mlとして金コロイド懸濁液を得た。

【0040】

比較例2（金コロイド標識抗体の調製）

白金微粒子被覆パラジウムコロイド再懸濁液の代わりに比較例1の金コロイド懸濁液を用いた以外は実施例2と同様にして金コロイド標識抗体を得た。

【0041】

比較例3（イムノクロマト法テストストリップの作成）

白金 - パラジウムコロイド標識抗体の代わりに比較例2の金コロイド標識抗体を使用した以外、実施例3と同様にしてイムノクロマト法テストストリップを得た。

【0042】

10

20

30

40

50

比較例 4 (白金微粒子被覆金コロイド粒子の調製)

(1) 使用するガラス器具の全てを王水で洗浄した。
(2) 390mlの超純水をフラスコに入れて沸騰させ、この沸騰水に塩化金酸水溶液(水溶液1リットル当たり金として1g、片山科学工業株式会社製)30mlを加え、その後、1重量%クエン酸ナトリウム水溶液60mlを加え、6分45秒後に、塩化白金酸水溶液(水溶液1リットル当たり白金として1g、和光純薬工業株式会社製)30mlを加えた。塩化白金酸水溶液添加から5分後に1重量%クエン酸ナトリウム水溶液60mlを加え、4時間還流を行い、白金微粒子被覆金コロイド懸濁液を得た。
(3) 次いでこの懸濁液を200mM炭酸カリウム水溶液でpH9.0に調整し、これに超純水を加えて全量を100mlとして白金微粒子被覆金コロイド再懸濁液を得た。この再懸濁液中の白金微粒子被覆金コロイドの平均粒径を動的光散乱式粒径分布測定装置LB-500((株)堀場製作所製)によって測定したところ80nmであった。

10

【0043】

比較例 5 (白金微粒子被覆金コロイド標識抗体の調製)

白金微粒子被覆パラジウムコロイド再懸濁液の代わりに比較例4の白金微粒子被覆金コロイド懸濁液を用いた以外は実施例2と同様にして白金微粒子被覆金コロイド標識抗体を得た。

【0044】

比較例 6 (イムノクロマト法テストストリップの作成)

白金-パラジウムコロイド標識抗体の代わりに比較例5の白金微粒子被覆金コロイド標識抗体を使用した以外、実施例3と同様にしてイムノクロマト法テストストリップを得た。

20

【0045】

実施例 4 (硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液の調製)

純水500mlに対し、酒石酸カリウムナトリウム(キシダ化学製)114g、硫酸銅(和光純薬株式会社製)23.5g、炭酸ナトリウム(関東化学株式会社製)40g、水酸化ナトリウム15g、EDTA 10gを溶解し、硫酸銅溶液を調製した。得られた硫酸銅溶液15mlにホルムアルデヒド3mlを添加し、硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液を調製した。混合液はテストストリップに反応させる前に調製した。

【0046】

30

試験例 1

実施例3(Pt-Pdコロイド標識)、比較例3(Auコロイド標識)および比較例6(Pt-Auコロイド標識)で得られたイムノクロマト法テストストリップを使用して、抗原であるリコンビナントCRPを測定した。リコンビナントCRP(オリエンタル酵母工業株式会社製)は、0.25% Tweenを含むリン酸緩衝液(pH7.4)と混合し、リコンビナントCRPの濃度を1.0ng/mlおよび500、250、125、62.5、31.25、15.63pg/mlに調製し被験試料とした。

これらの被験試料100 μ lを上記のイムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材に5上に滴下して膜担体3に展開せしめ、15分後に捕捉部位31の呈色の度合いを肉眼で観察した。ブランクは、0.25% Tweenを含むリン酸緩衝液(pH7.4)とした。その後、イムノクロマト法テストストリップを超純水にて洗浄し、水気を切った後、捕捉部位31を上記で作成した硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液に浸漬し、呈色の度合いを肉眼で観察した。

40

捕捉量は、その量に比例して増減する黒色の呈色度合いを肉眼で-(着色なし)、±w(微弱な着色)、±w(弱い着色)、+(明確な着色)の4段階に区分して判定した。結果を表1に示す。

【0047】

【表 1】

表 1

抗原濃度	Au コロイド 標識 (比較例 6)		Pt-Au コロイド 標識 (比較例 3)		Pt-Pd コロイド 標識 (実施例 3)	
	前	後	前	後	前	後
1.0ng/ml	+	+	+	+	+	+
500pg/ml	±	±	+	+	+	+
250pg/ml	±w	±w	±	±	±	±
125pg/ml	±ww	±ww	±w	±	-	±
62.5pg/ml	-	-	-	±w	-	±w
31.25pg/ml	-	-	-	±ww	-	±ww
15.63pg/ml	-	-	-	-	-	-
Blank	-	-	-	-	-	-

前： 硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液に浸漬前

後： 硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液に浸漬後

【 0 0 4 8 】

金コロイド標識した場合（比較例 6）は、硫酸銅 - ホルムアルデヒド混合液に浸漬前後で変化はなく同様の検出感度を示した。また、白金 - 金コロイド標識した場合（比較例 3）は、硫酸銅 - ホルムアルデヒド混合液に浸漬前の目視判定では125pg/mlが検出限界であったのに対し、浸漬後では31.25pg/mlと検出感度が向上した。一方、白金 - パラジウムコロイド標識した場合（実施例 3）は、硫酸銅 - ホルムアルデヒド混合液に浸漬前の目視判定では250pg/mlが検出限界であったのに対し、浸漬後では31.25pg/mlと検出感度が向上し、白金 - 金コロイドよりも2倍高い触媒能を有することが確認された。白金の触媒作用により添加した増感剤溶液中の銅イオンが還元されて、触媒作用を有する金属コロイド粒子表面に析出させることで増感効果が得られた。更に、白金 - パラジウムコロイドでは白金およびパラジウムの触媒作用にて酸化還元反応がより効果的に働くことが示された。

【 0 0 4 9 】

試験例 2

実施例 3 で得られたイムノクロマト法テストストリップを使用して、展開後のイムノクロマト法テストストリップの捕捉部位 31 に 3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン (TMBZ) (ペルオキシダーゼ用発色キット ST (株式会社タウンズ製)) を 10 μl 加え、呈色の有無を肉眼で観察した。

一方、実施例 3 で得られたイムノクロマト法テストストリップを使用して、展開後のイムノクロマト法テストストリップを超純水にて洗浄し、水気を切った後、捕捉部位 31 を上記で作製した硫酸銅 - ホルムアルデヒド混合液に浸漬し、呈色の度合いを肉眼で観察した

10

20

30

40

50

。【0050】

【表2】

表2

抗原濃度	TMBZ (試験例2)	硫酸銅-ホルムアルデヒド 混合液(実施例3)
1.0ng/ml	+	+
500pg/ml	±	+
250pg/ml	-	±
125pg/ml	-	±
62.5pg/ml	-	±w
31.25pg/ml	-	±ww
15.63pg/ml	-	-
Blank	-	-

10

20

30

40

【0051】

上記の結果から、TMBZを併用した際(試験例2)には、抗原濃度500pg/ml、また、硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液を併用した際(実施例3)には、抗原濃度31.25pg/mlまで検出できることが示された。したがって、従来から増感剤として使用されているTMBZよりも硫酸銅-ホルムアルデヒド混合液のほうが高い増感効果を示した。

【産業上の利用可能性】

【0052】

本発明は、従来よりも高感度で測定が行える免疫測定法、とりわけ、サンドイッチ式免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィ測定法およびイムノクロマト法テストストリップを提供するものであり、標識物質として金属コロイド粒子を用いて肉眼で簡便に判定できるようにした免疫測定法の分野で有用である。

【図面の簡単な説明】

【0053】

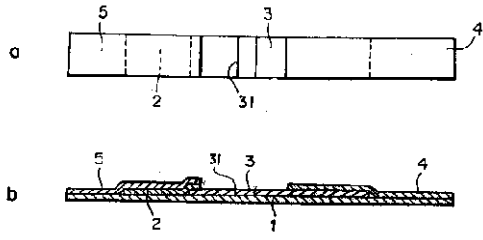
【図1】 aはイムノクロマト法テストストリップの平面図、bはaで示されたイムノクロマト法テストストリップの縦断面図。

【符号の説明】

【0054】

- 1 粘着シート
- 2 含浸部材
- 3 膜担体
- 3 1 捕捉部位
- 4 吸収用部材
- 5 試料添加用部材

【 図 1 】



专利名称(译)	高感度免疫测定法		
公开(公告)号	JP2009192270A	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2008031011	申请日	2008-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命		
申请(专利权)人(译)	株式会社ビー一工ル		
[标]发明人	蓮実文彦 難波靖治		
发明人	蓮実 文彦 難波 靖治		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/536.E G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z B82Y15/00		
代理人(译)	野上彰		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：为了廉价且高度灵敏地测量使用金属胶体作为颜色标记物质的免疫测定法，尤其是免疫色谱测定法。一种免疫分析方法，包括使分析物与分析物发生免疫反应的试剂反应，以检测两者的复合物，其中分析物或任一种试剂都用金属胶体颗粒标记，其中铂胶体负载在钯胶体上，并使络合物与含有金属离子的敏化剂溶液接触以获得金属胶体颗粒。提供了一种免疫测定方法，其特征在于还原金属离子以沉积用于检测的金属。优选夹心法，特别是免疫色谱法。[选型图]图1

