

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年10月18日 (18.10.2007)

PCT

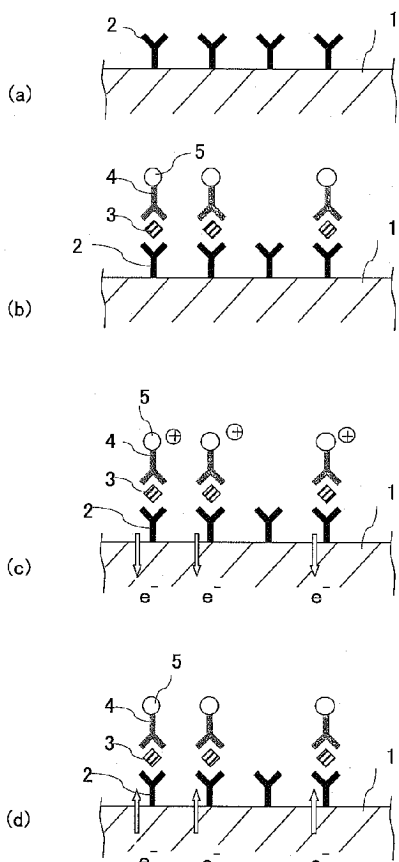
(10) 国際公開番号
WO 2007/116811 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/416 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/056992
- (22) 国際出願日: 2007年3月29日 (29.03.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2006-106583 2006年4月7日 (07.04.2006) JP
特願2006-265183 2006年9月28日 (28.09.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 Ishikawa (JP). 有限会社バイオデバイステクノロジー (BIODEVICE TECHNOLOGY LTD.) [JP/JP]; 〒9231100 石川県能美市旭台2-1-3 Ishikawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 民谷 栄一 (TAMIYA, Eiichi) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 永谷 尚紀 (NAGATANI, Naoki) [JP/JP]; 〒7010142 岡山県岡山市白石西新町14-103 スカイコートマンション201号 Okayama (JP). 由比 光子 (YUHI, Teruko) [JP/JP]; 〒9218105 石川県金沢市平和町3-20-10 平和宿舎C54棟44号 Ishikawa (JP). ケルマンカーン (KERMAN, Kagan) [TR/CA]; サスカチュワン州 エス7エイチ1ビー1 サスカトゥーン市7番通り東8-2903 ブレフォールトパーク Saskatchewan (CA). 井手上 公太郎 (IDEGAMI, Koutarou) [JP/JP]; 〒9202121 石川県白山市鶴来本町4丁目千目18番地 エウエーリオン2棟102号室 Ishikawa (JP). 近

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINATION OF SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 被検物質の測定方法



(57) Abstract: [PROBLEMS] To achieve a highly sensitive and accurate determination of a substance without the need of complicate procedures. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] The presence or concentration of a substance (3) of interest can be determined by gathering metal microparticles (5) in an amount corresponding to the amount of the substance (3) contained in a sample solution around the surface of a working electrode (1) to oxidize the metal particles (5) electrochemically, measuring a current value produced by electrochemically reducing the oxidized metal, and determining the presence or concentration of the substance (3) based on the current value. It is preferred that the electrochemical oxidization of the metal microparticles (5) is conducted while maintaining the potential of the working electrode (1) at a value equal to a potential employed for the electrochemical oxidization of the metal microparticles (5).

(57) 要約: 【課題】 測定操作を煩雑とすることなく、高感度且つ正確な測定を可能とする。【解決手段】 試料溶液中の被検物質3に応じた量の金属微粒子5を作用電極1の表面近傍に集め、金属微粒子5を電気化学的に酸化した後、酸化した金属を電気化学的に還元する際に生じる電流値を測定し、電流値に基づいて被検物質3の有無又は濃度を調べる。作用電極1の電位を金属微粒子5が電気的に酸化する電位に保持することにより、金属微粒子5を電氣的に酸化することが好ましい。

WO 2007/116811 A1



江 みゆき (CHIKAE, Miyuki) [JP/JP]; 〒9231100 石川県能美市緑が丘 10-154 Ishikawa (JP).

(74) 代理人: 木森 有平, 外(KIMORI, Yuhei et al.); 〒9200024 石川県金沢市西念4丁目4番25号 西村ビル205号 木森国際特許事務所 Ishikawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

被検物質の測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、電気化学的手法を用いた被検物質の測定方法に関する。

背景技術

[0002] 試験溶液中の微量物質を簡便且つ高感度に測定する方法の1つとして、抗原抗体反応を利用した免疫測定法が知られている。免疫測定法としては、酵素で標識した抗体を用い、酵素反応に由来する発色や発光等の信号を得ることにより被検物質の検知や濃度測定を行うELISA法が、幅広い分野で採用されている。しかしながら、ELISA法では、発色や発光等の信号検出時に光学系を必要とするため、大型の測定機が必要となる。また、正確な定量を行う場合には、発色等の測定結果を電気的な信号に変換する作業が必要となる等、複雑な処理を行う必要がある。

[0003] そこで、発色標識や蛍光標識のような汎用の標識物質を用いた免疫測定法等において、検出に際して電気化学的測定法を利用する方法が提案されている。電気化学的測定に用いる装置はELISA等に用いられる機器に比べて小型化が可能であることから、測定機器の小型化と検出感度の向上との両立が期待される。例えば特許文献1においては、金属微粒子を化学的処理によって溶解した後、電気化学的測定を行い、得られた金属微粒子の酸化に伴うピーク電流に基づいて被検物質の定性分析又は定量分析を行っている。

[0004] なお、非特許文献1において、溶液中の金コロイド又は金コロイド標識抗体の還元ピーク電流を測定する方法が記載されている。

特許文献1:特表2004-512496号公報

非特許文献1:Bioelectrochemistry and Bioenergetics 38 (1995) 389-395

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、特許文献1においては、溶液等を用いた化学的処理により金属微粒子を完全に溶解する工程が電気化学的測定に先立って必要となるため、測定操作

が煩雑になるといった不都合がある。また、特許文献1においては、電気化学的測定により金属微粒子の酸化に伴う電流値を測定しているが、得られる酸化電流値には目的とする金属微粒子に由来する電流の他、測定に用いる抗体や測定溶液中の夾雑物に由来する電流のようなノイズも比較的多く含まれているため、誤検出を起こす場合もある。さらに、非特許文献1においては溶液中の金コロイド濃度と還元電流との関係を調べるに留まり、溶液中の被検物質の定量等を行うことについては記載されていない。

[0006] 本発明はこのような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、測定操作を煩雑とすることなく、高感度且つ正確な測定を行うことが可能な被検物質の測定方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 前述の目的を達成するために、本発明に係る被検物質の測定方法は、試験溶液中の被検物質に対応した量の金属微粒子を作用電極の表面近傍に集め、前記金属微粒子を電気化学的に酸化した後、酸化した金属を電気化学的に還元する際に生じる電流値を測定し、前記電流値に基づいて被検物質の有無又は濃度を調べることを特徴とする。

[0008] 以上のような被検物質の測定方法においては、先ず、例えば抗原抗体反応のような生体物質の相互作用を利用して、作用電極の表面近傍に被検物質量に対応した金属微粒子を集め、金属微粒子を構成する金属を電気化学的に酸化させた後、酸化した金属を還元する際の還元電流値を測定する。ここで得られる還元電流強度は、作用電極の近傍に集められた金属量を表すことから、これに基づいて被検物質の定量又は検出が実現される。ここで、金属微粒子の電気化学的酸化は、作用電極の表面近傍に金属微粒子を集めた状態で行うことが重要である。これにより、被検物質との反応に関与した金属微粒子の全てを作用電極表面との電子授受に関与させることができるため、結果として被検物質の高感度な測定が実現される。

[0009] なお、測定により得られる還元電流値に含まれるノイズは、従来の電気化学的測定により得られる酸化電流値に比較して少ないことから、本発明によれば被検物質の正確な検出を行うことができる。また、金属微粒子の酸化は作用電極の電位制御により

容易に実現することができるため、例えば化学的処理により酸化する場合等に比較して、測定操作の煩雑化は最小限に抑えられる。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、例えばELISAの検出工程において用いられるような大型の測定機器を必要とすることなく、簡便な操作にて試験溶液中の被検物質の高感度且つ正確な測定を実現することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の第1の実施形態を説明するための要部概略断面図であり、(a)は一次抗体を固定した作用電極、(b)は抗原抗体反応、(c)は作用電極表面近傍に集めた金属微粒子の酸化、(d)は還元電流の測定を示す。

[図2]本発明の第2の実施形態を説明するための要部概略断面図であり、(a)は抗原抗体反応、(b)は磁性微粒子の捕集、(c)は電極表面への磁性微粒子の供給、(d)は作用電極表面近傍に集めた金属微粒子の酸化、(e)は還元電流の測定を示す。

[図3](a)はイムノクロマトグラフィー用ストリップの概略平面図、(b)は概略側面図である。

[図4]本発明の第3の実施形態を説明するための要部概略断面図であり、(a)は一次抗体を固定したイムノクロマトグラフィー用ストリップ、(b)は抗原抗体反応、(c)は作用電極表面近傍に集めた金属微粒子の酸化、(d)は還元電流の測定を示す。

[図5]本発明の第4の実施形態を説明するための要部概略断面図であり、(a)は一次抗体を固定した作用電極及び対極、(b)は抗原抗体反応、(c)は作用電極表面への金属の析出、(d)は作用電極表面近傍に集めた金属微粒子の酸化、(e)は還元電流の測定を示す。

[図6]実験1～実験3において用いた印刷電極デバイスの平面図である。

[図7]作用電極電位と電流変化との関係を示す図である。

[図8]hCG濃度と電流変化との関係を示す図である。

[図9]実験2の結果を示す図であり、hCG濃度と電流変化との関係を示す図である。

[図10]実験3の結果を示す図であり、作用電極電位と電流変化との関係を示す図である。

[図11]実験4において用いた印刷電極デバイスの平面図である。

[図12]作用電極に対して対極を正電位とする操作前後の対極の表面又は作用電極の表面を示す写真であり、(a)は電圧印加前の対極、(b)は電圧印加後の対極、(c)は電圧印加後の作用電極の縁部分を示す。

[図13]測定溶液として塩酸を用いた場合と塩化カリウム水溶液を用いた場合とのサイクリックボルタンメトリーの比較結果を示す図である。

[図14]測定溶液として塩酸を用いた場合と塩化カリウム水溶液を用いた場合との微分パルスボルタンメトリーの比較結果を示す図である。

[図15]測定溶液として飽和塩化カリウム水溶液を用いた場合と1M塩化ナトリウム水溶液を用いた場合とを比較した特性図である。

[図16]金属コロイドの最適な粒径の検討結果を示す特性図である。

[図17]hCG濃度と電流値との関係を示す特性図である。

[図18](a)は本発明の測定方法によるhCG濃度と還元電流値との関係を示す図であり、(b)はELISA法によるhCG濃度と吸光度との関係を示す図である。

[図19](a)は作用電極電位と酸化電流値との関係を示す特性図であり、(b)は作用電極電位と還元電流値との関係を示す特性図である。

[図20]印加電位を1.2V、1.4V又は1.6Vに設定したときの、酸化電位印加時間と還元電流値との関係を示す特性図である。

[図21]試験溶液中のhCG濃度を62pg/ml、620pg/ml又は62ng/mlに設定したときの酸化電位印加時間と還元電流値との関係を示す特性図である。

[図22]測定溶液として塩酸を用いた場合の濃度を検討した特性図である。

符号の説明

- [0012] 1 作用電極、2 一次抗体、3 被検物質(抗原)、4 二次抗体、5 金属微粒子、11 磁性微粒子、12 容器、13 反応溶液、14 磁石、15 電気化学的測定用溶液、21 イムノクロマトグラフィー用ストリップ、22 メンブレン、23 判定部、24 コントロール部、31 対極、32 基板、41 印刷電極、42 作用電極、43 対極、44 参照電極、45 絶縁支持体、46 絶縁層、51 プレナー型印刷電極デバイス、52 絶縁被膜、53 作用電極、54 対極、55 参照極、56 絶縁支持基板

発明を実施するための最良の形態

[0013] 以下、本発明を適用した被検物質の測定方法について、図面を参照しながら詳細に説明する。

[0014] (第1の実施形態)

第1の実施形態では、被検物質に対する2種類の特異的結合物質を用意し、一方(第1の結合物質)を作用電極の表面に固定化しておくとともに、他方(第2の結合物質)には金属微粒子を標識し、標識体とする。具体的には、先ず、電気化学的測定において用いる作用電極1の表面に、被検物質3に対する第1の結合物質として一次抗体2を固定しておく(図1(a))。電極表面は非特異吸着を防ぐためにブロッキングする。また、被検物質3上の異なる部位を認識する第2の結合物質として二次抗体4を用意し、これに金属微粒子5を標識することにより標識体を用意しておく。

[0015] 次に、前記標識体及び未知量の被検物質3を含む試験溶液を作用電極1の表面に供給し、一次抗体2と接触させ、作用電極1上で抗原抗体反応を行う。標識体が被検物質3を介して一次抗体2に結合することにより、被検物質3の濃度に対応した量の金属微粒子5が作用電極1の近傍に集められた状態となる(図1(b))。

[0016] ここで、本発明においては、生体物質、合成物質等のあらゆる物質を被検物質とすることができる。被検物質に特異的に結合する結合物質(第1の結合物質、第2の結合物質)には、被検物質に応じて適切なものを選択する。試験溶液中の被検物質に応じた量の金属微粒子を集めるために、本実施形態では抗原と抗体との特異的結合を利用しているが、物質間で特異的に結合するものであればこの組合せに限らず、例えば、核酸-核酸、核酸-核酸結合タンパク質、レクチン-糖鎖、又はレセプター-リガンドの特異的結合を利用してもよい。被検物質-特異的結合物質の関係の順序は、前記と逆でもよい。

[0017] 標識物質として用いられる金属微粒子5としては特に制限されないが、例えば金、白金、銀、銅、ロジウム、パラジウム等の微粒子やそれらのコロイド粒子、量子ドット等を用いることができる。なかでも粒径10nm~60nmの金微粒子、特に粒径40nm程度の金微粒子を用いることが好ましい。

[0018] 抗原抗体反応を行い、作用電極1の表面を必要に応じて洗浄した後、例えば電気

化学的測定用の溶液と作用電極1と接触させた状態とする。溶液と作用電極1とを接触させるには、作用電極1の表面に溶液を滴下する、作用電極1を溶液に浸す等、任意の手段をとることができる。

[0019] 次に、金属微粒子5を電気化学的に酸化させる。例えば、参照電極に対する作用電極1の電位を、金属微粒子5が電気化学的に酸化する電位に所定時間保持する。このことにより、作用電極1の表面近傍に集めた金属微粒子5を完全に酸化する(図1(c))。このとき、図示は省略するが、対極及び参照電極も溶液に接触させた状態とする。

[0020] 金属微粒子5を電気化学的に酸化させた後、酸化した金属を還元する際に生じるピーク電流値に基づいて、被検物質の有無又は濃度を測定する(図1(d))。具体的には、例えば、作用電極1の電位を負方向に変化させていき、電位変化に伴う電流変化を測定する。電極電位を負方向に変化させていくと、前述の電位制御により酸化溶出した金属が還元されることにより還元電流が流れるので、これを測定する。試験溶液中の被検物質が多く、作用電極1の近傍に集められた金属微粒子が多いほど還元電流強度も大きくなることから、これに基づいて被検物質の定量又は検出が実現される。例えば、還元電流値と既知濃度の被検物質と関係を予め求めておき、測定された還元電流値と比較することにより、被検物質濃度を求めることができる。また、得られる還元電流値から試験溶液中の被検物質の有無を知ることができる。

[0021] 作用電極1の電位制御及び電気化学測定の際に用いる溶液としては、金属微粒子5を容易に電気化学的に酸化させることができることから、酸性溶液を用いることが好ましい。酸性溶液としては、金属微粒子5の種類等に応じて適宜選択すればよいが、例えば塩酸、硝酸、酢酸、リン酸、クエン酸、硫酸等を含む水溶液を用いることができる。金属微粒子5の電気化学的酸化のし易さを考慮すると、0.05規定～2規定の塩酸水溶液を用いることが好ましく、0.1規定～0.5規定の塩酸水溶液を用いることがより好ましい。

[0022] 一方、作用電極1の電位制御及び電気化学測定の際に用いる溶液としては、酸性溶液の他、塩素を含む中性溶液を用いることも可能である。塩素を含む中性溶液を用いることにより、酸性溶液を用いる場合に比べて大きな電流変化量が得られ、結果

として、より高感度な測定が達成される。また、酸性溶液を用いる場合、例えば低電位側における還元ピークの裾が上昇する等のようにピーク形状が非対称となったり、例えば0.1V付近においてノイズが発生することがある。これに対して、塩素を含む中性溶液を用いることで、還元ピークの裾が平坦となるとともに、前記ノイズ発生が抑えられるので、還元ピーク強度検出が簡便となる。さらに、酸性溶液やアルカリ溶液のような取扱いの難しい溶液の使用を回避することができ、測定操作を安全且つ簡便に実施することができる。塩素を含む中性溶液としては、例えばKCl、NaCl、LiCl等を用いたときに前記の効果をえられるが、特にKClを用いたときに効果が大きい。

[0023] 金属微粒子5を酸化させるに際して、作用電極1の電位は、金属微粒子5が酸化可能な電位とする。具体的には、作用電極1の電位は、使用する金属微粒子5の種類に応じて適宜最適な値に設定する必要があるが、例えば、銀塩化銀参照電極に対して+1～+2Vとすることが好ましい。作用電極1の電位を前記範囲内にすることにより、作用電極1の表面近傍に集めた金属微粒子5を完全に酸化溶出させることができ、被検物質3の検出感度を確実に向上させることができる。作用電極1の電位を前記範囲未満とした場合、測定時に還元電流のピークが現れないおそれがあり、逆に前記範囲を超えた場合、酸化させた金属微粒子5の泳動による拡散が起こり、作用電極1近傍における酸化物の濃度が低下してしまい、これにより還元電流のピークが小さくなるおそれがある。より好ましい範囲は、+1.2V～+1.6Vである。

[0024] 金属微粒子5を電気化学的に酸化させる具体的な手段としては、作用電極1の電位を金属微粒子5が酸化する電位に所定時間保持することが挙げられる。前記電位を所定時間保持する操作は、金属微粒子を十分に酸化させられるため、好ましい方法である。また、作用電極に金属微粒子が電気化学的に酸化する電位を印加するに際しては、前述したように作用電極の電位を所定の電位に保持する方法の他、例えばサイクリックボルタンメトリー等によって、作用電極の電位を時間経過に伴い変化させてもよい。作用電極の電位を時間経過に伴って変化させる場合には、金属微粒子が酸化する電位の範囲内(例えば、銀塩化銀参照電極に対し+1～+2V)において、作用電極の電位を変化させることが好ましい。さらに、金属微粒子を酸化させるに際しては、金属微粒子が電気化学的に酸化する電位を作用電極に複数回印加して

もよい。

- [0025] なお、金属微粒子5として粒径10nm～60nmの金微粒子を使用する場合、金微粒子を電気化学的に酸化させるに際して、0.1規定～0.5規定の塩酸溶液中で、銀塩化銀参照電極に対する前記作用電極の電位を+1.2V～+1.6Vとすることが好ましい。
- [0026] ここで、金属微粒子5を十分に酸化させるに際しては、金属微粒子5の量に応じて最適な電荷量を与えるように注意する必要がある。電荷量は電流を積分した値であるため、作用電極1に印加する電位が比較的低い電位であれば、金属微粒子を十分に酸化させるためには当該電位を長時間印加する必要がある。一方、作用電極1に印加する電位が比較的高い電位であれば、金属微粒子5を十分に酸化させるために必要な時間は短時間でよい。
- [0027] 金属微粒子5が電気化学的に酸化する電位に作用電極1の電位を保持する時間を1秒以上とすることで、金属微粒子を十分に酸化させることができ、検出感度を確実に向上させることができる。一方、印加時間を100秒以上としても得られる電流値は殆ど変わらない。したがって、1秒以上100秒以下が好ましい。前記電位の保持時間のさらに好ましい範囲は、40秒以上100秒以下である。
- [0028] 酸化した金属を電気化学的に還元する際に生じる電流を測定する方法としては、例えば、微分パルスボルタンメトリー、サイクリックボルタンメトリー等のボルタンメトリー、アンペロメトリー、クロノメトリー等が挙げられる。
- [0029] 以上のような第1の実施形態においては、作用電極上で抗原抗体反応等を行って作用電極の表面近傍に金属微粒子を集め、標識体に含まれる金属微粒子に由来する還元ピーク電流を測定するので、簡便且つ高感度に試験溶液中の被検物質を測定することができる。
- [0030] (第2の実施形態)
- 第2の実施形態は、試験溶液中の被検物質に応じた量の金属微粒子を作用電極の表面近傍に集める具体的な手段が第1の実施形態と相違している。すなわち、本実施形態においては、試験溶液中の被検物質に応じた量の金属微粒子を作用電極の表面近傍に集めるに際し、被検物質に対する2種類の結合物質を用意し、一方(

第1の結合物質)を磁性微粒子の表面に固定化しておくとともに、他方(第2の結合物質)を金属微粒子で標識して標識体を形成しておき、標識体と反応させた後の磁性微粒子を作用電極の表面に集めることでこれを実現している。以下、第2の実施形態について、図2を参照しながら説明する。なお、以下の各実施形態の説明では、前述した第1の実施形態と重複する説明は省略する。

- [0031] まず、磁性微粒子11の表面に、被検物質3に特異的に結合する第1の結合物質として一次抗体2を固定しておく。一方、磁性微粒子11に固定した一次抗体2とは異なる部位を認識する第2の結合物質として二次抗体4に金属微粒子5を標識することにより、標識体を用意しておく。
- [0032] 次に、所定の容器12内に反応溶液13を準備する。反応溶液13は、一次抗体2が固定化された磁性微粒子11と、金属微粒子5で標識した二次抗体4と、未知濃度の被検物質3を含む試験溶液とを混合したものであり、これを所定時間インキュベーションすることにより、磁性微粒子11上で抗原抗体反応を行う。この結果、標識体が被検物質3を介して磁性微粒子11に結合する(図2(a))。
- [0033] 次に、磁石14を用いて磁性微粒子11を反応溶液13から分離する(図2(b))。その後、分離した磁性微粒子11を電気化学的測定用の溶液に懸濁する。
- [0034] 次に、金属微粒子5を作用電極1の表面近傍に集める(図2(c))。具体的には、標識体が結合した磁性微粒子11を電気化学的測定用の溶液15に懸濁し、懸濁液を作用電極1の表面に滴下する等により供給する。その後、例えば所定時間静置して磁性微粒子11を沈殿させることにより、金属微粒子5が作用電極1の表面近傍に集められた状態が得られる。或いは、作用電極1の裏面に磁石を配置して磁性微粒子11を磁氣的に作用電極1の表面に吸着させれば、磁性微粒子11に結合した金属微粒子5を作用電極1の近傍に集める時間を短縮することができる。
- [0035] この後の工程は、前述した第1の実施形態と同様である。すなわち、金属微粒子5を電気化学的に酸化させる。好ましくは、参照電極に対する作用電極1の電位を、金属微粒子5が電気化学的に酸化する電位に所定時間保持する。このことにより、作用電極1の表面近傍に集めた金属微粒子5を完全に酸化する(図2(d))。このとき、図示は省略するが、対極及び参照電極も溶液に接触させた状態とする。

[0036] 電気化学的に酸化させた後、酸化した金属を還元する際に生じるピーク電流値に基づいて、被検物質の有無又は濃度を測定する(図2(e))。具体的には、作用電極1の電位を負方向に変化させていき、電位変化に伴う電流変化を測定する。以上のようにして、第1の実施形態と同様に、被検物質濃度及び被検物質の有無を知ることができる。

[0037] また、本実施形態においては、反応溶液中に懸濁することが可能な磁性微粒子11に一次抗体2を固定化して被検物質3を捕捉するので、作用電極1の表面に一次抗体2を固定化する場合に比較して、被検物質3と標識体との反応効率を高めることができる。

[0038] さらに、磁気的な分離が可能な磁性微粒子11を使用することで、磁性微粒子11の懸濁に必要な電気化学的測定用溶液の量を減らすことができる。すなわち、電気化学的測定用溶液中に磁性微粒子11(金属微粒子5)を高濃度に存在させることができるため、検出感度のさらなる向上を図ることができる。

[0039] (第3の実施形態)

第3の実施形態は、試験溶液中の被検物質に応じた量の金属微粒子を作用電極の表面近傍に集める具体的な手段が第1の実施形態と相違している。すなわち、第3の実施形態においては、試験溶液中の被検物質に応じた量の金属微粒子を作用電極の表面近傍に集めるに際し、被検物質に対する2種類の特異的結合物質を用意し、一方(第1の結合物質)をイムノクロマトグラフィー用ストリップの判定部に固定化しておくとともに、他方(第2の結合物質)を金属微粒子で標識して標識体を形成しておき、試験溶液及び標識体をストリップ上に展開した後、ストリップと作用電極の表面とを対向させることにより、これを実現している。以下、イムノクロマトグラフィー法に適用した例について、図3及び図4を参照しながら説明する。

[0040] イムノクロマトグラフィー分析に用いるストリップの構造は特に限定されるものではないが、例えば図3に示すようなイムノクロマトグラフィー用ストリップ21を用いることができる。イムノクロマトグラフィー用ストリップ21は、ニトロセルロースからなる短冊状のメンブレン22と、メンブレン22の下流側に接合された吸収パッド25と、メンブレン22の裏面側に配されたバッキングシート26とを備えている。図4(a)に示すように、メンブレ

ン22表面の所定領域には一次抗体2が固定化され、判定部(固定化領域)23を形成している。判定部23の下流のメンブレン22の表面には、金属微粒子5で標識した二次抗体4に特異的に結合する抗体が固定化され、コントロール部24を形成している。

[0041] 試験溶液中の被検物質を検出するには、先ず、通常のイムノクロマトグラフィー法と同様に試験溶液を展開する。すなわち、試験溶液と金属微粒子5で標識した二次抗体4とを混合し、イムノクロマトグラフィー用ストリップ21の一端(図3においては左端)に吸収させ、毛細管現象を利用して展開させる。試験溶液中に被検物質3が存在する場合、一次抗体2と二次抗体4とがサンドイッチ状に被検物質3に対して結合し、結果として被検物質3に応じた量の金属微粒子5が判定部23に捕捉される(図4(b))。コントロール部24に捕捉された標識二次抗体からの発色により、展開が終了したことが示される。

[0042] 次に、メンブレン22のうち少なくとも判定部23と作用電極1とを重ね合わせる。これにより、判定部23に集められた金属微粒子5が作用電極1の表面近傍に近づけられ、集められることになる(図4(c))。金属微粒子5と作用電極1との距離を確実に縮めることを目的に、メンブレン22のうち少なくとも判定部23と作用電極1とを重ね合わせた後、加圧してもよい。加圧は、メンブレン22の表面と作用電極1の表面とが確実に接触する程度に軽く行えばよい。

[0043] メンブレン22のうち少なくとも判定部23と作用電極1との間隙には電気化学的測定用の溶液15を満たしておく。このとき、図示は省略するが、対極及び参照電極も溶液15に接触させた状態とする。

[0044] この後の工程は、前述した第1の実施形態と同様である。すなわち、金属微粒子5を電気化学的に酸化させる。好ましくは、参照電極に対する作用電極1の電位を、金属微粒子5が電気化学的に酸化する電位に所定時間保持する。このことにより、作用電極1の表面近傍に集めた金属微粒子5を完全に酸化する。

[0045] 電気化学的に酸化させた後、酸化した金属を還元する際に生じるピーク電流値に基づいて、被検物質の有無又は濃度を測定する(図4(d))。具体的には、作用電極1の電位を負方向に変化させていき、電位変化に伴う電流変化を測定する。以上の

ようにして、第1の例と同様に、被検物質濃度を求めることができる。また、得られる還元電流値から試験溶液中の被検物質の有無を知ることができる。さらに、イムノクロマトグラフィー分析の簡便性を損なうことなく、高感度な定量分析を実現することができる。

[0046] (第4の実施形態)

以下、第4の実施形態について説明する。前述した第1の実施形態では、作用電極のみに第1の結合物質として一次抗体を固定し、作用電極のみを反応場として例えば抗原抗体反応を行っている。しかしながら、作用電極、対極及び参照電極が同一基板上に例えば印刷形成されたプレーナ型デバイスを用いている場合、反応場である作用電極の面積はデバイス自体の大きさ、対極面積、参照電極面積等に制限されるため、第1の実施形態において説明した測定方法では、感度の向上には限界がある。

[0047] そこで本実施形態では、作用電極と少なくとも対極との両方を抗原抗体反応等の反応場として利用し、且つ、少なくとも対極の表面近傍に集められた金属微粒子を酸化溶出させ、作用電極へ電気化学的に泳動させて作用電極表面に析出させた後に、第1の例と同様にして作用電極の表面近傍に集められた金属微粒子の電気化学的酸化を行う。これにより、作用電極以外の領域に集められた金属微粒子についても電気化学的測定の対象となるので、より多くの金属微粒子が作用電極の表面に効率よく集められたことになり、検出感度のさらなる向上が実現される。

[0048] 具体的には、先ず、図5(a)に示すように、作用電極1、対極31及び参照電極(図示は省略する)が同一の基板32上に形成されたプレーナ型電極デバイスを用意し、作用電極1と対極31の両方に、被検物質3に対する第1の結合物質として一次抗体2を固定する。また、基板32のうち、作用電極1と対極31とで挟まれる電極間領域32a上にも一次抗体2を固定する。作用電極1と対極31とで挟まれる電極間領域32a上にも一次抗体2を固定することで、さらなる高感度検出が達成される。電極デバイス表面は、非特異吸着を防ぐためにブロッキングする。一方、被検物質3上の異なる部位を認識する第2の結合物質として二次抗体4を用意し、これに金属微粒子5を標識することにより標識体を用意しておく。なお、作用電極、対極及び参照電極は互いに

近接した場所に存在していれば、必ずしも同一基板上に形成されていなくてもよい。

[0049] 次に、前記標識体及び未知量の被検物質3を含む試験溶液を作用電極1、対極31及び電極間領域32aの表面に供給し、一次抗体2と接触させ、作用電極1、対極31及び電極間領域32a上で抗原抗体反応を行う。標識体が被検物質3を介して一次抗体2に結合することにより、被検物質3の濃度に応じた金属微粒子5が作用電極1、対極31及び電極間領域32aの表面近傍に集められた状態となる(図5(b))。

[0050] 次に、作用電極1、対極31及び電極間領域32aの表面を必要に応じて洗浄した後、これらの表面を電気化学的測定用の溶液と接触させ、作用電極1に対して対極31を正電位とする電位制御を行う。これにより、対極31の表面近傍に集められた金属微粒子5は酸化溶出し、溶液中を電気的に泳動する。また、作用電極1と対極31との間に位置する電極間領域32aの表面近傍に集められた金属微粒子5も、溶液中を電気的に泳動する。そして、作用電極1の表面に到達すると金属33として析出する(図5(c))。この結果、反応に関与した全ての金属微粒子5が作用電極1の表面近傍に集められることになる。

[0051] 少なくとも対極31の表面近傍の金属微粒子5を溶出させ、作用電極1の表面に泳動させて析出させるためには、作用電極1に対する対極31の電位を金属微粒子5が酸化する電位とする必要がある。具体的には、使用する前記測定用の溶液により変わるが、例えば、作用電極1に対する対極の電位を+1V～+2Vの範囲内とすることが好ましい。前記範囲内とすることにより、少なくとも対極31の表面に集められた金属微粒子5を確実に溶出させ、作用電極1上へ泳動させることができる。作用電極1に対する対極31の電位は、金属微粒子5が酸化する電位に所定時間保持してもよいし、金属微粒子5が酸化する電位の範囲内で時間経過に伴って変化させてもよい。

[0052] この後の工程は、前述した第1の実施形態と同様である。すなわち、作用電極1の表面近傍に集めた金属微粒子5を電気化学的に酸化させる。このことにより、作用電極1の表面近傍に集めた金属微粒子5を完全に酸化する(図5(d))。このとき、作用電極1の表面に析出した金属33も酸化することになる。次に、酸化した金属を還元する際に生じるピーク電流を測定し、これに基づいて、被検物質の濃度等を調べる(図5(e))。具体的には、例えば、作用電極1の電位を負方向に変化させていき、電位変

化に伴う電流変化を測定する。電極電位を負方向に変化させていくと、前述の電位制御により酸化した(溶出した)金属が還元されることにより還元電流が流れるので、これを測定する。還元電流値と既知濃度の被検物質と関係を予め求めておき、測定された還元電流値と比較することにより、被検物質濃度を求めることができる。また、得られる還元電流値から試験溶液中の被検物質の有無を知ることができる。

[0053] 以上のように、本実施形態によれば、作用電極1以外の少なくとも対極31も反応場として利用するとともに、少なくとも対極31の表面近傍に集めた金属微粒子5を作用電極1表面へ移すので、反応に関与した標識体中の全ての金属微粒子5について還元電流を測定することができ、作用電極1の表面のみを反応場とする場合に比べてさらなる高感度化を実現することができる。また、少なくとも対極31の表面に集められた金属微粒子5の作用電極1の表面への泳動は、作用電極1と対極31との電位を制御するという簡便な操作で達成されるので、例えば溶液を攪拌するための機械的な構造は不要である。したがって、電極デバイス側の構造を変更することなく、また、極めて簡単な操作で高感度化を実現することができる。

[0054] なお、以上の説明においては、被検物質質量に対応する量の金属微粒子を集める方法として、非競合反応を利用して試験溶液中の被検物質質量に対応する量の金属微粒子を集める方法を例に挙げたが、競合反応を利用して試験溶液中の被検物質質量に対応する量の金属微粒子を集める方法を採用しても構わない。

実施例

[0055] 以下、本発明の実施例について、実験結果を参照して説明する。

[0056] (実験1)

本実験では、作用電極の表面に一次抗体(抗hCG抗体)を固定化した印刷電極を用いて、PBS(リン酸緩衝液)で希釈したヒトゴナドトロピン(hCG)の測定を試みた。hCGは妊娠診断用マーカーの一種である。金コロイド標識二次抗体としては、金コロイド標識抗h α S抗体を用いた。

[0057] 1. 作用電極への抗体の固定化

被検物質測定用の電極デバイスとしては、図6に示すようなプレナー型の印刷電極デバイス41(幅4mm、長さ12mm)を用いた。印刷電極デバイス41は、カーボンペ

ーストで形成した作用電極42及び対極43と、カーボンペーストで形成したリード(図示は省略する。)と、銀/塩化銀で形成した参照電極44とを絶縁支持体45上に有するものであり、作用電極42、対極43及び参照電極44の表面の一部が絶縁層46で被覆されることにより、有効な電極面積が規定されている。

[0058] 濃度 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した抗hCG抗体(一次抗体)溶液を作用電極上に $2\ \mu\text{l}$ 滴下し、 4°C の冷暗所で12時間以上静置することにより抗hCG抗体を作用電極の表面に固定した。PBSを用いて印刷電極デバイスを洗浄後、 0.1% の牛血清アルブミンでブロッキングを行った。

[0059] 2. 被検物質の測定

被検物質としてのhCGをPBS(リン酸緩衝液)で希釈することにより、hCG濃度が $62\text{pg}/\text{ml}$ 、 $620\text{pg}/\text{ml}$ 、 $62\text{ng}/\text{ml}$ となるように溶液を調製した。それらの溶液を、抗体の固定及びブロッキングを行った前記作用電極上に $2\ \mu\text{l}$ 滴下し、室温で30分静置することにより抗原抗体反応させた。その後、PBSを用いて印刷電極デバイスを洗浄した。

[0060] 次に、金コロイド標識 $\text{h}\alpha\text{S}$ 抗体溶液を前記処理した作用電極上に $2\ \mu\text{l}$ 滴下し、室温で30分静置することにより抗原抗体反応させた。その後、PBSを用いて印刷電極デバイスを洗浄した。

[0061] 洗浄後、 0.1 規定塩酸水溶液の $30\ \mu\text{l}$ を、作用電極、参照極及び対極の全面が完全に覆われるように前記処理した印刷電極デバイス上に滴下し、銀塩化銀参照電極に対する作用電極の電位を $+1.2\text{V}$ に保持した。保持時間は40秒間とした。

[0062] 次に、微分パルスボルタンメトリーにより、作用電極の電位を 0.8V から -0.1V へ変化させていき、電位変化に対する電流変化を測定した。ボルタンメトリーの条件は電位増加 0.004V 、パルス振幅 0.05V 、パルス幅 0.05S 、パルス期間 0.2S とした。電位に対する電流変化の特性図を、図7に示す。図7に示すように、 $+0.4\text{V}$ 付近に、金の還元に伴う電流のピークが得られている。

[0063] また、試験溶液中のhCG濃度と電流値との関係を、図8に示す。図8より、hCG濃度が高くなるにつれて、電流値も増加する傾向が見られた。これは、作用電極表面上の一次抗体(hCG抗体)と反応した抗原(hCG)及び金コロイド標識二次抗体(金

コロイド標識h α S抗体)の量が増加し、その結果、作用電極の表面上で還元される金コロイド量も増加することを表している。

[0064] (実験2)

金属微粒子を発色試薬として用いるイムノクロマトグラフィー法は、目視で被検物質の有無を容易に判定することができるという利点を有するが、定量分析には不向きである。イムノクロマトグラフィー用ストリップの判定部を光学的に測定して濃度を求める方法も考えられるが、良好な検出感度が得られるとは言い難い。そこで、本実験では、図3に示すようなhCG検出用のイムノクロマトグラフィー用ストリップ(幅4mm、長さ30mm)を用いた通常のイムノクロマトグラフィー分析に本発明の電気化学的測定を利用した測定方法を適用し、hCGの測定を試みた。ストリップにおいては、判定部に抗hCG抗体を、コントロール部に抗h α S抗体をそれぞれ固定してある。

[0065] 被検物質としてのhCGをPBSで希釈することにより、hCG濃度が0.1ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、5ng/ml、10ng/mlとなるように溶液を調製した。

[0066] hCGと十分に反応する濃度の金コロイド標識h α S抗体を各溶液と混合し、ストリップの一端に吸収させ、展開した。展開が終了した後、ストリップを乾燥させた。

次に、0.1N塩酸水溶液をストリップに染み込ませた後、図6に示すような印刷電極の作用電極が判定部に接触するように、ストリップと印刷電極とを重ね合わせた。なお、本実験では、作用電極の表面には一次抗体を固定していない。

[0067] 次に、参照電極に対する作用電極の電位を+1.5Vに保持した。保持時間は、作用電極近傍の金コロイドが十分に酸化するように、hCG濃度に応じて30秒~100秒の間で適宜設定した。

[0068] 次に、微分パルスボルタンメトリーにより、作用電極の電位を負方向に変化させていき、電位変化に対する電流変化を測定した。ボルタンメトリーの条件はステップパルス5mV/sec、パルス幅25mVとした。試験溶液中のhCG濃度と電流値との関係を、図9に示す。

[0069] 図9より、hCG濃度が高くなるにつれて、電流も増加する傾向が見られた。

なお、イムノクロマトグラフィー分析直後のストリップを観察したところ、hCG濃度1ng/mlまでは金コロイドの集積による判定部の発色を目視により確認することが可能で

あったが、濃度0.5ng/ml以下については目視での確認ができなかった。

これに対し、本発明の方法によれば、0.1ng/mlのような低濃度のhCGの検出も可能であることが確認された。

[0070] (実験3)

本実験では、実験1と同様に、作用電極の表面に一次抗体(抗hCG抗体)を固定化した印刷電極と金コロイド標識抗h α S抗体とを用いて、ヒトゴナドトロピン(hCG)の測定を試みた。ただし、本実験では、微分パルスボルタンメトリーを利用した実験1とは異なり、サイクリックボルタンメトリーを利用した。銀塩化銀参照電極に対する作用電極の電位は、-0.8V~+1.3Vの範囲とした。hCG濃度62ng/mlの反応溶液を用いたときの結果を図10に示す。比較として、銀塩化銀参照電極に対する作用電極の電位を-0.8V~+1.0Vの範囲としたときの結果、及び-0.8V~+1.3Vの範囲とし且つ抗原抗体反応させていないときの結果を併せて図10に示す。

[0071] 図10より、銀塩化銀参照電極に対する作用電極の電位を-0.8V~+1.0Vの範囲とした場合、及び-0.8V~+1.3Vの範囲で抗原抗体反応させていない場合には金の還元ピークは認められないが、金コロイド標識抗h α S抗体とhCGを用いて抗原抗体反応させた後に作用電極の電位を-0.8V~+1.3Vの範囲とした場合には、0.3V付近に還元ピークが確認された。このことから金コロイドの酸化には1.0Vより大きな電位を印加する必要があることがわかる。

[0072] (実験4)

本実験は、第4の実施形態に対応している。本実験では、実験1~3とは異なり、図11に示すような形状のプレーナ型印刷電極デバイス51を用いた。このプレーナ型印刷電極デバイス51は、レジストからなる絶縁被膜52に設けられた略円形の開口部52aに露出した作用電極53と、作用電極53の外周の少なくとも一部を取り囲むように配された対極54と、参照極55とが短冊状の絶縁支持基板56上に印刷形成されたものである。絶縁被膜52上には絶縁被膜52より疎水性の高い表面を有する帯状のダム構造部材57が印刷電極デバイス51のほぼ全幅に亘って積層され、作用電極52等に滴下された溶液がコネクタとの接続部分へ到達することを防いでいる。

[0073] 先ず、図11に示す印刷電極デバイス51のうち作用電極53及び対極54の両方を

含む一端の表面全面、具体的には図11中a-a線より左側の表面全面に、抗hCG抗体を固定した。抗hCG抗体の固定化及び抗原抗体反応は、実験1と同様に行った。ただし、本実験でのhCG濃度は62ng/mlであり、抗原抗体反応のための溶液は図11中a-a線より左側の表面全面(以下、A面と称する)に滴下した。

[0074] 0.1規定塩酸水溶液をA面に滴下し、対極に対する作用電極の電位を-1.4Vに保持した。保持時間は80秒間とした。この操作前後における作用電極及び対極の表面の顕微鏡写真を、図12に示す。

[0075] 図12から、作用電極に対して対極を正電位とすることによって、対極においては金コロイドが酸化溶出することにより消失し、一方、作用電極表面には金が析出していることが確認された。なお、顕微鏡観察によって金の析出が明確に観察されたのは、作用電極の周縁部分であった。

[0076] 作用電極の表面に金を析出させた後、実験1と同様の条件で、作用電極表面近傍に集めた金を電気化学的に酸化させ、その後、微分パルスボルタンメトリーにより、作用電極の電位を負方向に変化させていき、電位変化に対する電流変化を測定した。この結果を実験1と同様に作用電極表面のみを反応領域としたものと比較したところ、より一層高感度な検出が実現したことが確認された。

[0077] (実験5)

本実験では、電気化学測定を行う際に用いる溶液として、0.1規定塩酸溶液、又は飽和塩化カリウム水溶液を用い、実験1と同様にして金コロイドの還元ピーク電流を測定した。サイクリックボルタンメトリーの結果を図13に、微分パルスボルタンメトリーの結果を図14に示す。図13に示すように、飽和塩化カリウム水溶液を用いることで、塩酸溶液を用いる場合に比較して大きな還元ピーク電流強度が得られている。また、図14に示すように、塩酸溶液では0.1V付近にノイズが発生しているが、飽和塩化カリウム水溶液ではノイズの発生は認められない。したがって、塩酸溶液に比較して、飽和塩化カリウム水溶液が測定溶液に適していることがわかる。

[0078] (実験6)

本実験では、塩素を含む中性溶液として、飽和塩化カリウム水溶液と1Mの塩化ナトリウム水溶液のいずれが測定溶液として適しているかの比較検討を行った。具体的

には、電気化学測定を行う際に用いる溶液として、飽和塩化カリウム水溶液、又は1 Mの塩化ナトリウム水溶液を用い、実験1と同様にして金コロイドの還元ピーク電流を測定した。結果を図15に示す。飽和塩化カリウム水溶液でより大きな出力が得られていることから、飽和塩化カリウム水溶液の使用が好ましいことが明らかとなった。

[0079] (実験7)

本実験では、金属微粒子として粒径15nmの金コロイド、粒径20nmの金コロイド、粒径40nmの金コロイド、粒径60nmの金コロイドを用い、最適な粒径について検討した。具体的には、金コロイド標識h α S抗体に用いる金コロイド粒子として、粒径15nmの金コロイド、粒径20nmの金コロイド、粒径40nmの金コロイド、粒径60nmの金コロイドを用い、その他は実験1と同様にして金の還元ピーク電流のhCG濃度依存特性を調べた。結果を図16に示す。hCG濃度特性を比較すると、金コロイドの粒径が大きいほど還元電流値が大きく、かつ低濃度まで電流値変化が現れる傾向を示した。しかしながら、40nmと60nmでは電流値変化にほとんど差が無いいため標識金コロイドの粒径はこれ以上大きくしても効果がないことが予想される。また、hCG濃度をゼロとしたときの還元ピーク電流値は、粒径80nmの金コロイド粒子を用いたとき0.54 μ A、粒径40nmのとき0.2 μ A、粒径15nmのとき0.14 μ Aであった。すなわち、金コロイド粒子の粒径が大きくなるとノイズも大きくなる傾向を示すことがわかる。さらに、金コロイドの粒径が小さくなると低濃度の範囲まで電流値変化が得られないことから、10~60nm程度が適当であり、40nmが最適であることがわかる。

[0080] (実験8)

本実験では、作用電極の表面に一次抗体(抗hCG抗体)を固定化した印刷電極デバイスを用い、生体試料中のhCG濃度を測定した。

まず、既知濃度のhCG希釈系列を実験1と同様の方法によって測定することにより、検量線を作成した。図17に示すように、hCG濃度と電流値との間に相関が認められた。次に、前記試験溶液の電流値を実験1と同様の方法によって測定し、hCG濃度を検量線から読み取り、試験溶液のhCG濃度を求めた。試験溶液は、妊婦より採取した尿サンプルをPBSで500倍に希釈することにより調製した。結果を表1に示す。なお、各試験溶液のhCG濃度を従来のELISA法によって測定した。ELISA法で

用いた抗体は実験1と同じである。結果を併せて表1に示す。

[0081] [表1]

	実施例 (ng/ml)	従来法(ELISA) (ng/ml)
サンプル1	247	498
サンプル2	168	323
サンプル3	532	524

[0082] 表1より、本発明の方法によって、従来法であるELISAと同様にhCGの定量が可能であることがわかる。

[0083] (実験9)

本実験では、本発明の測定方法の検出感度と、従来法であるELISA法の検出感度とを、両実験で同じ抗原及び抗体を用いて比較した。本発明の測定方法は、実験1と同様に行った。ELISA法は、電極上ではなくELISA用のプラスチックプレート上に抗hCG抗体を固定し、金コロイドではなくHRP(horseradish peroxidase)標識したh α S抗体を使用して抗原抗体反応させ、検出反応にはTMB(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン)基質を用いた。結果を図18に示す。図18(a)に示すように、本発明の方法によれば、hCG濃度 10^2 pg/ml程度までhCG濃度と測定結果との間に直線関係が得られた。一方、図18(b)に示すように、ELISA法で直線関係が得られる範囲はhCG濃度 10^3 pg/ml程度までだった。したがって、本発明の測定方法によれば、ELISA法に比べ10倍程度感度向上が期待できることがわかる。また、ELISA法では 100μ lのサンプル溶液が必要だったのに対し、本発明の測定方法で必要なサンプル溶液はその50分の1程度の 2μ lだった。したがって、本発明の測定方法では、従来法に比較してサンプル量を大幅に減らすことが可能であるとわかる。

[0084] (実験10)

本実験では、電気化学的な還元ピーク電流を測定する場合と酸化ピーク電流を測

定する場合とで、発生するノイズを比較した。

[0085] 先ず、図11に示す形状の印刷電極デバイスを用意し、濃度 $13\mu\text{g/ml}$ 、 $130\mu\text{g/ml}$ 、 $135\mu\text{g/ml}$ 又は $550\mu\text{g/ml}$ の抗hCG抗体溶液を用い、実験1と同様にして作用電極の表面に抗体を固定した。なお、比較例として、抗hCG抗体を固定化せずブロッキングのみ行い、ノイズ評価用印刷電極デバイスを用意した。

[0086] 次に、作用電極に電位を正方向に印加していき、得られた電流値を測定した。酸化側の結果を図19(a)に示す。一方、作用電極に電位を負方向に印加していき、得られた電流値を測定した。還元側の結果を図19(b)に示す。図19(a)の酸化側の測定の結果に着目すると、金の酸化ピーク(0.9V付近)の近傍に、抗体に含まれるチロシンやトリプトファン等の酸化ピークも認められた。抗体の固定化量が $13\mu\text{g/ml}$ 、 $135\mu\text{g/ml}$ 、 $550\mu\text{g/ml}$ と増加するにつれて、それらの電流値も 106nA 、 299nA 、 334nA と増大した。この電流は、ブロッキングで用いたタンパク質や抗体に含まれるチロシンやトリプトファン等の酸化に由来するものである。一方、図19(b)の還元側の測定結果に示すように、金の還元ピーク(0.3~0.4V)近傍には、前述の抗体やタンパク質等に由来するピークは認められなかった。以上の結果より、還元電流を測定することによって、酸化電流に比べてノイズの影響を抑えることができ、誤検出の危険性を抑えられることがわかる。

[0087] (実験11)

本実験では、作用電極の表面近傍に集めた金属微粒子を酸化溶出させる際に印加する電圧(前処理電圧)について検討した。

[0088] 先ず、図11に示す形状の印刷電極デバイスを用意し、実験1と同様に、抗原抗体反応により金微粒子を作用電極表面近傍に集める操作を行った。次に、前記電極表面に0.1規定塩酸水溶液を滴下し、参照電極に対する作用電極の電位を1.2V、1.4V又は1.6Vに所定時間(0~200秒)保持した。

[0089] 次に、微分パルスボルタンメトリーにより、作用電極の電位を0.8mVから0Vへ変化させていき、電位変化に対する電流変化を測定した。ボルタンメトリーの条件はこれまでと同じである。酸化電位の印加時間と0.3V付近に観察される金の還元に伴う電流ピーク値との関係を、図20に示す。

[0090] 図20より、電位を1.2V以上としたとき還元による電流ピークを観察可能であった。なお、印加電位を1.2V未満とした場合、0.3V付近に還元電流のピークは認められなかった。一方、電位を高くするにつれて必要な印加時間は短くなる傾向を示した。なお、本実験の傾向より1.6Vより酸化電位が大きくなると僅かな印加時間の差でも電流値が大きく異なってしまうことが予想される。このことから、検出の際の安定性を確保するためには、酸化電位を1.6V以下に設定する必要がある。以上の結果より、金属微粒子を酸化溶出させるための電位は1.2V～1.6Vとすることが好ましいことが確認された。

[0091] (実験12)

本実験では、作用電極の表面近傍に集めた金属微粒子を酸化溶出させるための電圧の印加時間(前処理時間)について検討した。

[0092] 金属微粒子を酸化するための電位を1.2Vに設定し、試験溶液中のhCG濃度を62pg/ml、620pg/ml又は62ng/mlとしたこと以外は、実験11と同様にして電位変化に対する電流変化を測定した。結果を図21に示す。図21より、印加時間1秒～300秒程度の範囲で測定可能であったが、印加時間を100秒以上としても電流値に変化は殆ど見られなかった。したがって、1秒以上100秒以下とすることが好ましいことがわかる。なお、酸化電位の印加時間を40秒以上としたとき全てのhCG濃度において十分に高い電流値が得られたことから、40秒以上100秒以下が特に好ましいことがわかる。

[0093] (実験13)

本実験では、作用電極の表面近傍に集めた金属微粒子を酸化溶出し、再析出させるための測定溶液である塩酸溶液の濃度条件を検討した。

[0094] 実験1と同様にして同量の金コロイド粒子を固定化した電極を複数用意し、0.05規定、0.1規定、0.2規定、0.5規定、1.0規定(1.0規定はグラフに掲載無し)のそれぞれの濃度の塩酸溶液で、1.2V、40秒の条件で酸化後、微分パルスボルタメトリーで電位変化に伴う還元電流を測定した。結果を図22に示す。図22より、0.05規定の濃度ではグラフの形状が歪みピーク電流値も低くなっている。それ以外の濃度においては、1.0規定も含めてピーク電位は異なるものの同じような波形の結果と

なった。また、濃度をあまり高くすると扱いが困難になる。したがって、使用する塩酸としては0.05規定～2規定程度が適当であり、0.1規定～0.5規定が特に好ましいことがわかる。

請求の範囲

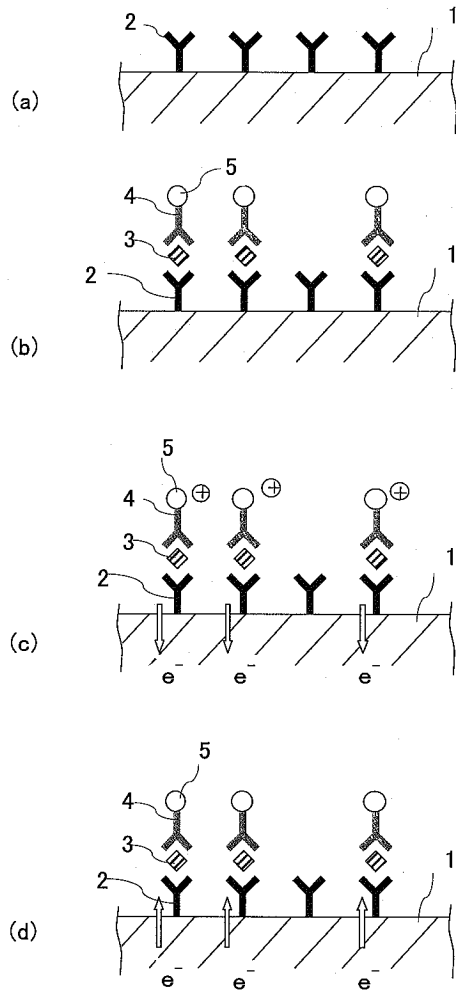
- [1] 金属微粒子を標識物質として用いる被検物質の測定方法であつて、試料溶液中の被検物質に対応した量の金属微粒子を作用電極の表面近傍に集め、前記金属微粒子を電気化学的に酸化した後、酸化した金属を電気化学的に還元する際に生じる電流値を測定し、前記電流値に基づいて被検物質の有無又は濃度を調べることを特徴とする被検物質の測定方法。
- [2] 前記作用電極の電位を前記金属微粒子が電気化学的に酸化する電位に保持することにより、前記金属微粒子を電気化学的に酸化することを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [3] 前記金属微粒子を電気化学的に酸化させるに際し、銀塩化銀参照電極に対する前記作用電極の電位を+1.2V～+1.6Vに保持することを特徴とする請求の範囲第2項記載の被検物質の測定方法。
- [4] 前記作用電極の電位を保持する時間を1秒以上100秒以下とすることを特徴とする請求の範囲第2項記載の被検物質の測定方法。
- [5] 前記作用電極の電位を時間経過に伴い変化させて前記金属微粒子が電気化学的に酸化する電位にすることにより、前記金属微粒子を電気化学的に酸化することを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [6] 酸性溶液中で前記作用電極の電位制御を行うことを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [7] 酸性溶液が0.05規定～2規定の塩酸であることを特徴とする請求の範囲第6項記載の被検物質の測定方法。
- [8] 塩素を含む中性溶液中で前記作用電極の電位制御を行うことを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [9] 前記塩素を含む中性溶液がKCl水溶液であることを特徴とする請求の範囲第8項記載の被検物質の測定方法。
- [10] 前記金属微粒子が粒径10nm～60nmの金微粒子であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [11] 0.1規定～0.5規定の塩酸溶液中で銀塩化銀参照電極に対する前記作用電極

の電位を+1.2~+1.6Vに保持することにより、前記金属微粒子を電気化学的に酸化させることを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。

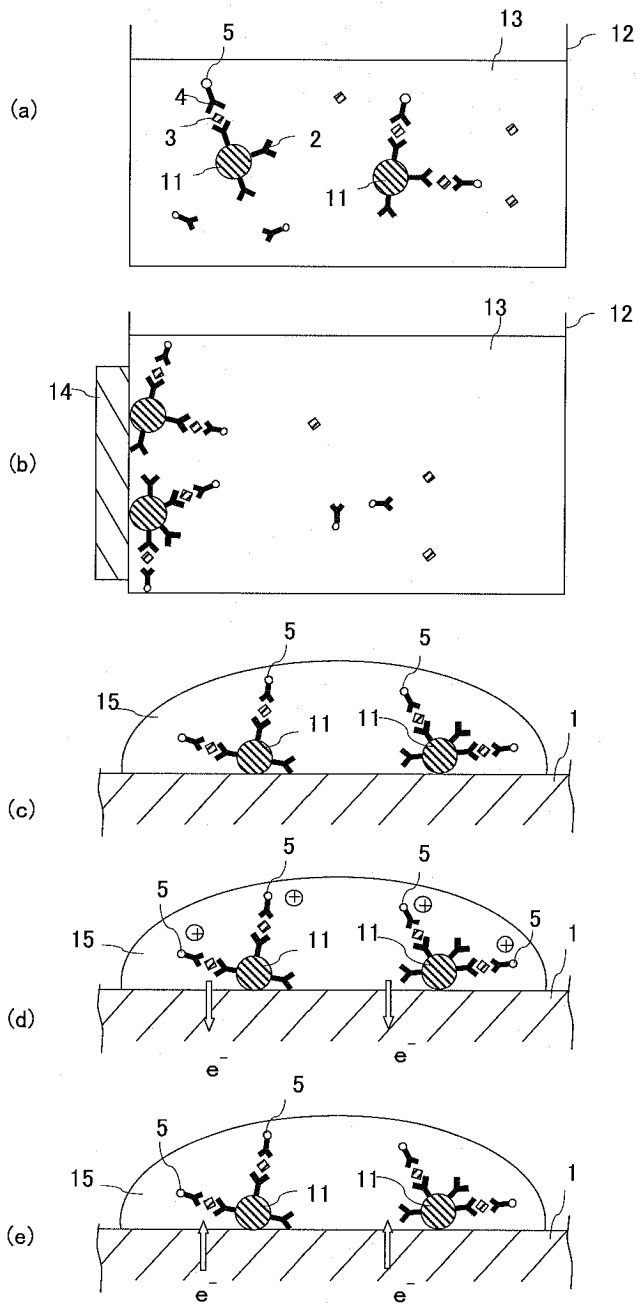
- [12] 被検物質に特異的に結合する第1の結合物質が固定された作用電極と、被検物質に特異的に結合する第2の結合物質を金属微粒子で標識した標識体とを用意し、前記作用電極の表面に試験溶液と前記標識体とを供給して反応させることにより、試験溶液中の被検物質に対応した量の前記金属微粒子を前記作用電極の表面近傍に集めることを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [13] 被検物質に特異的に結合する第2の結合物質を金属微粒子で標識した標識体を用意するとともに、被検物質に特異的に結合する第1の結合物質を少なくとも作用電極及び対極に固定し、前記作用電極と前記対極との表面に試験溶液と前記標識体とを供給して反応させることにより試験溶液中の被検物質に対応した量の前記金属微粒子を前記作用電極及び前記対極の表面近傍に集め、前記作用電極に対して前記対極を正電位とする電位制御を行った後、前記電位制御により前記作用電極表面に析出した金属と前記作用電極の表面近傍に集めた前記金属微粒子とを電気化学的に酸化することを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [14] 被検物質に特異的に結合する第1の結合物質が固定された磁性微粒子と、被検物質に特異的に結合する第2の結合物質を前記金属微粒子で標識した標識体とを用意し、試験溶液と前記磁性微粒子と前記標識体とを混合して反応させた後、前記磁性微粒子を前記作用電極の表面近傍に集めることにより、試験溶液中の被検物質に対応した量の前記金属微粒子を前記作用電極の表面近傍に集めることを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。
- [15] 被検物質に特異的に結合する第1の結合物質を所定の固定化領域に固定したイムノクロマトグラフィー用ストリップと、被検物質に特異的に結合する第2の結合物質を前記金属微粒子で標識した標識体とを用意し、試験溶液及び前記標識体を前記イムノクロマトグラフィー用ストリップに展開した後、前記イムノクロマトグラフィー用ストリップの前記固定化領域と前記作用電極とを重ね合わせることにより、試験溶液中の被検物質に対応した量の前記金属微粒子を前記作用電極の表面近傍に集めることを特徴とする請求の範囲第1項記載の被検物質の測定方法。

- [16] 前記第1の結合物質及び第2の結合物質は抗体であることを特徴とする請求の範囲第12項から第15項のいずれか1項記載の被検物質の測定方法。

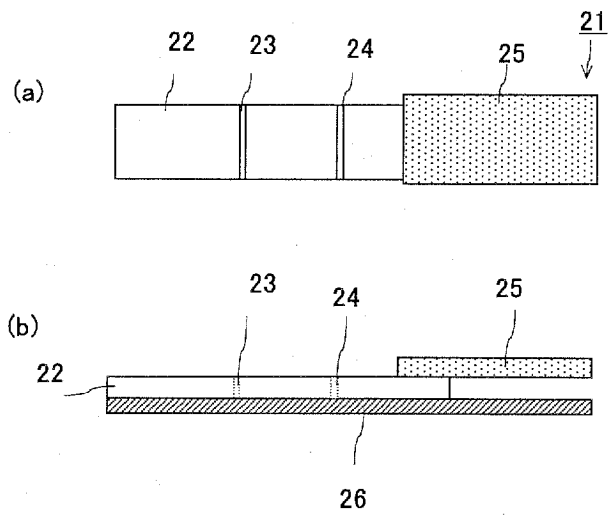
[図1]



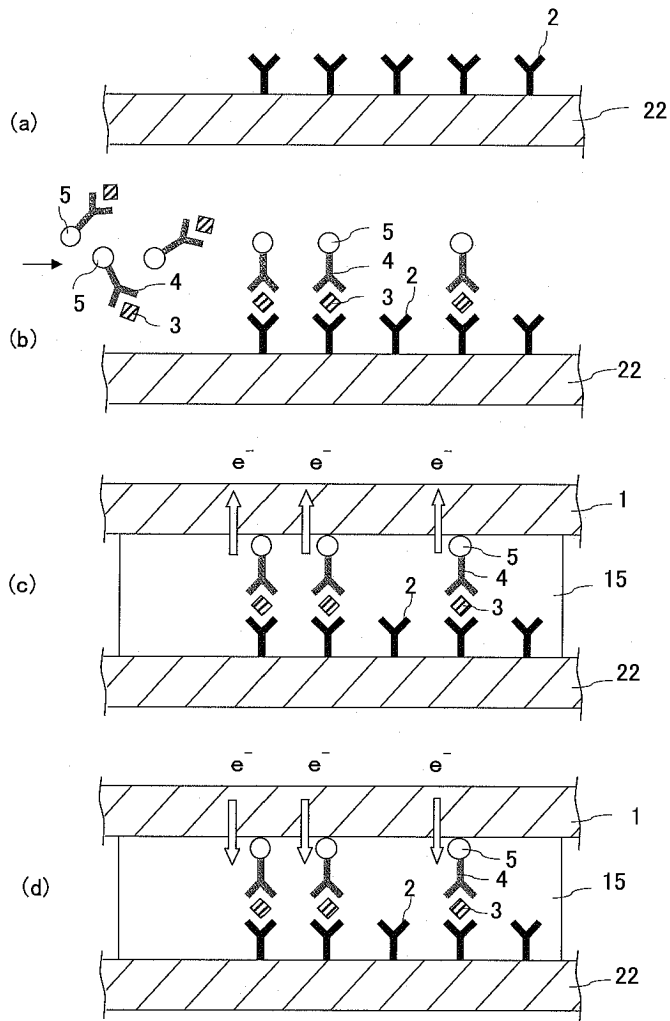
[図2]



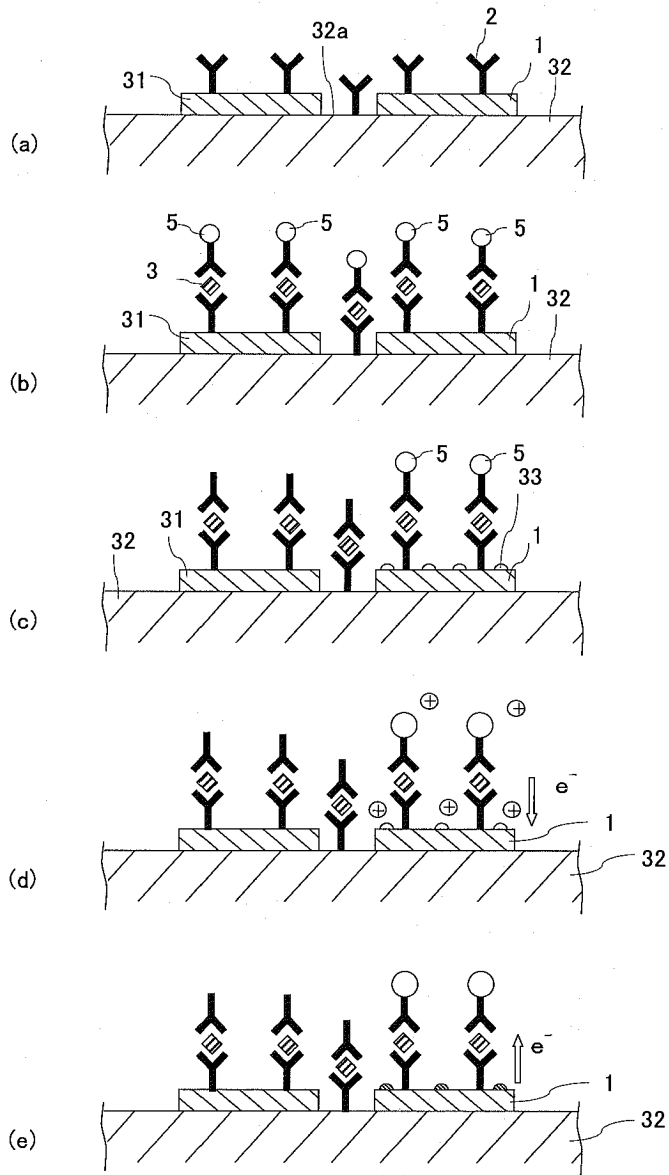
[図3]



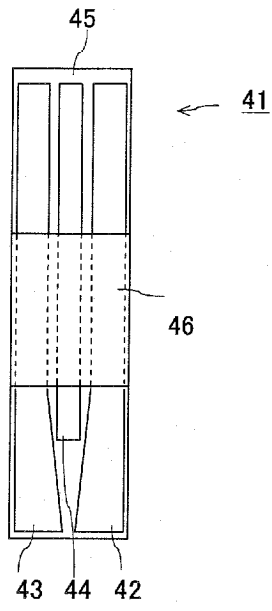
[図4]



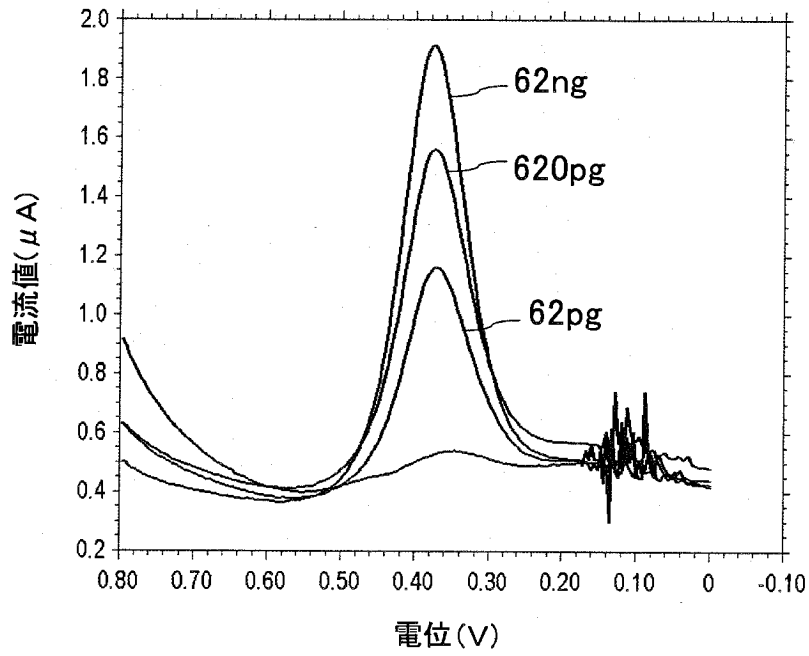
[図5]



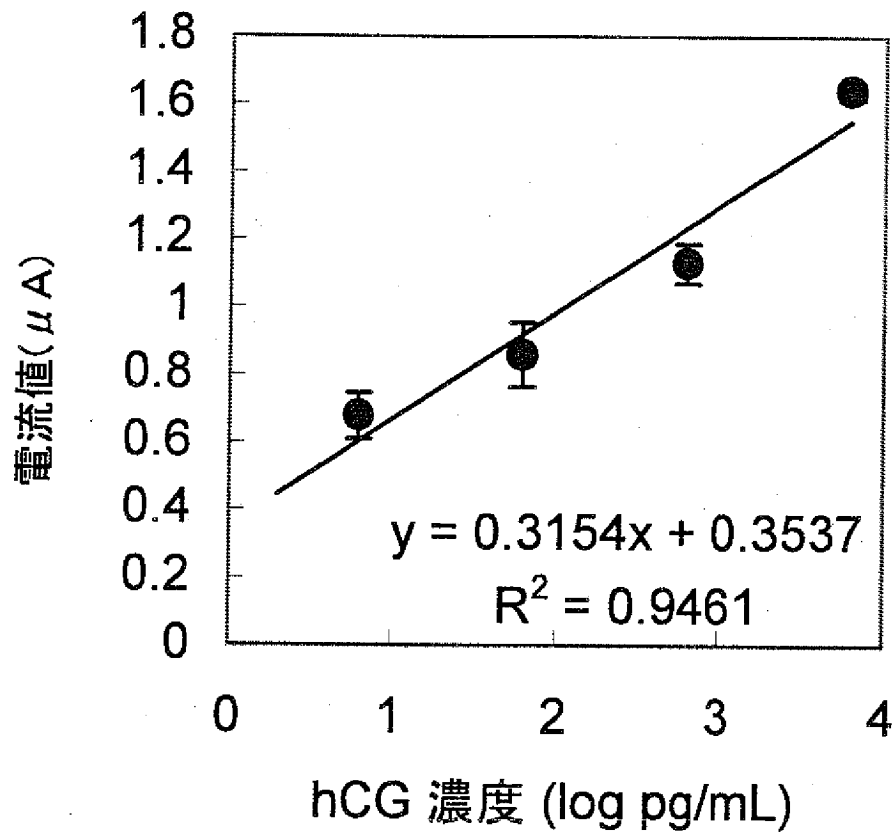
[図6]



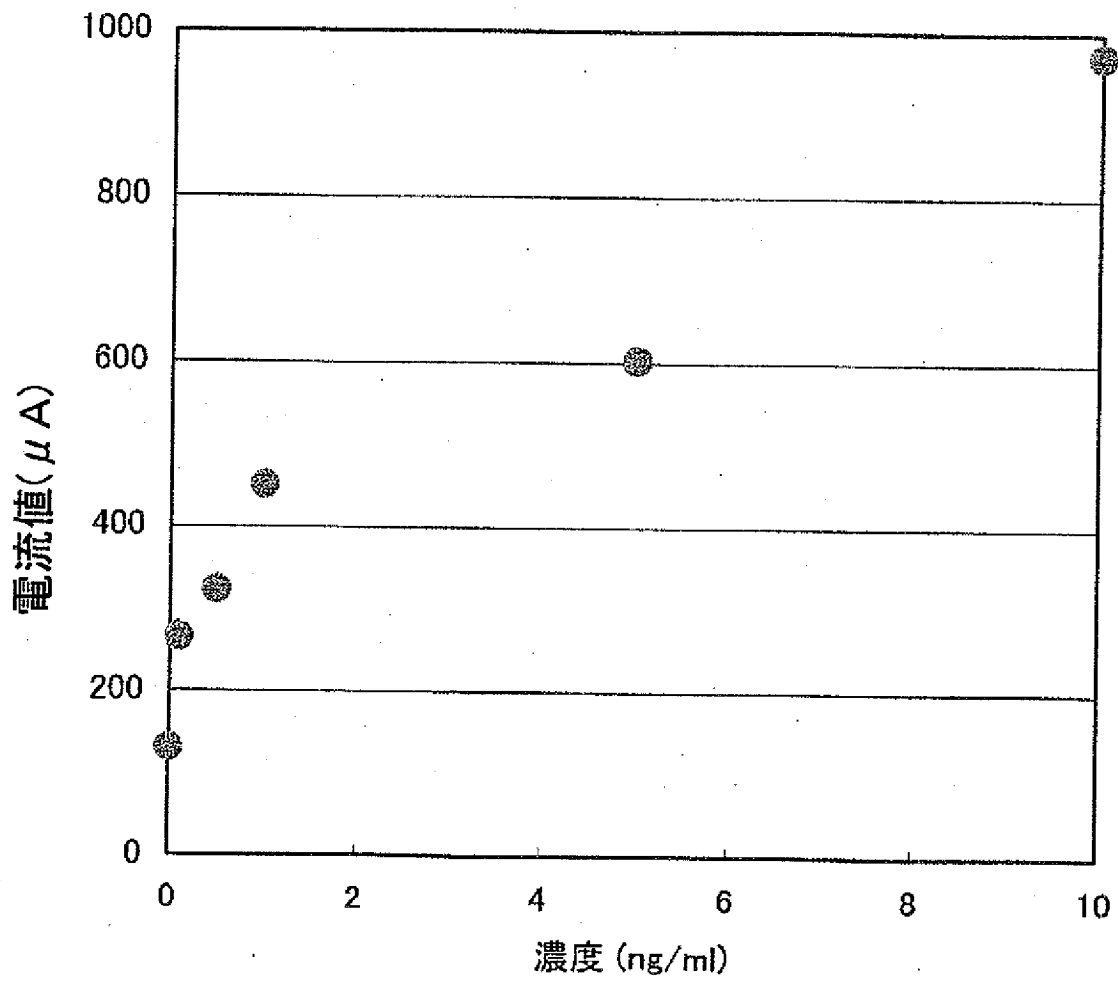
[図7]



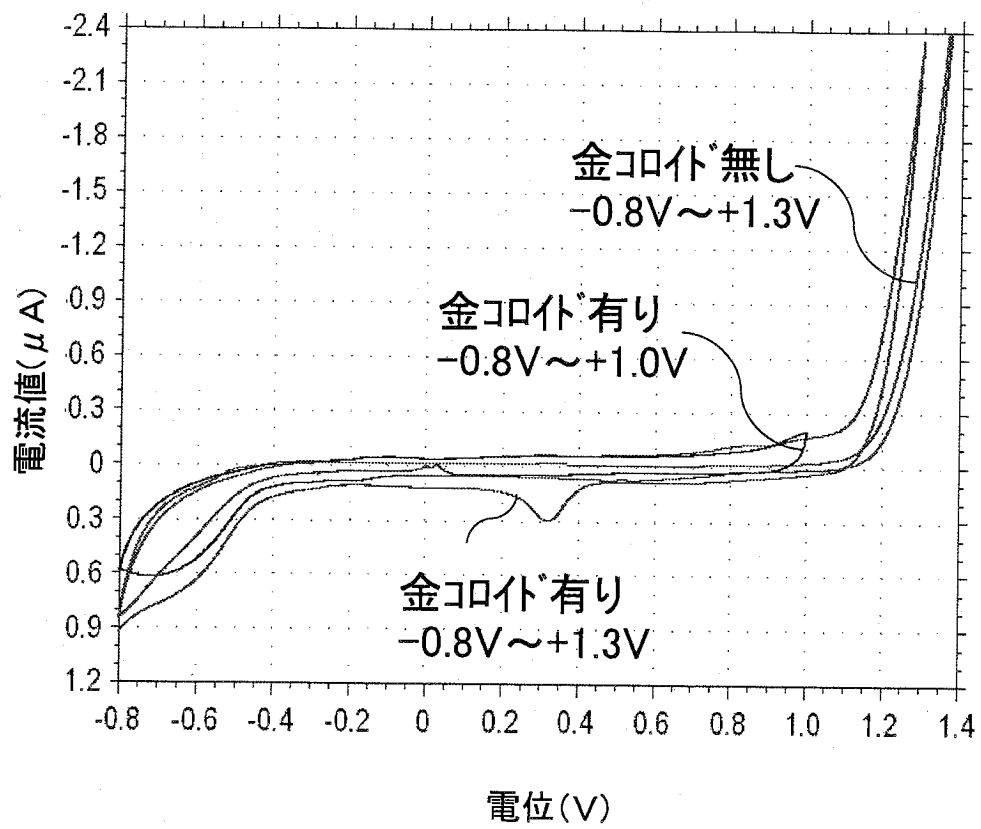
[図8]



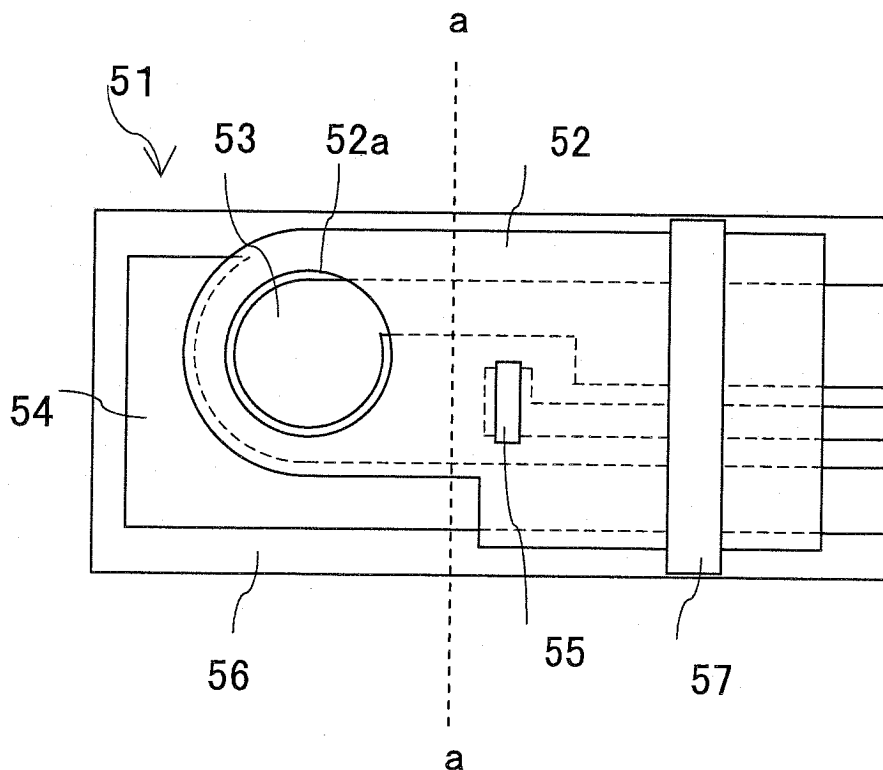
[図9]



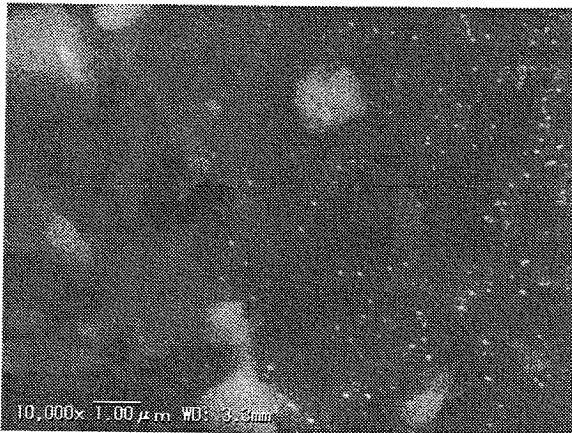
[図10]



[図11]



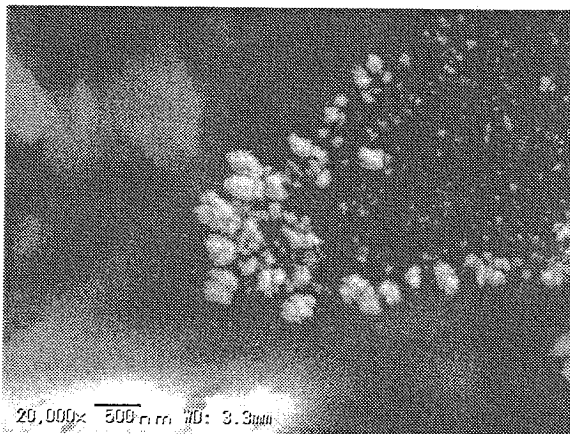
[図12]



(a) 対極 電圧印加前

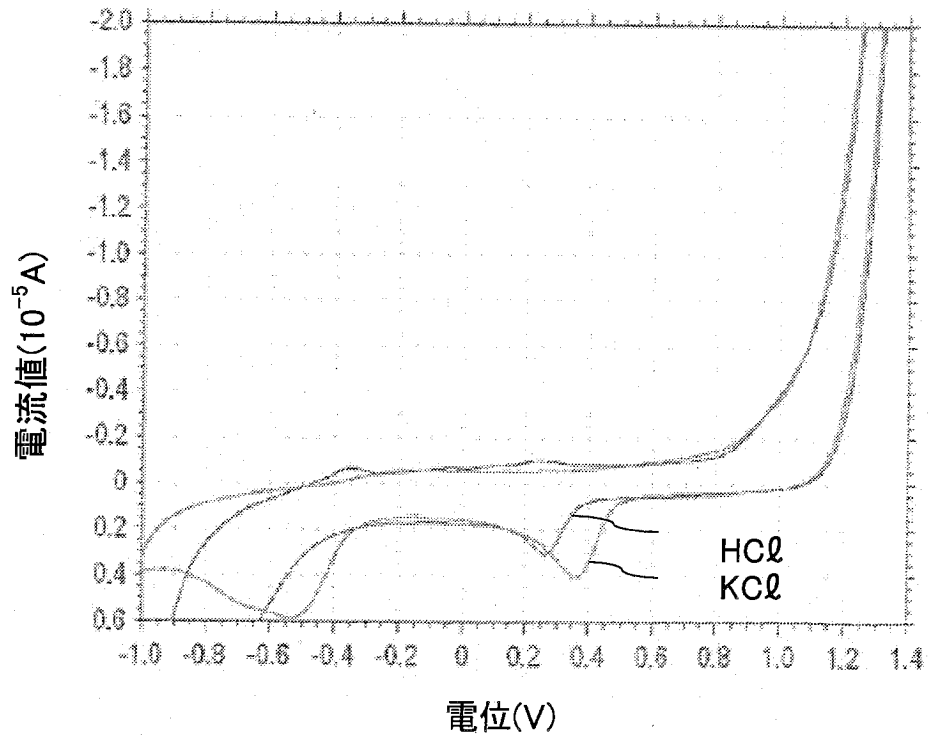


(b) 対極 電圧印加後

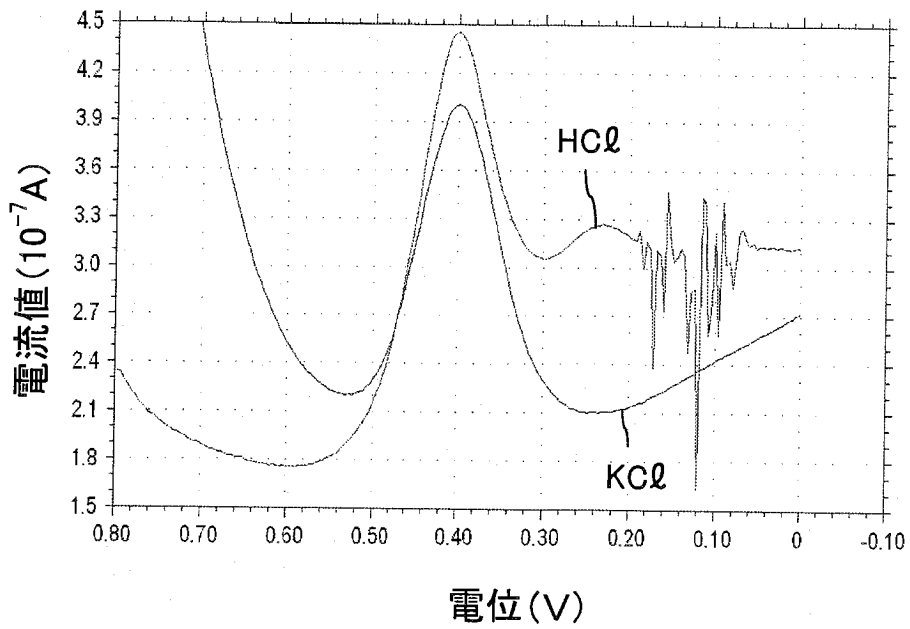


(c) 作用電極(縁部分)電圧印加

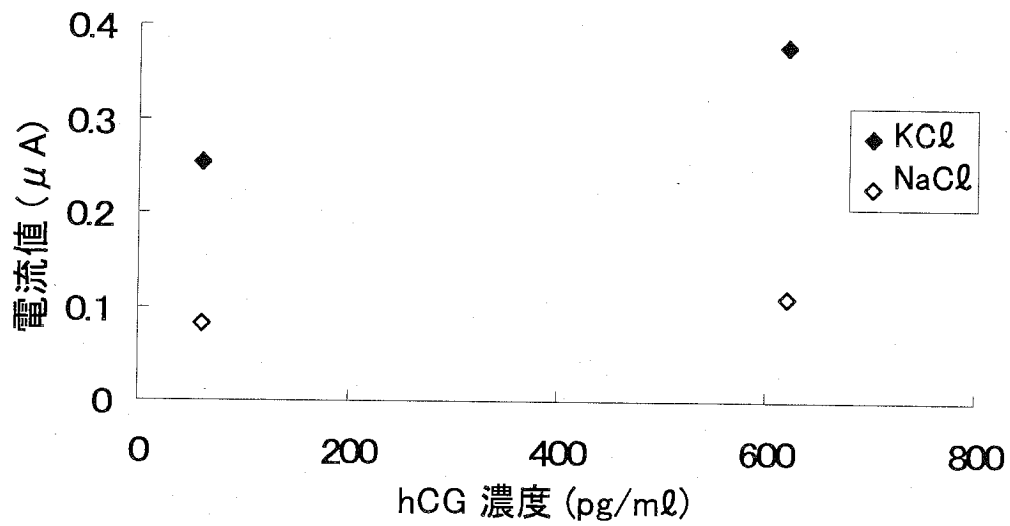
[図13]



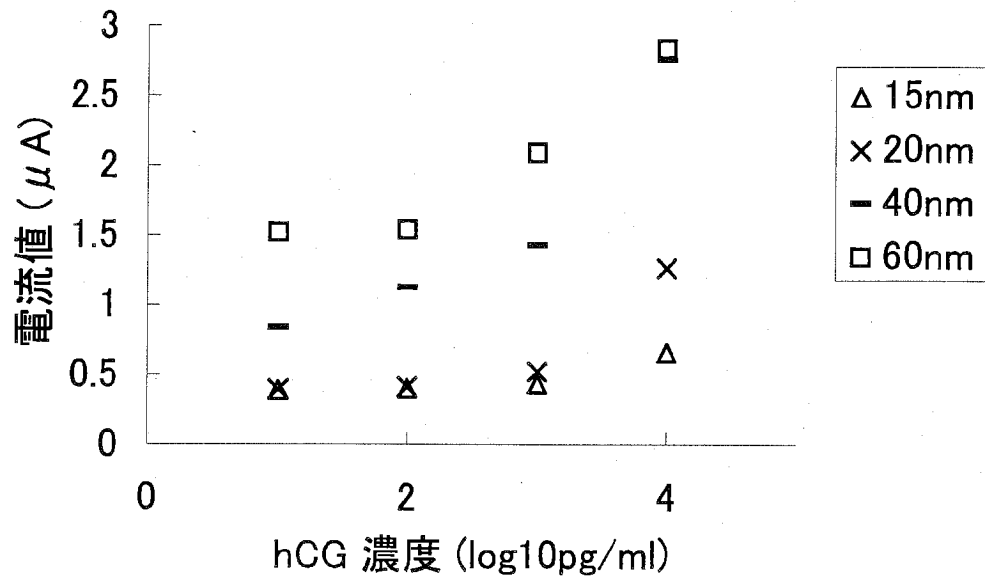
[図14]



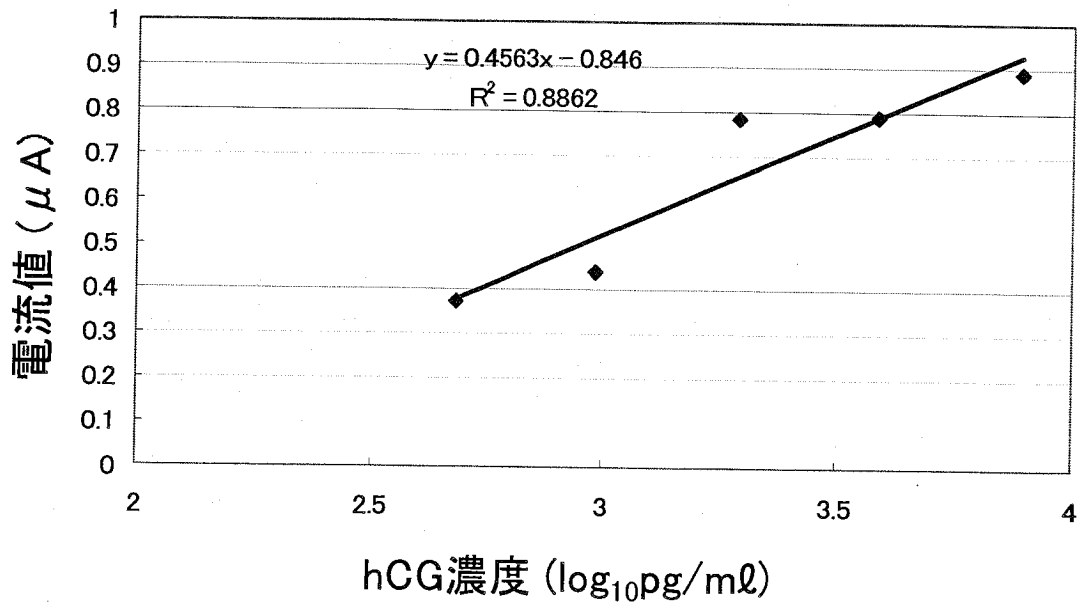
[図15]



[図16]

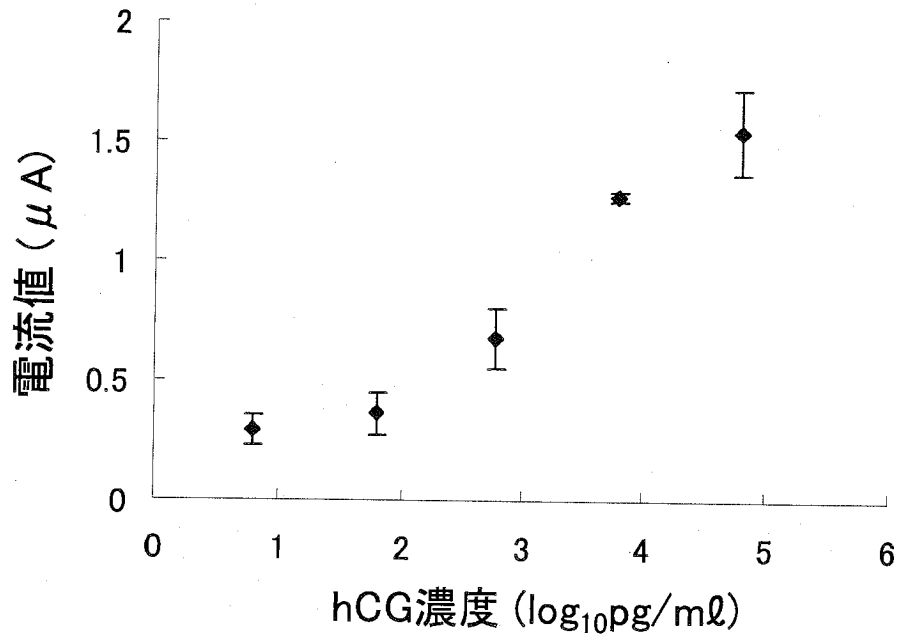


[図17]

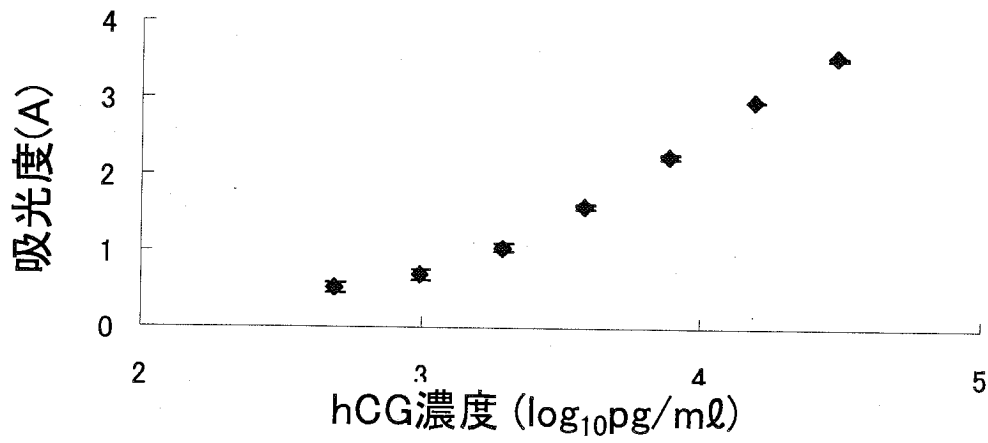


[図18]

(a)

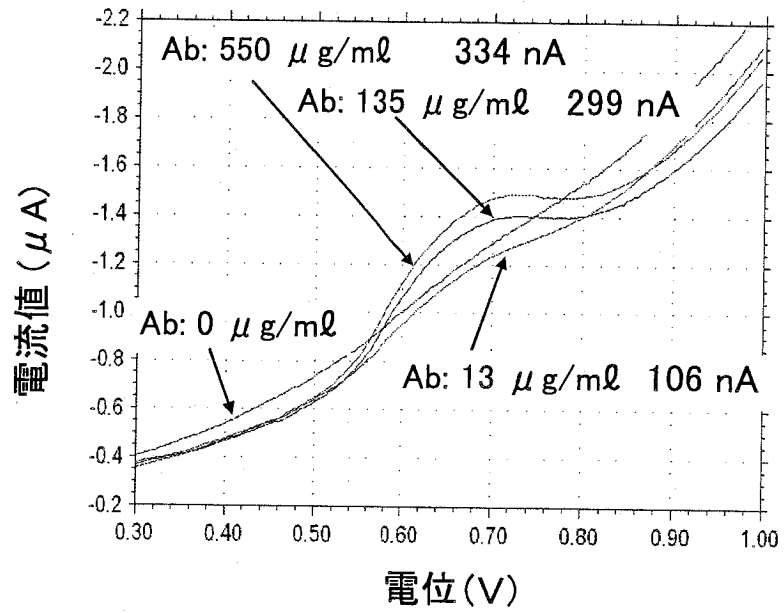


(b)

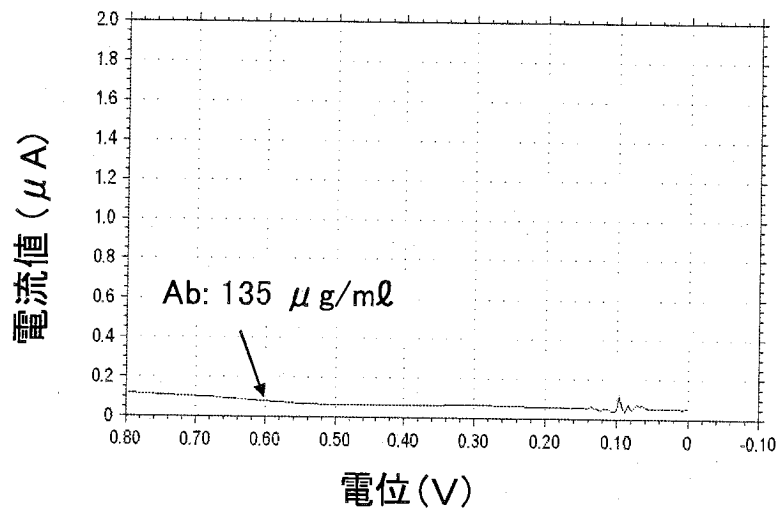


[図19]

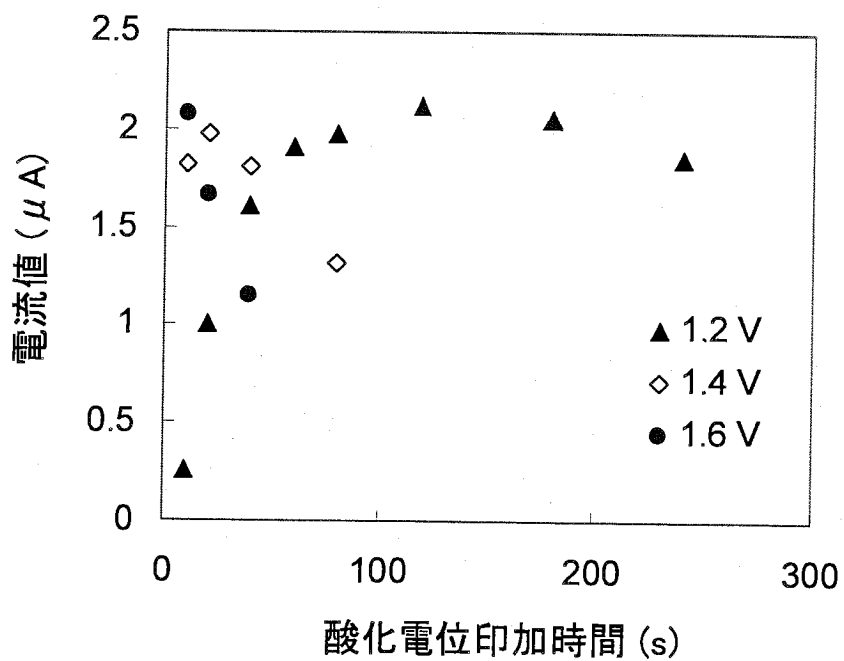
(a)



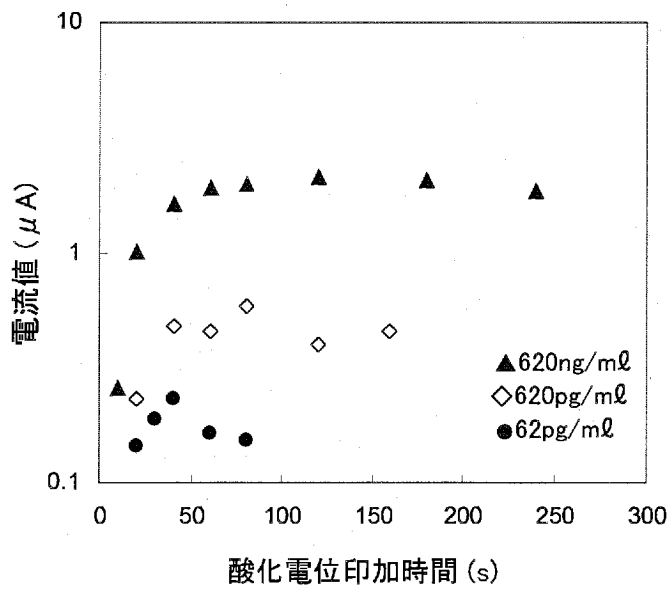
(b)



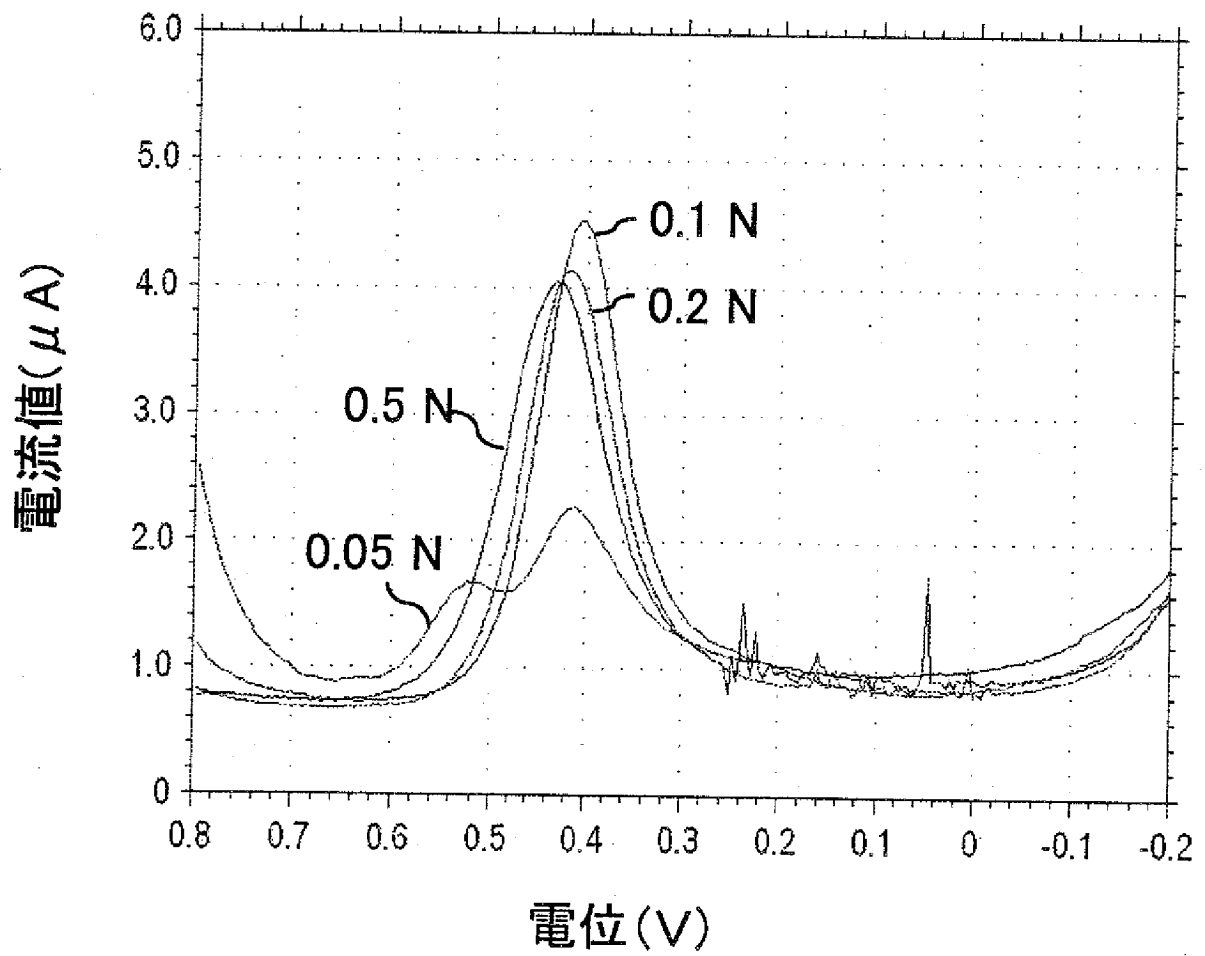
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/056992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N27/416(2006.01) i, G01N33/543(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N27/416, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-512496 A (Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)), 22 April, 2004 (22.04.04), Full text & WO 2002/001178 A2 & EP 1303759 A2 & US 2003/186274 A1 & AU 6925601 A & CA 2413929 A1 & DE 60114016 T2 & FR 2810739 A1	1-16
A	JP 1-123149 A (Hygeia Sciences, Inc.), 16 May, 1989 (16.05.89), Full text & EP 0310872 A1 & US 4859612 A & AU 2299788 A & CA 1334931 C & CN 1032458 A & RU 2025732 C1	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 June, 2007 (15.06.07)

Date of mailing of the international search report
26 June, 2007 (26.06.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/056992

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-510233 A (Pence, Inc.), 08 August, 2000 (08.08.00), Full text & WO 1997/041424 A1 & EP 0895592 A1 & US 5955379 A & AU 2563897 A & CA 2251674 A1	1-16
A	JP 2003-529770 A (Infineon Technologies AG.), 07 October, 2003 (07.10.03), Full text & WO 2001/075141 A2 & EP 1272850 A2 & US 2004/014054 A1 & DE 10015816 A1	1-16
A	M.B.Gonzalez Garcia, and A. Costa Garcia, "Adsorptive stripping voltammetric behaviour of colloidal gold and immunogold on carbon paste electrode", Bioelectrochemistry and Bioenergetics, , 1995, Vol.38, P.389-395	1-16
A	David Hernandez-Santos, Maria Begona Gonzalez-Garcia, Agustfn Costa Garcfa, "Metal-Nanoparticles Based Electroanalysis", Electroanalysis, 2002.10, Vol.14, No.18, P.1225-1235	1-16
A	Ryo TANAKA, Mitsuko YUHI, Tatsuro ENDO, Naoki NAGATANI, Yuzuru TAKAMURA, Eiichi TAMIYA, "Kin Nano Ryushi o Mochiita Shinki Sakuseiho ni yoru Immunochromato Strip no Kokandoka", CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 86 Shunki Nenkai Koen Yokoshu I, 13 March, 2006 (13.03.06), page 532, 1 K6-25	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N27/416(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N27/416, G01N33/543			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP 2004-512496 A (サルトル ナショナル ドウ ラ ルシエルシュ シアンティフィーク (セーエヌエールエス)), 2004. 04. 22, 全文 & WO 2002/001178 A2 & EP 1303759 A2 & US 2003/186274 A1 & AU 6925601 A & CA 2413929 A1 & DE 60114016 T2 & FR 2810739 A1	1-16	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 06. 2007		国際調査報告の発送日 26. 06. 2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 河野 隆一朗	2 J 3 7 0 8
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 1-123149 A (ハイジーア サイエンスイズ, インコーポ レイテッド), 1989.05.16, 全文 & EP 0310872 A1 & US 4859612 A & AU 2299788 A & CA 1334931 C & CN 1032458 A & RU 2025732 C1	1-16
A	JP 2000-510233 A (ペンス, インコーポレイテッド), 2000.08.08 , 全文 & WO 1997/041424 A1 & EP 0895592 A1 & US 5955379 A & AU 2563897 A & CA 2251674 A1	1-16
A	JP 2003-529770 A (インフィネオン テクノロジーズ アクチェンゲゼルシャフト), 2003.10.07, 全文 & WO 2001/075141 A2 & EP 1272850 A2 & US 2004/014054 A1 & DE 10015816 A1	1-16
A	M. B. Gonzalez Garcia, and A. Costa Garcia, "Adsorptive stripping voltammetric behaviour of colloidal gold and immunogold on carbon paste electrode", Bioelectrochemistry and Bioenergetics, , 1995, Vol. 38, P. 389-395	1-16
A	David Hernandez-Santos, Maria Begona Gonzalez-Garcia, Agustfn Costa Garcfa, "Metal-Nanoparticles Based Electroanalysis", Electroanalysis, 2002.10, Vol.14, No.18, P.1225-1235	1-16
A	田中 亮, 由比 光子, 遠藤 達郎, 永谷 尚紀, 高村 禅, 民谷 栄一, 「金ナノ粒子を用いた新規作製法によるイムノクロマトストリップ の高感度化」, 日本化学会第86春季年会 講演予稿集 I, 2006.03.13, P. 532, 1 K6-25	1-16