

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 340898

(P2002 - 340898A)

(43)公開日 平成14年11月27日(2002.11.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/543	521	G 0 1 N 33/543	2 G 0 4 5
27/416		33/483	E
33/483		33/53	T
// G 0 1 N 33/53		27/46	336 B
		336	Z
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10数)			

(21)出願番号 特願2001 - 152205(P2001 - 152205)

(22)出願日 平成13年5月22日(2001.5.22)

(71)出願人 000003609

株式会社豊田中央研究所

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1

(72)発明者 星野 文彦

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 嶋村 隆

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1株式会社豊田中央研究所内

(74)代理人 100097733

弁理士 北川 治

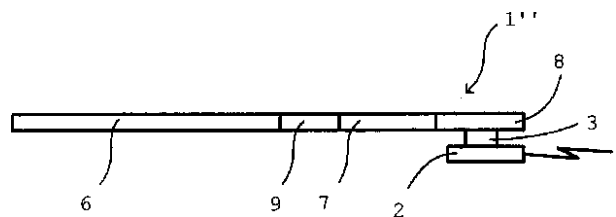
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 被検物質の検出方法及び検出装置

(57)【要約】

【課題】 免疫クロマトグラフィーの原理に過酸化水素電極を組合わせることにより、簡易かつ迅速に被検物質の検出を可能とした検出方法及び検出装置を提供する。

【解決手段】 被検液中の被検物質 A を酸化還元酵素標識付きの特異的結合対形成物質 B - 酵素と反応させて A - B - 酵素を形成させ、被検液中に残存する遊離の B - 酵素を特異的結合対形成反応を利用して固定・除外し、被検液中の A - B - 酵素を多孔性支持体の検出部において酵素基質に接触させて過酸化水素発生量を検出し、被検物質 A を検出する、被検物質の検出方法。多孔性支持体に、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部を設けた被検物質の検出装置。検出部には小面積で薄い多孔性材料からなり酵素基質を保持した検出シートを付設し、これに過酸化水素電極を接触させることが好ましい。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検液中の被検物質 A を定性的又は定量的に検出するための検出方法であって、以下の第 1 工程～第 3 工程を含むことを特徴とする被検物質の検出方法。

第 1 工程：被検液中の被検物質 A を、酸化還元酵素で標識された特異的結合対形成物質 B（B - 酵素）と反応させて、酵素標識された特異的結合対（A - B - 酵素）を形成させる工程。

第 2 工程：第 1 工程後の被検液中に残存する遊離の B - 酵素を、特異的結合対形成反応を利用して固定することにより除外する工程。

第 3 工程：被検液中の A - B - 酵素を多孔性支持体の検出部において酵素基質に接触させ、その際の過酸化水素発生量を過酸化水素電極により検出して、被検液中における被検物質 A を定性的又は定量的に検出する工程。

【請求項 2】 前記第 3 工程において、多孔性支持体の検出部には小面積で薄い多孔性材料からなり前記酵素基質を保持した検出シートを付設し、被検液の一部を毛細管現象により検出シートに移動させて過酸化水素を発生させ、その発生量を検出シートに接触した過酸化水素電極により検出することを特徴とする請求項 1 に記載の被検物質の検出方法。

【請求項 3】 前記検出シートの面積が 5 平方 mm 以下であり、その厚さが 0.5 mm 以下であることを特徴とする請求項 2 に記載の被検物質の検出方法。

【請求項 4】 前記検出方法において、予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、次に特異的結合対形成反応を利用した任意の分離手段により第 2 工程を行い、次にこの被検液を多孔性支持体の検出部に供給して第 3 工程を行うことを特徴とする請求項 1～請求項 3 のいずれかに記載の被検物質の検出方法。

【請求項 5】 前記検出方法において、予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、次に被検液を多孔性支持体の分離部（被検物質 A と同様の特異的結合対形成能力を有する第 3 物質 A' を固定した部分）に供給して第 2 工程を行い、次にこの被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行うことを特徴とする請求項 1～請求項 3 のいずれかに記載の被検物質の検出方法。

【請求項 6】 前記検出方法において、被検液を多孔性支持体の結合対形成部（B - 酵素を可溶に保持した部分）に供給して第 1 工程を行い、次に被検液を毛細管現象により多孔性支持体の分離部（B - 酵素に対する特異的結合対形成能力を有する第 3 物質 A' を固定した部分）に供給して第 2 工程を行い、次にこの被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行うことを特徴とする請求項 1～請求項 3 のいずれかに記載の被検物質の検出方法。

【請求項 7】 被検液中の被検物質 A を定性的又は定量的に検出するための検出装置であって、以下～のい

ずれかの構成を有することを特徴とする被検物質の検出装置。

毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部を設けた検出装置。

毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、請求項 5 に記載の第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた検出装置。

毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、被検液の移動方向に沿って順に、請求項 1 に記載の B - 酵素を可溶に保持した結合対形成部と、請求項 5 に記載の第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた検出装置。

【請求項 8】 前記検出部が、多孔性支持体と、これに付設された、小面積で薄い多孔性材料からなり酵素基質を保持した検出シートと、この検出シートに接触させた過酸化水素電極からなることを特徴とする請求項 7 に記載の被検物質の検出装置。

【請求項 9】 前記多孔性支持体の所要部分には、被検液を多孔性支持体に供給するための試料供給部、及び／又は、被検液の毛細管現象による移動を促進するための試料吸引部を設けたことを特徴とする請求項 7 又は請求項 8 に記載の被検物質の検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検物質の検出方法及び検出装置に関する。更に詳しくは、本発明は、被検液中の被検物質が抗原、抗体、受容体、該受容体に対するリガンド等である場合において、いわゆる免疫クロマトグラフィーの原理に過酸化水素電極を組合わせることにより、簡易かつ迅速に被検物質の検出を可能とした検出方法及び検出装置に関する。

【0002】

【従来の技術】抗原と抗体、あるいは受容体と該受容体に対するリガンド等のように、特異的な結合対を形成し得る物質を免疫クロマトグラフィーの原理を利用して検出する方法は、従来より種々に提案されている。

【0003】これらの方法では、特異的結合対の一方の構成物質を被検物質とする。いずれの方法でも、この被検物質を特異的結合対の他方の構成物質と特異的に結合させる等の過程を通じて、被検物質を酵素等の標識の結合量に反映させる。そして、結合標識又は未結合標識の存否又は量を測定することにより、被検物質を検出している。

【0004】使用される標識としては、酵素標識、蛍光等の化学発光標識、放射能標識等が例示される。酵素標識としては、グルコースオキシダーゼ等の酸化還元酵素

が代表的に例示される。酸化還元酵素を利用する際は、酸化還元反応を発色や酸素電極又は過酸化水素電極により検出する方法が知られている。例えば、特開平 5 - 7 2 1 7 3 号公報には、抗原 - 抗体反応の反応液を電極と接触させ、該反応液を攪拌しながら検出を行う方法が開示されている。

【0005】一方、免疫クロマトグラフィーに関しては、例えば特開平 4 - 1 6 7 4 5 号公報に開示された方法を例示できる。この方法では、体液の吸収、反応溶質の可溶化、免疫反応及び発色反応等を、繊維質の積層体 10 中において毛細管現象を利用することにより連続的にかつ迅速に行わせる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上記の特開平 5 - 7 2 1 7 3 号公報に開示された方法では、多量の反応液を必要とする。又、被検物質の検出に当たり反応液を攪拌すると言う面倒な操作を要する点等、全般に操作が複雑であって迅速に測定できない。更に、例えば家庭用等に好適な安価、簡便なディスプレイ装置を構成することが困難であった。

【0007】免疫クロマトグラフィーを利用した特開平 4 - 1 6 7 4 5 号公報の方法は簡易、迅速な検出法であり、家庭用等に好適なディスプレイ装置を構成することもできる。従って、種々の病気の診断の目安となる尿や唾液等の体液中の被検物質を安価、簡便、迅速に検出することを期待できる。しかしこの方法は、被検物質を定性的に検出できるが、定量的には検出できない。

【0008】以上のような従来技術の問題に鑑み、本件出願人は既に、免疫クロマトグラフィーの原理に酸素電極を組合わせた好ましい検出方法及び検出装置を提案し 30 ている（特願平 10 - 3 2 8 4 0 3 号、特開 2000 - 1 5 5 1 2 2 号公報）。この検出方法及び検出装置によれば、上記従来技術の諸問題を解決できる。

【0009】しかし、酸素電極ではなく過酸化水素電極を免疫クロマトグラフィーに組合わせることにより、更に検出部に到達した酵素量に比例した電流量が得られると言う利点を期待できる。

【0010】又、上記特開 2000 - 1 5 5 1 2 2 号に係る検出方法及び検出装置では、多孔性支持体そのものに酵素基質を保持させ、多孔性支持体中で酵素反応を起こさせている。ところが、多孔性支持体は、測定時の操作上の必要から、実際には一定以上の厚さと面積とを必要とする。従って、免疫クロマトグラフィーにおいて求められる被検液量の低減や、酸素電極の機能上酵素反応部分に求められる空気中酸素の十分な供給には、一定の限界があった。

【0011】そこで本発明は、本件出願人の出願に係る前記検出方法及び検出装置の発明の好ましい諸効果を確保しつつ、上記した被検液量の低減や酸素供給の問題を更に徹底して改良することを、解決すべき課題とする。 50

【0012】

【課題を解決するための手段】（第 1 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 1 発明（請求項 1 に記載の発明）の構成は、被検液中の被検物質 A を定性的又は定量的に検出するための検出方法であって、以下の第 1 工程～第 3 工程を含む、被検物質の検出方法である。

【0013】第 1 工程：被検液中の被検物質 A を、酸化還元酵素で標識された特異的結合対形成物質 B（B - 酵素）と反応させて、酵素標識された特異的結合対（A - B - 酵素）を形成させる工程。

【0014】第 2 工程：第 1 工程後の被検液中に残存する遊離の B - 酵素を特異的結合対形成反応を利用して固定することにより除外する工程。

【0015】第 3 工程：被検液中の A - B - 酵素を多孔性支持体の検出部において酵素基質に接触させ、その際の過酸化水素発生量を過酸化水素電極により検出して、被検液中における被検物質 A を定性的又は定量的に検出する工程。

【0016】（第 2 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 2 発明（請求項 2 に記載の発明）の構成は、前記第 1 発明に係る第 3 工程において、多孔性支持体の検出部には小面積で薄い多孔性材料からなり前記酵素基質を保持した検出シートを付設し、被検液の一部を毛細管現象により検出シートに移動させて過酸化水素を発生させ、その発生量を検出シートに接触した過酸化水素電極により検出する、被検物質の検出方法である。

【0017】（第 3 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 3 発明（請求項 3 に記載の発明）の構成は、前記第 2 発明に係る検出シートの面積が 5 平方 mm 以下であり、その厚さが 0.5 mm 以下である、被検物質の検出方法である。

【0018】（第 4 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 4 発明（請求項 4 に記載の発明）の構成は、前記第 1 発明～第 3 発明に係る検出方法において、予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、次に特異的結合対形成反応を利用した任意の分離手段により第 2 工程を行い、次にこの被検液を多孔性支持体の検出部に供給して第 3 工程を行う、被検物質の検出方法である。

【0019】（第 5 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 5 発明（請求項 5 に記載の発明）の構成は、前記第 1 発明～第 3 発明に係る検出方法において、予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、次に被検液を多孔性支持体の分離部（被検物質 A と同様の特異的結合対形成能力を有する第 3 物質 A' を固定した部分）に供給して第 2 工程を行い、次にこの被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行う、被検物質の検出方法である。

【0020】（第 6 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 6 発明（請求項 6 に記載の発明）の構成は、前記第 1 発明～第 3 発明に係る検出方法において、被検

液を多孔性支持体の結合対形成部（B - 酵素を可溶に保持した部分）に供給して第 1 工程を行い、次に被検液を毛細管現象により多孔性支持体の分離部（B - 酵素に対する特異的結合対形成能力を有する第 3 物質 A' を固定した部分）に供給して第 2 工程を行い、次にこの被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行う、被検物質の検出方法である。

【0021】（第 7 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 7 発明（請求項 7 に記載の発明）の構成は、被検液中の被検物質 A を定性的又は定量的に検出するための検出装置であって、以下 ~ のいずれかの構成を有する、被検物質の検出装置である。

【0022】 毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部を設けた検出装置。

【0023】 毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、請求項 5 に記載の第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた検出装置。

【0024】 毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、被検液の移動方向に沿って順に、請求項 1 に記載の B - 酵素を可溶に保持した結合対形成部と、請求項 5 に記載の第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた検出装置。

【0025】（第 8 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 8 発明（請求項 8 に記載の発明）の構成は、前記第 7 発明に係る検出部が、多孔性支持体と、これに付設された、小面積で薄い多孔性材料からなり酵素基質を保持した検出シートと、この検出シートに接触させた過酸化水素電極からなる、被検物質の検出装置である。

【0026】（第 9 発明の構成）上記課題を解決するための本願第 9 発明（請求項 9 に記載の発明）の構成は、前記第 7 発明又は第 8 発明に係る多孔性支持体の所要部分には、被検液を多孔性支持体に供給するための試料供給部、及び / 又は、被検液の毛細管現象による移動を促進するための試料吸引部を設けた、被検物質の検出装置である。

【0027】なお、「所要部分」とは、通常は、試料供給部については多孔性支持体における被検液移動方向に対する最上流部であり、試料吸引部については多孔性支持体における被検液移動方向に対する最下流部である。

【0028】

【発明の作用・効果】（第 1 発明の作用・効果）第 1 発明の被検物質の検出方法は、免疫クロマトグラフィーの原理を利用し、かつ酵素標識を利用して電極により検出するので、例えば種々の病気の診断の目安となる血液、尿、唾液等の体液中の被検物質を、安価、簡便、迅速に

検出でき、しかも被検物質を定性的にも定量的にも検出できる。そして例えば、家庭用等に好適なディスプレイ装置を構成することも容易である。

【0029】被検液を過酸化水素電極に接触させると、被検液中に夾雑する還元物質により電極は少量のベースライン電流を出力する。この系に酸化還元酵素と酵素基質が加わると、酸化反応により被検液中の酸素が消費され、その酸素濃度の低下が過酸化水素電極からの電流の増大として出力される。この場合、電流変化の初速度、又は酵素 - 基質反応開始より一定時間後（例えば、3 ~ 5 分後）の電流値を測定することにより、酸化還元酵素の濃度を知ることができる。電流変化の初速度を測定するには、0.5 ~ 2 分間（例えば約 1 分間）にわたって電流を測定すれば良い。

【0030】このように非常に短時間に測定可能であるため、酵素反応による酸素消費量は、検出部に到達した被検液中への空気中酸素の溶解量に比較して極めて少ない。更に、測定中における空気中酸素の被検液中への溶解も期待できる。そのため、開放系で測定することは、むしろ有利であると考えられる。

【0031】又、酵素標識として酸化還元酵素を用い、かつ過酸化水素電極により検出するので、例えば酸素電極により検出する場合に比較して、更に検出部に到達した酵素量に比例した電流量が得られると言う利点を期待できる。

【0032】（第 2 発明の作用・効果）第 2 発明の被検物質の検出方法においては、小面積で薄い多孔性材料からなる検出シートにおいて酵素反応を行わせて過酸化水素を発生させるので、多孔性支持体そのものは、測定時の操作等に不便を来さない程度の厚さと面積に設計しても支障がない。そして、被検液量を例えば 200 μ L 以下と言うレベルに低減させることができる。もちろん、被検物質の検出に当たり被検液を攪拌する必要はない。更に、小面積で薄い検出シートには、空気中酸素の十分な供給を確保することができる。

【0033】（第 3 発明の作用・効果）第 3 発明のように、上記検出シートの面積は 5 平方 mm 以下とし、その厚さを 0.5 mm 以下とすることが、被検液量の低減のために特に好ましい。又、検出部に到達した被検液中への空気中酸素の溶解量に比較して、酵素反応による酸素消費量を極めて少なくできることにより、安定的に定性あるいは定量することができる等の点からも、特に好ましい。

【0034】（第 4 発明の作用・効果）第 4 発明によって、第 1 発明 ~ 第 3 発明に係る被検物質の検出方法の一つの有力な実施形態が提供される。この実施形態においては、後述する第 7 発明の検出装置を利用することができる。

【0035】（第 5 発明の作用・効果）第 5 発明によって、第 1 発明 ~ 第 3 発明に係る被検物質の検出方法の一

つの有力な実施形態が提供される。この実施形態においては、後述する第 7 発明の 検出装置を利用することができる。

【0036】(第 6 発明の作用・効果) 第 6 発明によって、第 1 発明～第 3 発明に係る被検物質の検出方法の一つの有力な実施形態が提供される。この実施形態においては、後述する第 7 発明の 検出装置を利用することができる。

【0037】(第 7 発明の作用・効果) 第 7 発明の 検出装置のいずれかに係る被検物質の検出装置によって、第 1 発明～第 6 発明に係る被検物質の検出方法の具体的な実施手段が提供される。これらの被検物質の検出装置は、いずれも簡便な構成であり、非常に安価に提供できる。従って、家庭用等に好適なディスプレイ装置として利用できる。しかも、定性的にも定量的にも、迅速に被検物質を検出することができる。

【0038】(第 8 発明の作用・効果) 第 8 発明の被検物質の検出装置は、上記第 7 発明の作用・効果に加え、例えば 200 μ L 以下と言う非常に微量の被検液によっても、被検物質を正確に検出することができる。

【0039】(第 9 発明の作用・効果) 多孔性支持体が試料供給部を備える場合には、検出装置に対する被検液の供給操作が便利であり、多孔性支持体が試料吸引部備える場合には、検出装置に供給した被検液の移動が迅速になって更に迅速に被検物質を検出できる。

【0040】

【発明の実施の形態】次に、第 1 発明～第 9 発明の実施の形態について説明する。以下において単に「本発明」と言うときは、第 1 発明～第 9 発明を一括して指している。

【0041】〔被検物質の検出方法及び検出装置〕本発明における被検物質の検出方法は、少なくとも以下の第 1 工程～第 3 工程を含む。他の任意の前工程、後工程あるいは中間工程を含んでも構わない。

【0042】第 1 工程：被検液中の被検物質 A を、酸化還元酵素で標識された特異的結合対形成物質 B (B - 酵素) と反応させて、酵素標識された特異的結合対 (A - B - 酵素) を形成させる工程。第 2 工程：第 1 工程後の被検液中に残存する遊離の B - 酵素を特異的結合対形成反応を利用して固定することにより除外する工程。第 3 工程：被検液中の A - B - 酵素を多孔性支持体の検出部において酵素基質に接触させ、その際の過酸化水素発生量を過酸化水素電極により検出して、被検液中における被検物質 A を定性的又は定量的に検出する工程。

【0043】上記の第 1 工程～第 3 工程のうち、少なくとも第 3 工程は本発明の検出装置を用いて、即ち多孔性支持体の検出部において行う。第 1 工程のみ、あるいは第 1 工程及び第 2 工程は、本発明の検出装置を利用して行うこともできるが、本発明の検出装置を利用せずに前処理として行うこともできる。

【0044】即ち、上記の第 1 工程～第 3 工程は、例えば次の三通りの実施形態のいずれかとして行うことができる。

【0045】第 1 の実施形態：予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、次に特異的結合対形成反応を利用した任意の分離手段により第 2 工程を行い、次にこの被検液を多孔性支持体の検出部に供給して第 3 工程を行う。この実施形態において、第 1 工程は例えば適宜な小容量空間中で被検液に B - 酵素を添加・混合して行うことができる。第 2 工程における「分離手段」としては、例えば A - B - 酵素を通過させると共に遊離の B - 酵素を固定するカラムクロマトグラフィーを利用できる。

【0046】この第 1 の実施形態においては、第 3 工程を行うために、前記第 7 発明の 検出装置を用いることができる。この検出装置は、毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部を設けた検出装置である。

【0047】第 2 の実施形態：予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、次に被検液を多孔性支持体の分離部 (被検物質 A と同様の特異的結合対形成能力を有する第 3 物質 A' を固定した部分) に供給して第 2 工程を行い、次にこの被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行う。この実施形態において、第 1 工程は第 1 の実施形態の場合と同様に行うことができる。

【0048】この第 2 の実施形態においては、第 2 工程及び第 3 工程を行うために、前記第 7 発明の 検出装置を用いることができる。この検出装置は、毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、上記第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた検出装置である。

【0049】第 3 の実施形態：被検液を多孔性支持体の結合対形成部 (B - 酵素を可溶に保持した部分) に供給して第 1 工程を行い、次に被検液を毛細管現象により多孔性支持体の分離部 (B - 酵素に対する特異的結合対形成能力を有する第 3 物質 A' を固定した部分) に供給して第 2 工程を行い、次にこの被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行う。

【0050】この第 3 の実施形態においては、第 1 工程～第 3 工程を行うために、前記第 7 発明の 検出装置を用いることができる。この検出装置は、毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、被検液の移動方向に沿って順に、上記 B - 酵素を可溶に保持した結合対形成部と、上記第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた検出装置である。

【0051】〔多孔性支持体〕多孔性支持体は、本発明

に係る検出装置の本体部分を構成するものであって、毛細管現象によって液体の移動を許す多孔性材料からなる限りにおいて、使用する材料の種類は限定されない。例えば、有機又は無機の適当な材料からなる粉粒体又は繊維を柱状、板状等に成形したり、又はこのような形状を有するハウジングに充填して多孔性支持体を構成することもできる。有機又は無機のポーラスな剛体材料を柱状、板状等に成形して多孔性支持体を構成することもできる。

【0052】特に好ましい多孔性支持体は、各種の合成繊維又は天然繊維を用いてシート状に形成した濾紙である。これらの濾紙は、安価であり、薄くかつ小面積に形成し易く、しかも毛細管現象による液体の移動が容易・迅速である。ニトロセルロース繊維、酢酸セルロース繊維、セルロース繊維等の親水性の繊維からなる濾紙が好ましい。

【0053】他の好ましい多孔性支持体として、ガラス繊維フィルター、ポリアミドフィルター、ポリスルホンフィルター、ポリプロピレンフィルター、ポリ塩化ビニルフィルター、多孔性セラミック、カーボンファイバー、金属ウール等を例示することができる。

【0054】多孔性支持体の形状及びサイズは限定されない。濾紙等を用いて多孔性支持体をシート状に形成する場合、好ましくは、全体として細長い矩形に形成し、その長さを30～150mm程度、その幅を2～5mm程度、その厚さを0.2～2mm程度とする。

【0055】多孔性支持体が軟弱な場合は、これをポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル等のプラスチック基板上に構成することもできる。

【0056】多孔性支持体には、少なくとも、酵素基質を保持すると共に過酸化水素電極を接触させた検出部を設ける。多孔性支持体にはその他にも、前記した検出方法の実施形態に対応して、前記第3物質A'を固定した分離部や、前記B-酵素を可溶に保持した結合対形成部を設けることができる。多孔性支持体には更に、被検液を多孔性支持体に供給するための試料供給部、及び/又は、被検液の毛細管現象による移動を促進するための試料吸引部を設けることもできる。

【0057】上記した多孔性支持体の各部は、それが設けられる場合には、毛細管現象による被検液の移動方向に沿い、上流側から加硫側へ向かい、試料供給部/結合対形成部/分離部/検出部/試料吸引部、の順序で設定される。これら多孔性支持体の各部の境界は互いに区画される必要はないが、着色等により視覚的に区画しても良い。

【0058】〔検出部、検出シート、過酸化水素電極〕上記した多孔性支持体の検出部は、多孔性支持体における検出部区域に酵素基質を保持させて過酸化水素電極を接触させる実施形態であっても良い。より好ましくは、多孔性支持体における検出部区域に検出シートを付設

し、この検出シートに過酸化水素電極を接触させる実施形態とする。

【0059】検出シートは、多孔性支持体の検出部区域に比較して小面積の（更に好ましくは、小面積で薄い）濾紙等の多孔性材料からなる。検出シートの構成材料として、例えばニトロセルロース濾紙等が好ましく例示される。検出シートのサイズは、十分に小面積で薄い限りにおいて限定されないが、その面積が5平方mm以下であり、その厚さが0.5mm以下であることが特に好ましい。

【0060】過酸化水素電極としては、この種の目的で慣用されている通常の構成のものを使用すれば良い。特に、小型に構成され、その感知表面が検出シートに対応して小面積（例えば、4平方mm以下）のものを好ましく利用できる。

【0061】〔被検物質A、特異的結合対形成物質B、第3物質A'〕被検物質Aとしては、抗原、抗体、受容体、該受容体に対するリガンド等のように、抗原-抗体又は受容体-リガンド等のような特異的な結合対を形成し得る物質を、限定なく対象とすることができる。特に有用な被検物質Aとして、各種疾患や心身状態の判定指標となる体液成分、例えば、糖尿病性腎症の初期マーカーとして有用な尿中アルブミン等を例示することができる。被検物質Aを含む被検液の種類は限定されないが、ヒト又は動物の唾液、血液（血清や血漿を含む）、尿等の体液が代表的である。

【0062】特異的結合対形成物質Bとは、被検物質Aに対して特異的に結合対を形成することができる物質である。即ち、被検物質Aが抗原であればその抗体を、被検物質Aが抗体であればその抗原を、被検物質Aが受容体であればそれに対するリガンドを、被検物質Aが特定受容体に対するリガンドであれば当該受容体を、それぞれ特異的結合対形成物質Bとして利用できる。

【0063】本発明の一定の実施形態においては、第3物質A'が使用される。この第3物質A'は、特異的結合対形成物質Bに対して被検物質Aと同様の特異的結合対形成能力を有する物質であれば良い。被検物質Aと同一物質であっても良い。

【0064】〔酸化還元酵素〕本発明において、酸化還元酵素は特異的結合対形成物質Bに結合させて用いられ、結果的に酵素標識された特異的結合対（A-B-酵素）を形成する。そして検出部における酵素基質との接触によって特定量の過酸化水素を発生させ、これを過酸化水素電極に検出させる。

【0065】使用される酸化還元酵素の種類は限定されない。好ましい例として、グルコースオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アシル-COOオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、シュウ酸オキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ等

を挙げることができる。

【0066】〔酵素基質〕本発明において、酵素基質は多孔性支持体における検出部の部分に保持され、あるいはこの部分に付設した検出シートに保持される。被検液に対して可溶に保持されている限りにおいて保持の形態は限定されない。好ましくは、多孔性支持体の検出部又は検出シートを酵素基質溶液に浸漬した後、溶媒を乾燥させることにより酵素基質を保持させる。

【0067】酵素基質の種類は、酸化還元酵素の種類の種類に従って決まる。例えば、グルコースオキシダーゼ 10 に対してはグルコースを用いる。キサンチンオキシダーゼに対してはキサンチンを用いる。アミノ酸オキシダーゼに対してはアミノ酸を用いる。アスコルビン酸オキシダーゼに対してはアスコルビン酸を用いる。アシル - C o A オキシダーゼに対してはアシル C o A を用いる。コレステロールオキシダーゼに対してはコレステロールを用いる。ガラクトースオキシダーゼに対してはガラクトースを用いる。シュウ酸オキシダーゼに対してはシュウ酸を用いる。ザルコシンオキシダーゼに対してはザルコシンを用いる。

【0068】

【発明の有益な実施態様】本発明は、以下のような有益な態様において実施することができる。以下の各番号に係る実施態様において「上記」と言う時は、該当する内容を含む各先行番号に係る実施態様のすべてを、それぞれ択一的に指している。

【0069】1) 被検液中の被検物質 A を酸化還元酵素標識付きの酵素特異的結合対形成物質 B - 酵素と反応させて A - B - 酵素を形成させる工程、この工程後の被検液中に残存する遊離の B - 酵素を特異的結合対形成反応 30 を利用して固定することにより除外する工程、及び、被検液中の A - B - 酵素を多孔性支持体の検出部において酵素基質に接触させ、その際の過酸化水素発生量を過酸化水素電極により検出して、被検液中における被検物質 A を定性的又は定量的に検出する工程、を含む被検物質の検出方法。

【0070】2) 上記多孔性支持体が、濾紙、とりわけニトロセルロース繊維からなる濾紙である。

【0071】3) 上記濾紙からなる多孔性支持体が細長い矩形であり、長さ 30 ~ 150 mm 程度、幅 2 ~ 5 mm 程度、厚さ 0.2 ~ 2 mm 程度である。

【0072】4) 上記多孔性支持体の検出部では、多孔性支持体そのものに酵素基質を保持させ、これに過酸化水素電極を接触させる。

【0073】5) 上記多孔性支持体の検出部では、小面積で薄い多孔性材料からなり酵素基質を保持した検出シートを付設し、これに過酸化水素電極を接触させる。

【0074】6) 上記検出シートの面積が 5 平方 mm 以下で、厚さが 0.5 mm 以下である。

【0075】7) 上記検出シートが、濾紙、とりわけニ 50

トロセルロース繊維からなる濾紙である。

【0076】8) 上記 1) の検出方法において、予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、特異的結合対形成反応を利用した任意の分離手段により第 2 工程を行い、この被検液を多孔性支持体の検出部に供給して第 3 工程を行う。

【0077】9) 上記 1) の検出方法において、予め被検液に B - 酵素を添加して第 1 工程を行い、被検液を多孔性支持体の分離部に供給して第 2 工程を行い、この被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行う。

【0078】10) 上記 1) の検出方法において、被検液を多孔性支持体の結合対形成部に供給して第 1 工程を行い、被検液を毛細管現象により多孔性支持体の分離部に供給して第 2 工程を行い、この被検液を毛細管現象により多孔性支持体の検出部に移動させて第 3 工程を行う。

【0079】11) 上記被検物質 A、酵素特異的結合対形成物質 B が、抗原、抗体、受容体又は該受容体に対するリガンドである。

【0080】12) 上記酸化還元酵素が、グルコースオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アシル - C o A オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、シュウ酸オキシダーゼ又はザルコシンオキシダーゼである。

【0081】13) 上記酵素基質が、グルコース、キサンチン、アミノ酸、アスコルビン酸、アシル C o A、コレステロール、ガラクトース、シュウ酸又はザルコシンである。

【0082】14) 上記過酸化水素電極が、小型で、その感知表面が検出シートに対応して小面積（例えば、4 平方 mm 以下）のものである。

【0083】15) 毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部を設けた被検物質の検出装置。

【0084】16) 毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた被検物質の検出装置。

【0085】17) 毛細管現象による液体の移動を許す多孔性支持体に、被検液の移動方向に沿って順に、B - 酵素を可溶に保持した結合対形成部と、第 3 物質 A' を固定した分離部と、酸化還元酵素の酵素基質を保持させると共に過酸化水素電極を接触させた検出部とを設けた被検物質の検出装置。

【0086】18) 上記被検物質の検出装置において、検出部が、多孔性支持体と、これに付設された、小面積で薄い多孔性材料からなり酵素基質を保持した検出シ

トと、この検出シートに接触させた過酸化水素電極からなる。

【0087】19) 上記多孔性支持体の所要部分には、被検液を多孔性支持体に供給するための試料供給部を設けた。

【0088】20) 上記多孔性支持体の所要部分には、被検液の毛細管現象による移動を促進するための試料吸引部を設けた。

【0089】

【実施例】〔抗体の作製〕Balb/Cマウスにヒトアルブミンを感作させ、その脾臓を摘出し、マウスミエロマ細胞と融合させて抗アルブミン抗体を産生するハイブリドーマを得た。ハイブリドーマの内、アフィニティの高い抗体を産生するものを選択してモノクローン化した。このハイブリドーマ細胞をマウス腹腔内に注入して、数週間後に腹水を採取した。この腹水から、ProteinA固定カラムにより抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体（以下、「モノクローナル抗体」と言う）を精製した。

【0090】〔酵素標識抗体の作製〕上記により得たモノクローナル抗体のグルコースオキシダーゼによる標識を次のようにして行った。即ち、2mgのグルコースオキシダーゼを含む0.8mLの水溶液に100μLの0.1mol/L NaIO₃を添加し、25℃にて30分間反応させた。これに50μLのエチレングリコールを添加して25℃にて5分間インキュベートした後に、2mmol/L 酢酸ナトリウム（pH4.4）で脱塩ゲル濾過を行って、アルデヒド化グルコースオキシダーゼを得た。

【0091】2mgのアルデヒド化グルコースオキシダーゼに対して、10mgの前記モノクローナル抗体を20mLのPBS（Phosphate buffered saline）に溶解させた溶液と、100μLの1mol/L炭酸ナトリウム溶液（pH9.5）とを添加し、25℃にて2時間反応させた。

【0092】次に、4mg/mLのNaBH₄水溶液40μLを加えて4℃にて2時間反応させた後に濃縮し、ゲル濾過を行って、グルコースオキシダーゼによって標識された抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体（以下、「酵素標識抗体」と言う）を得た。

【0093】〔測定1〕緩衝液（例えば、10mMリン酸ナトリウム、pH7.0）液中に0~200mg/mLにわたる種々の濃度にアルブミンを溶解させた溶液を、上記により得た酵素標識抗体と反応させた。次にこの反応液をヒトアルブミンを固定化したカラムに通すことにより、遊離の酵素標識抗体を除去し、アルブミンと酵素標識抗体との結合対（以下、「酵素標識結合対」と言う）を含有する溶液を得た。

【0094】この「測定1」で使用した検出装置を図1に示す。この測定装置1は、電極感知面積が0.04平方mmである過酸化水素電極2上に、グルコース溶液を

吸収させた後に乾燥させた小濾紙片である検出シート3を重ね、更にセルロース繊維製の濾紙からなる多孔材料4で覆った小型チップ状のものである。検出シート3はポリカーボネートからなり、その厚さは0.1mmで、その面積が4平方mmである。多孔材料4の幅は約5mmである。

【0095】上記多孔材料4上に前記の酵素標識結合対を含有する溶液を滴下し、その前後にわたって過酸化水素電極2の出力電流を経時的に記録した。又、緩衝液のみを滴下した場合の同様な出力電流を経時的に記録し、これをベースラインとした。その結果を図4に示す。図4の右欄外の数値は溶液中のアルブミン濃度を示す。電流変化の初速度、及び一定時間後の電流変化量のいずれも、アルブミンの濃度に依存してグラフが上昇することを確認した。

【0096】〔測定2〕上記した「測定1」の場合と同様に種々の濃度にアルブミンを緩衝液に溶解させた溶液を準備し、酵素標識抗体と反応させて反応液を得た。

【0097】この「測定2」で使用した検出装置を図2に示す。この測定装置1'は、長さ38mm、幅8mm、厚さ1mmの長方形の濾紙からなる多孔性支持体5の一端側を試料供給部6とし、その下流側（図の右方側）を分離部7とし、多孔性支持体5の他端側を検出部8としたものである。分離部7においてはアルブミンが固定され、遊離の酵素標識抗体を固定できるようになっている。又、検出部8には、前記図1に示す検出シート3と過酸化水素電極2が設けられている。

【0098】上記多孔性支持体5の試料供給部6上に前記の反応液を滴下し、その前後にわたって過酸化水素電極2の出力電流を経時的に記録した。又、緩衝液のみを滴下した場合の同様な出力電流を経時的に記録し、これをベースラインとした。その結果を図5に示す。図5の右欄外の数値は溶液中のアルブミン濃度を示す。電流変化の初速度、及び一定時間後の電流変化量のいずれも、アルブミンの濃度に依存してグラフが上昇することを確認した。

【0099】〔測定3〕上記した「測定1」の場合と同様に種々の濃度にアルブミンを緩衝液に溶解させた溶液を準備した。

【0100】この「測定3」で使用した検出装置を図3に示す。この測定装置1''は、長さ43mm、幅8mm、厚さ1mmの長方形の濾紙からなる多孔性支持体5の一端側を前記と同様の試料供給部6とし、その下流側（図の右方側）に酵素標識抗体を可溶に保持した結合対形成部9を設定し、更にその下流側を前記と同様の分離部7とし、多孔性支持体5の他端側を検出部8としたものである。検出部8には、前記図1に示す検出シート3と過酸化水素電極2が設けられている。

【0101】上記多孔性支持体5の試料供給部6上に前記のアルブミン溶液を滴下し、その前後にわたって過酸

化水素電極 2 の出力電流を経時的に記録した。又、緩衝液のみを滴下した場合の同様な出力電流を経時的に記録し、これをベースラインとした。その結果を図 6 に示す。図 6 の右欄外の数値は溶液中のアルブミン濃度を示す。電流変化の初速度、及び一定時間後の電流変化量のいずれも、アルブミンの濃度に依存してグラフが上昇することを確認した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明に係る被検物質の検出装置の一実施例を簡略化して示す図である。

【図 2】本発明に係る被検物質の検出装置の一実施例を簡略化して示す図である。

【図 3】本発明に係る被検物質の検出装置の一実施例を簡略化して示す図である。

【図 4】本発明に係る被検物質の検出方法の一実施例の*

*結果を示すグラフ図である。

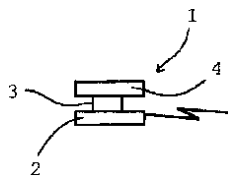
【図 5】本発明に係る被検物質の検出方法の一実施例の結果を示すグラフ図である。

【図 6】本発明に係る被検物質の検出方法の一実施例の結果を示すグラフ図である。

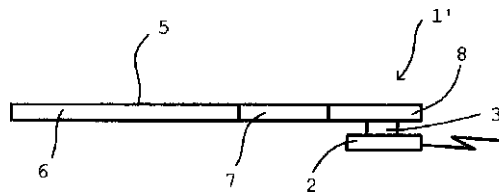
【符号の説明】

1, 1', 1''	測定装置
2	過酸化水素電極
3	検出シート
4	多孔材料
5	多孔性支持体
6	試料供給部
7	分離部
8	検出部
9	結合対形成部

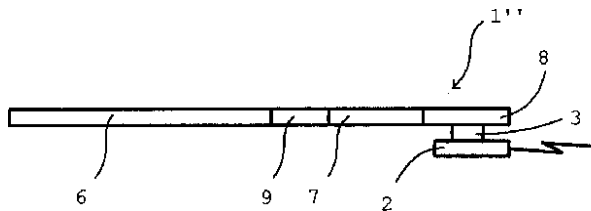
【図 1】



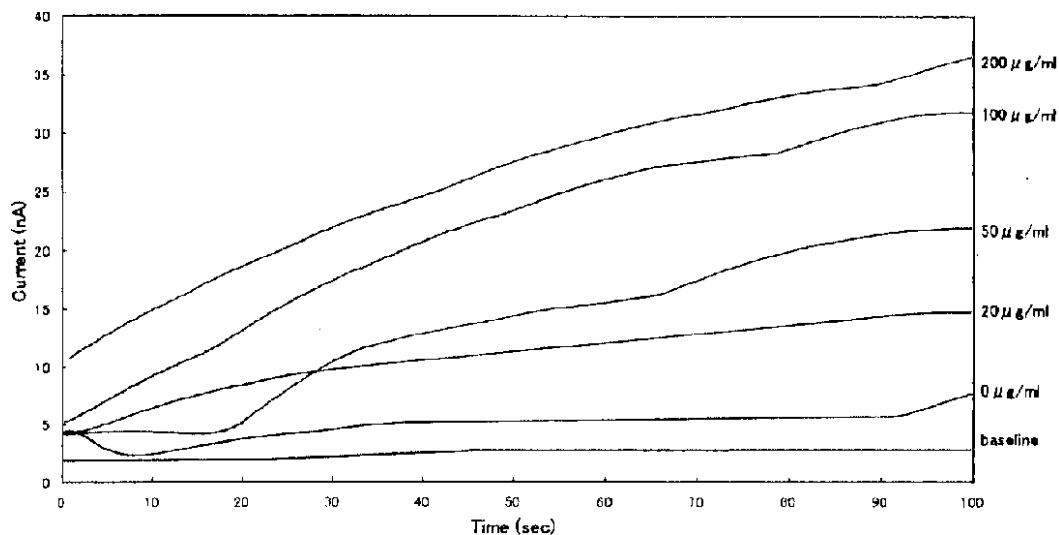
【図 2】



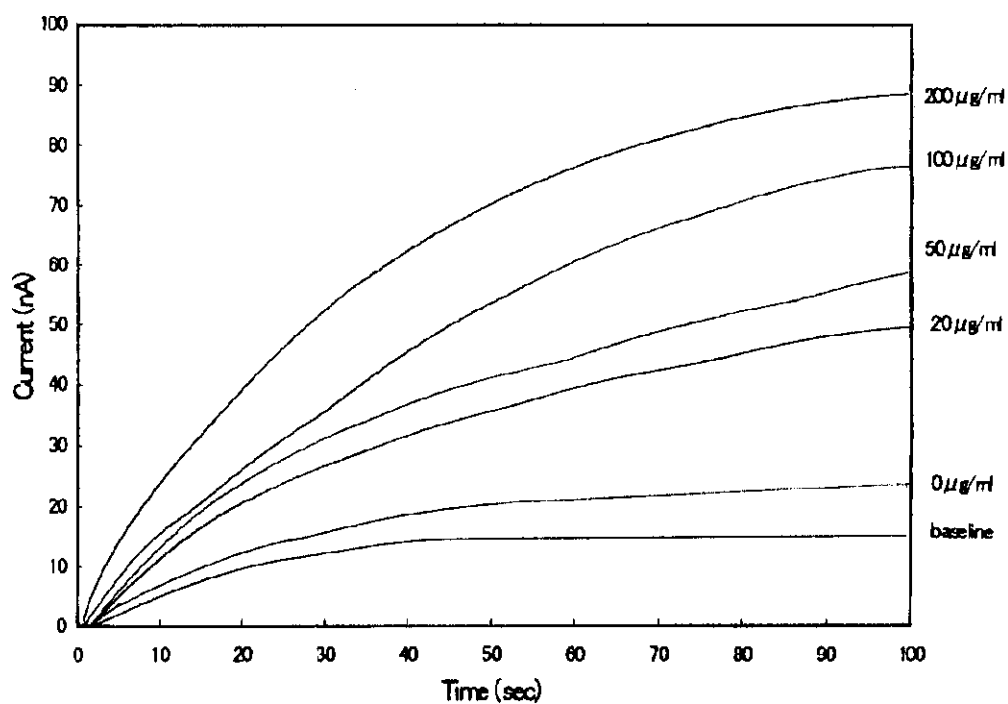
【図 3】



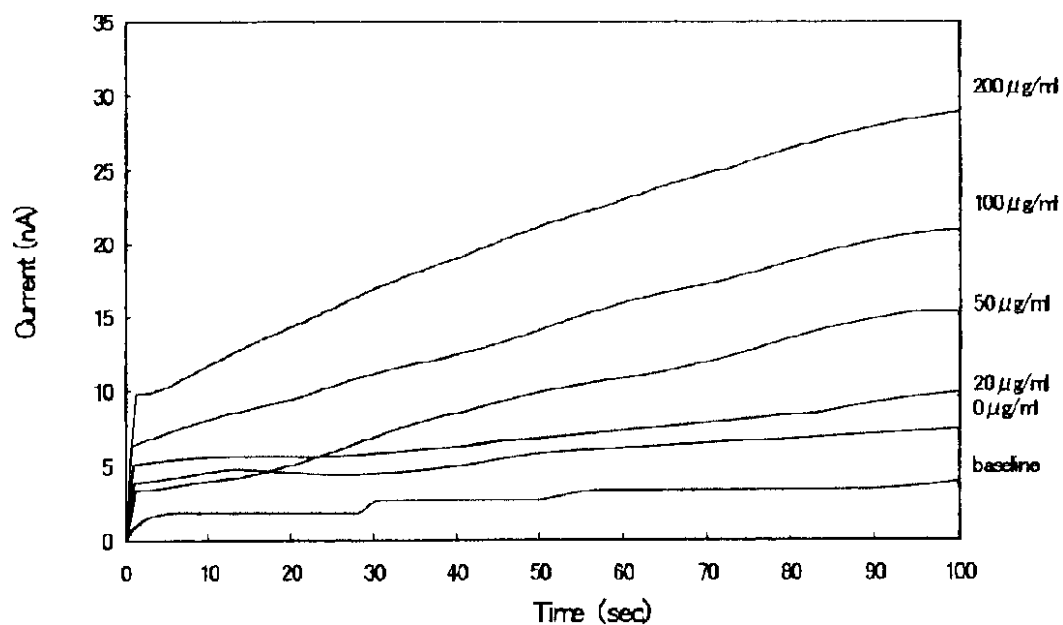
【図 5】



【図4】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 浅見 修
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 山田 幸生
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 株式会社豊田中央研究所内
Fターム(参考) 2G045 FB01 FB03 FB05

专利名称(译)	用于检测测试物质的方法和设备		
公开(公告)号	JP2002340898A	公开(公告)日	2002-11-27
申请号	JP2001152205	申请日	2001-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社豊田中央研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社豊田中央研究所		
[标]发明人	星野文彦 嶋村隆 浅見修 山田幸生		
发明人	星野 文彦 嶋村 隆 浅見 修 山田 幸生		
IPC分类号	G01N33/543 G01N27/416 G01N33/483 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/483.E G01N33/53.T G01N27/46.336.B G01N27/46.336.Z G01N27/416.336.B G01N27/416.336.Z		
F-TERM分类号	2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05		
代理人(译)	北川修		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够通过将过氧化氢电极与免疫层析原理结合而简单且快速地检测被测物质的检测方法和检测装置。 解决方案：将测试液体中的测试物质A与氧化还原酶标记的特异性结合对形成物质B-酶反应形成AB-酶，并形成残留在测试液体中的游离B。 -利用特异性结合对形成反应将酶固定化并排除，通过使测试溶液中的AB-酶与多孔载体的检测部分中的酶底物接触来检测产生的过氧化氢的量，一种检测测试物质的方法，其包括检测测试物质A。 一种用于检测被测物质的设备，包括：多孔支撑物，其容纳用于氧化还原酶的酶底物；和检测单元，其与过氧化氢电极接触。 优选将由具有小面积的薄的多孔材料制成并保持酶底物的检测片附着到检测部分，并使过氧化氢电极与其接触。

